

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 01/08/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**ESTUDOS MOLECULARES COM A BOTHROPSTOXINA-I,  
UMA MIOTOXINA DE *Bothrops jararacussu*: ESTUDO  
DINÂMICO DO SEU ESPAÇO CONFORMACIONAL**

**ANTONIEL AUGUSTO SEVERO GOMES**

**BOTUCATU – SP**

**2019**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**ESTUDOS MOLECULARES COM A BOTHROPSTOXINA-I,  
UMA MIOTOXINA DE *Bothrops jararacussu*: ESTUDO  
DINÂMICO DO SEU ESPAÇO CONFORMACIONAL**

**ANTONIEL AUGUSTO SEVERO GOMES**

**PROF. DR. MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES  
ORIENTADOR**

**PROF. DR. ANGELO JOSÉ MAGRO  
CO-ORIENTADOR**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas – estrutura e função.

**BOTUCATU – SP**

**2019**

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

Gomes, Antoniel Augusto Severo.

Estudos moleculares com a bothropstoxina-I, uma miotoxina de *Bothrops jararacussu* : estudo dinâmico do seu espaço conformacional / Antoniel Augusto Severo Gomes. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes  
Coorientador: Angelo José Magro  
Capes: 20901003

1. Venenos de serpentes. 2. *Bothrops*. 3. Saúde pública - Pesquisa. 4. Saúde mundial.

Palavras-chave: Bothropstoxina-I; MD; Modos normais; PLA<sub>2</sub>s-homólogas; Veneno de serpente.

Aos meus pais, Antônio e Rosilene,  
pelo amor, esforço e dedicação constante  
em realizar meu sonho em fazer Ciência

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes, por incentivar meu desenvolvimento profissional e pessoal, dispondo de um ambiente de trabalho com condições excelentes e sempre estando presente para discussão. O terei como referência para toda a vida.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Angelo José Magro, pelas oportunidades oferecidas, pelas discussões valiosas que sempre renderam trabalhos novos na minha carreira acadêmica, moldando minha visão como cientista.

Ao meu Supervisor Dr. David Perahia pela sua mente brilhante como Cientista, essencial no amadurecimento da personalidade de forma mais profunda com relação à Ciência e no desenvolvimento amplo do meu trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular Estrutural, por fazerem parte do meu cotidiano e compartilharem bons momentos. Neste local, pude participar de várias discussões produtivas sobre diversos temas, moldando meu pensamento crítico acadêmico e pessoal.

Ao Me. Fábio Filippi Matioli, pela amizade e por compartilhar parte do conhecimento que carrego até hoje.

Ao Dr. Rafael Junqueira Borges, pela amizade, compartilhar experiências e por ser uma figura referência no meu desenvolvimento pessoal e acadêmico.

À Bruna Maria Zamboni, pela sua amizade cativante e aos momentos prazerosos inesquecíveis.

À UNESP, pela estrutura profissional acadêmica fornecida, essencial para meu aprimoramento profissional.

À Seção Técnica de Pós-Graduação, em especial para Davi Müller, pelo seu papel importante nas questões burocráticas e funcionamento dos programas de Pós-Graduação da UNESP.

À CAPES, pelo incentivo no desenvolvimento da minha pesquisa e por ter me concedido oportunidades valiosas.

## RESUMO

Acidentes ofídicos são considerados um problema de saúde pública global, dada sua alta ocorrência de mortes, onde alguns casos resultam em sequelas irreparáveis, deixando o indivíduo desabilitado por toda a vida. Somente no Brasil, em média 20 mil mortes ao ano são registradas. Desta forma, alguns pesquisadores têm buscado estudar a estrutura-função de componentes dos venenos de serpentes peçonhentas à fim de desenvolver alternativas terapêuticas para esse problema de grande interesse médico. Um dos componentes que tem recebido atenção nas últimas décadas é a BthTX-I, uma proteína PLA<sub>2</sub>S-homóloga não catalítica, devido seu efeitos farmacológico notadamente miotóxico. Embora diversas técnicas tenham sido empregadas na compreensão do mecanismo de ação dessas proteínas, o conhecimento nessa área permanece controverso, tornando-se necessário a continuidade de estudos. O estudo estrutural e computacional de proteínas constitui uma alternativa viável para identificar as várias conformações de uma dada proteína, bem como seu comportamento dinâmico. Sendo assim, o presente trabalho buscou aplicar métodos computacionais, como simulação de MD, análise de Modos Normais (NM) e Dinâmica Molecular excitada por Modos Normais (MDeNM) à BthTX-I em pH ácido ou básico e nativa ou em complexo com o  $\alpha$ -tocoferol – molécula tida como ativadora alostérica – na descrição do seu espaço conformacional, buscando compreender os aspectos estruturais do seu mecanismo de ação. Além disso, foram empregadas técnicas em solução, como Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), a fim de compreender o estado oligomérico da proteína frente ao  $\alpha$ -tocoferol. Os resultados de MD mostraram que a BthTX-I possui estabilidade dimérica em pH neutro/básico. Já os experimentos de MDeNM mostraram que esta técnica é mais eficiente que a MD para descrever o espaço conformacional da BthTX-I, especialmente quando movimentos de alta amplitude são desejados, graças à sua combinação com os modos normais, causando altas alterações conformacionais do sítio de Ruptura de Membrana (MDiS), sendo exposto para o solvente e se aproximando do plano de sulfato que mimetiza a membrana celular. Tal movimento é altamente relacionado com a descrição dos ângulos de Euler, sugerindo que a exposição do MDiS é resultado de alterações da estrutura quaternária da BthTX-I. A liberdade do MDiS pode ser explicada pela perturbação da sua interação com a Hélice-I da BthTX-I causada pela presença do  $\alpha$ -tocoferol, definindo assim uma característica importante para um ativador alostérico. Por fim, os experimentos de DLS reforçaram o caráter oligomerizante do  $\alpha$ -tocoferol frente a BthTX-I, uma característica chave para a miotoxicidade dessa classe de proteínas.

**Palavras-chave:** Bothropstoxina-I; MD; Modos normais; PLA<sub>2</sub>S-homólogas; Veneno de serpente.

## ABSTRACT

Ophidian accidents constitute a global public health problem due its high mortality, with some cases leading to permanent sequels. In Brazil, around 20 thousand deaths are registered. Therefore, researchers have been studying the snake venom composition in order to develop therapeutic alternatives to this medical problem. Some components from snake venom are highlighted in the past decades, as BthTX-I, a non-catalytic PLA<sub>2</sub>s-homologous protein, due its many pharmacological effects, notably myotoxic. Although many techniques have been employed to better understand the molecular mechanism of action for these proteins, this knowledge remains controversial, emphasizing the need to progress this field. The structural and computational study of proteins is a valuable tool to access the various conformations of a given protein, as well its dynamical behavior. Thus, the present work applied computational methods as MD, Normal Modes (NM) analysis and Molecular Dynamics with excited Normal Modes (MDeNM) to BthTX-I in acidic or basic pH and unbound or bound to  $\alpha$ -tocopherol – a molecule identified as an allosteric activator – in order to describe the conformational space of this protein and determine the structural aspects of its mechanism of action. Further, biophysical experiments as Dynamic Light Scattering (DLS) were employed in order to comprehend the oligomeric form of BthTX-I with or without  $\alpha$ -tocopherol. MD simulations showed that dimeric form of BthTX-I is stable when in neutral/basic pH conditions. MDeNM showed as a better tool to describe the conformational space of BthTX-I, specially when high amplitude movements are desired, due its mixing with normal modes, leading to high conformational changes of the Membrane-Disruptin site (MDiS), which were exposed to the solvent and approximated to the sulphate plane that mimics the cell membrane surface. This movement is highly related with the Euler angle description, suggesting that the MDiS exposure is result of quaternary movements of BthTX-I. The liberty of MDiS might be explained due the perturbation of its interaction with Helix-I of the protein caused by the presence  $\alpha$ -tocopherol, describing an important feature that defines an allosteric activator. Furthermore, DLS experiments reinforced the ability of  $\alpha$ -tocopherol to induce the BthTX-I oligomerization, a key property for myotoxicity for this class of proteins.

**Keywords:** Bothrostoxin-I; MD; Normal modes; PLA<sub>2</sub>s-homologous; Snake venom.



## Lista de Figuras

Figura 1. Representação estrutural genérica das PLA <sub>2</sub> S-homólogas.....	4
Figura 2. Representação dos modelos de citotoxicidade e miotoxicidade das PLA <sub>2</sub> S-homólogas. Mecanismo de ação para as conformações de Dímero Aberto e Dímero Compacto.....	6
Figura 3. Modelos para a descrição das alterações conformacionais em proteínas em relação à energia livre ( $\Delta G_0$ ).....	9
Figura 4. Descrição de potenciais energéticos utilizados em simulações de MD: Potencial Harmônico, Potencial de Lennard-Jones e Potencial de Coulomb.....	10
Figura 5. Representação do padrão energético e conformacional de uma proteína.....	15
Figura 6. Representação hipotética para o potencial energético (G) de uma proteína com dois estados, identificados pro cada parábola.....	17
Figura 7. Representação em Cartoon da estrutura cristalográfica do Dímero Compacto da BthTX-I em complexo com o $\alpha$ -tocoferol.....	20
Figura 8. Distâncias entre as Hélices-I e MDiS (HMdist) entre os monômeros da BthTX-I definidas pelo centro de massa de cada uma das regiões.....	27
Figura 9. Determinação dos eixos <i>Roll</i> , <i>Tilt</i> e <i>Twist</i> para uma PLA <sub>2</sub> S-homólogas e determinação do plano de SO <sub>4</sub> .....	28
Figura 10. Representação dos resíduos protonados para o pH 4 e 8 da BthTX-I.....	31
Figura 11. Padrão de RMSD e RMSF da BthTX-I em pH 4 e 8.....	32
Figura 12. Padrão de medidas HMdist e Rg para a BthTX-I em pH 4 e 8.....	33
Figura 13. Número de contatos entre os monômeros da BthTX-I para o sistema em pH 4 e 8.....	33
Figura 14. Estruturas da BthTX-I após 100 ns de MD para pH 4 e 8. HMdist estão representados pelas setas em vermelho.....	34
Figura 15. Flutuação dos modos normais 7 ao 20 para os sistemas BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol.....	35
Figura 16. Direções gerais de movimentos da BthTX-I para os modos 7 e 10, indicadas pelas setas em preto.....	36
Figura 17. Cálculo de SASA do MDiS do monômero A da BthTX-I para as trajetórias dos modos 7 e 10.....	37
Figura 18. Temperatura do sistema numa simulação de MDeNM.....	38
Figura 19. Perfil bidimensional de Energia Livre (kcal/mol) da BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol. Estruturas geradas pela MDeNM após relaxamento de 50 ps de MD.....	39
Figura 20. Distribuição dos ângulos <i>Roll</i> e <i>Tilt</i> para a BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol.....	40
Figura 21. Distribuição dos ângulos <i>Roll</i> e <i>Tilt</i> para a BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol para as excitações ao longo do vetor da réplica 12 da BthTX-I.....	42
Figura 22. RMSD do relaxamento das estruturas após excitação utilizando o vetor 12 para a BthTX-	

I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol.....	43
Figura 23. Distribuição dos ângulos <i>Roll</i> e <i>Tilt</i> para a BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol durante 10 ns de MD.....	44
Figura 24. Raio de giro ( $R_g$ ), à esquerda, e SASA, à direita, da BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol durante 10 ns de MD.....	45
Figura 25. HMdist e distância dos MDiS ao plano de $SO_4$ ( $DSO_4$ ), à direita, da BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol durante 10 ns de MD.....	46
Figura 26. Valores de RMSD e $R_g$ para a BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol durante 100 ns de MD. .	47
Figura 27. HMdist e SASA para a BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol durante 100 ns de MD.....	47
Figura 28. Perfil bidimensional de Energia Livre (kcal/mol) da BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol, utilizando RMSD e $R_g$ .....	48
Figura 29. Distribuição dos ângulos <i>Roll</i> e <i>Tilt</i> para a BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol durante 100 ns de MD.....	49
Figura 30. Cromatograma de Exclusão Molecular do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> .....	51
Figura 31. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da Cromatografia de Exclusão Molecular do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> .....	52
Figura 32. Cromatografia de Fase Reversa da fração FR-III proveniente da Cromatografia de Exclusão Molecular do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> .....	53
Figura 33. Distância dos MDiS ao plano $SO_4$ ( $DSO_4$ ) para a BthTX-I, BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol e BthTX-I em pH 8 durante 100 ns de MD.....	61
Figura 34. Distribuição dos ângulos <i>Roll</i> e <i>Tilt</i> para a BthTX-I, BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol e BthTX-I em pH 8.....	62
Figura 35. Distância do MDoS para a BthTX-I em simulações de MD e MDeNM.....	63
Figura 36. Estrutura final do complexo BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol para 10 ns de simulação da BthTX-I após indução ao estado inativo pela técnica de MDeNM mostrando os contatos importantes na estabilização do complexo.....	66
Figura 37. Modelo dinâmico da atividade da BthTX-I numa bicamada lipídica.....	68

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Escalas de tempo para eventos moleculares.....	14
<b>Tabela 2.</b> Flutuação, frequência e coletividade dos modos normais 7 ao 14 para a BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol.....	36
<b>Tabela 3.</b> RMSD para ambos os monômero e porcentagem de estruturas secundárias para o dímero da BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol.....	40
<b>Tabela 4.</b> Prevalência dos contatos, em porcentagem, entre os resíduos da BthTX-I e o $\alpha$ -tocoferol para as estruturas geradas pelo MDeNM e 10 ns de MD com a BthTX-I induzida ao estado inativo.....	50

## Lista de Abreviações

Å	Ångström, unidade de comprimento
BPII	Miotoxina II de <i>Protothrops flavoviridis</i>
BthTX-I	Bothropstoxina-I, miotoxina de <i>Bothrops jararacussu</i>
CHARMM	<i>Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics</i>
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DSO4	Distância ao plano de sulfato cristalográfico
FR	Fração obtida a partir da purificação por cromatografia
GROMOS	<i>Groninger Molecular Simulation</i>
HMdist	Distância entre a Hélice-I e o Sítio de Ruptura de Membrana
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MD	Dinâmica Molecular
MDeNM	Dinâmica Molecular excitada por Modos Normais
MDiS	Sítio de Ruptura de Membrana
MDoS	Sítio de Ancoragem à Membrana
MjTX-II	Miotoxina II de <i>Bothrops moojeni</i>
nm	Nanômetro, unidade de comprimento
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
NPT	Condições Normais de Temperatura e Pressão constantes
ns	Nanosegundo, unidade de tempo
NVT	Condições Normais de Volume e Temperatura constantes
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	Protein Data Bank
PDB ID	Código de Identificação do Protein Data Bank

PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLA <sub>2</sub> S	Fosfolipases A <sub>2</sub>
PLA <sub>2</sub> S-homólogas	Fosfolipases A <sub>2</sub> homólogas
PrTX-I	Piratoxina-I, miotoxina de <i>Bothrops pirajai</i>
ps	Picossegundo, unidade de tempo
Rg	Raio de Giro
R <sub>H</sub>	Raio hidrogenâmico
RMSD	Desvio Médio Quadrático
RMSF	Flutuação Média Quadrática
SASA	Área Superficial Acessível ao Solvente
SAXS	Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
SO <sub>4</sub>	Sulfato
TEMED	Tetrametiletlenodiamina
Tris	Trisaminometano
UA	Unidades Arbitrárias

# Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Fosfolipases A2-Homólogas.....	2
1.2. Aspectos Estruturais e Funcionais das PLA <sub>2</sub> s-homólogas.....	3
1.3. Biologia Estrutural: Acessando os Estados Conformacionais de Biomoléculas.....	8
1.3.1. Simulação de Dinâmica Molecular (MD).....	9
1.3.1.1. Desenvolvimento de Campos de Força.....	12
1.3.2. MD Como Ferramenta de Estudo para Biomoléculas e suas Limitações.....	13
1.3.3. Modos Normais: Acessando Grandes Alterações Conformacionais em Biomoléculas.....	15
1.3.4. Dinâmica Molecular excitada com Modos Normais (MDeNM).....	18
2. OBJETIVOS.....	19
3. METODOLOGIA.....	20
3.1. Coordenadas Atômicas da BthTX-I e Tratamento Físico-Químico.....	20
3.2. Preparação do Sistema para Simulação de Dinâmica Molecular (MD).....	21
3.3. MD Usando o <i>Software</i> Gromacs.....	21
3.4. MD Usando o <i>Software</i> CHARMM.....	22
3.5. Cálculo e Seleção dos Modos Normais da BthTX-I.....	22
3.6. Coletividade dos Modos Normais.....	23
3.7. Teoria da Dinâmica Molecular excitada com Modos Normais (MDeNM).....	24
3.8. Aplicação da MDeNM na BthTX-I.....	25
3.9. Análise Estruturais.....	25
3.10. Análise da Interface Dimérica.....	27
3.11. Análise dos Ângulos entre Monômeros.....	28
3.12. Experimentos em Solução da BthTX-I.....	29
3.12.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	29
3.12.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	29
3.12.3. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	30
3.13. Geração de Gráficos, Tabelas e Imagens.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Estabilidade Dimérica da BthTX-I.....	31
4.2. Modos Normais da BthTX-I.....	34
4.3. MDeNM.....	37
4.3.1. Diversidade Estrutural da BthTX-I.....	38
4.3.2. Induzindo a BthTX-I ao Estado Inativo.....	41
4.3.3. MD da BthTX-I Após Indução ao Estado Inativo.....	44

4.4. MD da BthTX-I e BthTX-I/ $\alpha$ -tocoferol.....	46
4.5. Contatos Entre a BthTX-I e o $\alpha$ -tocoferol.....	49
4.6. Experimentos em Solução da BthTX-I.....	51
4.6.1. Purificação da BthTX-I.....	51
4.6.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	53
5. DISCUSSÃO.....	54
5.1. Alteração do pH Influencia a Atividade da BthTX-I.....	55
5.2. Comportamento Dinâmico da BthTX-I.....	57
5.2.1. Acessando Estados Conformacionais: MD <i>versus</i> MDeNM.....	57
5.2.2. O $\alpha$ -Tocoferol Como um Ativador Alostérico.....	58
5.2.3. A Exposição do MDiS pode estar Relacionada com a Distribuição Angular.....	60
5.3. Comportamento Oligomerizante da BthTX-I na Presença do $\alpha$ -Tocoferol.....	63
5.4. Aspectos Estruturais na Compreensão do Mecanismo de Ação da BthTX-I.....	66
6. CONCLUSÕES.....	71
7. REFERÊNCIAS.....	72
8. APÊNDICE.....	84
9. ANEXO.....	85

## 1. INTRODUÇÃO

Envenenamento por serpentes constitui um problema de saúde pública, considerado como uma doença negligenciada nas regiões tropical e subtropical, notadamente em países como Ásia, África e América Latina. Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu os acidentes ofídicos como uma doença negligenciada de categoria A (CHIPPAUX, 2017), demonstrando a importância em desenvolver estudos nessa área. É estimado que ocorrem cerca de 5,4 milhões de acidentes ofídicos por ano, com cerca de 1,8 mil a 2,7 milhões de casos de envenenamento, que resultam em até quase 140 mil mortes por ano (Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>>. Acesso em: 18 jul. 2019).

No Brasil, tais casos ocorrem por serpentes representantes da família Elapidae, formado pelas cobras coral verdadeiras (*Micrurus*), e Viperidae, formado pelas jararacas (*Bothrops*), cascavéis (*Crotalus*) e surucucus (*Lachesis*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A família Viperidae é responsável pelos acidentes ofídicos mais perigosos, dada sua frequência e gravidade. Aproximadamente 20.000 casos/ano são registrados no Brasil, número mantidos praticamente constantes durante cem anos. Em específico, gênero *Bothrops* é o responsável pela maioria dos casos (90,5%), seguido dos gêneros *Crotalus* e *Lachesis*, com 7,7% e 1,4%, respectivamente. Quanto à letalidade, o gênero *Crotalus* possui maior impacto, com 1,87% enquanto que o gênero *Bothrops* leva suas vítimas a óbito em 0,31% dos casos (FUNASA, 2001; BOCHNER; STRUCHINER, 2001).

A identificação do gênero da serpente causadora do envenenamento é de suma importância, uma vez que o tratamento é feito através da administração de antivenenos específicos para cada gênero: antiofídico (SAB), anticrotálico (SAC) e antielapídico (SAE). Para o gênero *Lachesis* ou quando não se sabe tal gênero, é administrado o antiveneno antiofídico-laquéutico (SABL) (FUNASA, 2001). A ação de tais antivenenos é feita através do bloqueio dos componentes presentes nos respectivos venenos e, neste contexto, se faz importante o desenvolvimento de pesquisas nessa área, visando aprimorar o desenvolvimento dos antivenenos, refletindo na saúde pública.

Um levantamento bibliográfico realizado por Cunha e Martins (2012) demonstrou que o veneno das serpentes bothrópicas é constituído por metaloproteinases, serinoproteinases, fosfolipases A<sub>2</sub>, desintegrinas, miotoxina e neurotoxinas. Dessa forma, pesquisadores demandam esforços para compreender como esses componentes atuam para que possam ser desenvolvidos



métodos eficazes para garantir o bloqueio/inibição dessas moléculas. Dentre tais moléculas, as miotoxinas chamadas de Lys49-fosfolipases A<sub>2</sub> (Lys49-PLA<sub>2</sub>) fazem parte das chamadas PLA<sub>2</sub>s-like ou PLA<sub>2</sub>s-homólogas, constituindo um grupo de grande interesse médico e científico, dado seu envolvimento em diversos eventos farmacológicos traumáticos, como abordado a seguir.

### 1.1. Fosfolipases A<sub>2</sub>-Homólogas

As PLA<sub>2</sub>s-homólogas foram inicialmente identificadas por Maraganore e colaboradores (1984), purificadas do veneno de *Agstrodon piscivorus piscivorus*. Com massa molecular de ~14 kDa e diferenças notáveis na composição do *loop* de cálcio e, em especial, na substituição Asp49Lys, onde foram então classificadas como um novo grupo de fosfolipases A<sub>2</sub>. Em 1988, Homsí-Brandeburgo e colaboradores purificaram a Bothropstoxina-I (BthTX-I) do veneno de *Bothrops jararacussu*. Com a mesma massa molecular, a BthTX-I foi identificada com uma fosfolipase cataliticamente inativa de alto ponto isoelétrico (pI 8,2) e, portanto, de caráter básico (Figura 1A); e constitui cerca de 15% do veneno e 40% das proteínas totais presentes nele. Por apresentar atividade necrótica específica em células musculares, a BthTX-I, assim como as demais PLA<sub>2</sub>s-homólogas miotóxicas, passou a ser identificada como miotoxinas ou fosfolipases-like miotóxicas. Em acordo com isso, estudos de superfície eletrostática demonstraram que a grande quantidade de resíduos das Lys49 é uma característica importante para a expressão da sua miotoxicidade (MURAKAMI; ARNI, 2003).

A miotoxicidade pode ser definida como uma ação específica do veneno em músculo esquelético que afeta apenas as fibras musculares, deixando os demais tecidos e estruturas – como nervos e vasos – inalterados, resultando na mionecrose. Seu efeito, expressado em 0,25-3 horas após sua administração, em nível celular, é caracterizado pela lise da membrana sarcoplasmática e hipercontração muscular. Após 24-48 horas, as células musculares danificadas se mostram como uma massa amorfa repleta de células fagocíticas, especialmente macrófagos (MEBS; OWNBY, 1990). Já a nível de indivíduo, o progresso da miotoxicidade pode causar lesões teciduais graves e permanentes, capazes a desabilitar o paciente de forma irreversível (GUTIÉRREZ, THEAKSTON, WARRELL, 2006). Portanto, as PLA<sub>2</sub>s-homólogas são tidas como um grupo de grande importância médica, e a compreensão do seu real mecanismo molecular pode abrir portas para o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos. Vale ressaltar ainda a relevante contribuição científica gerada a partir do seu estudo molecular e estrutural.

À medida que os estudos na área foram se desenvolvendo, foi observado que, além da miotoxicidade, as PLA<sub>2</sub>s-homólogas apresentam ainda diversos efeitos farmacológicos, como: atividade neuromuscular em camundongos através da inibição da liberação de acetilcolina

(GALLACI; CAVALCANTI, 2010; CORREIA-DE-SÁ *et al.*, 2013), genotoxicidade em linfócitos humanos (MARCUSSE *et al.*, 2013), influxo de  $\text{Ca}^{++}$  do sarcolema (células musculares) (CINTRA-FRANCISCHINELLI *et al.*, 2010), efeito proliferativo, citolítico e necrótico concentração-dependente em células linfoblastóide (MORA *et al.*, 2005), atividade pró-inflamatória em ratas Wistar (BARBOSA *et al.*, 2005), produção de ciclooxygenase-2 e prostaglandinas, por meio da ativação da proteína quinase C (PKC), proteína tirosina quinase (PTK), ativação da via intracelular ERK e MAPK p38, além da expressão do fator de transcrição NF- $\kappa\beta$  (MOREIRA *et al.*, 2013), efeito bactericida e antiparasítico (STÁBELI *et al.*, 2006) e liberação do conteúdo interno de lipossomas (BORTOLELO-BUGS *et al.*, 2007; de OLIVEIRA; FERREIRA; WARD, 2009). Uma possível explicação para a diversidade de efeitos farmacológicos observados pelas proteínas desse grupo seria porque seus genes apresentam altas taxas de mutações/substituições, tornando-se assim uma potente matéria-prima para a evolução guiada pela seleção natural (OHNO *et al.* 2003).

A origem das PLA<sub>2</sub>s-homólogas é atribuída a um processo evolutivo à partir do grande grupo das fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) – enzimas que promovem catálise de fosfolipídios – que resultou na duplicação desse gene e então mutações foram fixadas, levando a sua inabilidade catalítica, porém apresentando outros efeitos farmacológicos, como citados no parágrafo acima. A expressão de uma variedade de efeitos farmacológicos através de um mecanismo molecular independente de catálise tem despertado interesse nos pesquisadores e, portanto, um número crescente de estudos vem sendo realizado para identificar seu real mecanismo de ação e definição dos seus determinantes estruturais (LOMONTE; RANGEL, 2012).

## 1.2. Aspectos Estruturais e Funcionais das PLA<sub>2</sub>s-homólogas

As PLA<sub>2</sub>s-homólogas são identificadas como pequenas proteínas de 119-143 aminoácidos, com massa molecular que varia entre 12 e 15 kDa e arquitetura extremamente similar às PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas. Sua característica estrutural mais notável é a presença de duas hélices- $\alpha$  antiparalelas (Hélice II e III) separadas por uma distância aproximada de 10 Å com características anfipáticas, onde os resíduos hidrofílicos são expostos ao solvente e os hidrofóbicos dispostos para seu interior, com exceção da díade His48/Lys49. As PLA<sub>2</sub> são também constituídas por uma região N-terminal, representada pela Hélice I (resíduos 1 a 12), seguida por uma hélice curta (*short helix*) formada pelos resíduos 18 a 23. Entre os resíduos 25 e 34 está o *loop* ligante de  $\text{Ca}^{++}$ , seguido pela Hélice II (40 a 55) e uma folha- $\beta$  antiparalela (55 a 89), onde estes últimos são separados pelo *loop* pancreático. Em seguida é encontrada a Hélice III (90 a 107), e então um *loop* C-terminal bastante flexível (108 a 113), conhecido por cauda C-terminal, finaliza a proteína. Outro aspecto de

importante destaque é a presença de sete ligações dissulfeto, formadas pelos resíduos 27-126, 29-45, 44-105, 50-133, 51-98, 61-91 e 84-96 (RENETSEDER *et al.*, 1985; ARNI; WARD, 1996). Tais regiões podem ser observadas abaixo (Figura 1B).

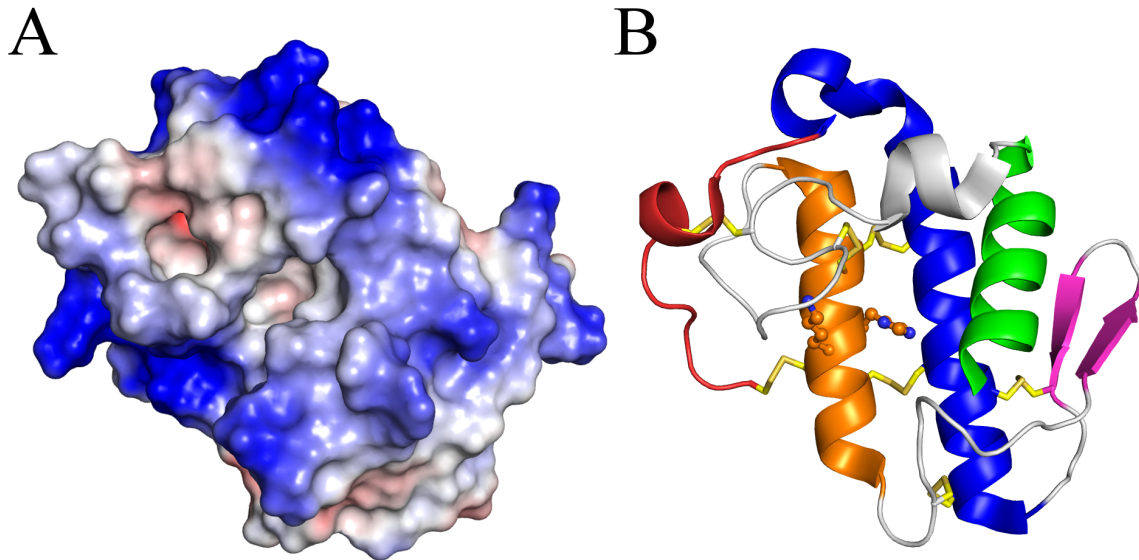


Figura 1: Representação estrutural de uma PLA<sub>2</sub>-homóloga (BthTX-I, PDB: 3CXI): (A) superfície eletrostática, onde os resíduos básicos, ácidos e neutros são mostrados nas cores azul, vermelho e branco, respectivamente; (B) e *cartoon*, mostrando as hélices- $\alpha$  I (N-terminal), II e III são representadas nas cores verde, laranja e azul, respectivamente; a folha- $\beta$  está representada em roxo, enquanto que a cauda C-Terminal está mostrada em vermelho, enquanto que a hélice curta e regiões de *loops* estão representadas em branco. As ligações dissulfeto estão representadas em *sticks* coloridos em amarelo. A díade His48/Lys49, pertencente à Hélice-II, está representada com os átomos de suas cadeias laterais em esferas. Imagem gerada pelo Pymol (DELANO, 2002).

Atualmente, a inabilidade catalítica das PLA<sub>2</sub>S-homólogas é atribuída a duas substituições específicas que impedem a coordenação com o cálcio, sendo elas: a) a ocupação do sítio de acoplamento do cálcio pelo nitrogênio  $\zeta$  da cadeia lateral do resíduo de lisina, ocasionada pela substituição Asp49Lys; e b) a alteração conformacional do *loop* de cálcio resultante da substituição Tyr28Asn (FERNANDES *et al.*, 2010). Embora esse novo grupo de proteínas tenha sido descoberta há mais de 30 anos, seu mecanismo molecular de ação permanece controverso e, portanto, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas por pesquisadores para desvendar este mistério, com o uso de técnicas de modificação química, análise comparativa de sequência, interação com moléculas neutralizantes, estudos de peptídeos sintéticos e mutagênese sítio dirigida, por exemplo (FERNANDES *et al.*, 2014).

Estudos cristalográficos com as PLA<sub>2</sub>S-homólogas complexadas a inibidores têm sido uma das ferramentas para a compreensão dos determinantes estruturais dessas moléculas. Tais estudos permitem identificar regiões na proteína que são passíveis de serem bloqueadas e, portanto, podem

corresponder a regiões importantes para a expressão dos seus efeitos farmacológicos. Por outro lado, existem outro grupo de moléculas que são capazes de ligar às PLA<sub>2</sub>s-homólogas, auxiliando na sua citotoxicidade, os chamados ativadores alostéricos. Uma relevante revisão (FERNANDES *et al.*, 2014) lista as diferentes estruturas cristalográficas produzidas até então, com a identificação de PLA<sub>2</sub>s-homólogas complexadas a ativadores alostéricos, como ácidos graxos, polietileno glicol (PEG),  $\alpha$ -tocoferol; e também a bloqueadores, como o ácido rosmarínico, ácido cafeico, suramina e brometo *p*-bromofenacil.

Outra característica estrutural é a polarização da cavidade hidrofóbica das PLA<sub>2</sub>s-homólogas causada pela cadeia lateral do resíduo Lys112 (LEE *et al.*, 2001). Esse resíduo permite a polarização da cavidade hidrofóbica, aumentando sua afinidade a fosfolipídios de membrana e levando à expressão da citotoxicidade. Posteriormente, esse resultado foi reforçado por estudos de mutagênese Lys112Ala, Val102Ala/Leu106Phe e Leu5Phe/Val102Ala/Leu106Phe, capazes de afetar a expressão dos efeitos farmacológicos dessas proteínas (CHIOATO *et al.*, 2002; SÁ *et al.*, 2004). Por outro lado, a polarização do resíduo Lys122 pode também ativar resíduos hidrofóbicos encontrados na cauda C-terminal, expondo-os para o solvente, sendo assim considerados importantes para a expressão da citotoxicidade (AMBROSIO *et al.*, 2005).

A cauda C-terminal das PLA<sub>2</sub>s-homólogas é considerada importante para a expressão dos seus efeitos farmacológicos graças a estudos de peptídeos sintéticos (NÚÑEZ; ANGULO; LOMONTE, 2001), onde foi demonstrado sua participação na expressão dos efeitos farmacológicos dessas proteínas, notadamente através dos resíduos Lys115, Lys116, Tyr117 e Arg118. Além disso, outro trabalho demonstrou que mutações da Lys112 também pode reduzir a atividade dessas miotoxinas (CHIOATO *et al.*, 2002). Em 2007, foi observado que tais mutações afetam a atividade das miotoxinas de modo geral, onde foi possível observar alteração da sua atividade contra bactérias, lipossomas e células musculares, esta última sendo bastante sensível aos efeitos das PLA<sub>2</sub>s-homólogas (CHIOATO *et al.*, 2007). Ainda, sobre as células musculares, foi descrita a alteração de sensibilidade de acordo com o estágio de desenvolvimento dessas células, sendo os miotubos – células mais desenvolvidas – mais susceptíveis aos efeitos das PLA<sub>2</sub>s-homólogas. (ANGULO; LOMONTE, 2005).

De modo geral, os modelos atuais para tentar compreender o mecanismo miotóxico das PLA<sub>2</sub>s-homólogas buscam explicá-lo apenas pela via da desestabilização de biomembranas através do reconhecimento de fosfolipídios carregados negativamente. Estudos de inibição com poliânios serviram de base para a proposição do primeiro modelo molecular de atuação das PLA<sub>2</sub>s-homólogas, através da perturbação de biomembranas por meio das saliências hidrofóbicas presentes em cada cauda C-terminal (LOMONTE, ANGULO, CALDERÓN, 2003), apresentado na Figura 2

(A). Em acordo com isso, Magro e colaboradores (2003) sugeriram que as PLA<sub>2</sub>s-homólogas poderiam agir através de um mecanismo de dobradiça, aproximando as caudas C-terminal ainda mais da membrana. Tal movimento seria observado quando o dímero da miotoxina é formado através da interação das folhas-beta de cada monômero, resultando numa conformação chamada de Dímero Aberto.

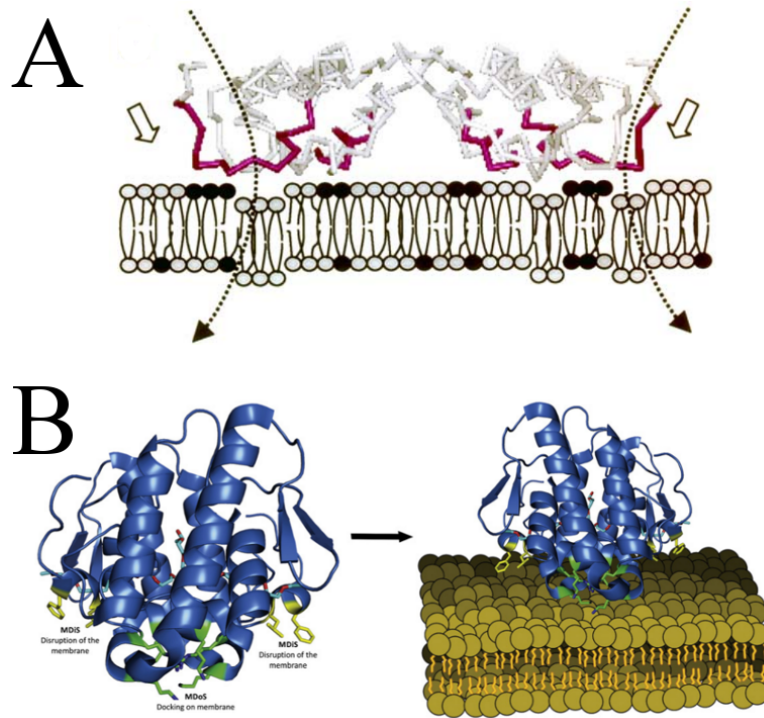


Figura 2. Representação dos modelos de citotoxicidade e miotoxicidade das PLA<sub>2</sub>s-homólogas. Mecanismo de ação para as conformações de Dímero Aberto (A) e Dímero Compacto (B). Adaptado de Lomonte, Angulo e Calderón (2003) (A) e Fernandes *et al.* (2013) (B).

Posteriormente, outro modelo (Figura 2B) foi desenvolvido, baseado no estudo cristalográfico de duas miotoxinas (PrTX-I e BthTX-I) complexadas com  $\alpha$ -tocoferol (dos SANTOS; SOARES; FONTES, 2009). Tal modelo propõe que as PLA<sub>2</sub>s-homólogas se organizam numa outra conformação oligomérica, surgindo então um novo tipo de dímero, sendo então chamado de Dímero Alternativo, enquanto que o dímero anteriormente descrito passou a se chamar de Dímero Convencional. O Dímero Alternativo apresenta conformação de menor energia e alinhamento dos domínios estruturais considerados importantes. Este dímero apresenta os monômeros com interações entre a cauda C-terminal e hélice I, permitindo a formação de uma região de alta densidade catiônica – chamado de sítio de Ancoragem à Membrana (*Membrane-Docking site*, MDoS), que, com o auxílio das saliências hidrofóbicas encontradas em cada região C-terminal – chamado de sítio de Ruptura de Membrana (*Membrane-Disruption site*, MDiS), são capazes de penetrar membranas, levando a sua ruptura e então morte celular (FERNANDES *et al.*,

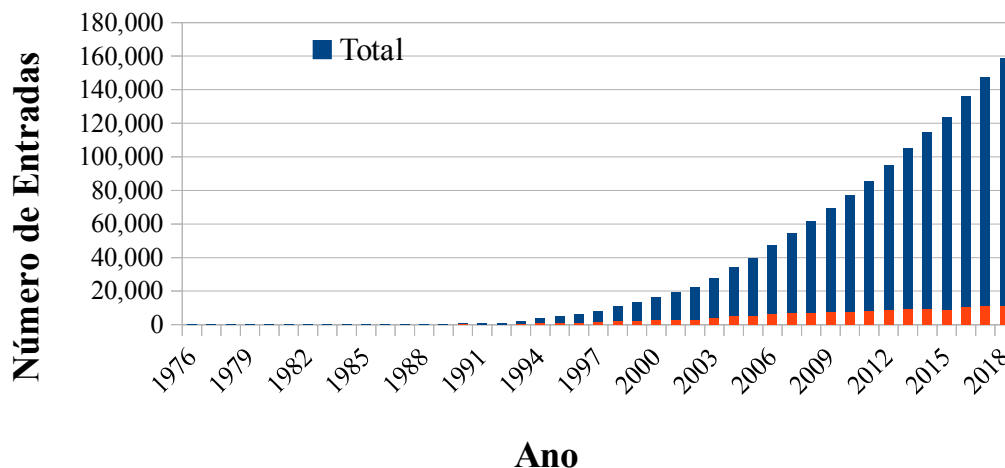
2013). Para evitar problemas de nomenclatura, descartando termos definidos historicamente, optamos por tratar os tipos de dímeros considerando suas características estruturais. Sendo assim, o Dímero Convencional e Dímero Alternativo serão chamados como Dímero Largo e Dímero Compacto, respectivamente.

O estado oligomérico da BthTX-I observado na cristalografia sugere a possibilidade dos dois dímeros, onde existem modelos de mecanismos de ação para cada um deles (explicados nos dois parágrafos acima); entretanto, resultados experimentais podem auxiliar na resolução deste problema com maior ênfase. Por exemplo, dados de fluorescência mostraram mudança no padrão de intensidade da BthTX-I durante alterações de pH, sugerindo que essa proteína depende do estado dimérico para desempenhar sua função, notadamente em faixas de pH 7,0 (de OLIVEIRA; FERREIRA; WARD, 2009). De acordo com isso, dados de Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scatening*, DLS) apresentou a BthTX-I em solução contendo raio hidrodinâmico de 22,5 nm e polidispersividade próxima de 10%.), reforçando a presença de estados diméricos (FERNANDES *et al.*, 2010). Por fim, dados de Difração de Raios-X a Baixo Ângulo (*Small-Angle X-ray Scattering*, SAXS) para a BthTX-I reforçam a presença de dímeros em solução, com raio de giro em torno de 17,5 Å, sendo de acordo com o dímero cristalográfico, como mostrado por Murakami e colaboradores (2007). Este último resultado é interessante, pois os dados de SAXS costumam apresentar alta confiança no estudo de proteínas em solução. Dessa forma, o Dímero Compacto (Figura 2B) parece ter relevância biológica e merece atenção.

Vale ressaltar que os estudos sobre o mecanismo de ação das PLA<sub>2</sub>S-homólogas têm sido desenvolvidos majoritariamente por meio da análise de estruturas obtidas por cristalografia. Esta técnica teve seu início com a resolução da estrutura tridimensional da mioglobina em 1958 (KENDREW *et al.*, 1958) e vem crescendo gradativamente a cada ano, onde estruturas de proteínas são depositadas num banco de dados chamado de *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000). Este banco contém milhares de proteínas depositadas até então, apresentando 147.409 estruturas até 20 de Dezembro de 2018, como mostrado no gráfico 1 (Disponível em: <<https://www.rcsb.org/stats/growth/overall>>. Acesso em: 20 dez. 2018). A título de ilustração, a estrutura da BthTX-I foi elucidada em 2007 através da técnica de Cristalografia pelo grupo do Professor Arni (Murakami *et al.*, 2009). Atualmente, existem dez estruturas depositadas, nativa ou em complexo com diversos ligantes.

O surgimento da cristalografia resultou em fortes impactos na compreensão da biologia como um todo e permitiu a emergência e o desenvolvimento da Biologia Estrutural. Tal ciência busca compreender como moléculas biológicas são construídas, descrevendo-as tridimensionalmente, na tentativa de compreender seu funcionamento.

Gráfico 1. Número de estruturas de proteínas depositadas no Protein Data Bank (PDB).



### 1.3. Biologia Estrutural: Acessando os Estados Conformacionais de Biomoléculas

Com o *boom* da cristalografia, o entendimento do funcionamento das proteínas teve grande avanço, porém as proteínas eram consideradas – comumente observado em livros acadêmicos – como modelos estáticos conformacionalmente, ou até mesmo trabalhando entre estados, como observado nas estruturas cristalográficas do domínio externo da Proteína G de *E. coli*, onde foram identificados os estados Aberto e Fechado (YILDIZ *et al.*, 2006). Todavia, com o desenvolvimento de técnicas como a Ressonância Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), essa visão passou a mudar: foi observado que as proteínas poderiam ser descritas por vários estados conformacionais, sugerindo diferentes populações estruturais para as proteínas (JAMES; TAWFIK, 2003). Outro dado pertinente diz respeito ao efeito do empacotamento cristalográfico, que pode induzir a proteína a apresentar estados diferentes da sua forma em solução. Esse problema se torna ainda mais delicado quando é levado em conta o estado oligomérico da proteína, pois o efeito do empacotamento cristalográfico pode forçar as proteínas do cristal a assumir pontos de interações não observadas em solução (JEFFERSON; WALSH; BARTON, 2006).

As diferentes populações de proteínas podem ser representadas por estados topográficos de sua superfície energética dados seus possíveis graus de liberdade, podendo ser contabilizado como  $3N$ , onde  $N$  seria o número de átomos. Dentro dos graus de liberdade de uma proteína, foi pensado que ela possui um estado de mínimo local (Figura 3A), também chamado de Estado Nativo.

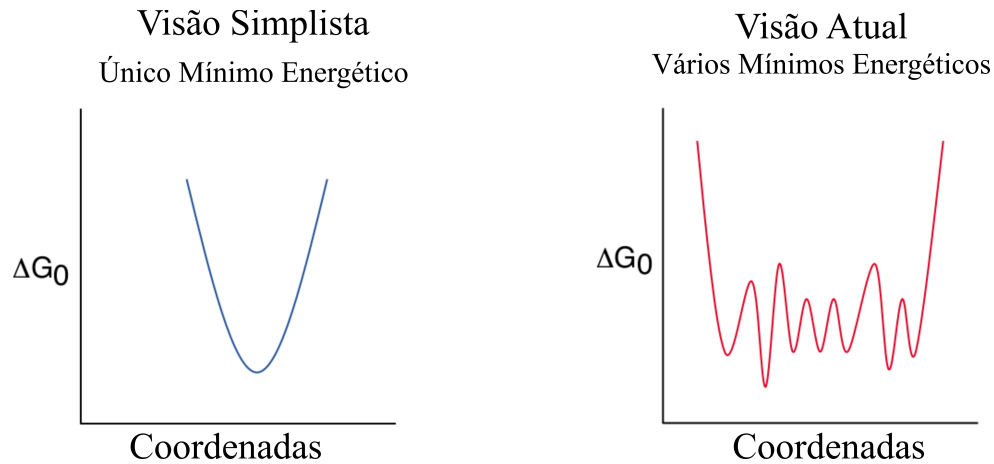


Figura 3. Modelos para a descrição das alterações conformacionais em proteínas em relação à energia livre ( $\Delta G_0$ ). Representação com apenas um mínimo local (A) e representação com vários mínimos locais (B), considerado mais próximo da realidade. Adaptado de JAMES e TAWFIK (2003).

Entretanto, a nova visão das proteínas as define como microestados conformacionais com mínimos energéticos similares, onde cada um desses estados representa um estado diferente, mesmo que com pouca variação estrutural (Figura 3B) (JAMES; TAWFIK, 2003). Neste contexto, experimentos de Simulação de Dinâmica Molecular (MD) vêm assumindo um papel importante no campo da estrutura de proteínas, uma vez que esta técnica permite com que a proteína vibre ao longo do tempo, considerando suas propriedades físico-químicas, como massa atômica, ligações químicas, carga e interações atômicas.

### 1.3.1. Simulação de Dinâmica Molecular (MD)

MD pode ser compreendida como a descrição do comportamento dos átomos de um determinado sistema ao longo do tempo, através da utilização de conceitos da Mecânica Clássica, como a Segunda Lei de Newton, que diz respeito às leis de movimento:

$$F = m a$$

**Equação 1.** Segunda Lei de Newton.

onde a Força (**F**) é igual a Massa (**m**) vezes a Aceleração (**a**). Dessa forma, o método busca determinar as posições atômicas do sistema em determinado tempo, criando, assim, conjunto de coordenadas, que resultam na trajetória do sistema. Essa trajetória pode ser descrita como o



comportamento dos átomos do sistema ao longo do tempo (DROR *et al.*, 2012).

Para sistemas como proteínas, a variável mais fácil de ser encontrada na equação é a massa dos átomos, definidas em tabelas periódicas, porém para se obter a força aplicada em cada átomo, a maneira mais simples seria obter a energia potencial que cada átomo é submetido. Assim, deve-se levar em consideração as interações estes átomos, definidas como interações *bonded* e *non-bonded*. O primeiro, diz respeito às características intrínsecas dos átomos, como: ligação covalente e ângulos (simples, diedros e impróprios). Vale salientar que tais características podem ser chamadas de potenciais harmônicos, onde a descrição dessas funções podem ser representadas por uma equação de 2º grau (uma parábola), tendo um mínimo energético favorável (Figura 4A). Já o segundo grupo diz respeito às características atômicas que permitem a interação com o meio, sendo elas: interações de Lennard-Jones e Coulombianas. Nesse caso, a descrição dessas interações é dada por potenciais dependentes da distância dos átomos, onde a interação Lennard-Jones se expressa em curtas distâncias, aumentando drasticamente com a aproximação dos átomos (Figura 4B). Por outro lado, a interação de Coulomb é mais suave, aumentando à medida que diminui a distância entre os átomos (Figura 4C) (GROMACS v. 5.0.5, manual. Website: <ftp://ftp.gromacs.org/pub/manual/manual-5.0.5.pdf>).

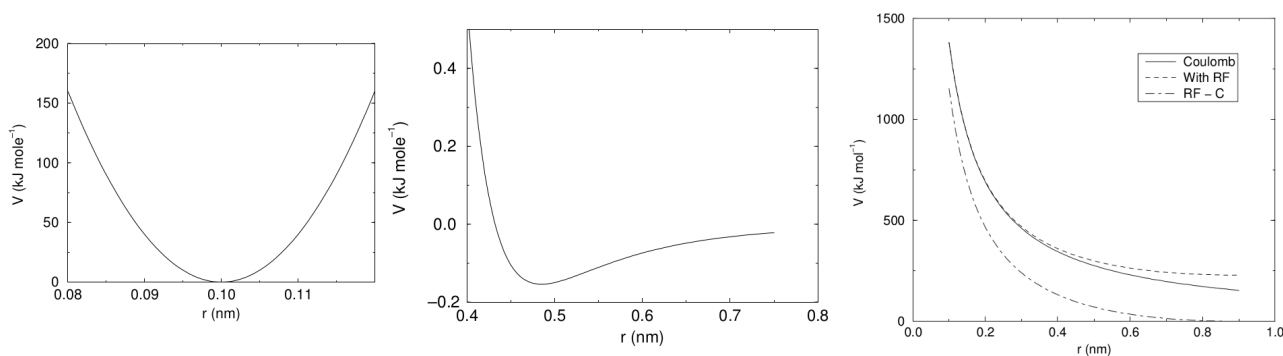


Figura 4. Descrição de potenciais energéticos utilizados em simulações de MD: Potencial Harmônico (A), Potencial de Lennard-Jones (B) e Potencial de Coulomb (C). Retirado do manual do GROMACS versão 5.0.5.

A soma desses potenciais, para cada átomo, resulta na Energia Potencial (V) do sistema, sendo descrita como:

$$V = \left( \frac{1}{2} \kappa_{ij} (r_{ij} - r_{0ij})^2 \right) + \left( \frac{1}{2} \kappa_{ijk}^{\theta} (\theta_{ijk} - \theta_{0ijk})^2 \right) + \left( \frac{1}{2} \kappa_{\xi} (\xi_{ijkl} - \xi_0)^2 \right) + \left( \frac{\delta_{ij}^{(12)}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\delta_{ij}^{(6)}}{r_{ij}^6} \right) + \left( \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \right)$$

**Equação 2.** Energia Potencial (V) de um conjunto de átomos.

Essa equação é representada por quatro equações menores, respectivamente explicadas em seguida:

- i. Potencial de Ligação: descreve o estiramento (*stretching*) dos átomos (*i* e *j*) conectados covalentemente;
- ii. Potencial Angular: descreve a variação de ângulo ( $\theta$ ) para cada três átomos (*i*, *j* e *k*) ligados covalentemente;
- iii. Potencial Diedral: descreve a variação de ângulos diedro ( $\xi$ ) para cada quatro átomos (*i*, *j*, *k* e *l*) ligados covalentemente;
- iv. Potencial *Non-Bonded*: descreve as interações dos átomos próximos. O primeiro termo diz respeito ao Potencial de Lennard-Jones e o segundo é o Potencial de Coulomb.

Dessa forma, a força pode ser descrita como a Energia Potencial (*V*) exercida em cada átomo (*i*) numa dada posição (**r**) num determinado tempo:

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\delta V_i}{\delta \mathbf{r}_i}$$

**Equação 3.** Definição de Força (**F**) considerando variáveis de um sistema de MD.

Uma vez que é possível determinar a Força (**F**) e a Massa (*m*) do sistema, torna-se fácil encontrar a aceleração para cada átomo, alcançando então a movimentação dos átomos do sistema. Sendo assim, a Aceleração (**a**) pode ser descrita como:

$$\mathbf{a}_i = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}$$

**Equação 4.** Aceleração que cada átomo *i* está submetido (obtido a partir da equação 1).

Entretanto, dada a complexidade de sistema molecular, se torna necessário o desenvolvimento de uma equação que considere tais termos. Pensando nisso, o físico francês Loup Verlet, pioneiro na área de simulação molecular computacional, integrou os potenciais do sistema e desenvolveu equações para determinar as posições dos átomos, bem como suas velocidades ao longo do tempo. Portanto, após um dado tempo (*t*), a nova posição (**r**) de um dado átomo (*i*) num dado incremento de tempo ( $\delta t$ ) pode ser descrita como:

$$\mathbf{r}_i(t+\delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t-\delta t) + \mathbf{a}_i(t)\delta t^2$$

**Equação 5.** Determinação da posição atômica ( $r$ ) em relação ao tempo ( $t$ ).

enquanto que sua velocidade ( $v$ ) pode ser descrita como:

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{[\mathbf{r}_i(t+\delta t) - \mathbf{r}_i(t-\delta t)]}{2\delta t}$$

**Equação 6.** Determinação da velocidade atômica ( $v$ ) em relação ao tempo ( $t$ ).

resolvendo assim um problema essencial para a simulação de átomos (VERLET, 1967).

### 1.3.1.1. Desenvolvimento de Campos de Força

Para que as equações descritas acima funcionem de forma satisfatória, as características dos átomos do sistema devem ser atenciosamente definidas. Por exemplo, qual o estiramento de uma ligação O-H? Qual a angulação da molécula de água? Todas essas variáveis devem ser validadas experimentalmente e então serem implementadas junto com as equações a fim de realizar simulações moleculares fidedignas. O conjunto dessas informações pode ser definido como Campo de Força. Atualmente, existem vários Campos de Força, como: AMBER, OPLS, GROMOS e CHARMM (CINO; CHOY; KARTTUMEN, 2012). Embora, serão discutidos apenas os dois últimos, a ideia geral pode ser aplicada para qualquer Campo de Força.

Outra classificação para os Campos de Força pode ser como *united-* ou *all-atoms*: o primeiro normalmente agrega os hidrogênios aos carbonos alifáticos, enquanto que o segundo representa exatamente todos os átomos do sistema. O Campo de Força CHARMM (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*) é bastante difundido no meio acadêmico e constitui um exemplo *all-atom*. Seu desenvolvimento é feito liderado pelo grupo de pesquisa do pesquisador Karpus, um dos idealizadores da ferramenta. A primeira versão desse Campo de Força foi lançada 1998 com o nome de CHARMM22 (MACKERELL *et al.*, 1998). A versão corrente do CHARMM é chamada de CHARMM36 (C36), capaz de reproduzir dados experimentais de NMR, como interações de ligação de hidrogênio, interações dipolo, tendo impacto na estabilização das cadeias principal e lateral dos resíduos de aminoácidos das proteínas (HUANG; MACKEREL, 2013).

Embora o C36 represente bem os estados conformacionais das proteínas, foi observado que ele tem a tendência de super estabilizar estruturas de hélices- $\alpha$ , sendo um problema na área,

notadamente para estudos de pequenas proteínas ou peptídeos (CINO; CHOY; KARTTUMEN, 2012). Dessa forma, uma atualização do C36 (C36m) foi desenvolvida a fim de resolver tal problema, onde interações *non-bonded* e os potenciais de ângulo foram otimizados para reproduzir conformações de proteínas observadas em solução. O C36m foi capaz de descrever uma curva de SAXS com alta precisão ( $\chi^2 = 0.12$ ), passando a reproduzir dados de peptídeos ou proteínas com alta variação conformacional (HUANG *et al.*, 2017).

Outro Campo de Força bastante difundido é o GROMOS (*Groningen Molecular Simulation*), constituindo um representante *united-atom*. O GROMOS é desenvolvido pelo pesquisador van Gunsteren em colaboração com a Holanda e Suíça. As versões 53a5 e 53a6 são parte da última grande atualização do GROMOS e conta com a validação de dados experimentais de 28 pequenas moléculas (OOSTENBRINK *et al.*, 2004). Em 2011, foi lançada uma atualização chamada 54a7, que contou com o aprimoramento de interações de ligação de hidrogênio para melhor reproduzir estruturas secundárias, além do aprimoramento das interações *non-bonded* dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em busca de uma maior correlação com resultados experimentais (SCHMID *et al.*, 2011). Além disso, foi observado que o 54a7 é capaz de gerar resultados satisfatórios para  $\beta$ -peptídeos (HUANG; LIN; van GUNSTEREN, 2011).

### 1.3.2. MD Como Ferramenta de Estudo para Biomoléculas e suas Limitações

A MD é responsável por uma série de resultados importantes na compreensão do funcionamento de biomoléculas em geral, como o transporte de moléculas por proteínas transmembrana, interação proteína-ligante, alterações conformacionais e enovelamento de proteínas. Essas funções dependem do alto custo computacional do tempo de simulação, otimizado graças ao desenvolvimento de computadores mais potentes e utilização de placas de vídeos (DROR *et al.*, 2012). Abaixo três exemplos são apresentados a fim de fortalecer a robustez do método.

Miller e colaboradores (2014) foram capazes de determinar a alteração de estado na DNA Polimerase I na exposição do DNA com bases não emparelhadas executando MD numa escala de microssegundo ( $\mu\text{s}$ ). Foi possível observar a mudança do estado conformacional da DNA Polimerase após o reconhecimento de uma base nitrogenada não emparelhada, levando a sua exposição ao solvente. Tal exposição é necessária para que outras proteínas do Sistema de Reparo de DNA possa reconhecer e consertar o problema. Outro caso foi observado no estudo da proteína transmembrânica da membrana externa de *E. coli*, onde foi observada a passagem de uma molécula de ciclodextrina, através da proteína (van der BERG *et al.*, 2015). A MD também permitiu realizar experimentos de eletrofisiologia, com o transporte de íons através de proteínas transmembrânicas,

gerando resultados numéricos dos potenciais e dinâmica do fluxo de íons do sistema e relacionar com resultados experimentais (KUTZNER *et al.*, 2011). Vale destacar o poder da MD, que é capaz de fornecer informações interessantes na função de moléculas com acurácia atômica, permitindo uma série de análises.

Embora a MD permita atingir alguns níveis conformacionais, graças às movimentações atômicas, conformações mais complexas podem não ser alcançadas, visto que demandam mais tempo de simulação. Uma vez que essa técnica possui alto gasto computacional, o tempo de simulação se torna um fator limitante e, nesse contexto, o estudo de grandes sistemas ou de movimentos globais/coletivos, responsáveis por grandes alterações conformacionais, requerem uma escala de tempo maior, como observado na Tabela 1.

Tabela 1. Escalas de tempo para eventos moleculares. Adaptado de Schlick (2010).

<b>Movimentos Internos</b>	<b>Tempo (segundos)</b>
<b><i>Stretch</i> de ligação covalente</b>	$10^{-14}$
<b><i>Stretch</i> de ligação dupla</b>	$2 \cdot 10^{-14}$
<b>Torção de ângulo</b>	$2 \cdot 10^{-14}$
<b>Torção global do DNA</b>	$10^{-12}$
<b>Movimentos coletivos (abre e fecha)</b>	$10^{-11}-10^{-7}$
<b>Curvatura global do DNA</b>	$10^{-10}-10^{-7}$
<b>Enovelamento proteico</b>	$10^{-5}-10$

Uma detalhada revisão, feita por Henzler-Wildman e Kern (2007), demonstra que o padrão conformacional de uma dada proteína apresenta uma série de estados de baixa energia (microestados ou mínimos locais), que podem ser agrupados em camadas de variação de energia, e a conexão entre eles é dada por barreiras energéticas, que precisam ser vencidas até que um outro estado possa ser atingido (Figura 5). A transição entre estados acontece num dado tempo e podendo ser observados em picossegundos (ps) ou nanossegundos (ns), entretanto, outros estados podem exigir microssegundos ( $\mu$ s) ou até mesmo milissegundos (ms) para que podem ser alcançados, dado o alto gasto energético da mudança, como observado na mudança do estado A para o B. Talvez, a mudança do estado A para o B demore segundos de simulação para ocorrer (ou talvez nem ocorra), o que se tornaria inviável para a técnica de MD. Dessa forma, algumas técnicas vêm buscando vencer essas limitações, onde uma delas é a análise de modos normais (MD), graças a suas particularidades, discutidas na seção seguinte.

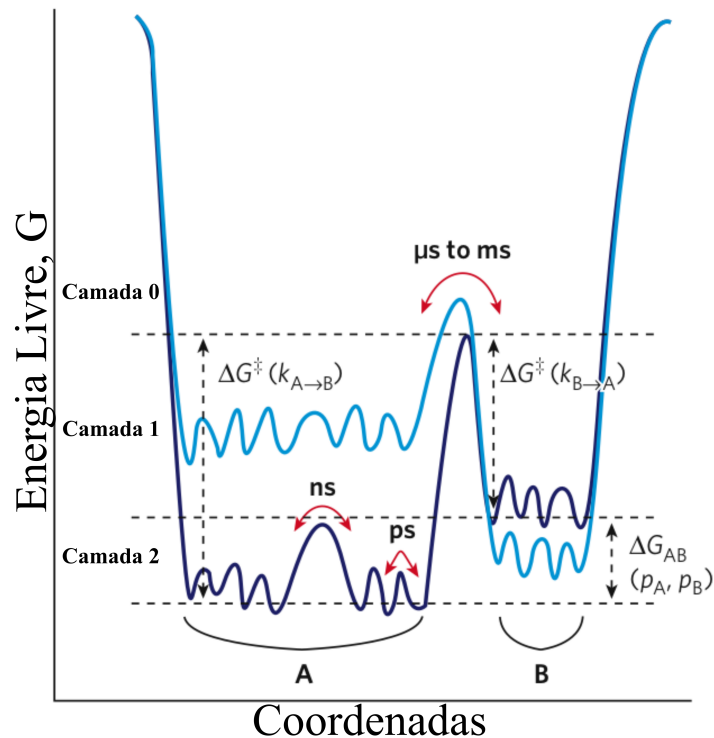


Figura 5. Representação do padrão energético e conformacional de uma proteína. Os diferentes níveis de energia são representados em camadas, que correspondem a regiões de alteração conformacional. A alteração entre estados (A e B) pode resultar na mudança entre camadas, exigindo um gasto energético, contabilizado pela variação de energia ( $\Delta G$ ). Retirado de Henzler-Wildman e Kern (2007).

### 1.3.3. Modos Normais: Acessando Grandes Alterações Conformacionais em Biomoléculas

Os modos normais representam padrões de vibração/oscilação para uma dada direção de um sistema, onde essa direção é descrita por um autovetor (*eigenvector*). Todas essas direções são expressas num espaço de D-dimensões, chamado Espaço dos Modos Normais, onde cada *eigenvector* é ortogonal a todos os outros vetores, daí a definição do termo ‘normal’ (CUI; BAHAR, 2005). Dessa forma, um modo normal pode ser representado como:

$$\mathbf{K} \cdot \mathbf{e}_i = \lambda_i \mathbf{e}_i$$

**Equação 7.** Definição de um modo normal para uma matriz K

onde  $\mathbf{K}$  representa uma matriz de  $M \times M$ ,  $\mathbf{e}$  é o autovetor e  $\lambda$  é o autovalor (*eigenvalue*) associado ao autovetor. Cada valor descreve um autovetor para  $N$  direções e, portanto  $i$  é um número inteiro que

varia de 1 a  $N$ . O autovalor representa a curvatura da oscilação, que pode ser melhor compreendida adiante (Figura 6).

Para biomoléculas, o modo normal descreve o padrão de movimentação de  $N$  átomos em três dimensões ( $3N$  direções), e pode ser descrito através de uma Energia Potencial ( $V$ ) resultante da Série de Taylor. Uma vez que os modos normais são calculados a partir de uma estrutura referência/inicial encontrada num mínimo local energético – requerendo uma considerável etapa de minimização da estrutura – a Série de Taylor pode ser simplificada, sendo representada pela diferença de posição da estrutura inicial e o deslocamento do modo de forma quadrática (CUI; BAHAR, 2005):

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{3N} k_{ij} (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i^0) (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_j^0)$$

**Equação 8.** Energia Potencial para um modo normal.

onde  $k_{ij}$  representa uma constante de força relacionada ao deslocamento dos átomos  $i$  e  $j$  e, enquanto que  $(\mathbf{r}_i$  e  $\mathbf{r}_i^0)$  e  $(\mathbf{r}_j$  e  $\mathbf{r}_j^0)$  correspondem às posições finais e iniciais dos átomos  $i$  e  $j$ , respectivamente. Quando  $N$  átomos são considerados no cálculo, é preciso então calcular a constante  $k$  para cada um deles – levando em consideração os átomos vizinhos dentro de uma área de corte ( $k_{ij}$ ) – gerando assim uma matriz  $3N \times 3N$  com as forças de deslocamento dos átomos, chamada matriz Hessiana. O termo  $(\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i^0)$  se refere ao deslocamento das coordenadas de um dado modo normal, que, por sua vez, pode ser descrito como um oscilador harmônico em função do tempo de acordo com a equação:

$$(\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i^0) = k_{ij} C_k \cos(\omega_k t + \phi_k)$$

**Equação 9.** Deslocamento atômico para modos normais.

onde  $k_{ij}$  representa a constante da força para cada átomo em relação a seus vizinhos;  $C_k$ ,  $\omega_k$  e  $\phi_k$  correspondem a amplitude, frequência e fase do modo  $k$ .

É importante notar que, com essa técnica, é possível atingir estados conformacionais mais amplos, forçando a proteína a se mover ao longo do modo e então um dado estado conformacional através dessas aproximações de superfície energética, de forma mais rápida e eficiente que a MD. Entretanto, como esse cálculo trata-se de uma aproximação, e, na realidade, o fluxo dos estados

conformacionais deve ser mais diverso, onde essa curva quadrática apresenta uma série de pequenas curvas, chamadas de microestados. Tais microestados poderiam ser alcançados por MD (BAHAR *et al.*, 2010).

A Figura 6 mostra uma curva de energia potencial para uma dada proteína, onde é possível observar dois estados distintos. Tais estados são representados por microestados ( $m_1, m_2, m_3, \dots, m_N$ ) representados pela curva vermelha. A curva vermelha segue um padrão aproximado de uma parábola, como mostrado na curva preta, correspondente à aproximação de energia de cada estado, sendo, portanto, os modos normais em questão. Além disso, é possível notar que a largura das parábolas são distintas, correspondendo ao autovalor de cada modo, relacionado com a amplitude do modo. Os círculos em verde são estados de baixa energia, podendo ser representados por conformações da cristalografia, como estado aberto e fechado, por exemplo:

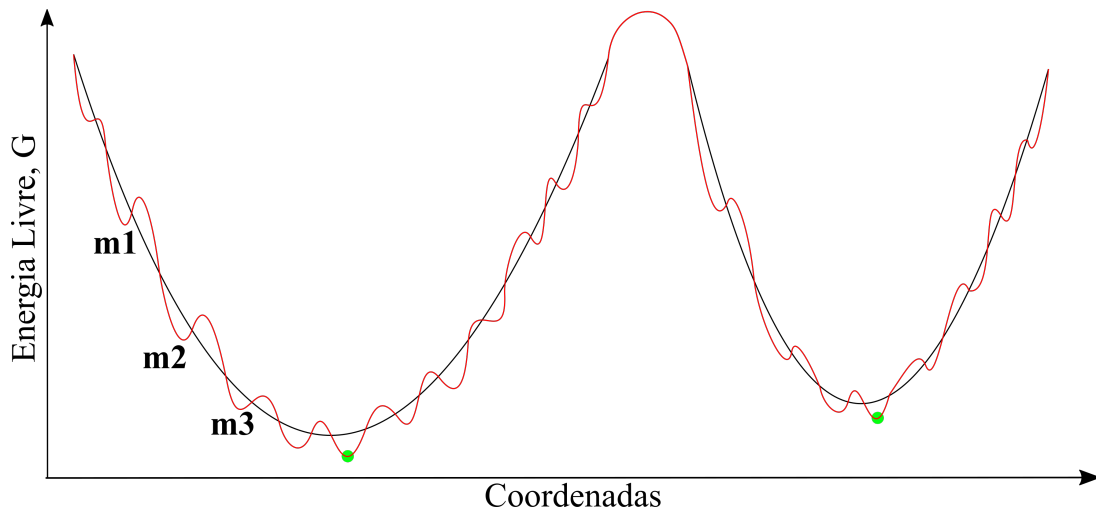


Figura 6. Representação hipotética para o potencial energético (G) de uma proteína com dois estados, identificados por cada parábola (curva em preto). Cada parábola é uma simplificação do potencial, que apresenta vários microestados ( $m_1$ -3). Os círculos em verde correspondem a estruturas pontuais desse potencial, podendo ser estruturas cristalográficas. Inspirado em Cui e Bahar (2005) e Bahar e colaboradores (2010).

O estudo dos modos normais para proteínas tem se apresentado como uma alternativa para compreender seus movimentos de alta amplitude, ou movimentos coletivos/de baixa frequência, uma vez que estes modos estão fortemente relacionados com aspectos estruturais e funcionais de proteínas (TIRION, 1996; BERENDSEN; HAYWARD, 2000). Além disso, alguns trabalhos foram capazes de determinar aspectos estruturais importantes para o desempenho funcional de proteínas, como observado pelo estudo da enzima glicosamina-6-fosfato sintase e seu ligante natural nas alterações estruturais relacionadas com o ciclo catalítico da enzima descritas pelos modos de alta



amplitude (FLOQUET *et al.*, 2009). Por fim, NM também permite o estudo de grandes proteínas de forma mais rápida, como observado no estudo de microtúbulos (QUINIOU *et al.*, 2013), sendo uma alternativa viável para responder algumas perguntas que a MD pode ser pouco eficaz.

#### **1.3.4. Dinâmica Molecular excitada com Modos Normais (MDeNM)**

Uma vez que ambos os métodos, MD e NM, possuem benefícios e limitações, a junção dessas duas técnicas poderia ser relevante para o estudo de proteínas, possibilitando então atingir alta variação de estados conformacionais e também os microestados ao longo da superfície energética da proteína. Pensando nisso, o grupo liderado pelo Prof. Dr. Perahia propôs uma nova técnica híbrida, que usa as direções dos modos normais de uma dada proteína no contexto da MD a fim de atingir uma descrição conformacional mais eficiente. Esta técnica permitiu descrever o espaço conformacional da lisozima de forma mais diversa usando um tempo de simulação menor, em torno de 20 ns de simulação total, onde foi possível encontrar aspectos estruturais relevantes para sua função (COSTA *et al.*, 2015).

A aplicação dessa técnica permite uma melhor compreensão estrutura de proteínas de forma mais eficiente e, portanto, foi trazida para o contexto do estudo da miotoxina BthTX-I a fim de melhor compreender seus aspectos estruturais até então desconhecidos (os aspectos específicos da técnica foi descrito na seção da metodologia). Além disso, MD também foi aplicada de forma a complementar o estudo e buscar outros aspectos estruturais importantes, como a dinâmica e participação dos resíduos considerados pela literatura como relevantes para sua atividade.

## 6. CONCLUSÕES

- I. Ambientes de pH ácido alteram o estado oligomérico da BthTX-I de modo a desfazer a conformação quaternária, impossibilitando-a de expressar seus efeitos farmacológicos;
- II. A Hélice-I tem importância estrutural para a BthTX-I, uma vez que participa da estabilização dimérica, através da interação com o MDiS;
- III. As simulações de MD foram essenciais para determinar a estabilidade da conformação quaternária da BthTX-I observada na cristalografia, constituindo um resultado que favorece a conformação proposta pelo Dímero Compacto;
- IV. A técnica de MDeNM se mostrou mais eficiente que a MD para preencher o espaço conformacional para a BthTX-I;
- V. O MDiS pode apresentar conformações mais diversas que as observadas na cristalografia, sendo mais expostos ao solvente e se aproximando do plano de SO<sub>4</sub>. Tais estruturas podem estar relacionadas com conformações da BthTX-I consideradas “super-ativas”;
- VI. O  $\alpha$ -tocoferol tem papel importante na oligomerização e estabilização quaternária da BthTX-I, além de participar na modulação do MDiS, facilitando sua exposição ao solvente;
- VII. A descrição conformacional da BthTX-I através dos ângulos de Euler parece ser mais prudente ao estudar movimentos conformacionais de alta amplitude. Em simulações de MD, onde todos os graus de liberdade estão agindo – apresentando muitos movimentos locais – pode não apresentar um padrão notável;
- VIII. O modo normal 7, de alta coletividade, possui um movimento que favorece a movimentação do MDiS em direção ao plano de SO<sub>4</sub>;
- IX. Existe uma forte correlação positiva entre o ângulo *Tilt* e a distância DSO<sub>4</sub>, que pode ser observada quando movimentos de alta amplitude são realizados;
- X. O espectro conformacional gerado pelas simulações de MDeNM pode gerar artefatos, notadamente observado no sistema BthTX-I. Uma alternativa para evitar tais conformações poderia ser determinar o momento em que a estrutura quaternária é perdida. Tal procedimento pode ser uma encorajadora limitação no presente trabalho, mas que poderia ser resolvida através da definição de uma “área de estabilidade” da proteína considerando as estruturas dentro das regiões mais visitadas no padrão de Energia Livre.

## 7. REFERÊNCIAS

- AMBROSIO, A. L.; NONATO, M. C.; ARAÚJO, H. S. S.; ARNI, R.; WARD, R.; J.; OWNBY, C. L.; SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C. (2005). A molecular mechanism for Lys<sup>49</sup>-phospholipase A<sub>2</sub> activity based on ligand-induced conformational change. **Journal of Biological Chemistry**, 280(8): 7326-7335.
- ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; SOARES, A. M.; CHO, W.; LOMONTE, B. (2005). Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. **Toxicon**, 46(3): 291-6.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. (2005) Differential susceptibility of C2C12 myoblasts and myotubes to group II phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms. **Cell Biochemistry and Function**, 23(5): 307-313.
- ARAGÃO, E. A.; CHIOATO, L.; WARD, R. J. (2008). Permeabilization of *E. coli* K12 inner and outer membranes by bothropstoxin-I, A LYS49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, 51(4): 538-46.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. (1996). Phospholipase A<sub>2</sub> – A structural review. **Toxicon**, 34(8): 827-841.
- BAHAR, I.; LEZON, T. R.; BAKAN, A.; SHRIVASTAVA, I. H. (2010). Normal Mode Analysis of Biomolecular Structures: Functional Mechanisms of Membrane Proteins. **Chemical Reviews**, 110(3): 1463-97.
- BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; HAVT, A.; TOYAMA, D. O.; EVANGELISTA, J. S. A.M.; FERREIRA, D. P. P.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. (2005). Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, 46(4): 376-386.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; van GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK J. R. (1984). Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. **Journal of Chemical Physics**, 81:

3684-90.

BERENDSEN, H. J.; HAYWARD, S. (2000). Collective protein dynamics in relation to function. **Current Opinion in Structural Biology**, 10(2): 165-9.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSING, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. (2000) The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, 28: 235-242A.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n 1, p. 7-16, jan-fev, 2003.

BORGES, R. J.; LEMKE, N.; FONTES, M. R. M. (2017). PLA<sub>2</sub>-like proteins myotoxic mechanism: a dynamic model description. **Scientific Reports**, 7(1): 15514.

BORTOLELO-BUGS, R. K.; BUGS, M. R.; NETO, A. A.; WARD, R. J. (2007). A micelle nucleation model for the interaction of dodecyl sulphate with Lys49-phospholipases A<sub>2</sub>. **Biophysical Chemistry**, 125(1): 213-220.

BORTOLETO-BUGS, R. K.; NETO, A. A.; WARD, R. J. (2004). Activation of Ca<sup>2+</sup>-independent membrane-damaging activity in Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> promoted by amphiphilic molecules. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 322(2): 364-72.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816 p.

BROOKS, B.R.; BROOKS III, C.L.; MACKERELL JR, A.D.; NILSSON, L.; PETRELLA, R.J.; ROUX, B.; WON, Y.; ARCHONTIS, G.; BARTELS, C.; BORESCH, S.; CAFLISCH, A.; CAVES, L.; CUI, Q.; DINNER, A.R.; FEIG, M.; FISCHER, S.; GAO, J.; HODOSCEK, M.; IM, W.; KUCZERA, K.; LAZARIDIS, T.; MA, J.; OVCHINNIKOV, V.; PACI, E.; PASTOR, R.W.; POST, C.B.; PU, J.Z.; SCHAEFER, M.; TIDOR, B.; VENABLE, R. M.; WOODCOCK, H. L.; WU, X.; YANG, W.; YORK, D.M.; KARPLUS, M. (2009). CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. **Journal of Computational Chemistry**, 30(10): 1545-1614.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics** , 126(1): 014101.

CARDOSO, F. F.; BORGES, R. J.; DREYER, T. R.; SALVADOR, G. H, M.; CAVALCANTE, W. L. G.; PAI, M. D.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. (2018). Structural basis of phosphopase A2-like myotoxin inhibition by chicoric acid, a novel potent inhibitor of ophidian toxins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, 1862(12): 2728-2737.

CHIOATO, L.; ARAGÃO, E. A.; FERREIRA, T. L.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H.; WARD, R. J. (2007). Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> by scanning alanine mutagenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1768(5): 1247-1257.

CHIOATO, L.; OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SÁ, J. M.; WARD, R. J. (2002). Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochemical Journal**, 366(3): 971-976.

CHIPPAUX, J-P. (2017). Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 23:38.

CINO, E. A.; CHOY, WY; KARTTUMEN, M. (2012) Comparison of Secondary Structure Formation Using 10 Different Force Fields in Microsecond Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 8(8): 2725-2740.

CINTRA-FRANCISCHIELLI, M.; CACCIN, P.; CHIAVEGATO, A.; PIZZO, P.; CARMIGNOTO, G.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C. (2010). Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **PNAS**, 107(32): 14140-14145.

CORREIA-DE-SÁ, P.; NORONHA-MATOS, J. B.; TIMÓTEO, M. A.; FERREIRINHA, F.; MARQUES, P.; SOARES, A. M.; CARVALHO, C.; CAVALCANTE, W. L. G.; GALLACCI, M. (2013). Bothropstoxin-I reduces evoked acetylcholine release from rat motor nerve terminals: Radiochemical and real-time video-microscopy studies. **Toxicon**, 61: 16-25.

COSTA, M. G. S.; BATISTA, P. R.; BISCH, P. M.; PERAHIA, D. (2015). Exploring Free Energy Landscapes of Large Conformational Changes: Molecular Dynamics with Excited Normal Modes. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 11(6): 2755-67.

CUADRADO, A.; NEBREDA, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signaling. **Biochemical Journal**, 429(3): 403-417.

CUI, Q.; BAHAR, I. **Normal Mode Analysis: Theory and Applications to Biological and Chemical Systems** 1st Edition – Chapman and Hall/CRC, 2005. 432p.

CUNHA, E. M; MARTINS, O. A. (2012). Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, 2(2): 21-26.

de OLIVEIRA, A. H. C.; FERREIRA, T. L.; WARD, R. J. (2009). Reduced pH induces an inactive non-native conformation of the monomeric bothropstoxin-I (Lys49-PLA<sub>2</sub>). **Toxicon**, 54(3): 373-378.

de OLIVEIRA, A. H. C.; GIGLIO, J. R.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ITO, A. S.; WARD, R. J. (2001). A pH-Induced Dissociation of the Dimeric Form of a Lysine 49-Phospholipase A<sub>2</sub> Abolishes Ca<sup>2+</sup>-Independent Membrane Damaging Activity. **Biochemistry**, 40(23): 6912-6920.

DELANO, W. L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.

dos SANTOS, J. I.; CARDOSO, F. F.; SOARES, A. M.; SILVA, M. P.; Gallacci, M.; FONTES, M. R. M. (2011). Structural and Functional Studies of a Bothropic Myotoxin Complexed to Rosmarinic Acid: New Insights into Lys49-PLA<sub>2</sub> Inhibition. **PloS One**, 6(12): e28521.

dos SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. (2009). Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A(2) from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **Journal of Structural Biology**, 167(2): 106-16.

- DROR, R. O.; DIRKS, R. M.; GROSSMAN, J. P.; XU, H.; SHAW, D. E. (2012). Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology. **Annual Reviews of Biophysics**, 41: 429-52.
- FERRÉ-D'AMARÉ, A. R.; BURLEY, S. K. (1994). Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. **Structure**, 2: 357-9.
- FERNANDES, C. A. H.; COMPARETTI, E. J.; BORGES, R. J.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. (2013). Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic phospholipases A<sub>2</sub>-like from *Bothrops brazili* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1834(12): 2772-2781.
- FERNANDES, C. A. H.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SALVADOR, G. M.; SILVA, M. C. O.; COSTA, T. R.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. (2010). Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca<sup>2+</sup>-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA<sub>2</sub>s. **Journal of Structural Biology**, 171(1): 31-43.
- FERNANDES, C. A.H.; BORGES, R. J.; LOMONTE, B.; FONTES, M. R. M. (2014). A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>-like proteins from viperid snake venoms. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1844(12): 2265-2276.
- FERREIRA, T. L.; RULLER, R.; CHIOATO, L.; WARD, R. J. (2008). Insights on calcium-independent phospholipid membrane damage by Lys49-PLA<sub>2</sub> using tryptophan scanning mutagenesis of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, 90(9): 1397-406.
- FLOQUET, N.; DURAND, P.; MAIGRET, B.; BADET, B.; BADET-DENISOT, MA, PERAHIA, D. (2009). Collective motions in Glucosamine-6-phosphate Synthase: Influence of Ligand Binding and role in Ammonia Channeling and Opening of the Fructose-6-Phosphate Binding Site. **Journal of Molecular Biology**, 385(2): 653-64.
- FUNASA (Fundação Nacional da Saúde). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2<sup>a</sup> ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 120p.
- GALLACCI, M.; CAVALCANTE, W. L. G. (2010). Understanding the in vitro neuromuscular

activity of snake venom Lys49 phospholipase A 2 homologues. **Toxicon**, 55(1): 1-11.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. (1997). SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, 18(15): 2714-23.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. (2006) Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. **PloS Medicine**, 3(6): e150.

HENZLER-WILDMAN, K.; KERN, D. (2007). Dynamic personalities of proteins. **Nature**, 450(7172): 964-72.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, 18(12): 1463-1472.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. (1988). Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, 26(7): 615-27.

HOOVER, W. G. (1985). Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions. **Physical Review A, General Physics**, 31(3): 1695-1697.

HUANG, J.; MACKERREL JR, A. D. (2013). All-Atom Additive Protein Force Field: Validation Based on Comparison to NMR Data. **Journal of Computational Chemistry**, 34(25): 2135-45.

HUANG, J.; RAUSCHER, S.; NAWROCKI, G.; RAN, T.; FEIG, M.; de GROOT, B. L.; GRUBMÜLLER, H.; MACKERELL JR, A. D. (2017). CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, 14(1): 71-73.

HUANG, W.; LIN, Z.; van GUNSTEREN, W. F. (2011). Validation of the GROMOS 54A7 Force Field with Respect to  $\beta$ -Peptide Folding. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 7(5): 1237-43.



JAMES, L. C.; TAWFIK, D. S. (2003). Conformational diversity and protein evolution – a 60-year-old hypothesis revisited. **Trends in Biochemical Sciences**, 28(7): 361-8.

JEFFERSON, E. R.; WALSH, T. P.; BARTON, G. J. (2006). Biological units and their effect upon the proprieties and prediction of protein-protein interactions. **Journal of Molecular Biology**, 364(5): 1118-29.

JO, S.; KIM, T.; IYER, V. G.; IM, W. (2008). CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, 29(11): 1859-65.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; SILVA, H. J. (2008). The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PloS Medicine**, 5(11): 1591-1604.

KENDREW, J. C.; BODO, G.; DINTZIS, H. M.; PARRISH, R. G.; WYCKOFF, H. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis. **Nature**, 181(4610): 662-6.

KUTZNER, C.; GRUBMÜLLER, H.; de GROOT, B. L.; ZACHARIAE, U. (2011). Computational Electrophysiology: The Molecular Dynamics of Ion Channel Permeation and Selectivity in Atomistic Detail. **Biophysical Journal**, 101(4): 809-817.

LARDNER, A. (2001). The effects of extracellular pH on immune function. **Journal of Leukocyte Biology**, 69(4): 522-30.

LEE, W.; GIOTTO, M. T. S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R. C. (2001). Structural basis for low catalytic activity in lys49 phospholipases A<sub>2</sub> – A hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, 40(1): 28-36.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. (2003). An overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, 42(8): 885-901.

LOMONTE, B.; RANGEL, J.(2012). Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A<sub>2</sub> to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, 60(4): 520-530.

MACKERELL JR, A. D.; BASHFORD, D.; BELLOTT, M.; DUNBRACK JR, R. L.; EVANSECK, J. D.; FIELD, M. J.; FISCHER, S.; GAO, J.; GUO, H.; HA, S.; JOSEPH-MCCARTHY, D.; KUCHNIR, L.; KUCZERA, K.; LAU, F. T. K.; MATTOS, C.; MICHNICK, S.; NGO, T.; NGUYEN, D. T.; PRODHOM, B.; REIHER, W. E.; ROUX, B.; SCHLENKRICH, M.; SMITH, J. C.; STOTE, R.; STRAUB, J.; WATANABE, M.; WIÓRKIEWICZ-KUCZERA, J.; YIN, D.; KARPLUS, M. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. **The Journal of Physical Chemistry B**, 102(18): 3586-3616.

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. (2003). Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A<sub>2</sub>: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 311(3): 713-720.

MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KÉZDY, F. J.; HEINRIKSON, R. L. (1984). A new class of phospholipases A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49: Functional consequences for calcium and substrate binding. **Journal of Biological Chemistry**, 259(22): 13839-13843.

MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; SANTOS-FILHO, N. A.; MENALDO, D. L.; PEREIRA, L. L. S.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; SILVA, S. L.; ANTUNES, L. M. G.; SOARES, A. M. (2013). Genotoxic effect of *Bothrops* snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, 65: 9-14.

MATSUI, T.; KAMATA, S.; ISHII, K.; MARUNO, T.; GHANEM, N.; UCHIYAMA, S.; KATO, K.; SUZUKI, A.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; TANAKA, Y. (2019). SDS-induced oligomerization of Lys49phospholipase A<sub>2</sub> from snake venom. **Scientific Reports**, 9(1): 2330

MEBS, D.; OWNBY, C. L. (1990). Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacology & Therapeutics**, 48(2): 223-236.

MILLER III, B. R.; PARISH, C. A.; WU, EY. (2014). Molecular dynamics study of the opening mechanism for DNA polymerase I. **PLoS Computational Biology**, 10(12): e1003961.

MORA-OBANDO, D.; FERNÁNDEZ, J.; MONTECUCCO, .; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. (2014). Synergism between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A<sub>2</sub> Myotoxins of Viperid Snake Venom *In Vitro* and *In Vivo*. **PloS One**, 9(10): e109846.

MORA, R.; VALVERDE, B.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. (2005). A Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops aspers* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, 45(5): 651-660.

MOREIRA, V.; SOUTO, P. C. M. C.; VINOLO, M. A. R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CURI, R.; TEIXEIRA, C. (2013). A catalytically-inactive snake venom Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue induces expression of cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins through selected signaling pathways in macrophages. **European Journal of Pharmacology**, 708(1-3): 68-79.

MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. (2003). A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A<sub>2</sub>s. **Toxicon**, 42(8): 903-913.

MURAKAMI, M. T.; VIÇOTI, M. M.; ABREGO, J. R. B.; LOURENZONI, M. R.; CINTRA, A. C. O.; ARRUDA, E. Z.; TOMAZ, M. A.; MELO, P. A.; ARNI, R. K. (2007). Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA<sub>2</sub>-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA<sub>2</sub> homologues. **Toxicon**, 49(3): 378-387.

NOSÉ, S. (1984). A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. **Molecular Physics**, 52: 255-268.

NÚÑEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. (2001). Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, 39(10): 1587-1594.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. (2003). Molecular evolution of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venom. **Toxicon**, 42(8): 841-854.

OLSSON, M. H.; SØNDERGAARD, C. R.; ROSTKOWSKI, M.; JENSEN, J. H. (2011). PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 7(2): 525-37.

OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; van GUNSTEREN, W. F. (2004). A Biomolecular Force Field Based on the Free Enthalpy of Hydration and Solvation: The GROMOS Force-Field Parameter Sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, 25(13): 1656-76.

PARRINELLO, M. R. A.; RAHMAN, A. J. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, 52(12): 7182-7190.

PERAHIA, D.; MOUAWAD, L. (1955). Computation of low-frequency normal modes in macromolecules: improvements to the method of diagonalization in a mixed basis and application to hemoglobin. **Computers & Chemistry**, 19(3): 241-6.

QUINIOU, E.; GUICHARD, P.; PERAHIA, D.; MARCO, S.; MOUAWAD, L. (2013). An Atomistic View of Microtubule Stabilization by GTP. **Structure**, 21(5): 833-43.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; SIGLER, P. B. (1985). A comparison of the crystal structures of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **Journal of Biological Chemistry**, 260(21): 11627-11634.

RYCKAERT, JP.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of *n*-alkanes. **Journal of Computational Physics**, 23(3): 327-341.

SÁ, J. M.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T. L.; OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. (2004). Topology of the substrate-binding site of a Lys<sup>49</sup>-phospholipase A<sub>2</sub> influences Ca<sup>2+</sup>-independent membrane. **Biochemical Journal**, 382(1): 191-198.

SALVADOR, G. H. M.; dos SANTOS, J. I.; BORGES, R. J.; FONTES, M. R. M. (2018a). Structural evidence for a fatty acid-independent myotoxic mechanism for a phospholipase A<sub>2</sub>-like toxin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**, 1866(3): 473-481.

SALVADOR, G. H. M.; DREYER, T. R.; GOMES, A. A. S.; CAVALCANTE, W. L. G.; dos SANTOS, J. I.; GANDIN, C. A.; NETO, M. O.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. (2018b). Structural and Functional characterization of suramin-bound MjTX-I from *Bothrops moojeni* suggests a particular myotoxic mechanism. **Scientific Reports**, 8: 10317.

SALVADOR, G. H. M.; FERNANDES, C. A. H.; MAGRO, A. J.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CAVALCANTE, W. L. G.; FERNANDEZ, R. M.; GALLACCI, M.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, C. L. P.; FONTES, M. R. M. (2013). Structural and Phylogenetic Studies with MjTX-I Reveal a Multi-Oligomeric Toxin – a Novel Feature in Lys49-PLA<sub>2</sub>s Protein Class. **PLoS One**, 8(4): e60610.

SCHLICK, T. **Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide**. 2<sup>nd</sup> Edition – Springer, 2010. 723p.

SCHMID, N.; EICHENBERGER, A. P.; CHOUTKO, A.; RINIKER, S.; WINGER, M.; MARK, A. E.; van GUNSTEREN, W. F. (2011). Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. **European Biophysics Journal**, 40(7): 843-56.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. (2006). *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 142(3-4): 371–381.

TIRION, M. M. (1996). Large Amplitude Elastic Motions in Proteins from a Single-Parameter, Atomic Analysis. **Physical Review Letters**, 77(9): 1905-1908.

van den BERG, B.; BHAMIDIMARRI, S. P.; PRAJAPATI, J. D.; KLEINEKATHÖFER, U.; WINTERHALTER, M. (2015). Outer-membrane translocation of bulky small molecules by passive diffusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, 112(23): E2991-9.

VANOMMESLAEGHE, K.; HATCHER, E.; ACHARYA, C.; KUNDU, S.; ZHONG, S.; SHIM, J.; DARIAN, E.; GUVENCH, O.; LOPES, P.; VOROBYOV, I.; MACKERELL JR, A. D. (2010). CHARMM Cheneral Force Field (CGenFF): A force field for drug-like molecules compatible with

the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of Computational Chemistry**, 31(4): 671-690.

VERLET, L. (1967). Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. **Physocal Review**, 159(1): 98-103.

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; de OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SÁ, J. M. (2002). Active-site mutagenesis of a Lys<sup>49</sup>-phospholipase A<sub>2</sub>: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **The Biochemical Journal**, 362(1): 89-96.

YILDIZ, Ö.; VINOTHKUMAR, K. R.; GOSWAMI, P.; KUHLEBRANDT, W. (2006). Structure of the monomeric outer-membrane porin OmpG in the open and closed conformation. **The EMBO Journal**, 25: 3702-3713.