

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – CAMPUS DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E BIOFÍSICA

**ESTUDOS ESTRUTURAIS E FILOGENÉTICOS COM
FOSFOLIPASES E SERINO PROTEASES DE VENENOS DE
SERPENTES BOTRÓPICAS NATIVAS E QUIMICAMENTE
MODIFICADAS**

Carlos Alexandre Henrique Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, UNESP, como
exigência para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas Área de
Concentração: Genética.

BOTUCATU – SP

Setembro/2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Selma Maria de Jesus*

Fernandes, Carlos Alexandre Henrique.

Estudos estruturais e filogenéticos com fosfolipases e serino proteases de venenos de serpentes botrópicas nativas e quimicamente modificadas / Carlos Alexandre Henrique Fernandes. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientadora: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Assunto CAPES: 20204000

1. Serpentes - Veneno - Genética Fosfolipase

CDD 615.9

Palavras-chave: *Bothrops*; Cristalografia de proteínas; Fosfolipases A₂ homólogas; Veneno de serpentes

Aos meus pais, Manuel e Maria Lucia, pelo maravilhoso aprendizado que me proporcionaram.

Ao meu filho Heitor, na esperança que eu possa ser um pai tão bom quanto os meus foram.

À minha esposa Evelyn, minha amada companheira.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Marcos, pela paciência, pelos conhecimentos transmitidos e pelo seu extraordinário caráter como cientista e, principalmente, ser humano.

À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou o presente projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares do Departamento de Ciências Farmacêuticas da USP – Ribeirão Preto, por fornecer as amostras estudadas.

Ao LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncroton) pelo apoio técnico de suas instalações para coleta de dados de difração de raios X.

À técnica Cilene do Carmo Padilha pelas fantásticas assistências e recomendações no dia a dia do laboratório.

À Agnes, pela amizade e companheirismo antes mesmo da nossa convivência no laboratório.

Ao Marcio, pela nossa valorosa amizade e aos demais integrantes do LBBC, Prof. Dr. Ney Lemke, pela revisão do trabalho e Luís Augusto, pelos valiosos socorros computacionais.

Aos meus colegas de laboratório Angelo, Juliana, Rafael, Patrícia, Andréia (muito obrigado pela tabela!), Mabel, Guilherme, pelas ajudas oferecidas e pelas risadas proporcionadas.

ESTUDOS ESTRUTURAIS E FILOGENÉTICOS COM FOSFOLIPASES E SERINO PROTEASES DE VENENOS DE SERPENTES BOTRÓPICAS NATIVAS E QUIMICAMENTE MODIFICADAS

Resumo

As serpentes do gênero *Bothrops* são de grande interesse científico, médico e social para o Brasil, visto que este gênero é responsável por cerca de 90% dos acidentes ofídicos que ocorrem em nosso país. Dois dos principais componentes do veneno desses animais são as fosfolipases A₂ e as serino proteases. As fosfolipases A₂ são enzimas responsáveis pela destruição da membrana celular através da hidrólise de fosfolipídios Ca²⁺ dependente. Uma classe destas fosfolipases, as fosfolipases homólogas (Lys49-PLA₂s), que se caracteriza pela uma substituição natural na posição 49 de um resíduo de Asp para um resíduo de Lys, não apresenta atividade catalítica, mas é capaz de induzir mionecrose por um mecanismo Ca²⁺ independente devido, provavelmente, à resíduos da região C-terminal. Neste trabalho, através de estudos por cristalografia de raios-X de Lys49-PLA₂s botrópicas nativas e quimicamente modificadas pelo brometo de *p*-bromofenacila (BPB), revisamos a posição da Lys122 – anteriormente apontado como um dos responsáveis pela ausência da atividade catalítica das Lys49-PLA₂s por conta da hiperpolarização que causaria na ligação peptídica Cys29/Gly30 – e concluímos que, por conta de esta hiperpolarização ocorrer apenas em alguns monômeros de Lys49-PLA₂s complexadas, a Lys122 não deve estar envolvida no “bloqueio” da atividade catalítica. Além disso, a comparação estrutural do *loop* de ligação de Ca²⁺ entre as Lys49 e Asp49-PLA₂s nos mostra a importância da conservação da Tyr28 dentre as Asp49-PLA₂s para a integridade do *loop* de ligação do Ca²⁺. Este resíduo estabiliza essa região através de uma ponte de hidrogênio com a Gly35. Nas Lys49-PLA₂s, que possuem um resíduo de Asn na posição 28, não ocorre a formação dessa ponte, o que contribuiria para a desestabilização dessa região nessas proteínas, dificultando a ligação do co-fator Ca²⁺. Por fim, estudos filogenéticos demonstraram que as Asp49-PLA₂s de baixa atividade catalítica e também capazes de induzir mionecrose são filogeneticamente mais próximas às Lys49 do que do restante das Asp49-PLA₂s, formando com as Lys49 um ramo miotóxico monofilético. As serino proteases, por sua vez, são enzimas responsáveis por grandes efeitos na coagulação sanguínea no envenenamento ofídico. Neste trabalho, a análise filogenética destas enzimas mostrou que as serino proteases das famílias de serpentes mais importantes quando consideramos o envenenamento ofídico, Elapidae e Viperidae, podem ter diferentes origens evolutivas. Enquanto que as serino proteases da família Elapidae possuem elevado parentesco filogenético com o fator de coagulação Xa, as da família Viperidae e de outras famílias de serpentes peçonhentas são filogeneticamente próximas às enzimas presentes na saliva de animais, indicando que as serino proteases não constituem um ramo monofilético nos venenos de serpentes.

Palavras chave: Veneno de serpentes; Cristalografia de proteínas; *Bothrops*; Fosfolipases A₂ homólogas; Serino proteases.

Structural and phylogenetic studies of phospholipases and serine proteases from bothropic snake venom in native and chemically modified forms.

Abstract

The snakes from *Bothrops* genus are objects with great scientific, medical and social interesting since that these snakes are responsible of 90% of snakebites in our country. Two of the main components of the venom from these animals are the phospholipases A₂ and the serine proteases. The phospholipases A₂ are enzymes responsible of cellular membrane disruption through phospholipids hydrolysis Ca²⁺-dependent. A class of these phospholipases, the homolog phospholipases (Lys49-PLA₂s) that underwent a natural substitution Lys to Asp substitution in 49 position, does not show catalytic activity. However, these proteins can perform myonecrosis by a Ca²⁺-independent mechanism probably, due to action of C-termini region residues. In this work, by x-ray crystallography studies with bothropic Lys49-PLA₂s in native and chemically modified by *p*-bromophenacyl bromide (BPB) forms, we revised the position of Lys122, previously pointed as one of the responsables of Lys49-PLA₂s due to hiperpolarization of its side chain on Cys29/Cys30 peptide bond. Here, we conclude that this hiperpolarization are present only in a few monomers and thus, Lys122 may not be involved in the “blocking” of catalytic activity. Furthermore, structural comparisons of Ca²⁺ binding loop between Lys49 and Asp49-PLA₂s reveals the importance of the Tyr28 residue conservation to the integrity of this region. This residue stabilizes the Ca²⁺ binding loop by a hydrogen bond to Gly35. In Lys49-PLA₂s that have an Asn residue in 28 position, does not occur the formation of this bond, contributing to unstabilization of this region and difficulting the binding of Ca²⁺ cofactor. Phylogenetic studies showed that Asp49-PLA₂s with reduced catalytic inactivity and capable to induce myonecrosis are phylogenetic more related to Lys49-PLA₂s than to others Asp49-PLA₂s, forming a monophyletic myotoxic clade. Serine proteases are responsible for harsh effects in blood coagulation in snakebites. Here, a phylogenetic analysis showed that serine proteases from the two most important snake families when we consider snakebites, Elapidae and Viperidae families can have different evolutive origin. Whereas the serine proteases from Elapidae family are phylogenetically related to active factor Xa, the serine proteases from Viperidae family and from other families of snake venoms are related to enzymes present in several saliva animals. These data indicates that serine proteases do not form a monophyletic clade in snake venoms.

Key words: Snake venom; Protein crystallography; *Bothrops*; Homolog phospholipases A₂; Serine proteases.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. A importância do estudo de proteínas de venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	1
1.2 Fosfolipases A ₂ e serino-proteases: componentes protéicos de elevado interesse científico encontrados em venenos botrópicos.....	2
1.2.1 Fosfolipases A ₂	2
1.2.1.1 Modificações químicas de resíduos específicos.....	11
1.2.1.1.1 Modificação química pelo brometo de p-bromofenacila (BPB)	11
1.2.1.1.2 Modificação química pelo fluoreto de p-nitrobenzenosulfonila (NBSF).....	12
1.2.1.1.3 Modificação química pelo cloreto de o-nitrofenilsulfelina (NPSC).....	13
1.2.1.1.4 Modificação química de resíduos de lisina.....	13
1.2.1.1.5 Modificação química pelo brometo de cianogênio (CNBr)	14
1.2.2 Serino proteases.....	14
2. Objetivos	19
3. Materiais e Métodos.....	21
3.1 Estudos estruturais.....	21
3.1.1 Purificação da proteína alvo a partir do veneno bruto.....	22
3.1.2 Amostras utilizadas no trabalho	22
3.1.2.1 Bothropstoxina-I, uma Lys49-PLA ₂ s de <i>Bothrops jararacussu</i>	22
3.1.2.2 Piratoxina-I, uma Lys49-PLA ₂ s de <i>Bothrops pirajai</i>	22
3.1.2.3 Modificação química pelo brometo de p-bromofenacil (BPB).....	23
3.1.3 Testes de cristalização	23
3.1.4 Coleta de dados de difração de raios-X e obtenção de dados preliminares	27
3.1.5 Substituição molecular, modelagem e refinamento da estrutura tridimensional.....	29
3.1.6 Espalhamento Dinâmico de Luz	31
3.2 Estudos filogenéticos.....	32
4. Resultados e Discussão	35
4.1 Estudos estruturais com Lys49-PLA ₂ s nativas, modificadas quimicamente pelo brometo de p-bromophenacil (BPB) e complexadas com PEG 4000.....	35
4.1.2 Dímero biológico das Lys49-PLA ₂ s.....	54
4.1.3 Revisão do papel da Lys122 na estrutura das Lys49-PLA ₂ s.....	58
4.1.4 O papel do loop de ligação do Ca ²⁺	62
4.2 Estudos evolutivos.....	72
4.2.1 Inferências evolutivas de serino proteases de venenos de répteis da ordem Squamata	72
4.2.2 Inferências evolutivas de fosfolipases de venenos de serpentes da família Viperidae, subfamília Crotalinae	78
5. Conclusão.....	85
6. Publicações e outros resultados	88
Referências Bibliográficas	90

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática do enovelamento de uma sPLA2 do grupo IIA, gerada a partir do monômero da BthA-I-PLA2s de <i>Bothrops jararacussu</i> (PDB ID 1U73).	6
Figura 2: a. Região do loop ligação do íon Ca^{+2} de uma PLA2 cataliticamente ativa de <i>N. naja naja</i> (Asp49-PLA2). b. Região análoga à região de ligação do Ca^{+2} de uma miotoxina II (Lys49-PLA2) cataliticamente inativa de <i>Bothrops asper</i> (Figura adaptada de Arni & Ward, 1996)	7
Figura 3: Etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios-X de maneira simplificada.	21
Figura 4: Representação esquemática da curva de solubilidade para proteínas.	25
Figura 5: Diagrama das etapas de montagem do método de cristalização por difusão de vapor, sistema hanging drop	26
Figura 6: Monocristal preso ao loop	28
Figura 7: Imagem de difração de raios X de um cristal de proteína	29
Figura 8: Cristais de Piratoxina I e Bothropstoxina I modificadas quimicamente pelo BPB... ..	36
Figura 9: Representação em <i>cartoon</i> das estruturas aqui apresentadas.	38
Figura 10: Gráfico de Ramachandran das estruturas apresentadas.	43
Figura 11: Mapa de densidade eletrônica (corte a $1,6 \sigma$) $3 F_{\text{obs}} -2 F_{\text{calc}} $ da região do “sítio ativo” do monômero A da estrutura PrTX-I/BPB mostrando o resíduo His48 ligado covalentemente ao BPB.	44
Figura 12: Interação da molécula de BPB com os resíduos das estruturas da PrTX-I e BthTX-I modificadas quimicamente pelo BPB.....	45
Figura 13: Mapa de densidade eletrônica (corte a $1,2 \sigma$) $2 F_{\text{obs}} -1 F_{\text{calc}} $ das densidades eletrônicas interpretadas como moléculas de polietilenoglicol.....	46
Figura 14: Interações das moléculas de BPB com a proteína na estrutura BthTX-I/PEG4K. .	47
Figura 15: Sobreposição de Ca dos monômeros correspondentes entre as estruturas apo-dBthTX-I, PrTX-I/BPB, dBthTX-I/BPB, BthTX-I/PEG4K.....	48

Figura 16: Sobreposição de $C\alpha$ entre as estruturas apo-dBthTX-I, apo-mBthTX-I/BPB e mBthTX-I/BPB	49
Figura 17: Sobreposição de $C\alpha$ entre os monômeros correspondentes entre as estruturas BthTX-I/PEG4K, PrTX-I/BPB, dBthTX-I/BPB, BthTX-I/ α T e PrTX-I/ α T.	50
Figura 18: Ponte de hidrogênio formada pelos oxigênios H das Tyr119 resultante da reorientação conformacional de um dos monômeros nas estruturas de Lys49-PLA ₂ s.	51
Figura 19: Estrutura de uma Lys49-PLA ₂ s complexada (PEG, BPB, alfa-tocoferol, suramina, ácidos graxos) com destaque em azul, para a região C-terminal, e em sticks, o sítio miotóxico proposto por dos Santos et al. (2009) (Lys20, Arg115, Lys118).....	52
Figura 20: Modelo para caracterização estrutural das mudanças oligoméricas sofridas pelas Lys49-PLA ₂ s complexadas usando dois ângulos: θ_A (ângulo de abertura) indica o valor de abertura entre os monômeros definido pelo vetores A_1 (laranja) e B_1 (azul); θ_T (ângulo de torção) indica o ângulo de torção entre os planos α (bege) e β (azul) ocupado pelas α -hélices h2 e h3 dos monômeros A e B, respectivamente.	53
Figura 21: Comparação entre os fatores temperatura das estruturas diméricas	54
Figura 22: Gráfico do espalhamento dinâmico de luz (DLS) da bothropstoxina I (BthTX-I) a 293 K.....	55
Figura 23: Representação das duas conformações diméricas possíveis para as Lys49-PLA ₂ s: o “alternativo” (em verde) e “convencional” (azul/verde) dímeros.....	58
Figura 24: Variação da posição das cadeias laterais dos resíduos de Lys122 frente à ligação peptídica Cys29/Gly30.	60
Figura 25: Interações que a Lys122 realiza com outros resíduos, que não a Cys29, entre as mais diversas estruturas das Lys49-PLA ₂ s.....	62
Figura 26: Sobreposição de $C\alpha$ de um dos monômeros entre estruturas de Lys49, Arg49 e Asp49-PLA ₂ s. Os números referem-se aos números dos resíduos que ali se localizam.	64
Figura 27: Alinhamento da região do <i>loop</i> de ligação do Ca^{2+} de sequências de Asp49-PLA ₂ s, Arg49-PLA ₂ s e Lys49-PLA ₂ s presentes no NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez).....	66
Figura 28: Posição da cadeia lateral dos resíduos Tyr28 (nas Asp49-PLA ₂ s) e Asn28 (nas Arg49 e Lys49-PLA ₂ s)..	68

Figura 29: Ponte de hidrogênio formado pelo oxigênio H da Tyr27 com o N da cadeia principal da Gly35, que leva a estabilização do *loop* de ligação de Ca^{2+} nas Asp49-PLA₂s.... 70

Figura 30: Distância *d* que reflete a abertura do *loop* de ligação de Ca^{2+} estabilizado pela ponte de hidrogênio formada pelo oxigênio H da Tyr com o N da cadeia principal da Gly35.71

Figura 31: Árvore filogenética de serino proteases de veneno de vertebrados da ordem Squamata. 73

Figura 32: Árvore filogenética de serino proteases de serpentes da família Elapidae..... 76

Figura 33: Árvore filogenética de fosfolipases A₂ de venenos de serpentes da família Viperidae, subfamília Crotalinae. 79

Lista de tabelas

Tabela 1: Dados de cristalização e estatísticas da coleta de dados	39
Tabela 2: Estatística do refinamento das estruturas	40
Tabela 3: Valores de r.m.s.d. para a sobreposição de C α entre os monômeros correspondentes entre as estruturas apo-dBthTX-I, PrTX-I/BPB, dBthTX-I/BPB e BthTX-I/PEG4K (Å).	48
Tabela 4: Valores de r.m.s.d. para a sobreposição de C α entre as estruturas monoméricas, apo-mBthTX-I e mBthTX-I/BPB e os monômeros da estrutura dimérica apo-dBthTX-I (Å).	49
Tabela 5: Valores de r.m.s.d. para a sobreposição de C α entre os monômeros correspondentes entre as estruturas apo-dBthTX-I, PrTX-I/BPB, dBthTX-I/BPB, BthTX-I/PEG4K, BthTX-I/ α T e PrTX-I/ α T (Å).	49
Tabela 6: Ângulos de torção (θ T) e abertura (θ A) para as estruturas de Lys49-PLA2s nativas e complexadas (°).....	53
Tabela 7: Valores da área de interface e ganho de energia livre de solvatação (Δ iG) para as duas possíveis conformações oligoméricas das Lys49-PLA2s.....	57
Tabela 8: Comparação dos valores de B-factor (fator temperatura) médio entre os átomos da cadeia lateral do resíduo Lys122 e os valores médios de suas respectivas estruturas e sumarização da posição deste resíduo entre as estruturas de Lys49-PLA2s.....	60
Tabela 9: Valores de r.m.s.d. para a sobreposição de C α da região do loop de ligação de Ca ²⁺ entre estruturas de Lys49, Arg49 e Asp49-PLA2s (Å).....	65
Tabela 10: Códigos utilizados no alinhamento da região do <i>loop</i> de ligação do Ca ²⁺ de sequências de Asp49-PLA ₂ s, Arg49-PLA ₂ s e Lys49-PLA ₂ s.....	67
Tabela 11: Valor da distância d que reflete a abertura do loop de ligação de Ca ²⁺ em estruturas Asp49, Arg49 e Lys49-PLA2s (Å).....	71
Tabela 12: Códigos utilizados nas árvores filogenéticas de serino proteases de vertebrados da ordem Squamata e da família Elapidae.....	74
Tabela 13: Sequências homólogas às serino proteases do veneno de Elapidae encontradas no banco de dados do NCBI através do programa BLAST (Altschul et al., 1990).	77
Tabela 14: Sequências homólogas às serino proteases do veneno de Viperidae, Colubridae, Hydrophiidae, Varanidae e Helodermatidae encontradas no banco de dados do NCBI através do programa BLAST (Altschul et al., 1990).....	77

Tabela 15: Códigos utilizados na árvore filogenética de fosfolipases A2 de venenos de serpentes da família Viperidae, subfamília Crotalinae.	83
---	----

Abreviaturas

- PLA₂: Fosfolipase A₂.
- svPLA₂: Fosfolipase A₂ de veneno de serpentes.
- SVSPs: Serino protease de veneno de serpentes.
- Asp49-PLA₂s: Fosfolipase A₂ que possui um resíduo de ácido aspártico na posição 49.
- Lys49-PLA₂s: Fosfolipase A₂ que possui um resíduo de lisina na posição 49.
- Arg49-PLA₂s: Fosfolipase A₂ que possui um resíduo de arginina na posição 49.
- Gln49-PLA₂s: Fosfolipase A₂ que possui um resíduo de glutamina na posição 49.
- Asn49-PLA₂s: Fosfolipase A₂ que possui um resíduo de asparagina na posição 49.
- BPB: brometo de *p*-bromofenacil.
- NBSF: fluoreto de *p*-nitrobenzenosulfonil.
- NPSC: cloreto de *o*-nitrofenilsulfelina.
- CNBr: brometo de cianogênio
- PEG: polietileno
- apo-mBthTX-I: Estrutura nativa da Bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* que apresenta uma molécula na unidade assimétrica.
- apo-dBthTX-I: Estrutura nativa da Bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* que apresenta duas moléculas na unidade assimétrica.
- mBthTX-I/BPB: Estrutura da Bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* modificada quimicamente pelo BPB que apresenta uma molécula na unidade assimétrica.
- dBthTX-I/BPB: Estrutura da Bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* modificada quimicamente pelo BPB que apresenta duas moléculas na unidade assimétrica.
- BthTX-I/PEG4K: Estrutura da Bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* cristalizada com PEG 4000.
- BthTX-I/ α T: Estrutura da Bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* complexada com alfa-tocoferol.

BthTX-I/PEG400: Estrutura da Bothropstoxina I de *Bothrops jararacussu* cristalizada com PEG 400

PrTX-I/ α T: Estrutura da Piratoxina I de *Bothrops pirajai* complexada com alfa-tocoferol.

PrTX-I/BPB: Estrutura da Piratoxina I de *Bothrops pirajai* modificada quimicamente pelo BPB

PrTX-II/ácido graxo: Estrutura da Piratoxina II de *Bothrops pirajai* cristalizada com ácido graxo.

MjTX-II/ácido esteárico: Estrutura da Moojenitoxina II de *Bothrops moojeni* cristalizada com ácido esteárico.

apo-BaspTX-II: Estrutura nativa da miotoxina II de *Bothrops asper*.

BaspTX-II/suramina: Estrutura da miotoxina II de *Bothrops asper*.complexada com suramina.

Introdução

1. Introdução

1.1. A importância do estudo de proteínas de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*

As serpentes sempre despertaram curiosidade e fascínio entre os homens, fato este comprovado pela influência que estes animais exerceram e exercem em vários aspectos da vida humana através de mitos, símbolos e religiões. Este interesse também se refletiu na ciência, com a consequente realização de muitos estudos a respeito das propriedades e componentes dos venenos de serpentes. A importância dada a tais estudos é claramente evidenciada pelo grande volume de artigos que tratam do estudo dos venenos destes animais e seus constituintes publicados em periódicos especializados em toxicologia (Guimaraes & Carlini, 2004)

No Brasil, o estudo dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e potenciais moléculas inibidoras das frações biologicamente ativas nestes venenos é especialmente relevante, uma vez que este gênero possui 24 espécies no Brasil, com ampla distribuição geográfica, e é responsável por 90% dos acidentes ofídicos que ocorrem no país (Melgarejo, 2003). Além disso, devido à grande variedade de efeitos farmacológicos e bioquímicos apresentados pelas proteínas e peptídeos que compõem os venenos destes répteis, o estudo aprofundado destas toxinas podem contribuir de forma decisiva para aquisição de novos e importantes dados a respeito dos efeitos biológicos destas toxinas nos organismos. Por fim, estes estudos podem ser de grande utilidade para o desenvolvimento de novos medicamentos e produtos de interesse biotecnológico, como, por exemplo, o hipotensor captopril, desenvolvido a partir de uma bradiginina isolada do veneno de *Bothrops jararaca* (Smith & Vane, 2003) e, mais recentemente, a cola de fibrina utilizada como adesivo cirúrgico preparada a partir de uma *thrombin-like* isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Barbosa *et al.*, 2007).

1.2 Fosfolipases A₂ e serino-proteases: componentes protéicos de elevado interesse científico encontrados em venenos botrópicos

1.2.1 Fosfolipases A₂

Um dos principais componentes do veneno botrópicos são as fosfolipases A₂ (PLA₂s) (PLA₂ - E.C.3.1.1.4). Estas são enzimas correspondem a 4% do veneno bruto seco e são encontradas em um grande número de organismos e de fluidos biológicos (Schaloske & Dennis, 2006; Fox & Serrano, 2008). As fosfolipases A₂ são pequenas, estáveis e que promovem a hidrólise da ligação éster *sn*-2 de fosfolipídios, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídios, como por exemplo, o ácido aracdônico (Van & De Haas, 1963; Schaloske & Dennis, 2006). Estes produtos, por sua vez, participar de um grande número de processos biológicos. O ácido aracdônico, por exemplo, podem ser convertidos em eicosanóides, que são utilizados como segundo mensageiros em grande número de processos fisiológicos e patológicos, como regulação do sono, respostas imunes, mediação de inflamações e nocicepção (Tsuboi *et al.*, 2002). Já os lisofosfolipídios, podem servir como precursores envolvidos na proliferação, migração e controle da apoptose celular em diversos processos inflamatórios (Prescott *et al.*, 2000; Moolenaar *et al.*, 2004).

Inicialmente, as fosfolipases A₂ foram classificadas em três grupos, de acordo com a sua sequência de aminoácidos (Davidson & Dennis, 1990). Em 1994, foi estabelecido o primeiro sistema de numeração que classificou estas enzimas em quatro grupos (Dennis, 1994). Essa classificação foi revisada alguns anos depois, reclassificando estas enzimas em onze grupos, tendo como critérios o número de pontos dissulfeto e a similaridade das sequências de aminoácidos (Six & Dennis, 2000). Com o grande avanço nas técnicas de biologia molecular nos últimos anos, um grande número

de novas PLA₂s foram descobertas e uma nova revisão da classificação se tornou necessária. Recentemente, as PLA₂s foram classificadas em quinze grupos, que podem ser organizados em cinco grande grupos: as PLA₂ secretadas (sPLA₂), as PLA₂ citosólicas (cPLA₂), as PLA₂ Ca²⁺ independentes (iPLA₂), os fatores de ativação plaquetária do tipo acetilhidrolases (PAF-AH) e as PLA₂ lisossomais (Schaloske & Dennis, 2006). O grupo das sPLA₂s possui dezesseis subgrupos, que incluem as PLA₂s de veneno de serpentes (svPLA₂s). As fosfolipases dos venenos das famílias Elapidae e Viperidae, as mais importantes em relação a envenenamento ofídico, pertencem, respectivamente, aos grupos IA e IIA/IIB. Esta classificação é baseada na similaridade das sequências, posição das pontes dissulfeto e inserção de *loops* (Six & Dennis, 2000; Schaloske & Dennis, 2006). As svPLA₂s classificadas nos grupos IA e IIA possuem seis pontes dissulfeto, sendo que seis delas são conservadas nas duas famílias, com diferenças nas pontes Cys11/Cys77, exclusiva de Elapidae, e Cys51/Cys133, exclusiva de Viperidae. Além disso, as svPLA₂s classificadas no grupo IIB possui apenas seis pontes dissulfeto, faltando a ponte Cys61/Cys91 (Arni & Ward, 1996; Schaloske & Dennis, 2006)

O sítio catalítico das fosfolipases A₂ é composto por uma histidina (His48, de acordo com o sistema de numeração para PLA₂s proposto por Renetseder *et al.* (1990)) próxima a um aspartato conservado (Asp99) e um ácido aspártico na posição 49, que é essencial para a mobilização do cofator Ca²⁺ (Arni & Ward, 1996; Magro *et al.*, 2009). Duas propostas foram realizadas na tentativa de explicar o mecanismo catalítico da hidrólise de fosfolipídios das fosfolipases A₂. A primeira proposta foi realizada por Scott, White *et al.* (1990) baseada em estruturas de fosfolipases das classes IA e III nativas e complexadas com análogos de transição. Neste modelo, conhecido como *single-water mechanism*, o átomo Nδ1 da His48 é estabilizado pelo átomo de oxigênio

do grupo carboxil do Asp99, que, por sua vez, forma uma ponte de hidrogênio com o oxigênio hidroxil da Tyr53 (Scott, Otwinowski *et al.*, 1990; Scott, White *et al.*, 1990). Após a ligação do fosfolípido, o átomo N δ 1 da His48 retira um próton de uma molécula de água estrutural, iniciando o ataque nucleofílico da posição *sn*-2 do substrato, formando intermediário oxianion tetraédrico. Esse intermediário tetraédrico é estabilizado pelo cofator Ca²⁺, que por sua vez, está ligado ao oxigênio do carboxil da Asp49, aos átomos de oxigênio da cadeia principal do loop de ligação de Ca²⁺ (região 26-35) e duas águas estruturais. Após o colapso do intermediário tetraédrico e a liberação dos produtos da hidrólise, três moléculas de água se movem para a região do sítio ativo. Posteriormente, foi proposto um segundo mecanismo, conhecido como *assisting-water mechanism*, onde duas moléculas de água estariam na formação e na quebra, respectivamente, do intermediário tetraédrico (Rogers *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1998). Neste modelo, a molécula de água que gera o ataque nucleofílico é coordenada pelo Ca²⁺. Essa molécula de água também é estabilizada por uma segunda molécula de água que, por sua vez, forma pontes de hidrogênio com a His48 e com o Asp99. Este mecanismo é suportado pela estrutura cristalográfica de um mutante His48Gln de uma fosfolipase humana do grupo IIA (Edwards *et al.*, 2002). Esse mutante ainda possui uma significativa atividade catalítica e apresenta as regiões do sítio catalítico e do loop de ligação do Ca²⁺ sem desvios estruturais significantes. Levando em conta o *assisting-water mechanism*, o Gln funcionaria de maneira similar a His48, formando uma ponte de hidrogênio com a molécula de água que é responsável por estabilizar a molécula de água catalítica (Edwards *et al.*, 2002).

Apesar das diferenças entre os dois mecanismos apresentados, diversos estudos demonstraram que o íon Ca²⁺ co-fator obrigatório para a catálise das sPLA₂s. Estudos que o substituíram por outros cátions divalentes (Cd²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺) mostraram que o

Cd^{2+} , ao contrário dos outros íons, era capaz de fazer com que a enzima ainda se ligasse com o substrato, mas, ainda, apenas o Ca^{2+} suportava atividade catalítica (Yu *et al.*, 1993). Entretanto, experimentos mais recentes demonstraram também que os íons Ni^{2+} e Co^{2+} eram capazes de suportar significativa atividade catalítica em determinados grupos polares de fosfolipídios (Yu *et al.*, 1998). Esses resultados podem ser atribuídos a diferentes coordenações na geometria da coordenação entre os íons e os fosfolipídios, indicando uma notável plasticidade do sítio ativo (Yu *et al.*, 1998).

O *foldings* típico das PLA₂s de veneno de serpentes (Figura 01) é extremamente conservado em todas as enzimas das classes I e II e é constituído por duas longas α -hélices ligadas por pontes dissulfeto em conjunção com o *loop* de ligação do Ca^{2+} (hélices 2 e 3; resíduos 37-54 e 90-109; respectivamente) (Arni & Ward, 1996; Magro *et al.*, 2009). Embora essas duas hélices não apresentem um claro caráter anfipático, as cadeias laterais dos aminoácidos hidrofílicos estão geralmente expostas para o solvente e as dos resíduos hidrofóbicos apontando para o interior da proteína, com exceção dos resíduos que compõem o sítio catalítico: His48, Asp49, Asp99 e Tyr52 (Arni & Ward, 1996; Magro *et al.*, 2009). Outras regiões estruturais bem conservadas são a hélice N-terminal (1-13), a região das folhas β (75-84), o *loop* de ligação do Ca^{2+} (26-35), o “*loop* elapídico” (uma inserção de dois a três aminoácidos na região 52-65 presente apenas nas enzimas da classe IA), a *short-helix* (15-22) e o *loop* C-terminal (115-133). Estas regiões podem adotar diversas orientações, especialmente o *loop* C-terminal, uma região extremamente flexível. Além da sua típica ação fosfolipídica, um grande variedade de outras atividades farmacológicas foram descritas para as fosfolipases de venenos de serpentes, como pré (Westerlund *et al.*, 1992) e pós-neurotoxicidade (Bon *et al.*, 1979), cardiotoxicidade (Fletcher *et al.*, 1981), miotoxicidade (Gutierrez *et al.*, 1991), bactericida (Paramo *et al.*, 1998), inibição de agregação plaquetária (Yuan *et al.*, 1993),

edema (Lloret & Moreno, 1993), hemólise (Condrea, Yang *et al.*, 1981), anti-coagulante (Rosenberg *et al.*, 1983), convulsionante (Fletcher *et al.*, 1980) e hipotensiva (Huang, 1984).

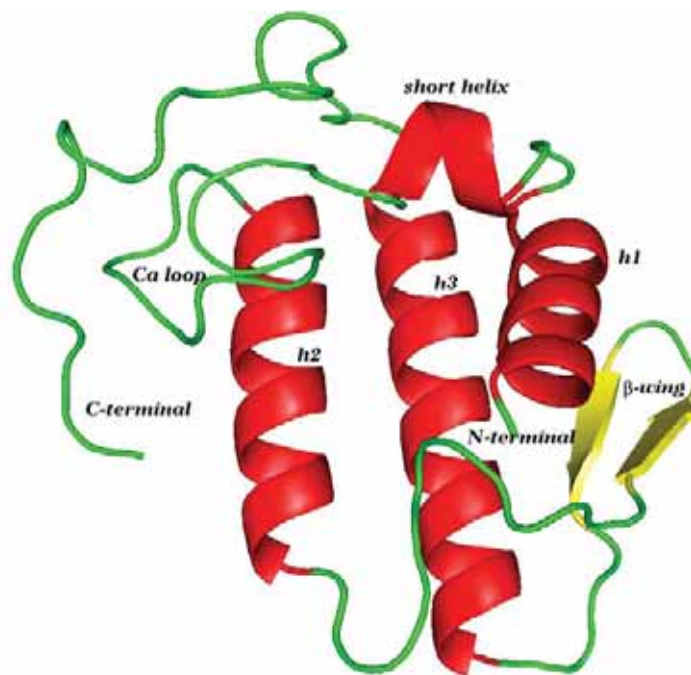


Figura 1: Representação esquemática do enovelamento de uma sPLA2 do grupo IIA, gerada a partir do monômero da BthA-I-PLA_{2s} de *Bothrops jararacussu* (PDB ID 1U73).

Em 1984, foi isolada pela primeira vez uma PLA_{2s} homóloga do veneno de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (Maraganore *et al.*, 1984). Essa importante classe de proteínas é encontrada em um grande número de serpentes da Ásia e da América e é constituída por moléculas que são incapazes se ligar ao íon Ca²⁺ (Holland *et al.*, 1990). Estas proteínas apresentam uma substituição natural do ácido aspártico por uma lisina na posição 49; e por essa razão, essas moléculas também são conhecidas, além de PLA_{2s} homólogas, como Lys49-PLA_{2s}; em contrapartida às fosfolipases catalíticas, conhecidas como Asp49-PLA_{2s}. Atualmente, aproximadamente 40 sequencias de aminoácidos de Lys49-PLA_{2s} estão depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e 19 estruturas cristalográficas, em formas nativa e complexadas,

estão depositadas no *Protein Data Bank* (PDB). Além disso, outras variações de PLA₂s com alanina, arginina, asparagina, cisteína, glutamina e serina na posição 49 têm sido identificadas recentemente (Liu *et al.*, 1992; Polgar *et al.*, 1996; Pan *et al.*, 1998; Bao *et al.*, 2005; Jabeen *et al.*, 2006; Mebs *et al.*, 2006).

Inicialmente, acreditava-se que as Lys49-PLA₂s eram cataliticamente inativas devido a sua incapacidade de se ligar o íon Ca²⁺, conseqüentemente, incapaz de estabilizar o intermediário tetraédrico formado na reação catalíticas das Asp49-PLA₂ (Maraganore *et al.*, 1984). Estudos estruturais suportaram essa hipótese, mostrando que o ε-grupo amino da Lys49 ocupa exatamente a posição do íon Ca²⁺ nas Asp49-PLA₂ (Holland *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1992; Arni & Ward, 1996) (Figura 02). Além disso, experimentos de mutação sítio-dirigida com PLA₂s suína (Van Den Bergh *et al.*, 1988) e bovina (Li *et al.*, 1994) mostraram que o mutante Asp49Lys sofre uma severa redução em sua habilidade de ligar Ca²⁺ com uma concomitante perda da atividade catalítica.

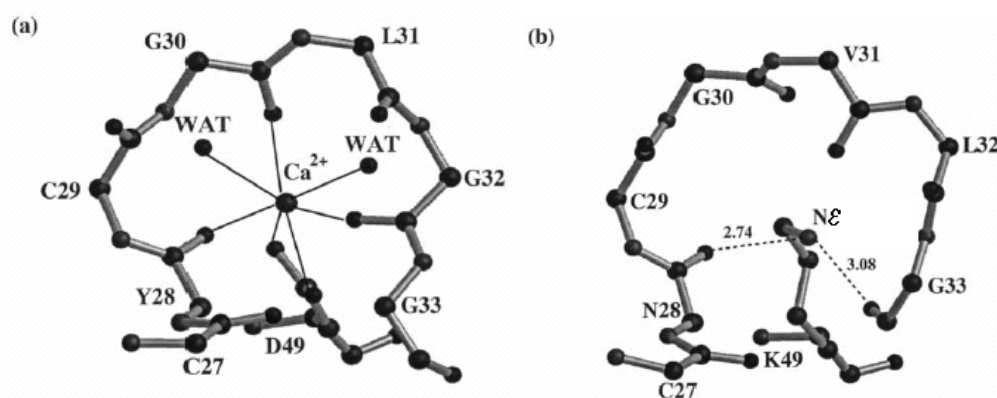


Figura 2: a. Região do loop ligação do íon Ca²⁺ de uma PLA₂ cataliticamente ativa de *N. naja naja* (Asp49-PLA₂). b. Região análoga à região de ligação do Ca²⁺ de uma miotoxina II (Lys49-PLA₂) cataliticamente inativa de *Bothrops asper* (Figura adaptada de Arni & Ward, 1996)

Apesar desta aparente inatividade catalítica destas moléculas, alguns estudos *in vitro* mostraram que as Lys49-PLA₂ ainda apresentam uma pequena atividade catalítica (Liu *et al.*, 1990; Yoshizumi *et al.*, 1990; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1995; Shimohigashi

et al., 1995; Mancin *et al.*, 1997). Entretanto, estes estudos foram criticados porque foram realizados com proteínas purificadas do veneno bruto e, por essa razão, possíveis traços de contaminação de Asp49-PLA₂s podem ter sido responsáveis pela atividade enzimática residual observada. Além disso, experimentos com a bothropstoxina I (BthTX-I) de *Bothrops jaracussu* recombinante mostraram que ela era incapaz de realizar catálise em substratos artificiais *in vitro*, ao contrário da proteína purificada diretamente do veneno (Ward *et al.*, 2001). Por outro lado, apesar desta inatividade catalítica das Lys49-PLA₂s contra substratos artificiais *in vitro*, foi observado em alguns experimentos uma grande liberação de ácidos graxos naturais após exposição de culturas de células marcadas radioativamente às Lys49-PLA₂s (Soares *et al.*, 2002). Apesar destas evidências, é importante enfatizar, como os próprios autores deste trabalho faz, a impossibilidade de determinar se esta liberação de ácidos graxos é causada por uma possível (e improvável) ação catalítica das Lys49-PLA₂s ou por uma ativação indireta da lipases celulares causada por um influxo intracelular de Ca²⁺

Experimentos de mutação sítio dirigida com Lys49-PLA₂s mostraram que o mutante Lys49Asp permanece sem atividade catalítica, demonstrando que outras alterações estruturais, além da simples substituição Asp49Lys, é responsável pela ausência de atividade enzimática (Ward *et al.*, 2002). O estudo estrutural de uma Lys49-PLA₂ do veneno de *Bothrops pirajai* complexada com ácido graxo propôs que a Lys122 (conservada em todas as Lys49-PLA₂s, mas rara em Asp49-PLA₂s) interagiria com o carbonil da Cys29, hiperpolarizando a ligação peptídica entre os aminoácidos Cys29 e Gly30 (Lee *et al.*, 2001). Essa forte interação provocaria um aumento da afinidade pela cabeça do fosfolípido, impedindo a liberação da molécula de ácido graxo produzida por uma hidrólise inicial, interrompendo o ciclo catalítico, e, portanto, tornando as Lys49-PLA₂s cataliticamente inativas. Reforçando esta hipótese, Magro *et al.*, analisando oito

Lys49-PLA₂s diméricas, observou que a Lys122 interage com a Cys29 nos dois monômeros apenas nas estruturas que apresentam ligantes em seu canal hidrofóbico. Por outro lado, as estruturas que não apresentam estes ligantes, a Lys122 apresenta uma conformação alternativa em um ou nos dois monômeros (Magro *et al.*, 2003).

Apesar da ausência de atividade catalítica, as Lys49-PLA₂s, com exceção da Asp49, conservam todos os outros resíduos que participam da hidrólise de fosfolípidios (His48, Tyr53 e Asp99). Além disso, são responsáveis pela indução de mionecrose através de um mecanismo de dano à membrana Ca²⁺-independente, que não é eficientemente neutralizado pela soroterapia, podendo levar a perda permanente de tecido e amputação (Gutierrez & Lomonte, 1995). Este efeito miotóxico foi observado pela primeira vez em 1986 utilizando ensaios de liberação de creatina quinase no plasma sanguíneo e técnicas histológicas (Gutierrez *et al.*, 1986). Anos depois, Lomonte, Tarkowski *et al.* (1994) observou uma ação citolítica da miotoxina II de *Bothrops asper* em uma grande variedade de tipos celulares em cultura, incluindo mioblastos de músculo esquelético (Lomonte, Tarkowski *et al.*, 1994). Graças a capacidade do polissacarídeo heparina de inibir a atividade miotóxica da BthTX-I (Lomonte, Moreno *et al.*, 1994), Lomonte, Tarkowski *et al.* (1994) propuseram então que a região responsável por este efeito miotóxico deveria ser uma região que combinasse aminoácidos básicos e hidrofóbicos. Posteriormente, diversos experimentos utilizando peptídeos sintéticos demonstraram que a região 115-129, rica em aminoácidos básicos e hidrofóbicos, mostrou capacidade de se ligar à heparina e de exercer atividade miotóxica, com destaque para a necessidade de um resíduo hidrofóbico na posição 121 para desorganização da membrana (Nunez *et al.*, 2001; Lomonte, Angulo & Santamaria, 2003). Dessa maneira, para o rompimento da membrana muscular, é seria necessária a formação de interações eletrostáticas entre os

resíduos catiônicos da porção C-terminal das Lys49-PLA₂s e porções carregadas negativamente dos fosfolipídios da membrana (Lomonte, Angulo & Calderon, 2003). Experimentos de mutação sítio dirigida também apontaram a porção C-terminal como responsável pela expressão da atividade miotóxica ao mostrarem que a substituição dos resíduos Tyr117, Arg118, Tyr119, Lys122, e Phe125 por Ala resultam em significativa redução desta atividade (Ward *et al.*, 2002; Chioato *et al.*, 2007). Além desses experimentos, estudos estruturais também reforçam a região C-terminal como responsável pela expressão da miotoxicidade. Ambrosio *et al.* (2005) propuseram que a retenção da molécula de ácido graxo no “sítio ativo” das Lys49-PLA₂s, descrita por Lee *et al.* (2001), promoveria um grande aumento na exposição dos aminoácidos hidrofóbicos do C-terminal frente ao solvente, provocando, portanto, um aumento na interação entre as Lys49-PLA₂s e a membrana celular (Ambrosio *et al.*, 2005). Dos Santos *et al.* (2009), por sua vez, propuseram um sítio miotóxico exclusivo para Lys49-PLA₂s de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, formado por um resíduo da região N-terminal (Lys20) e dois resíduos da porção C-terminal (Lys155 e Arg118) (Dos Santos *et al.*, 2009). Recentemente, foi identificado um novo grupo de proteínas, as Arg49-PLA₂s, que possuem uma substituição natural na posição 49 do Asp por uma Arg e, da mesma maneira que as Lys49-PLA₂s, são desprovidas de atividade catalítica mas são capazes de induzir mionecrose através de um mecanismo Ca²⁺ independente pouco conhecido (Mebs *et al.*, 2006; Murakami *et al.*, 2008).

Conforme se pode observar até aqui, apesar do grande número de trabalhos já realizados, ainda restam muitas dúvidas a respeito do mecanismo de ação das Lys49-PLA₂s e dos motivos que provocam a ausência da atividade catalítica nestas proteínas. Um dos caminhos que podem trazer pistas para a solução destas questões, e que será

abordado a seguir, é a avaliação dos efeitos tóxicos destas proteínas após modificações químicas de aminoácidos específicos.

1.2.1.1 Modificações químicas de resíduos específicos

Como observado anteriormente, modificações químicas de resíduos específicos parecem ser uma valiosa tentativa de correlacionar a estrutura com a função das PLA₂s. Dentre as substâncias mais utilizadas estão o brometo de *p*-bromofenacila (BPB), o fluoreto de *p*-nitrobenzenosulfonila (NBSF), o cloreto de *o*-nitrofenilsulfelina (NPSC), além de acetilação de resíduos de lisina e da clivagem dos primeiros resíduos da porção N-terminal através da ação do brometo de cianogênio (CNBr). O objetivo destas modificações é, através da inibição parcial ou completas das funções das fosfolipases A₂, se identificar os sítios farmacológicos responsáveis pelo grande número de ações destas fosfolipases.

1.2.1.1.1 Modificação química pelo brometo de p-bromofenacila (BPB)

O brometo de *p*-bromofenacila (BPB) é responsável pela modificação química de resíduos de histidina, através de uma reação de alquilação, e vêm sendo utilizado há mais de 30 anos nos estudos da relação da estrutura/função de fosfolipases A₂ (Volwerk *et al.*, 1974) devido, como já comentado, o resíduo His48 ser de vital importância à atividade catalítica destas enzimas.

No gênero *Bothrops*, a alquilação de His48 pelo BPB de algumas Asp49-PLA₂s ácidas levou à perda total da atividade catalítica e redução considerável das atividades farmacológicas, sugerindo que estes efeitos dependem da integridade da região responsável pela execução da atividade catalítica (Roberts *et al.*, 1977; Miyake *et al.*,

1989; Ownby *et al.*, 1999; Andriao-Escarso *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2001). Esta mesma modificação química, quando realizada em duas Asp49-PLA₂s que, interessantemente, além da atividade catalítica também possuem atividade miótoxica (Gutierrez *et al.*, 1991; Toyama *et al.*, 1999), reduziu quase totalmente as atividades catalítica, anti-coagulante, miótoxica e citotóxica, reforçando que a His48 é essencial para a atividade catalítica e que estes efeitos farmacológicos são dependentes, ainda que parcialmente da atividade catalítica (Soares & Giglio, 2003). Entretanto, outras atividades como indução de edema e disrupção de lipossomos, não apresentaram redução significativa, sugerindo uma dissociação parcial os sítios ativo e farmacológico.

Com relação às Lys49-PLA₂s, embora não apresentem atividade catalítica, interessantemente a alquilação da His48 levou a uma redução de 40-50% na atividade miotóxica, 85-90% na citotoxicidade e 15-20% na capacidade de induzir a formação de edema (Soares & Giglio, 2003). Esses resultados sugerem, interessantemente, que a região do “sítio ativo” das Lys49-PLA₂s, embora “inoperante”, está envolvido, mesmo que parcialmente, na expressão destas atividades.

1.2.1.1.2 Modificação química pelo fluoreto de *p*-nitrobenzenosulfonila (NBSF)

O fluoreto de *p*-nitrobenzenosulfonila (NBSF) é responsável pela sulfonação de resíduos de tirosina e também são bastante utilizadas em fosfolipases A₂ devido à participação da Tyr53 durante o processo de hidrólise de fosfolipídios. Esta modificação foi utilizada pela primeira vez no estudo da notexina, uma neurotoxina pré-sináptica do veneno de *Notechis sculatus*, que ao sofrer sulfonação dos resíduos Tyr7 ou 77 reduziu em 80% a toxicidade desta enzima; enquanto que, quando ambos os resíduos eram sulfonados pelo NBSF, a redução chegou a 98% (Yang & Chang, 1991). No entanto, a

atividade catalítica na apresentou uma redução tão significativa (cerca de 30%) e, quando a modificação foi apenas na Tyr77, houve um aumento de 80% desta atividade. Esses resultados sugerem a presença de duas regiões distintas associadas à neurotoxicidade e à atividade fosfolípida (Yang & Chang, 1991).

Nas serpentes do gênero *Bothrops*, a sulfonação das Tyr52 e 73 levam a uma redução parcial da atividade catalítica nas Asp49-PLA₂s (Kuipers *et al.*, 1990; Andriao-Escarso *et al.*, 2000). Já nas Lys49-PLA₂s, a sulfonação dos resíduos de Tyr, a atividade miotóxica reduziu 30%, o rompimento de lisossomos reduziu 20% e a atividade bactericida não mostrou redução significativa (Soares & Giglio, 2003).

1.2.1.1.3 Modificação química pelo cloreto de *o*-nitrofenilsulfelina (NPSC)

O cloreto de *o*-nitrofenilsulfelina (NPSC) é responsável pela sulfonação de resíduos de triptofano. Nas Lys49-PLA₂s, que possuem apenas um resíduo de triptofano (Trp77), o tratamento com NPSC leva a uma leve redução da letalidade, miotoxicidade e grande redução do bloqueio neuromuscular (Soares & Giglio, 2003).

1.2.1.1.4 Modificação química de resíduos de lisina

Um grande número de estudos vem apontando que a carbamilação de resíduos de lisina provoca grandes efeitos sobre as atividades catalíticas e farmacológicas das fosfolipases A₂ (Yang & Chang, 1989; Takasaki *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1994). A carbamilação de 9 entre 10 resíduos de lisina em uma Asp49-PLA₂s de *Naja nigricollis* e de 3 em 5 lisinas em uma Asp49-PLA₂s de *Naja naja atra* reduziu completamente a letalidade e os efeitos anti-coagulante, hemolítico e neurotóxico destas enzimas, embora

nenhuma relação com a atividade enzimática tenha sido observada (Condrea, Fletcher *et al.*, 1981). Em Lys49-PLA₂S, a acetilação dos resíduos de lisina de três miotoxinas básicas de PLA₂S do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, fez com que as lisinas perdessem seu caráter básico e houvesse uma drástica redução das atividades miotóxica, bactericida e de indução de edema (Soares & Giglio, 2003). Estes resultados sugerem que as regiões básicas de PLA₂S neurotóxicas e miotóxicas podem favorecer a interação destas proteínas com as cargas negativas de membranas musculares e nervosas (Gutierrez & Lomonte, 1995).

1.2.1.1.5 Modificação química pelo brometo de cianogênio (CNBr)

O brometo de cianogênio (CNBr) é responsável pela clivagem dos oito primeiros aminoácidos da porção N-terminal. A retirada desse octapeptídeo causa decréscimo da atividade neurotóxica na notexina, sugerindo que a Met8 tenha um papel importante na interação destas enzimas com a membrana do terminal nervoso (Yang & Chang, 1988).

Em Lys49-PLA₂S de serpentes do gênero *Bothrops*, o tratamento com CNBr induz uma redução das atividades miotóxica e citotóxica, redução na formação de edema, da atividade bactericida e da capacidade de romper lisossomos. Entretanto, no caso da modificação química pelo CNBr, temos que considerar que a ausência dos oito primeiros aminoácidos da porção N-terminal, pode levar a alterações nas estruturas secundárias e terciárias destas proteínas (Soares & Giglio, 2003).

1.2.2 Serino proteases

Serino proteases de venenos de serpentes (SVSPs) são uma das classes de toxinas mais bem estudadas e caracterizadas que afetam o sistema de coagulação

sangüínea (Serrano & Maroun, 2005). São glicoproteínas, com um número variável de sítios de glicosilação, cujo número e seqüência diferenciam uma SVSP de outra. Estas enzimas agem sobre vários componentes da cascata de coagulação, células e outros constituintes do sangue, como os componentes dos sistemas calicreína-cinina e de fibrinólise, com a finalidade de promover um desequilíbrio no mecanismo de coagulação de presas e vítimas de acidentes ofídicos atacadas por serpentes que apresentem este tipo de toxina em seus venenos (Markland, 1997; Pirkle, 1998). Halfon & Crick (1998) apontam que as SVSPs pertencem ao maior grupo de peptidases existente: a família S1 das tripsinas (clã SA).

O mecanismo de hidrólise destas proteínas é caracterizado pela presença de um resíduo de serina (Ser195) altamente reativo em seus sítios catalíticos. Este resíduo é responsável pela formação do complexo intermediário de catálise do substrato, que é estabilizado por um resíduo de histidina (His57) e outro de aspartato (Asp102) presentes nos sítios catalíticos das SVSPs (Barrett & Rawlings, 1995). Essa tríade catalítica é altamente conservada dentre as serino proteases, tanto de venenos de serpentes quanto de mamíferos (Burkhart *et al.*, 1992; Matsui *et al.*, 1998; Matsui *et al.*, 2000)

Sob o ponto de vista funcional, as SVSPs podem apresentar as mais variadas funções. Algumas delas são conhecidas como enzimas *thrombin-like*, pelo fato de “mimetizarem” alguns mecanismos bioquímicos da trombina, como por exemplo, quebra de moléculas de fibrinogênio (formando moléculas de fibrina), indução de agregação de plaquetas, ativação de fator V e da proteína C, promovendo uma repentina coagulação do sangue da presa (Serrano & Maroun, 2005). Existem algumas SVSPs, no entanto, com ação específica de ativação de plasminogênio, convertendo-o em plasmina, que possui a função anticoagulante de clivagem de fibrina (Serrano *et al.*, 1995). Existem também as SVSPs conhecidas como enzimas *kallikrein-like*, que

possuem pouca habilidade de clivar fibrinogênio, mas com grande capacidade de produção de bradicinina a partir de quininogênio, induzindo a queda de pressão arterial (Markland *et al.*, 1982; Serrano *et al.*, 1998; Oyama & Takahashi, 2003). Entretanto, existem algumas SVSPs capazes de ao mesmo tempo clivar fibrinogênio e produzir bradicinina (Matsui *et al.*, 1998). Por fim, existem ainda SVSPs com função de ativação de protrombinas dos tipos C e D (Kini, 2005). As SVSPs ativadoras de protrombinas do tipo D são funcionalmente e estruturalmente conservados com o fator de coagulação Xa de mamíferos, enquanto que as do tipo C é um complexo protéico formado por duas subunidades, uma enzimática e uma não enzimática, similar ao complexo formado pelos fatores de coagulação Xa e Va de mamíferos, sendo a subunidade não enzimática similar ao fator Va e a enzimática similar ao fator Xa (Rao *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2004; St Pierre *et al.*, 2005).

As SVSPs apresentam um intrigante paradoxo: a apesar de possuírem entre si estrutura e atividade catalítica primária em um alto grau de identidade, estas enzimas mostram uma alta especificidade frente a determinados substratos (Serrano & Maroun, 2005). Aparentemente, as SVSPs interagem com seus substratos através de epítomos que apresentam resíduos de aminoácidos responsáveis por mais de uma atividade. Ademais, algumas observações experimentais indicaram que sítios de ligação secundários e epítomos lineares também podem explicar as bases moleculares da especificidade apresentada por estas proteases. Por outro lado, é de conhecimento comum que carboidratos influenciam substancialmente a conformação estrutural e as atividades funcionais de enzimas glicosiladas, o que evidencia a possível importância destes componentes para o funcionamento dos mecanismos bioquímicos específicos de cada uma destas enzimas (Serrano & Maroun, 2005). No caso específico das SVSPs que apresentam atividade coagulante, tanto dados experimentais quanto predições teóricas

indicaram que resíduos de superfície positivamente carregados são muito importantes para o reconhecimento do fibrinogênio. Contudo, este mecanismo de interação SVSP/fibrinogênio ocorre de forma bastante distinta daquele apresentado pela trombina (Castro *et al.*, 2001; Maroun & Serrano, 2004).

Devido a este elevado grau de identidade existente entre as SVSPs, não é possível determinar os tipos de interações entre estas moléculas e seus substratos específicos apenas com base em suas similaridades com outras enzimas (Amiconi *et al.*, 2000). Por conta disto, a análise filogenética deste grupo de proteínas pode ser fonte de dados bastante interessantes a respeito de sua história evolutiva e fornecer pistas aos estudos estruturais, o que ajudaria a resolver o paradoxo típico destas moléculas, ou seja, sobre como enzimas com um alto grau de similaridade seqüencial e estrutural podem promover a catálise de macromoléculas tão distintas entre si. A elucidação desta questão, somada ao estudo das possíveis aplicações biotecnológicas destas proteínas, podem concorrer para a geração de novas classes de medicamentos e métodos de diagnóstico a serem utilizados no combate de coagulopatias e outras doenças do sistema circulatório.

Objetivos

2. Objetivos

O presente trabalho tem como finalidade estudar as Lys49-PLA₂s de venenos de serpentes nas formas nativa e modificadas quimicamente pelo brometo de *p*-bromofenacil (BPB), através da técnica de cristalografia de raios-X. Dessa maneira, visamos realizar detalhados estudos estruturais comparativos entre estas estruturas e outras PLA₂s, homólogas ou não, na tentativa de melhorar o entendimento da relação estrutura-função destas proteínas. Por fim, é objetivo deste trabalho também conhecer a evolução e o parentesco filogenético das serino proteases e fosfolipases A₂ de venenos de serpentes.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Estudos estruturais

O fluxograma da Figura 3 mostra, de maneira simplificada, as etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios-X de PLA₂ de veneno de serpentes. A maneira como estas etapas serão realizadas são discutidas a seguir.

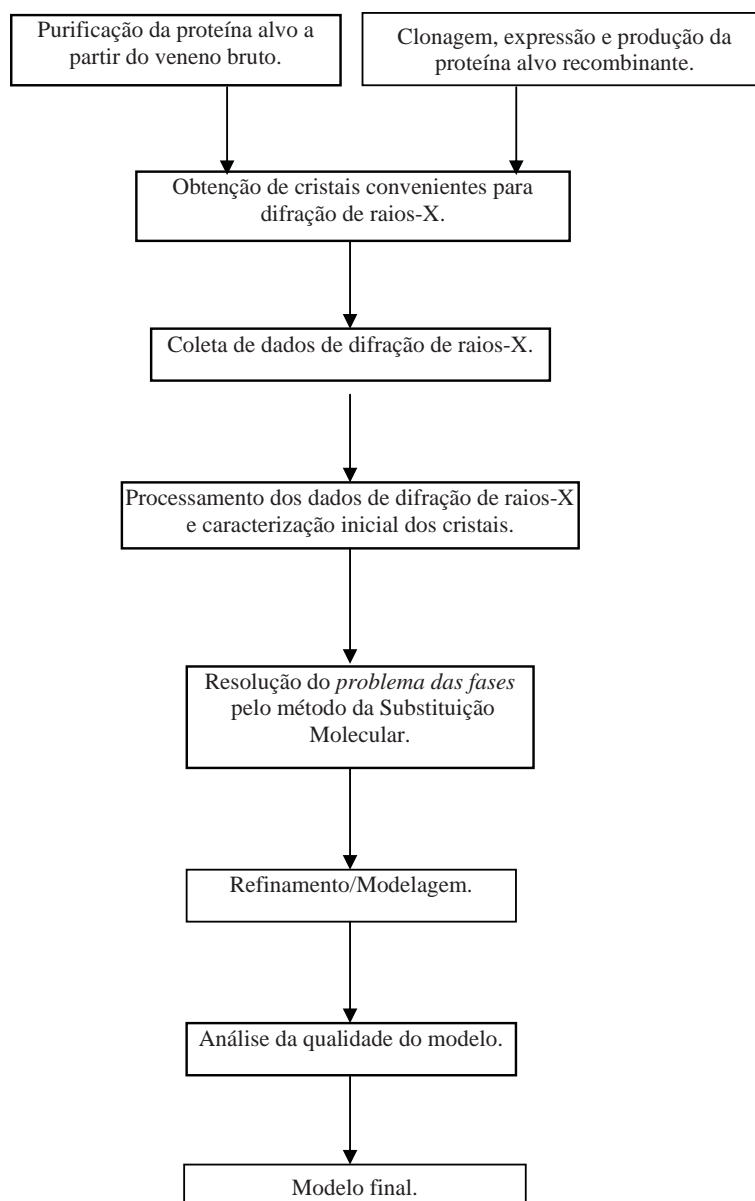


Figura 3: Etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios-X de maneira simplificada.

3.1.1 Purificação da proteína alvo a partir do veneno bruto

A purificação das PLA₂s é realizada a partir do veneno bruto e é conduzida a temperatura ambiente, sem perda da atividade enzimática, em duas etapas: filtração em Sephadex ou HPLC de fase reversa do veneno seguido de cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25 ou CM-Sepharose (ou CM-Sephadex) (Gutierrez & Lomonte, 1995). Outra possibilidade é a utilização de cromatografia de afinidade, explorando o princípio pelo qual as miotoxinas básicas interagem com o poliânion heparina. Nesse caso, pode-se utilizar uma coluna de afinidade em heparina-agarose (Soares *et al.*, 2000).

3.1.2 Amostras utilizadas no trabalho

3.1.2.1 Bothropstoxina-I, uma Lys49-PLA₂s de *Bothrops jararacussu*

A Botropstoxina I (BthTX-I) é uma Lys49-PLA₂s isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*. Esta proteína contém 121 aminoácidos, pI de 8,2 e peso molecular aproximado de 13,8 kDa. Esta proteína foi cristalizada em sua forma nativa por da Silva Giotto *et al.* (1998) em duas conformações diferentes: uma forma “aberta” e uma forma “fechada”. Recentemente, esta proteína foi cristalizada complexada com PEG 400 (Murakami *et al.*, 2007) (PDB ID 2H8I) e com alfa-tocoferol (Dos Santos *et al.*, 2009) (PDB ID 3CXI).

3.1.2.2 Piratoxina-I, uma Lys49-PLA₂s de *Bothrops pirajai*

A Piratoxina I (PrTX-I) é uma Lys49-PLA₂s isolada do veneno de *Bothrops pirajai*. Esta proteína contém 121 aminoácidos, pH 8,3 e peso molecular de 13,8 kDa. Ela também possui alta similaridade sequencial com a BthTX-I, apresentando apenas dois aminoácidos de diferença. Enquanto na BthTX-I, as posições 67 e 132, são

ocupadas, respectivamente, por resíduos de Asp e Asn, na PrTX-I, essas posições são ocupadas por resíduos de Pro e Asp.

Esta proteína em sua forma nativa foi cristalizada pela primeira vez por de Azevedo Jr. *et al.* (1998), à partir de dados à baixa resolução (2,8 Å) e não foi depositada no Protein Data Bank (PDB). Recentemente, dos Santos *et al.* (2009) cristalizou esta proteína em sua forma nativa (PDB ID 2Q2J) e complexada com alfa-tocoferol (PDB ID 3CYL) à alta resolução (1,65Å e 1,87Å, respectivamente).

3.1.2.3 Modificação química pelo brometo de p-bromofenacil (BPB)

De maneira geral, a modificação química da His48 pelo brometo de *p*-bromofenacil (BPB) se dá pela dissolução de 3mg de proteína nativa em 1ml de solução 100mM bicarbonato de sódio pH 8,0 acrescida de 150 µl de solução de BPB (0,8 mg.ml⁻¹). Essa mistura é incubada durante 3 ou 24 horas. O excesso de reagente é removido por ultracentrifugação, seguido de liofilização. No caso deste trabalho, as Lys49-PLA₂s utilizadas foram purificadas a partir do veneno bruto, modificadas quimicamente pelo BPB e liofilizadas pelo nosso colaborador Prof. Dr. Andreimar Martins Soares, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP que, gentilmente, nos cedeu as amostras para cristalização.

3.1.3 Testes de cristalização

A cristalização de moléculas em uma solução é um fenômeno de equilíbrio reversível cujos parâmetros termodinâmicos e cinéticos dependem das propriedades físico-químicas do solvente e do soluto envolvidos. Sabe-se que sob condições de supersaturação, o sistema é guiado para um estado de equilíbrio no qual o soluto é dividido entre as fases líquidas e sólidas. As moléculas perdem liberdade rotacional e

translacional, diminuindo a entropia do sistema. No entanto, ao mesmo tempo ganham novas ligações químicas estáveis, reduzindo a energia potencial do sistema e fornecendo uma força direcional para o estado ordenado (Figura 04). Entretanto, dependendo das propriedades químicas do solvente e soluto envolvidos, quando o sistema retornar ao equilíbrio, o resultado pode ser uma fase amorfa em vez de uma fase cristalina (McPherson, 2003).

Segundo Blundell & Johnson (1976), os principais fatores que afetam o processo de cristalização são: pH da solução de cristalização, concentração e tipo do agente precipitante (e outros aditivos utilizados), força iônica da solução e temperatura durante o processo de cristalização. O crescimento de cristais de proteínas envolve três etapas principais: nucleação, crescimento e término do crescimento (Kobe *et al.*, 1999).

A nucleação, onde ocorre formação dos primeiros agregados ordenados, é o processo inicial na obtenção de cristais, os quais representam a fase sólida de uma proteína. Quando o núcleo atinge um tamanho crítico, começa a fase de crescimento. Um cristal pequeno pode crescer pela incorporação de átomos (moléculas) nas suas faces planas em duas dimensões ou em espiral, ou sobre defeitos na superfície do cristal, incorporando uma molécula via interações tridimensionais. O mecanismo dependerá da energia das interações entre os constituintes do cristal nas direções consideradas. A morfologia do cristal corresponde diretamente à taxa de crescimento de cada face: faces crescidas lentamente serão maiores e bem desenvolvidas, enquanto as que crescem mais rapidamente tendem a possuírem faces menores. O crescimento de um cristal cessa provavelmente quando há acúmulo de defeitos dentro da rede cristalina, impedindo desta forma a continuação do crescimento de suas faces (McPherson, 2003).

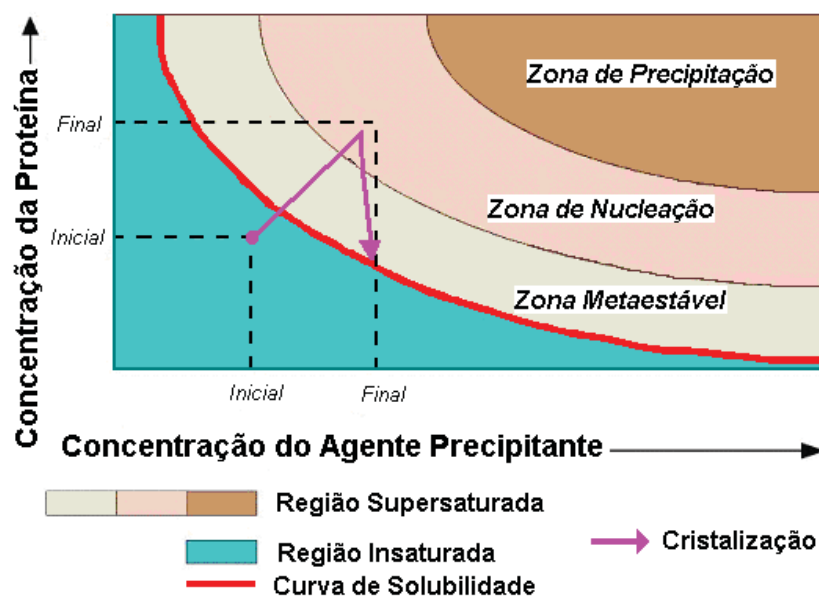


Figura 4: Representação esquemática da curva de solubilidade para proteínas.

Um método bastante eficiente para o aumento gradativo da concentração do agente precipitante é o *método de difusão de vapor* (McPherson, 2003). O princípio deste método é o processo de equilíbrio de duas soluções; uma é formada pela solução de cristalização (ou solução precipitante) e a outra por esta solução + a solução de proteína; através da fase de vapor, em meio hermeticamente fechado por uma graxa de vácuo. A solução menos concentrada (solução de cristalização+solução de proteína) perderá seu solvente mais volátil até o potencial químico de ambas as soluções se igualar. Cristais tendem a se formar à medida que a concentração de precipitante e de proteína aumenta gradativamente (McPherson, 2003). Para a determinação de estruturas protéicas, deve-se obter monocristais que serão analisados por alta resolução de difração de raios X.

Para o método de difusão de vapor podem ser utilizados os sistemas: *hanging drop* (“gota suspensa”), *sitting drop* (“gota sentada”) e *sandwich drop* (“gota sanduíche”). Os sistemas *hanging drop* e *siting drop* são os mais adequados para testes iniciais com um grande número de condições de cristalização, já que utiliza quantidades

pequenas de proteína (0,5 a 5,0 μ L) e facilita a análise dos experimentos (McPherson, 2003). Neste sistema, a solução de cristalização fica no reservatório e a solução de proteína + solução de cristalização ficam na gota suspensa. Um diagrama das etapas de montagem do método de cristalização por difusão de vapor, *hanging drop*, pode ser visto na figura 05.

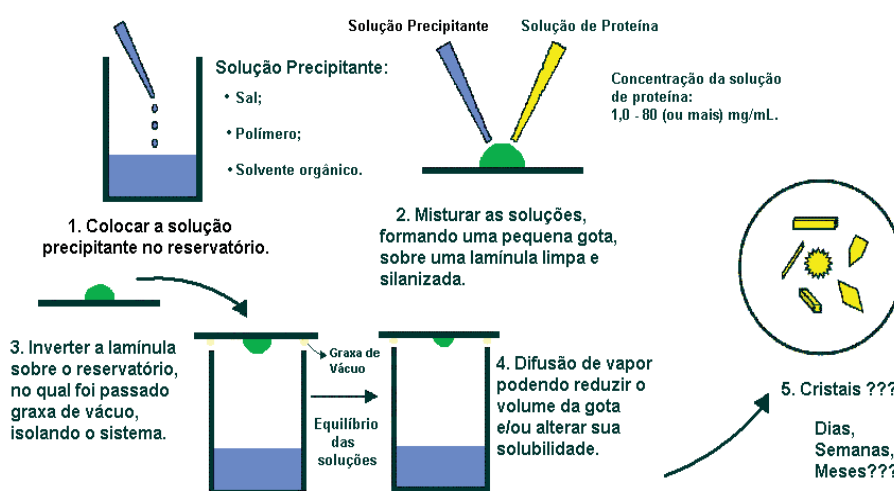


Figura 5: Diagrama das etapas de montagem do método de cristalização por difusão de vapor, sistema *hanging drop*

Para cristalizar uma proteína, deve-se fazer uma busca das melhores condições de cristalização que atuam na nucleação e no crescimento dos cristais. Com o aumento do número de macromoléculas biológicas cristalizadas com sucesso, tornou-se óbvio que muitas das condições de cristalização apresentavam semelhanças químicas entre si. Empresas como a Hampton Research®, desenvolveram então, quites comerciais de soluções de cristalização previamente determinadas (Anexo 1), através das quais, se faz uma busca inicial da condição de cristalização da proteína em estudo. Após a montagem das gotas, observam-se quais soluções obtiveram melhores resultados e então se altera o tipo e a concentração dos componentes químicos que compõem a solução (tampões, sais, agentes orgânicos e polímeros) até que a condição de cristalização seja alcançada.

Este método de se variar o tipo e a concentração dos componentes da solução é conhecido como método da matriz esparsa (Jancarik & Kim, 1991).

Existem ainda outras metodologias de cristalização que podem ser utilizadas para a obtenção de monocristais e/ou melhoramento de cristais previamente obtidos, como por exemplo o método de *seeding* (“semeadura”) (Stura, 1999), subdividido em *macroseeding* (consiste na colocação de um pequeno monocristal em solução estável de proteína e precipitante para crescimento deste) e *microseeding* (consiste na trituração de um monocristal, utilizando-se micronúcleos, a partir dos quais novos cristais serão formados). Além disso, pode-se acrescentar diversos tipos de óleos nos reservatórios (o óleo fica sobre a solução precipitante contida no poço, diminuindo a velocidade de crescimento dos cristais); a adição de substâncias “aditivas” à gota (quites comerciais); variações da temperatura de crescimento dos cristais (4, 10, 18 ou 25°C); entre outras técnicas (McPherson, 2003).

3.1.4 Coleta de dados de difração de raios-X e obtenção de dados preliminares

A coleta de dados de difração de raios X é muito importante, pois constitui a única fonte de dados através da qual podemos obter a estrutura cristalográfica (Blundell & Johnson, 1976). Os dados são obtidos quando um feixe de raios X, após incidir sobre um material cristalino, sofre difração. Estes dados podem ser obtidos através da utilização de uma fonte de raios X convencional, com um âncoro rotatório, ou raios X de obtidos a partir de luz síncrotron (Drenth, 1994), como o existente no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas – SP, local onde os conjuntos de dados de difração de raios X das proteínas estudadas nesta dissertação foram obtidos. Nestes equipamentos, o cristal de proteína é colocado em um *loop* de *nylon* (figura 06) cujo diâmetro deve ser adequado para abrigar o cristal. No *loop* também é necessária a

presença da solução de cristalização e normalmente é necessária a adição de um crioprotetor (como, por exemplo, o glicerol) para impedir a formação de cristais de gelo ao redor do cristal em estudo.

O cristal é, então, exposto ao feixe de raios X e também a um fluxo de nitrogênio gasoso, à temperatura controlada (normalmente 100 K). Isto permite um aumento no tempo de coleta, pois promove aumento no tempo útil do cristal comparado com coletas sem o congelamento do cristal. O *loop* montado é alinhado ao feixe de raios X de tal maneira que, durante os movimentos oscilatórios que o mesmo sofrerá, o cristal fique exposto à radiação de maneira homogênea (McRee, 1993).

Os dados de difração de raios X são transmitidos por uma interface a uma estação gráfica na qual as imagens de difração de raios X (Figura 07) podem ser visualizadas (através da intensidade das difrações) e então ocorre o processamento destes dados. As intensidades com seus respectivos desvios-padrão são os únicos dados disponíveis para a determinação da estrutura tridimensional de uma proteína (McRee, 1993).

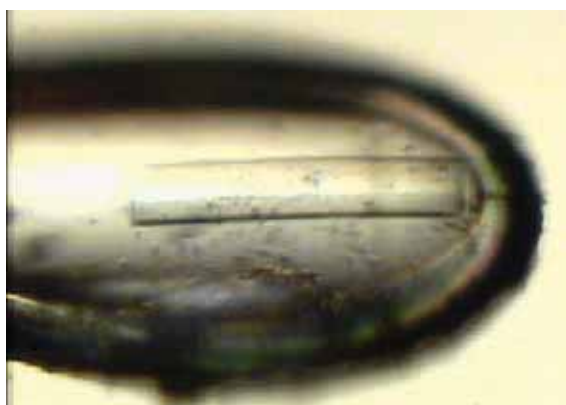


Figura 6: Monocristal preso ao loop. Extraído de <http://network.nature.com/people/scurry/blog/2009/04/24/i%E2%80%99m-reviewing-the-situation>. Acesso em 12/10/09.

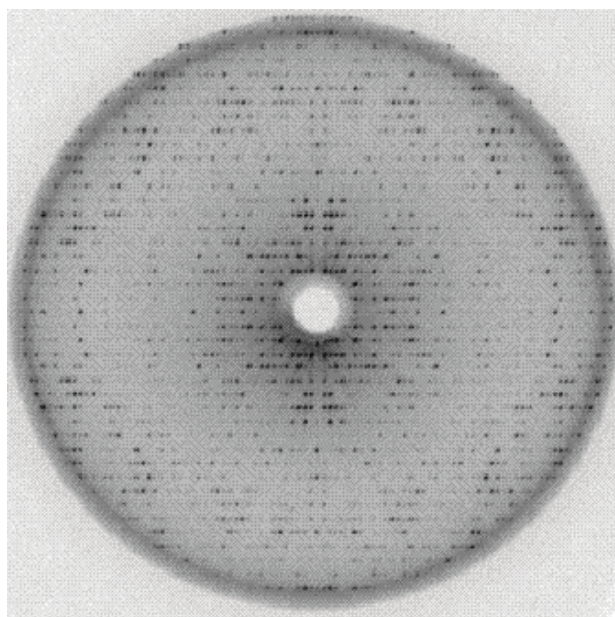


Figura 7: Imagem de difração de raios X de um cristal de proteína (Blundell & Johnson, 1976)

Inicialmente, pode-se determinar a partir deste conjunto de dados informações como grupo espacial, parâmetros de rede do cristal, número de monômeros da proteína na unidade assimétrica cristalina e previsão da porcentagem de água no cristal (McPherson, 2003). O processamento dos dados coletados pode ser feito utilizando-se os programas HKL 2000 (Otwinowski & Minor, 1997) e MOSFLM (Leslie, 1992) largamente utilizados pela comunidade cristalográfica. A partir do processamento dos dados, gera-se o mapa de densidade eletrônica que será utilizado para a modelagem da estrutura da proteína.

3.1.5 Substituição molecular, modelagem e refinamento da estrutura tridimensional

Para se determinar a estrutura tridimensional de uma proteína é necessário o conhecimento completo dos feixes de raios X difratados por um cristal para se conhecer a distribuição eletrônica das cargas da molécula que forma o cristal, ou seja, necessitamos conhecer a intensidade e a fase da radiação difratada. Como a única

informação que pode ser medida é a intensidade da radiação, torna-se necessário obterem-se maneiras de conhecer a fase da radiação, ou como se diz habitualmente: resolver o "problema das fases" (Drenth, 1994). Existem diversas maneiras de resolver este "problema", mas o método mais simples e mais utilizado é o método de Substituição Molecular, uma possibilidade é utilizar-se o programa AMoRe – *Automated Package for Molecular Replacement* (Navaza, 1994). Basicamente, o seu conceito envolve calcular as fases a partir de um modelo protéico, já resolvido, que seja homólogo e tenha alta identidade com a proteína em estudo (McPherson, 2003). Esse conjunto de fases iniciais será utilizado para se dar início à construção do modelo cristalográfico e subsequente refinamento.

No refinamento, fazem-se ajustes manuais do modelo em relação ao mapa de densidade eletrônica utilizando o programa gráfico "O" (Jones *et al.*, 1991) e Coot (Emsley & Cowtan, 2004). Em seguida a esses ajustes manuais, o modelo deve ter sua energia livre minimizada e refinadas as distâncias das ligações peptídicas, os ângulos diédricos, as interações atômicas, entre outros parâmetros. Para isto, utiliza-se o programa REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) do pacote de programas do CCP4 (Potterton *et al.*, 2004). Após ter sua energia livre minimizada e ter refinado diversos de seus parâmetros estruturais, o modelo retorna novamente aos programas gráficos (Coot/"O") para novos ajustes manuais, em seguida, volta novamente ao REFMAC para novo refinamento e minimização da energia livre e, novamente aos programas gráficos para mais ajustes manuais. E assim se faz sucessivamente até se obter a estrutura final da proteína em estudo. Além do REFMAC, os programas CNS (Brunger *et al.*, 1998) e Phenix (Adams *et al.*, 2002) também pode ser utilizados no refinamento da estrutura. Uma estrutura é refinada até a máxima concordância entre os dados obtidos da coleta de difração de raios-X e o modelo obtido através da substituição molecular. Esta

concordância é dada através dos valores de R_{cryst} e R_{free} (McPherson, 2003). O R_{free} e o R_{cryst} são conceitos basicamente idênticos, exceto que o R_{free} é calculado usando um subconjunto de reflexões retiradas aleatoriamente (geralmente em torno de 5%) que não são usadas durante o refinamento da estrutura (Brunger, 1992). Além disso, o gráfico de Ramachandran e outros critérios estereoquímicos que podem ser gerados pelo programas dos programas PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) e RAMPAGE (Lovell *et al.*, 2003), avalia a qualidade da estrutura obtida através da coerência estereoquímica com a de outras estruturas já obtidas.

Obtida a estrutura tridimensional de uma proteína, pode-se então, dar início aos estudos da relação estrutura-função que ela apresenta. No presente trabalho, todos os valores de *root square mean deviation* (r.m.s.d.) e as sobreposições de estruturas foram obtidos com o programa “O” (Jones *et al.*, 1991) e as figuras geradas pelo programa Pymol (Delano, 2002).

3.1.6 Espalhamento Dinâmico de Luz

Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) é uma técnica que permite calcular o coeficiente de difusão translacional de uma macromolécula (D_T) a partir do seu movimento browniano em solução (Amaré & Burley, 1997). A partir do coeficiente de difusão translacional é possível se calcular o raio hidrodinâmico da molécula (R_H) utilizando-se a equação de Stokes-Einstein e sua massa molecular pode ser obtida utilizando-se a curva de calibração de proteínas globulares de massa conhecida. O DLS é bastante utilizado para se verificar a polidispersividade de uma amostra em solução, já que amostras com baixa polidispersividade (< 15%) têm uma chance cerca de 80% maior de cristalizar do que amostras com alta polidispersividade (Amaré & Burley, 1997). Além disso, devido ao cálculo da massa molecular, é possível se obter, em

amostras com baixa polidispersividade, uma indicação do estado oligomérico da proteína em solução. Neste trabalho, os experimentos de DLS foram executados utilizando-se o sistema DynaPro[®] - *Molecular Sizing Instruments, Protein Solutions, Lakewood, NJ, USA*, utilizando uma concentração de solução de BthTX-I 3,0 mg.ml⁻¹ solubilizada em água ultrapura, seguida de filtração. A solução foi medida 100 vezes em triplicata.

3.2 Estudos filogenéticos

A construção de uma árvore filogenética de enzimas tem por objetivo se estudar as relações de parentesco entre sequências homólogas de proteínas. Inicialmente, é necessário, sequências homólogas nos bancos de dados. O programa BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool) (Altschul *et al.*, 1990) é um algoritmo desenvolvido para alinhar seqüências de nucleotídeos ou aminoácidos de acordo com a similaridade existente entre a sequencia alvo e as sequencias depositadas no banco de dados. Ao final de cada alinhamento, o BLAST gera uma lista de seqüências mais similares à seqüência alvo e classifica cada alinhamento individual utilizando dois valores: o score e o E-value. O score é um valor que indica o número de semelhança entre duas seqüências. O E-value é um valor estatístico que indica a expectativa de que outra seqüência com score idêntico ou maior ao valor obtido em um determinado alinhamento seja encontrada. Portanto, seqüências com alto score exibem um baixo E-value, e seqüências idênticas possuem E-value igual a zero.

A partir das sequências encontradas, elas devem ser alinhadas para que possam ser submetidas aos algoritmos de análise filogenética. Existem um grande número de programas de alinhamento de seqüências, sendo o programa AMAP (Schwartz & Pachter, 2007) o mais recente e cuja utilização pela comunidade vêm crescendo nos

últimos anos. Com as sequências alinhadas, já é possível iniciar os cálculos para a construção da árvore. Dentre todos os métodos existentes, o que vêm ganhando destaque nos últimos anos é a metodologia baiesiana por ser tão eficaz como a metodologia da máxima verossimilhança (ML), mas mais rápida e menos exigente computacionalmente por conta da aplicação de uma cadeia Markov-Monte Carlo (Hall, 2008).

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1 Estudos estruturais com Lys49-PLA₂s nativas, modificadas quimicamente pelo brometo de *p*-bromophenacil (BPB) e complexadas com PEG 4000.

As amostras cedidas pelo Prof. Dr. Andreimar M. Soares foram ressuspensas em água ultra-pura e durante os testes de cristalização as mesmas estavam na concentração de 12 mg/ml. Inicialmente, os testes de cristalização foram realizados a partir das condições de cristalização das proteínas nativas e das condições com o quite número de 50 soluções da *Hampton Research* (Anexo I). Para a montagem das placas foram utilizados um poço com 500µl de solução e 1µl de solução do poço e 1µl de solução protéica na gota, utilizando o método *sitting-drop*. Foram obtidos cristais da Piratoxina I modificada quimicamente pelo BPB (PrTX-I/BPB) e da bothropstoxina I também modificada quimicamente pelo BPB, com uma (mBthTX-I/BPB) e duas (dBthTX-I/BPB) moléculas na unidade assimétrica (Figura 08). Todos os cristais foram obtidos em soluções de cristalização similares, com exceção da temperatura de cristalização para o complexo mBthTX-I/BPB (Tabela 01). A estrutura da apo-PrTX-I (dos Santos *et al.*, 2009) (PDB ID 2Q2J) foi utilizada como modelo na substituição molecular. Na tabela 01 encontram-se os dados referentes às estatísticas da coleta de dados.

Em todos os casos, os dados foram processados utilizando-se o programa HKL2000 (Otwinowski & Minor, 1997). Após um ciclo de refinamento de corpo rígido e um do tipo *simulated annealing*, foi gerado um mapa de densidade eletrônica para que a modelagem manual dos resíduos pudesse ser iniciada com o programa gráfico Coot (Emsley & Cowtan, 2004). Todos os ciclos de refinamento foram executados com o refinamento de máxima verossimilhança do programa REFMAC (Murshudov *et al.*,

1997), com refinamento do B-factor isotrópico no início e anisotrópico no final do refinamento. Entre os ciclos de refinamento foram gerados mapas de densidade eletrônica com os coeficientes $3|F_{\text{obs}}|-2|F_{\text{calc}}|$ e $2|F_{\text{obs}}|-1|F_{\text{calc}}|$ para que as correções manuais da posição dos aminoácidos pudessem ser feitas.

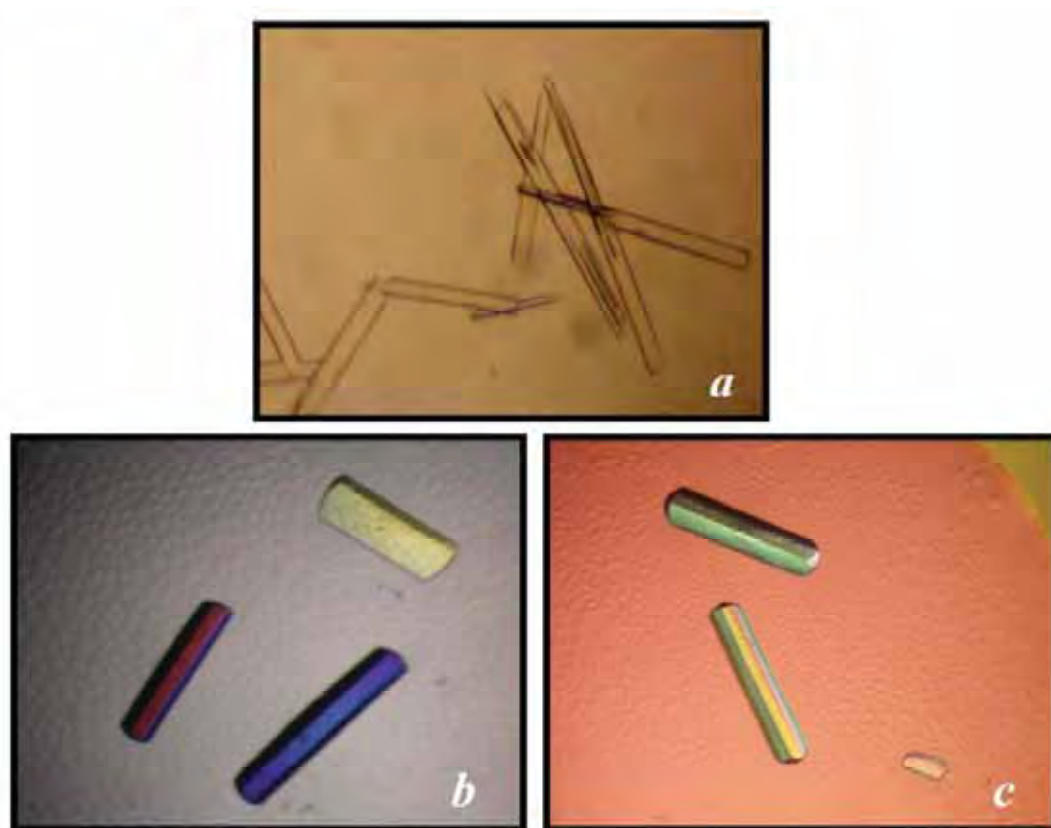


Figura 8: Cristais de Piratoxina I e Bothropstoxina I modificadas quimicamente pelo BPB. a. Cristais de PrTX-I/BPB; b. Cristais de dBthTX-I/BPB; c. Cristais de mBthTX-I/BPB.

A fim de se obter estudos comparativos mais completos entre as Lys49-PLA₂s, foram utilizadas outras três estruturas de Lys49-PLA₂s, resolvidas em colaboração pelos alunos de iniciação científica Mabel Clarice Oyan da Silva e Guilherme Henrique Marchi Salvador. São elas: a estrutura da bothropstoxina I nativa, com uma (apo-mBthTX-I) e duas (apo-dBthTX-I) moléculas na unidade assimétrica e a estrutura da bothropstoxina I nativa complexada com PEG 4000 (BthTX-I/PEG4K). Na tabela 01 podemos encontrar os dados referentes às suas condições de cristalização e estatísticas

de coletas de dados e na tabela 02 as estatísticas de refinamento das estruturas. Na figura 9, podemos observar todas as estruturas em uma representação do tipo *cartoon*.

Podemos observar na tabela 01, que as estruturas que apresentam apenas uma molécula na unidade assimétrica, mBthTX-I/BPB e apo-mBthTX-I pertencem ao grupo espacial centrado ortorrômbico $C222_1$. Já as estruturas que apresentam duas moléculas na unidade assimétrica (apo-dBthTX-I; dBthTX-I/BPB; BthTX-I/PEG4K) apresentam o mesmo padrão observado por dos Santos *et al.* (2009): enquanto que as formas nativa pertencem ao grupo espacial trigonal $P3_12_1$; as formas complexadas pertencem ao grupo espacial primitivo ortorrômbico $P2_12_12_1$ ou ao grupo espacial monoclinico $P2_1$.

Em determinadas regiões da estrutura das estruturas PrTX-I/BPB e dBthTX-I/BPB, onde a densidade eletrônica mostrou-se fraca ou ambígua mesmo após vários ciclos de refinamento, optou-se por executar a troca (mutação) de alguns resíduos por outros de glicina ou alanina. Na estrutura da PrTX-I/BPB foram feitas as seguintes mutações: Lys69→Ala no monômero A e Lys127→Ala no monômero B. Já na estrutura dBthTX-I/BPB foram feitas as seguintes mutações.: Lys36→Gly, Lys106→Ala, Lys122→Gly e Lys127→Gly no monômero A e Lys69→Ala e Lys122→Ala no monômero B. Esta prática é justificável já que a falta de dados experimentais nas regiões onde a densidade eletrônica é imprecisa pode levar a modelagem incorreta dos resíduos originais, introduzindo erros estatísticos consideráveis ao modelo. Assim, a troca de resíduos que possuem grandes cadeias laterais por outros de menor peso molecular (p.ex. glicina e alanina) minimiza estas possíveis incorreções estatísticas.

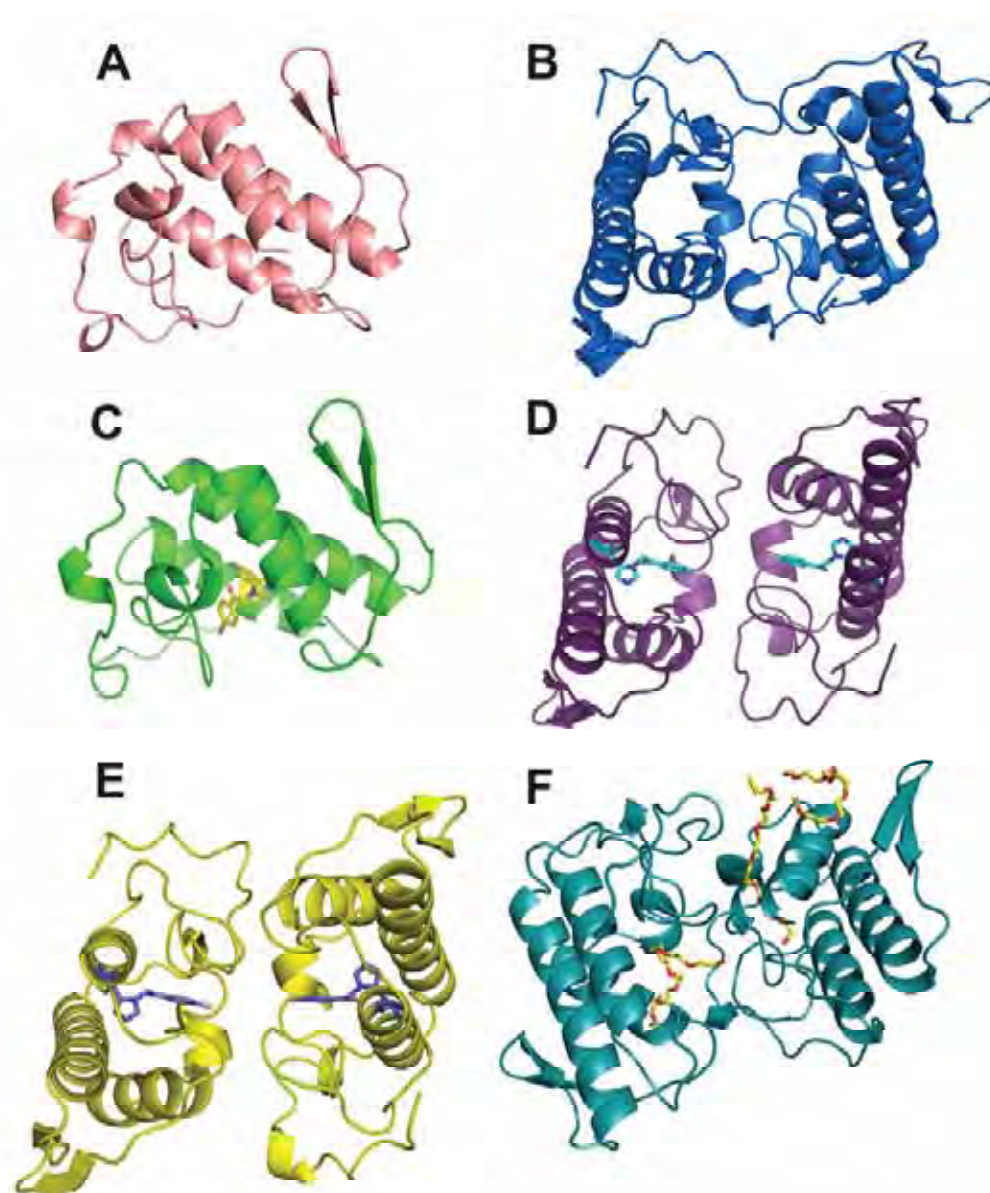


Figura 9: Representação em *cartoon* das estruturas aqui apresentadas. A. apo-mBthTX-I; B. apo-dBthTX-I; C. mBthTX-I/BPB; D. dBthTX-I/BPB; E. PrTX-I/BPB; F. BthTX-I/PEG4K (não está representada na mesma orientação das demais para que possam ser visualizadas as três moléculas de polietilenoglicol complexadas à estrutura).

Tabela 1: Dados de cristalização e estatísticas da coleta de dados

	PrTX-I/BPB	apo-mBthTX-I	apo-dBthTX-I	mBthTX-I/BPB	dBthTX-I/BPB	BthTX-I/PEG4K
Condições de cristalização	20% (m/v) isopropanol; 23% (m/v) PEG 4000; 100 mM Citrato de Sódio pH 5,8 291 a=38,6; b=70,6; c=43,8; β = 102.6°	20% (m/v) isopropanol; 18% (m/v) PEG 4000; 100 mM Citrato de Sódio pH 6,0 283 a=57,8; b=80,1; c=67,8	26% (m/v) PEG 4000; 200 mM Sulfato de lítico; 100 mM Tris HCl pH 8,5 298 a=b=55,6; c=127,8; β =120°	20% (w/v) isopropanol; 23% (w/v) PEG 4000; 100 mM Citrato de sódio pH 6,0 283 a=49,2; b=65,8; c=85,4	20% (m/v) isopropanol; 23% (m/v) PEG 4000; 100 mM Citrato de sódio pH 6,1 291 a=50,6; b=62,4; c=87,1	29% (m/v) PEG 4000; 200 mM Sulfato de lítico; 100 mM Tris HCl pH 8,5 283 a=38,5; b=70,8; c=43,8; β = 102.2°
Temperatura de cristalização (K)						
Cela unitária (Å)						
Grupo espacial	P2 ₁	C222 ₁	P3 ₁ 21	C222 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
Coefficiente de Matthews V_M (Å ³ Da ⁻¹)	2,14	2,87	2,1	2,74	2,57	2,14
Moléculas na Unidade Assimétrica	2	1	2	1	2	2
Conteúdo de Solvente (%)	42,52	57,18	41,48	55,24	51,84	42,53
Resolução (Å)	20,67-2,34 (2,49- 2,34) ^a	50-1,82 (1,90-1,82) ^a	40-1,91 (2,00-1,91) ^a	18,42-1,48 (1,53- 1,48) ^a	29,40-2,28 (2,36- 2,28) ^a	50,0-1,55 (1,62-1,55) ^a
Redundância	2,8 (2,3) ^a	3,1 (2,7) ^a	3,0 (2,4) ^a	6,1 (6,1) ^a	4,2 (4,1) ^a	3,3 (2,2) ^a
Completeza (%)	98,1 (92,1) ^a	97,3 (92,5) ^a	92,3 (91,6) ^a	88,7 (88,4) ^a	93,3 (94,0) ^a	98,2 (99,4) ^a
R_{merge}^b	12,1 (40,9) ^a	6,4 (30,9) ^a	12,8 (47,3) ^a	9,1 (49,1) ^a	4,7 (23,5) ^a	6,7 (43,8) ^a
$I/\sigma(I)$	8,14 (1,82) ^a	15,77 (3,19) ^a	8,05 (1,89) ^a	10,45 (3,08) ^a	26,26 (4,81) ^a	12,73 (1,82) ^a

^aNúmeros em parênteses correspondem à faixa a mais alta resolução. ^b $R_{merge} = \sum_{hkli} (\sum_{i=1}^n |I_{hkli,i} - \langle I_{hkli} \rangle|) / \sum_{hkli} \langle I_{hkli} \rangle$, onde $I_{hkli,i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h, k and l, e $\langle I_{hkli} \rangle$ é a intensidade média para aquela reflexão. Calculado para $I > 3\sigma(I)$.

Tabela 2: Estatística do refinamento das estruturas

	PrTX-I/BPB	apo-mBthTX-I	apo-dBthTX-I	mBthTX-I/BPB	dBthTX-I/BPB	BthTX-I/PEG4K
Resolução (Å)	20,67-2,34 (2,49-2,34) ^a	50-1,82 (1,90-1,82) ^a	40-1,91 (2,00-1,91) ^a	18,42-1,48 (1,53-1,48) ^a	29,40-2,28 (2,36-2,28) ^a	50-1,55 (1,62-1,55) ^a
Reflexões únicas	9425 (1355) ^a	14091 (1647) ^a	17151 (2081) ^a	22361 (2212) ^a	12419 (1202) ^a	32689 (4127) ^a
Completeza (%)	98,1 (92,1) ^a	97,3 (92,5) ^a	92,3 (91,6) ^a	88,7 (88,4) ^a	93,3 (94,0) ^a	98,2 (99,4) ^a
R _{cryst} ^b (%)	21,9	15,8	22,3	20,6	23,5	21,1
R _{free} ^c (%)	24,2	21,2	25,6	24,3	25,4	25,5
Número de átomos não-hidrogênio						
Proteína	1894	953	1906	953	1873	1906
brometo de p-bromofenacila	20	-	-	10	20	-
Poliétienoglicol	-	-	-	-	-	70
Isopropanol	12	-	-	4	4	-
Sulfato	-	-	-	-	-	10
Lítio	-	-	1	-	-	-
Água	178	260	190	372	128	184
Valor médio de Fator de Temperatura (Å ²) ^d	49,01	30,84	36,52	29,33	48,73	29,1
Valor médio de G-factor ^e	2,2	0,4	1,1	1,9	2,2	0,9
Gráfico de Ramachandran (%) ^f						
Resíduos nas regiões mais favoráveis	94,0	95,8	96,2	93,1	94,1	97,1
Resíduos nas regiões permitidas	5,6	4,2	3,8	6,9	3,8	2,9
Resíduos em regiões não permitidas	0,4	-	-	-	2,1	-

^aNúmeros em parênteses correspondem à faixa a mais alta resolução. ^b $R_{cryst} = \sum_{hkl} (|F_{obs,hkl}| - |F_{calc,hkl}|) / \sum_{hkl} |F_{obs,hkl}|$, onde $|F_{obs,hkl}|$ and $|F_{calc,hkl}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados. ^c R_{free} é equivalente ao R_{cryst} , porém calculado com 5% das reflexões omitidas do processo de refinamento (Brunger, 1992). ^dCalculado com o programa CNS (Brunger *et al.*, 1992). ^eCalculado com o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). ^fCalculado com o programa RAMPAGE (Lovell *et al.*, 2003).

Todas as seis estruturas apresentadas aqui possuem uma qualidade estereoquímica melhor ou igual ao esperado para estruturas com a mesma resolução, como é indicado pelo valor *G-factor* geral¹ (tabela 02). A análise dos modelos também mostra que a grande maioria dos resíduos das estruturas apresenta uma combinação adequada dos ângulos ϕ e ψ (tabela 02; figura 10). Os resíduos que são encontrados (Leu32, Gly33, Glu87, Asn88, Pro90, Gly127) nas regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran fazem parte de regiões bastante flexíveis destas PLA₂s, o que justifica a dificuldade de modelagem destes resíduos. As estruturas foram depositadas no Protein Data Bank (PDB) com os seguintes códigos de acesso: 2OK9 (PrTX-I/BPB), 3I3I (apo-mBthTX-I), 3HZD (apo-dBthTX-I), 3IO3 (mBthTX-I/BPB), 3HZW (dBthTX-I/BPB), 3IQ3 (BthTX-I/PEG4K).

Nas três estruturas modificadas quimicamente pelo BPB, mBthTX-I/BPB, dBthTX-I/BPB e PrTX-I/BPB, as moléculas de BPB estão covalentemente ligadas ao átomo N δ 1 da His48 em todos os monômeros (Figura 11). O grupo fenacil do BPB ocupa canal hidrofóbico destas proteínas na região do sítio ativo, formando contatos hidrofóbicos com a Leu5, Cys29, Gly30 e Lys49. Além disso, a molécula de BPB também interage (distância menor que 4,0 Å) com diversos resíduos (Fig. 12). Na estrutura PrTX-I/BPB, o BPB interage com a Tyr22, Gly23, Cys45, com uma molécula de propanol e uma molécula de água. Nas estruturas dBthTX-I/BPB e mBthTX-I/BPB, o BPB interage, respectivamente com a Tyr22, Gly23, Cys45 e Lys49 e com a Gly23, Gly30, Lys49 e com uma molécula de propanol (Figura 12).

O mapa de densidade eletrônica da estrutura BthTX-I/PEG4K mostra claramente a posição de três moléculas de PEG na estrutura (Figura 13). Duas delas estão em posição similar às moléculas de PEG encontradas na estrutura da BthTX-I complexada com suramina e da molécula de alfa-tocopherol nas estruturas BthTX-I e PrTX-I complexadas com alfa-tocopherol, ou seja, estão localizadas ao longo de todo canal hidrofóbico da proteína, realizando

¹ O valor de *G-factor* corresponde a uma medida calculada a partir da qualidade estereoquímica da molécula em comparação com outras já obtidas à mesma resolução, a utilizando diversos critérios, como, por exemplo, combinação dos ângulos phi-psi, combinação dos ângulos chi1-chi2 e chi3-chi4, torsões omega de ângulos, comprimento e ângulos da cadeia principal

um grande número de interações hidrofóbicas com os resíduos ali localizados (Figura 14). A terceira molécula de PEG, da mesma maneira que a molécula de PEG encontrada na estrutura da BthTX-I complexada com alfa-tocoferol, interage (distância menor que 4,0 Å) com a Lys7, Leu10, Glu14, Gly15, Tyr75 e Trp77 no monômero B (Figura 14).

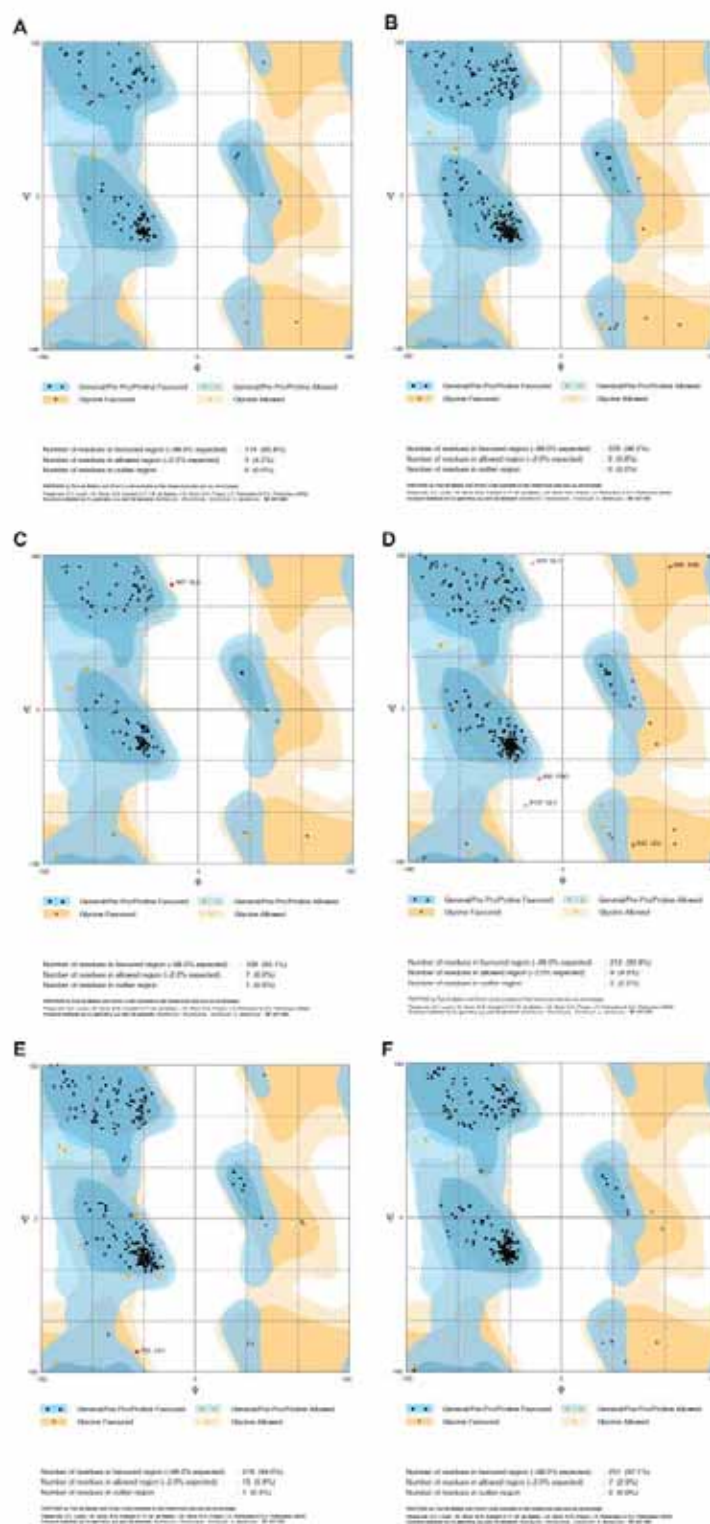


Figura 10: Gráfico de Ramachandran das estruturas apresentadas. A. apo-mBthTX-I; B. apo-dBthTX-I; C. mBthTX-I/BPB; D. dBthTX-I/BPB, E. BthTX-I/PEG4K. Calculado utilizando o programa RAMPAGE (Lovell et al., 2003).

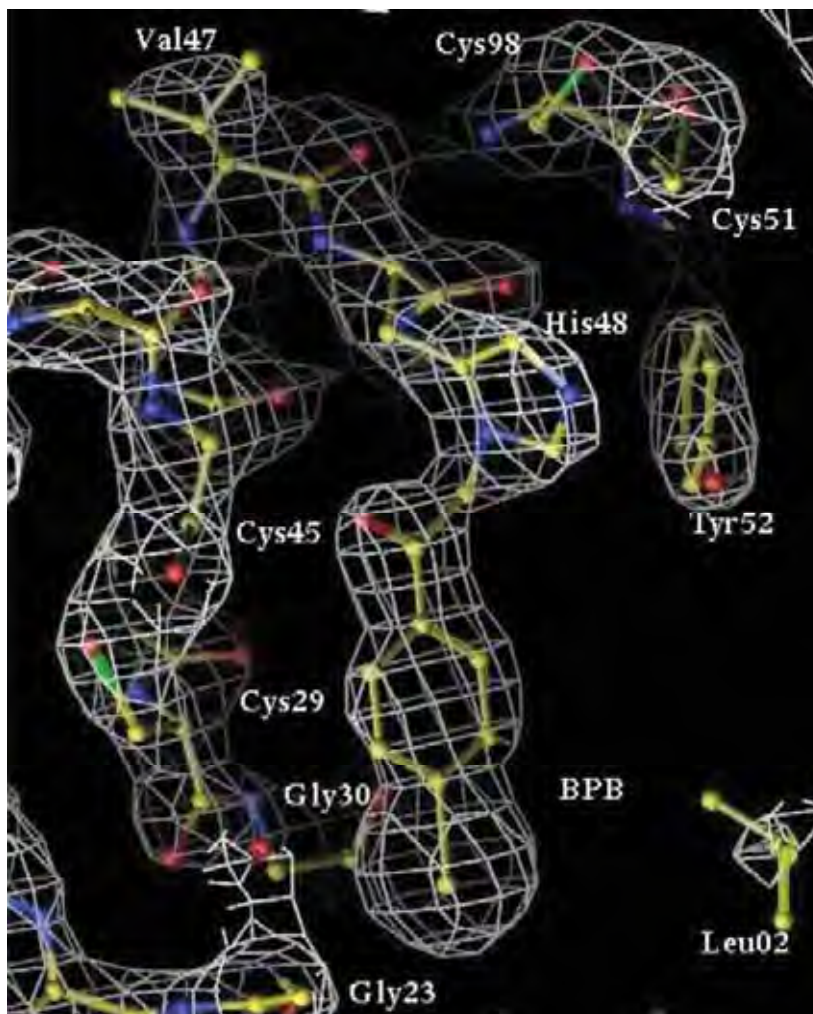


Figura 11: Mapa de densidade eletrônica (corte a $1,6\sigma$) $3|F_{obs}| - 2|F_{calc}|$ da região do “sítio ativo” do monômero A da estrutura PrTX-I/BPB mostrando o resíduo His48 ligado covalentemente ao BPB. Figura gerada pelo programa “O” (Jones et al., 1992).

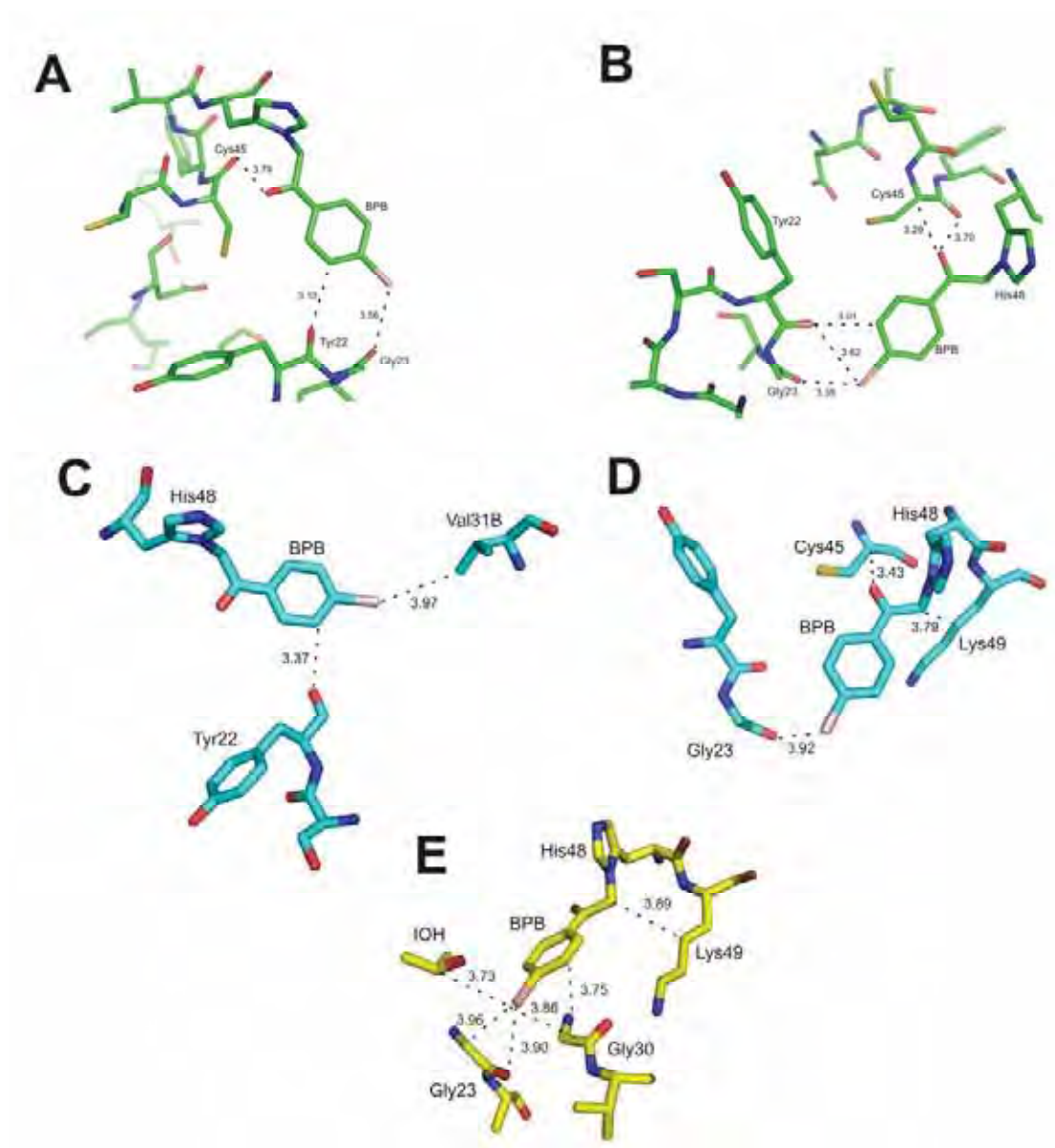


Figura 12: Interação da molécula de BPB com os resíduos das estruturas da PrTX-I e BthTX-I modificadas quimicamente pelo BPB. *A.* Monômero A da estrutura PrTX-I/BPB; *B.* Monômero B da estrutura PrTX-I/BPB; *C.* Monômero A da estrutura dBthTX-I/BPB; *D.* Monômero B da estrutura dBthTX-I/BPB; *E.* Monômero da estrutura mBthTX-I/BPB

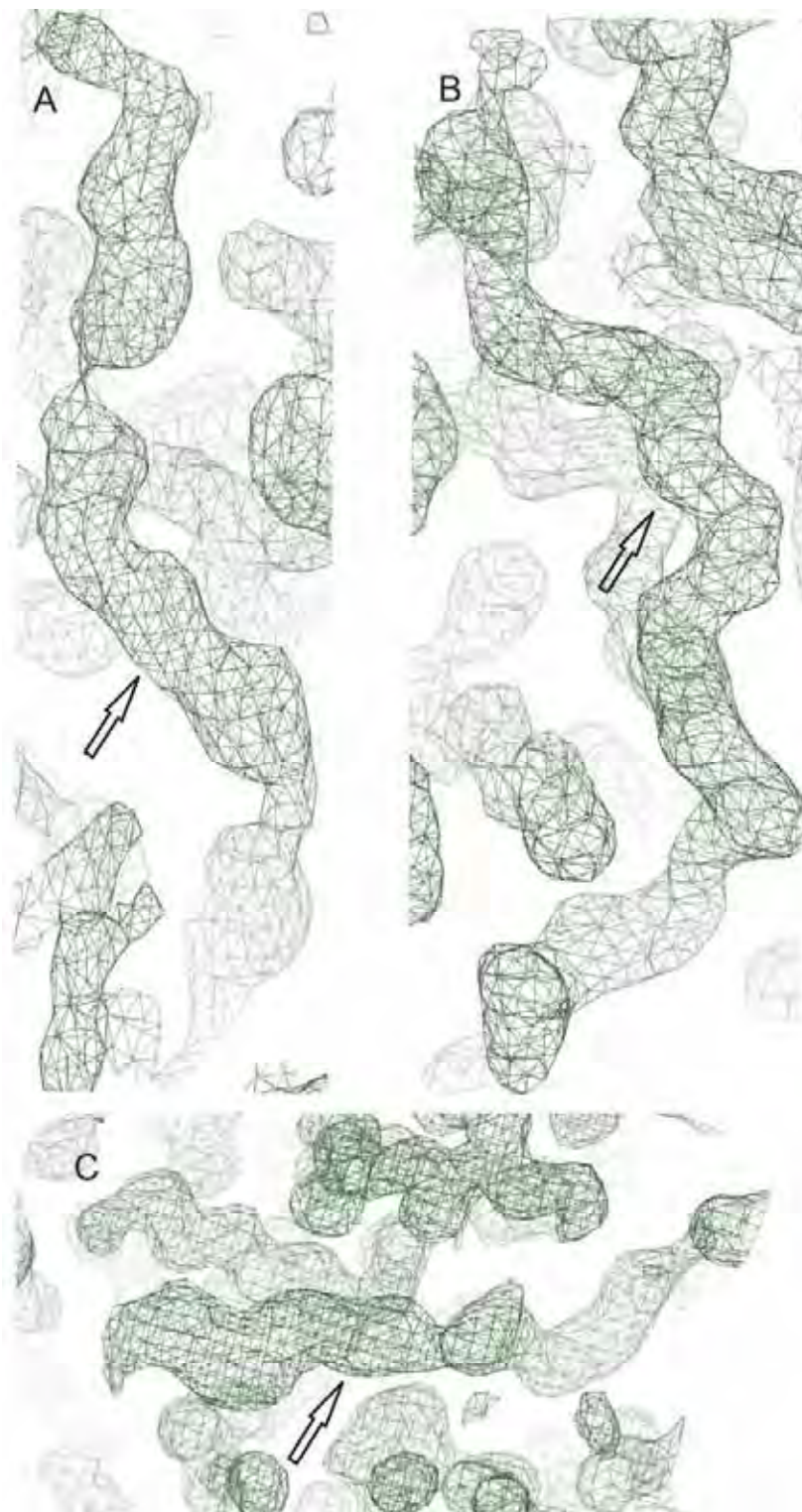


Figura 13: Mapa de densidade eletrônica (corte a $1,2\sigma$) $2|F_{obs}| - |F_{calc}|$ das densidades eletrônicas interpretadas como moléculas de polietilenoglicol. Figura gerada pelo programa “O” (Jones et al., 1992).

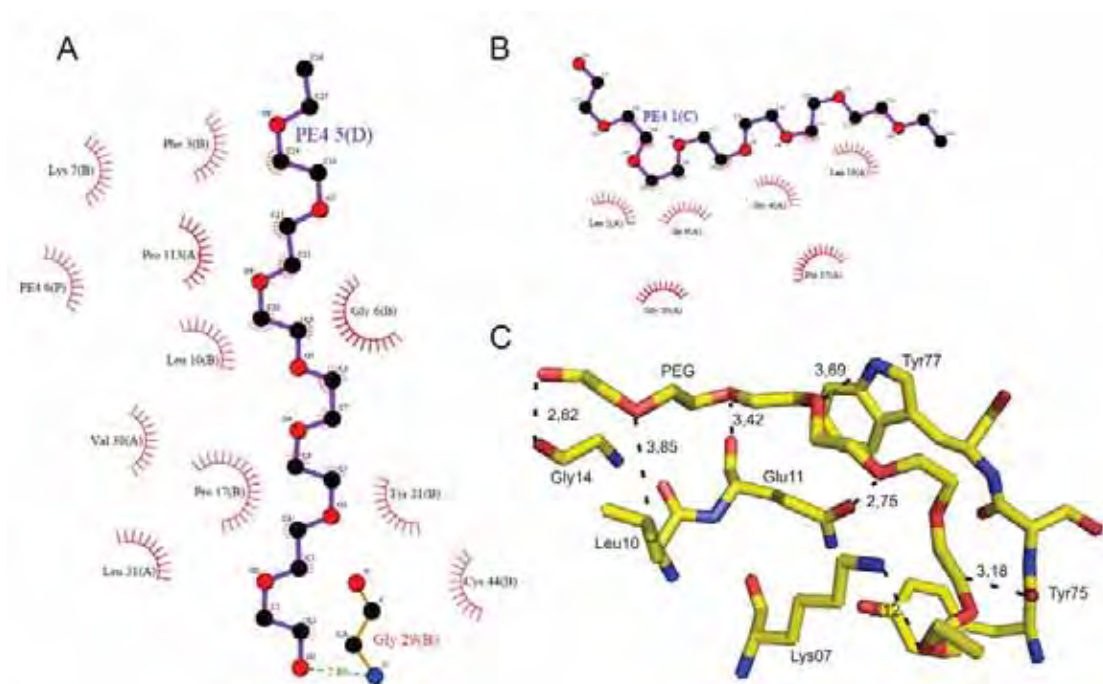


Figura 14: Interações das moléculas de BPB com a proteína na estrutura BthTX-I/PEG4K. As figuras A e B correspondem às moléculas que ocupam o canal hidrofóbico da estrutura. A figura C corresponde à molécula próxima a Lys7, exposta ao solvente. Diagrama das interações (A e B) gerado pelo programa Ligplot (Wallace *et al.*, 1995).

A sobreposição entre os monômeros das apo estruturas diméricas mostra um baixo valor de *root square mean deviation* (r.m.s.d.) em comparação com os monômeros das estruturas complexadas (Tabela 03), sobretudo na sobreposição dos monômeros B, indicando que apesar da inserção de um ligante no canal hidrofóbico, um dos monômeros não tem a sua estrutura perturbada. As regiões que apresentam maior desvio são o *loop* de ligação de Ca^{2+} , a região C-terminal e os *loops* 57-60 e 87-90 (Figura 15). Essa preservação de um dos monômeros de torna mais clara ao analisarmos a sobreposição das estruturas monoméricas com os monômeros da apo-dBthTX-I: o valor de r.m.s.d. da sobreposição entre apo-mBthTX-I e mBthTX-I/BPB é menor do que o da sobreposição entre apo-mBthTX-I e o monômero B da apo-dBthTX-I (Tabela 04; Figura 16). Quando realizamos uma comparação entre os monômeros das estruturas complexadas com PEG e modificadas quimicamente pelo BPB e os monômeros das estruturas de BthTX-I e PrTX-I complexadas com alfa-tocoferol, observamos que as estruturas complexadas com PEG e alfa-tocoferol são extremamente parecidas, com um

valor de r.m.s.d. da ordem de 0,1Å; enquanto que o valor de r.m.s.d. entre os monômeros destas estruturas com os das estruturas modificadas pelo BPB fica entre 0,4-0,6Å (Tabela 05; Figura 17). Essa diferença se deve provavelmente à maior estabilização das estruturas complexadas com PEG e alfa-tocoferol graças ao comprimento das moléculas de PEG e alfa-tocoferol que permitem realizar um grande número de contatos hidrofóbicos com a proteína (Figura 14). A molécula de BPB, pelo contrário, de cadeia curta, não consegue ocupar toda a região do canal hidrofóbico, ficando restrito apenas à região do sítio ativo.

Tabela 3: Valores de r.m.s.d. para a sobreposição de C α entre os monômeros correspondentes entre as estruturas apo-dBthTX-I, PrTX-I/BPB, dBthTX-I/BPB e BthTX-I/PEG4K (Å).

		Monômero A	Monômero B
		apo-dBthTX-I	apo-dBthTX-I
Mon. A	PrTX-I/BPB	1,109	-
	dBthTX-I/BPB	0,866	-
	BthTX-I/PEG4K	1,020	-
Mon. B	PrTX-I/BPB	-	0,697
	dBthTX-I/BPB	-	0,703
	BthTX-I/PEG4K	-	0,647

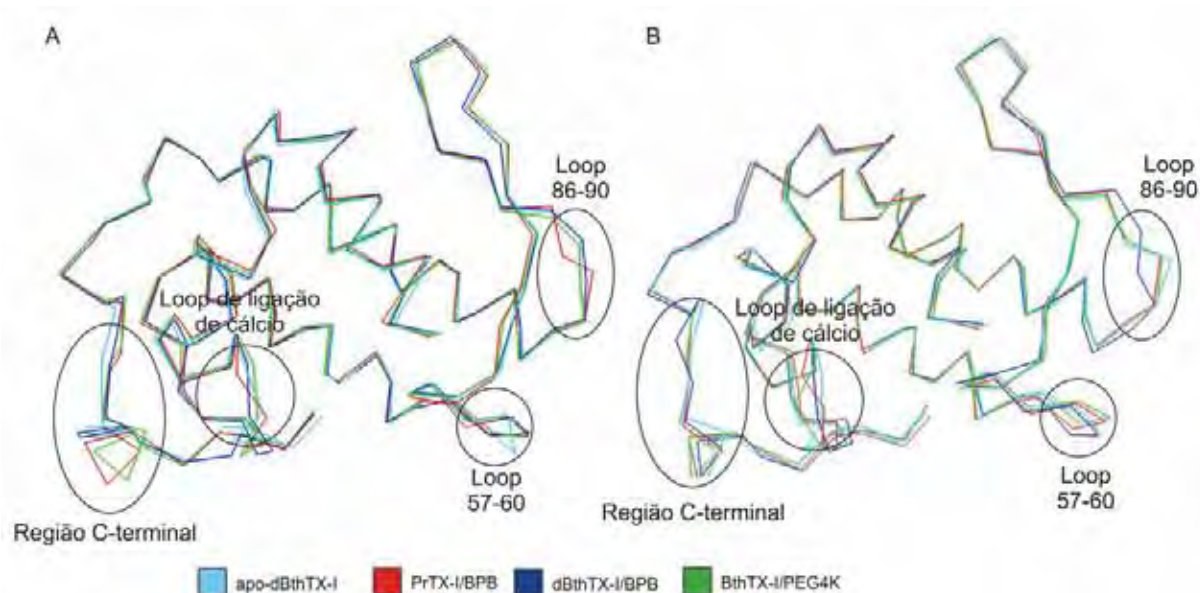


Figura 15: Sobreposição de C α dos monômeros correspondentes entre as estruturas apo-dBthTX-I, PrTX-I/BPB, dBthTX-I/BPB, BthTX-I/PEG4K. A. Monômeros A; B. Monômeros B.

Tabela 4: Valores de r.m.s.d. para a sobreposição de C α entre as estruturas monoméricas, apo-mBthTX-I e mBthTX-I/BPB e os monômeros da estrutura dimérica apo-dBthTX-I (Å).

	apo-mBthTX-I
mBthTX-I/BPB	0,473
Monômero A - apo-dBthTX-I	1,123
Monômero B - apo-dBthTX-I	0,637

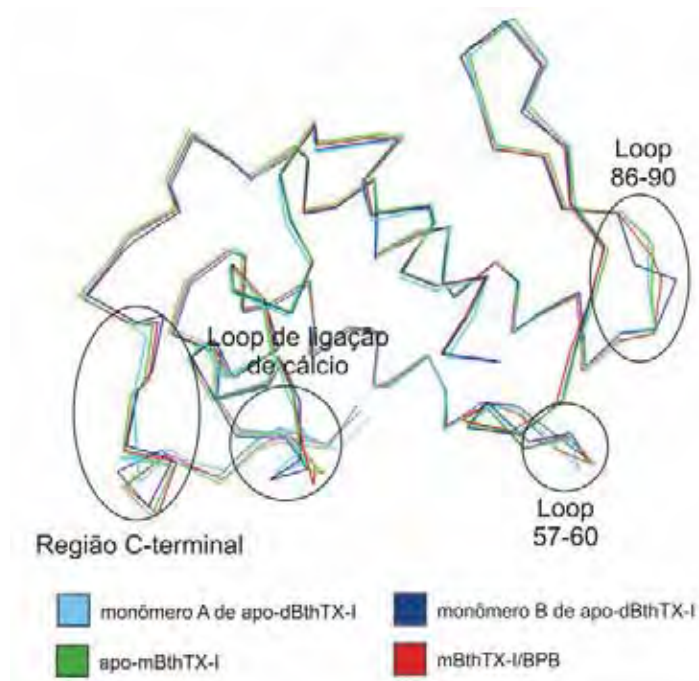


Figura 16: Sobreposição de C α entre as estruturas apo-dBthTX-I, apo-mBthTX-I/BPB e mBthTX-I/BPB

Tabela 5: Valores de r.m.s.d. para a sobreposição de C α entre os monômeros correspondentes entre as estruturas apo-dBthTX-I, PrTX-I/BPB, dBthTX-I/BPB, BthTX-I/PEG4K, BthTX-I/ α T e PrTX-I/ α T (Å).

		Monômero A	Monômero B
		BthTX-I/PEG4K	BthTX-I/PEG4K
Mon. A	PrTX-I/BPB	0,583	-
	dBthTX-I/BPB	0,746	-
	PrTX-I/ α T	0,186	-
	BthTX-I/ α T	0,181	-
Mon. B	PrTX-I/BPB	-	0,463
	dBthTX-I/BPB	-	0,759
	PrTX-I/ α T	-	0,196
	BthTX-I/ α T	-	0,140

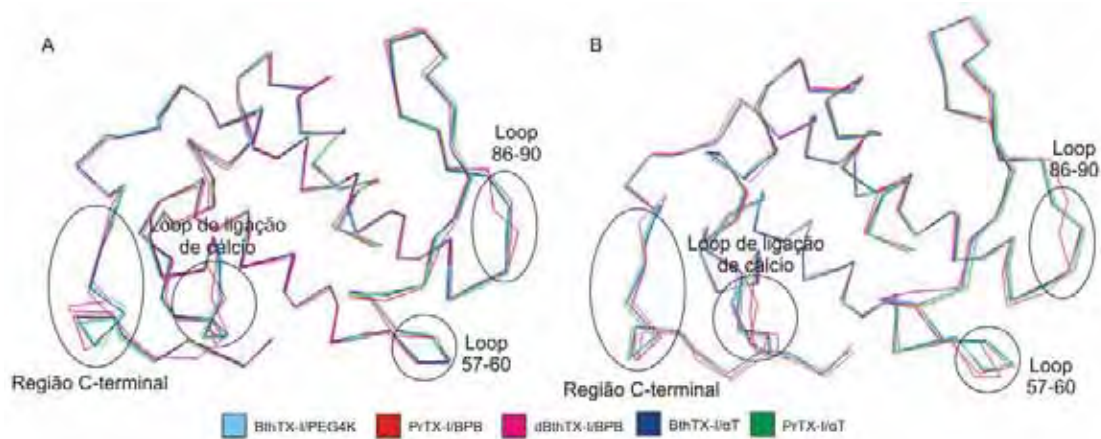


Figura 17: Sobreposição de $C\alpha$ entre os monômeros correspondentes entre as estruturas BthTX-I/PEG4K, PrTX-I/BPB, dBthTX-I/BPB, BthTX-I/ α T e PrTX-I/ α T. A. Monômeros A; B. Monômeros B.

Os dímeros dos modelos estruturais apresentados são mantidos nesta conformação principalmente por interações hidrofóbicas entre os resíduos presentes na interface dos monômeros, formando um canal hidrofóbico entre os monômeros. Além disso, interações do tipo pontes de hidrogênio entre os monômeros, mas que, no entanto, são diferentes entre a estrutura nativa e as estruturas com PEG ou modificadas quimicamente pelo BPB. Enquanto que para a apo-dBthTX-I as pontes de hidrogênio (distância menor que 3,4 Å) se estabelecem entre os resíduos Asn17:Tyr119, Asn17:His120 e Val31:Lys69, para os complexos (PrTX-I/BPB; dBthTX-I/BPB e BthTX-I/PEG4K) são estabelecidos contatos entre os resíduos Asn17(B):Tyr119(A) e Tyr119(A):Tyr119(B). Dessa maneira, para que as interações entre os oxigênios H das Tyr119 das estruturas complexadas se estabeleçam, este resíduo em um dos monômeros sofre uma reorientação espacial (rotação de cerca de 180°) (Figura 18). Essa reorientação espacial das Lys49-PLA₂s complexadas já havia sido observado por dos Santos *et al.* (2009) que propõem que a formação desta ponte de hidrogênio e a reorientação dos monômeros confere maior estabilidade aos complexos e, portanto, maior estabilidade destas proteínas para sua ação junto à membrana muscular. Além disso, essa reorientação colocaria as regiões do sítio miotóxico proposto por dos Santos *et al.* (2009) lado a lado (Lys20,

Arg115, Lys118), bem como, toda a região C-terminal, classicamente apontada como responsável pela ação da miotoxicidade (Figura 19).

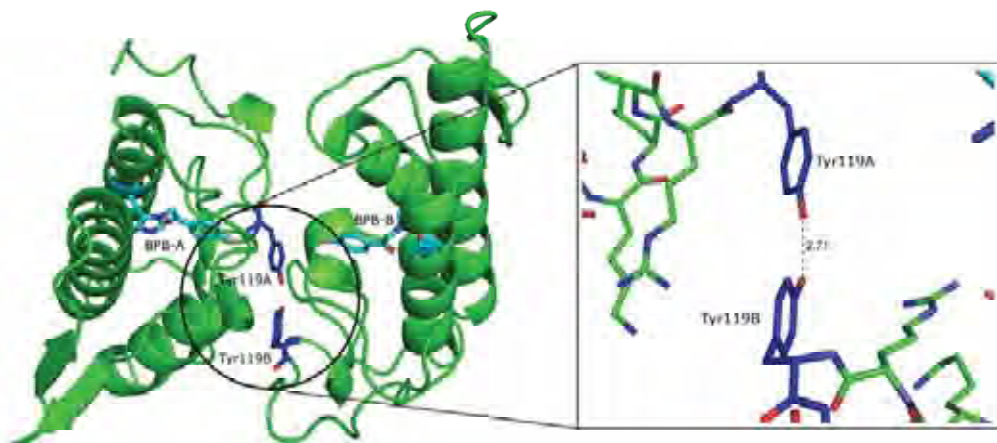


Figura 18: Ponte de hidrogênio formada pelos oxigênios H das Tyr119 resultante da reorientação conformacional de um dos monômeros nas estruturas de Lys49-PLA2s.

De maneira a quantificar essa reorientação de um dos monômeros, dos Santos *et al.* (2009) criaram um modelo baseado no grau de abertura (θ_A) e no grau de torção entre os monômeros (θ_T) (Figura 20). Segundo dos Santos *et al.* (2009), com a reorientação de um dos monômeros nas estruturas complexadas, os monômeros se tornariam alinhados em um mesmo plano, o que é demonstrado pelo menor ângulo de torção nas formas complexadas, com exceção da apo-BaspTX-II, de resolução limitada (2,8 Å) e da PrTX-II complexada com ácidos graxos (Tabela 06). Nas estruturas aqui apresentadas, esse padrão também é observado: o ângulo de torção das formas complexadas (PrTX-I/BPB; dBthTX-I/BPB e BthTX-I/PEG4K) é menor do que na estrutura nativa (Tabela 06). Este autores também propuseram que esta estabilidade observada nas Lys49-PLA₂s complexadas também poderia ser verificada pela diminuição dos fatores de temperatura destas estruturas. Entretanto, no presente trabalho, essa diminuição só é observada na estrutura da BthTX-I complexada com PEG (Figura 21). Nas estruturas modificadas quimicamente pelo BPB, observa-se um aumento no fator de temperatura (Figura 21). Dessa maneira, apenas moléculas longas, como o PEG e o alfa-tocoferol, que se alojam ao longo de todo o canal hidrofóbico, parecem conseguir estabilizar

eficientemente o dímero das Lys49-PLA₂s. Estas observações apontam para uma conexão estrutural entre o “sítio ativo” e a região responsável pela expressão da miotoxicidade, justificando a conservação dos aminoácidos envolvidos na atividade catalítica das fosfolipases A₂. A interação da região “sítio ativo” com moléculas de lisofosfolípido aderidos à membrana, resultantes da hidrólise de fosfolípidios provocada pelas Asp49-PLA₂s, causaria a formação da ponte Tyr119:Tyr119 e, conseqüentemente, a reorientação de um dos monômeros, colocando lado a lado a região responsável pela expressão da miotoxicidade (sítio miotóxico/C-terminal). A inibição da miotoxicidade provocada pelo BPB nas Lys49-PLA₂s (em torno de 50%) pode ser explicada por desestabilização provocada pelo BPB, demonstrado pelo aumento dos fatores de temperatura das estruturas modificadas quimicamente pelo BPB, sobretudo na região C-terminal (Figura 21). Dessa maneira, a inibição da atividade miotóxica pode ser alcançada através de duas diferentes maneiras: (i) obstrução do sítio miotóxico/região C-terminal, (ii) bloqueio físico da entrada do lisofosfolípido no canal hidrofóbico das Lys49-PLA₂s pela presença de um ligante na região do “sítio ativo” destas proteínas.

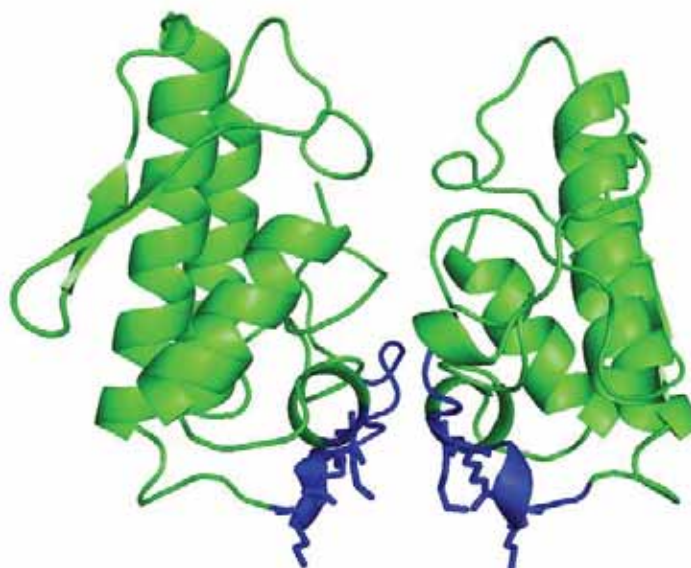


Figura 19: Estrutura de uma Lys49-PLA₂s complexada (PEG, BPB, alfa-tocoferol, suramina, ácidos graxos) com destaque em azul, para a região C-terminal, e em sticks, o sítio miotóxico proposto por dos Santos et al. (2009) (Lys20, Arg115, Lys118).

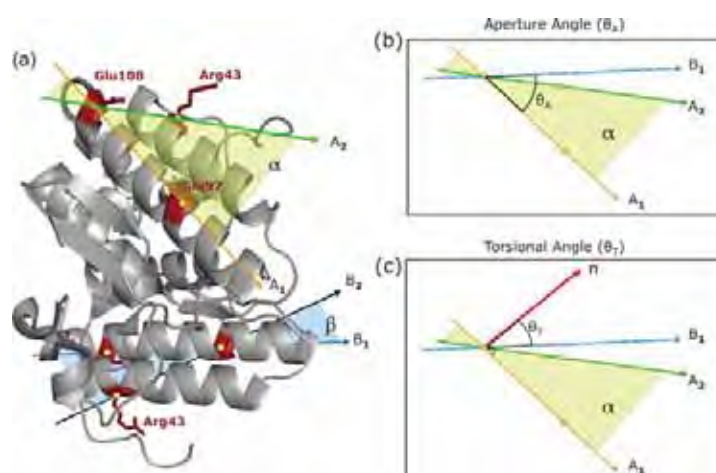


Figura 20: Modelo para caracterização estrutural das mudanças oligoméricas sofridas pelas Lys49-PLA₂s complexadas usando dois ângulos: θ_A (ângulo de abertura) indica o valor de abertura entre os monômeros definido pelo vetores A_1 (laranja) e B_1 (azul); θ_T (ângulo de torção) indica o ângulo de torção entre os planos α (bege) e β (azul) ocupado pelas α -hélices h2 e h3 dos monômeros A e B, respectivamente. Figura adaptada de dos Santos *et al.* (2009).

Tabela 6: Ângulos de torção (θ_T) e abertura (θ_A) para as estruturas de Lys49-PLA₂s nativas e complexadas (°)

		Ângulo θ_T (Torção)	Ângulo θ_A (Abertura)
Nativas	apo-BaspTX-II	44	22
	BnSP-7	60	6
	BnSP-6	60	6
	apoPrTX-I	60	7
	apo-dBthTX-I	60	7
Complexadas	PrTX-I/BPB	42	28
	dBthTX-I/BPB	53	23
	BthTX-I/PEG4K	40	14
	PrTX-I/ α T	41	12
	BthTX-I/ α T	40	11
	MjTX-II/ácido esteárico	52	20
	BaspTX-II/suramina	51	15
PrTX-II/ácido graxo	81	23	

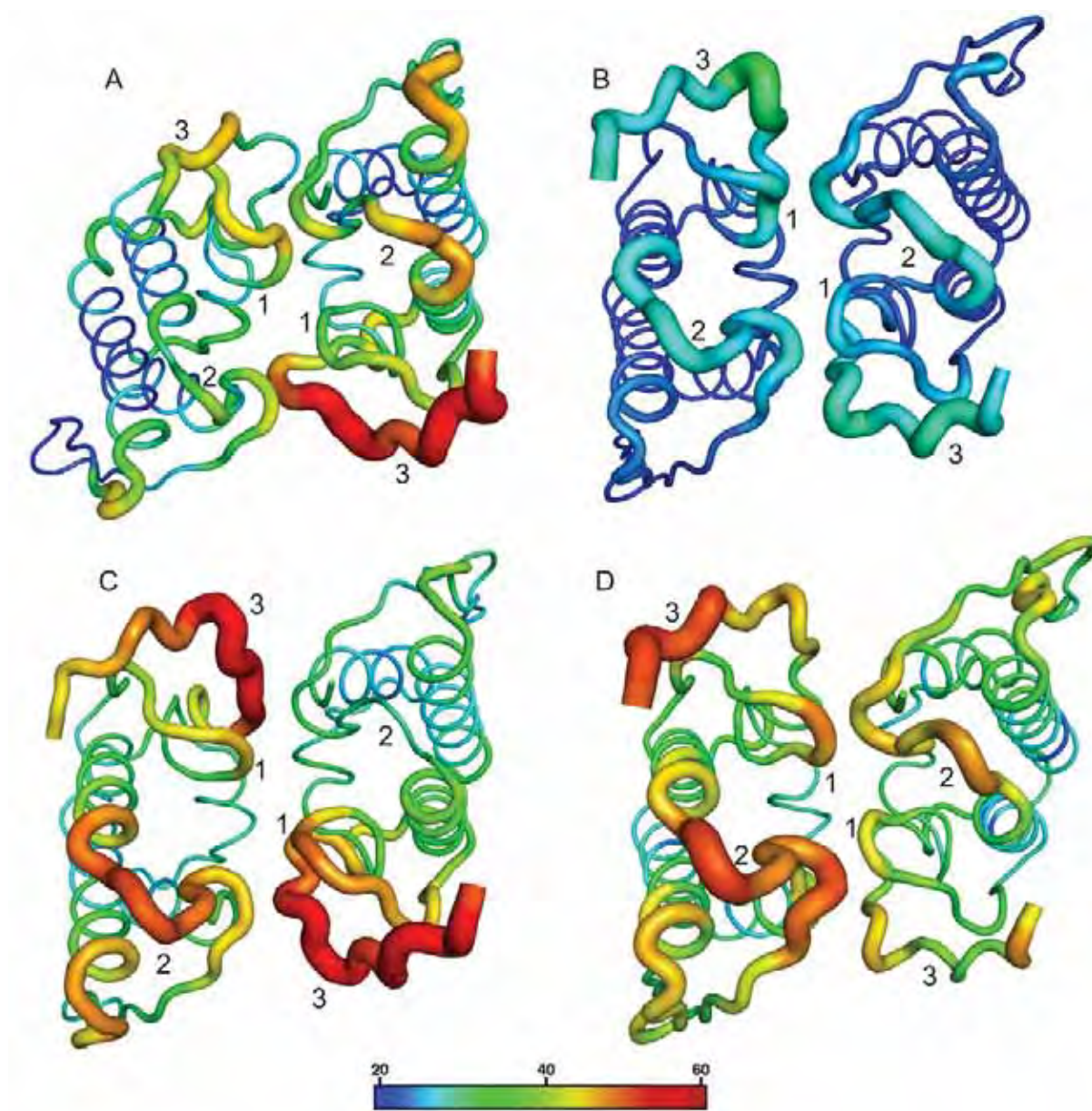


Figura 21: Comparação entre os fatores temperatura das estruturas diméricas. A. apo-dBthTX-I; B. BthTX-I/PEG4K; C. dBthTX-I/BPB; D. PrTX-I/BPB. Regiões com maior fator temperatura são mostradas em vermelho e as com menor fator temperatura em azul. As regiões apontadas como 1, 2 e 3 correspondem, respectivamente, a *loop* de ligação do Ca²⁺, loop 57-60 e região C-terminal.

4.1.2 Dímero biológico das *Lys49-PLA₂s*

Diversos experimentos mostraram que as *Lys49-PLA₂s* são proteínas diméricas, como análises espectroscópicas, espalhamento de raios X a baixo ângulo, e eletroforese, mesmo após aquecimento e na presença de β-mercaptoetanol (Da Silva Giotto *et al.*, 1998; Arni *et al.*,

1999; Soares *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 2007). Além disso, a dissociação dos monômeros leva a uma diminuição na atividade de dano à membrana (Angulo *et al.*, 2005). No presente estudo, realizamos um experimento de espalhamento dinâmico de luz com apo-BthTX-I. Os resultados (Figura 22) indicaram para a apo-BthTX-I, com uma polidispersividade 10,7%, um raio hidrodinâmico (R_H) de 2.5nm. Esse valor de R_H corresponde a um peso molecular de aproximadamente 28 kDa, reforçando, portanto que as Lys49-PLA₂s são um dímero em solução.

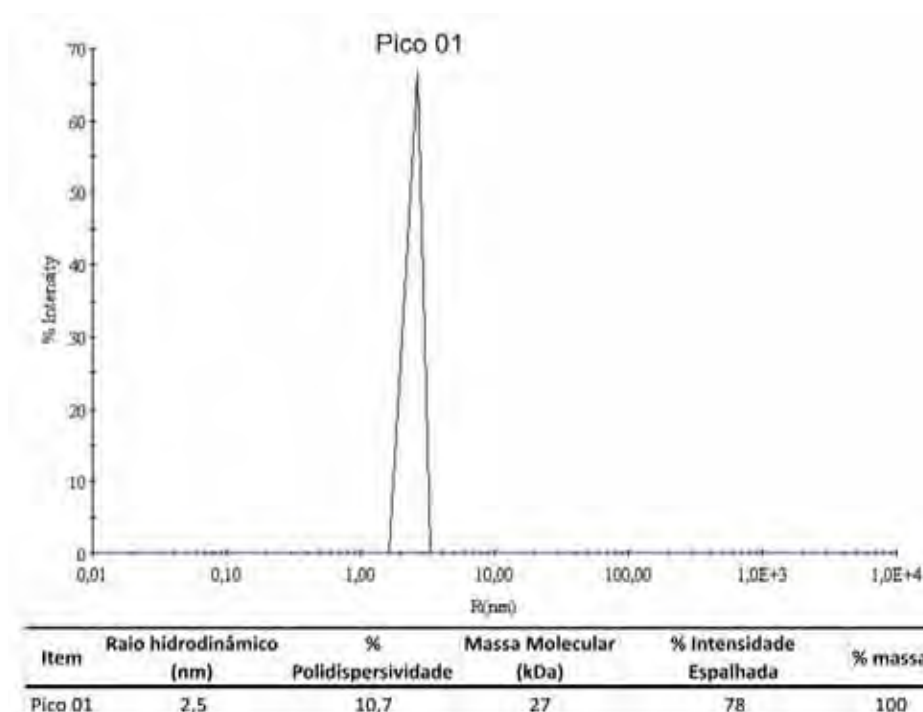


Figura 22: Gráfico do espalhamento dinâmico de luz (DLS) da bothropstoxina I (BthTX-I) a 293 K.

Apesar das mais variadas técnicas biofísicas demonstrarem que as Lys49-PLA₂s são dímeros em solução, existe um grande discussão sobre qual seria a conformação dimérica que representaria o dímero biológico já que a observação da rede cristalina das Lys49-PLA₂s não se permite apontar de maneira inequívoca qual seria o dímero biológico. Pela observação da rede cristalina das estruturas de Lys49-PLA₂s percebe-se que há duas possibilidades de dímeros. Uma delas, conhecida como “dímero convencional”, adotada em diversas estruturas

de Lys49-PLA₂s já elucidadas, relaciona os monômeros por um eixo de ordem dois perpendicular à região dos *B-wings*, sendo estabilizada por interações desta região e das hélices N-terminais, envolvendo resíduos conservados nas Lys49-PLA₂s: Gln11, Glu12, Trp77 e Lys80. Recentemente, no entanto, as estruturas cristalinas da BaspTX-II complexada com suramina (Murakami *et al.*, 2005) e da PrTX-I e BthTX-I complexadas com alfa-tocoferol (dos Santos *et al.*, 2009) mostraram que se estas estruturas fossem resolvidas utilizando como modelo o “dímero convencional”, uma porção das moléculas de suramina e alfa-tocoferol não interagiriam com nenhuma porção da proteína, ficando exposta ao solvente. Dessa maneira, estas estruturas foram resolvidas em uma conformação dimérica conhecida como “dímero alternativo”, onde as moléculas de suramina e alfa-tocoferol ficam totalmente inseridas no dímero e, portanto, não expostas ao solvente (Figura 23). Além disso, análises destas conformações diméricas programa *on line* PISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) (Krissinel & Henrick, 2007), que analisa os contatos da interface protéica das possibilidades de simetria cristalográfica e calcula qual interface tem maior probabilidade de ocorrer em solução, mostram que o dímero alternativo apresenta maior probabilidade de ocorrer em solução, já que apresenta maior área de interface e melhores valores de energia livre para as interfaces hidrofóbicas. Por fim, dos Santos *et al.* (2009) mostrou que a região responsável pela expressão da miotoxicidade (sítio mióxico/C-terminal) só conseguem estar lado a lado na conformação “dímero alternativo” e dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo também mostram que a conformação “alternativa” é tida como a que melhor representa o envelope protéico das Lys49-PLA₂s (Murakami *et al.*, 2007).

As estruturas diméricas (PrTX-I/BPB; apo-dBthTX-I; dBthTX-I/BPB; BthTX-I/PEG4K) aqui apresentadas também indicam o dímero alternativo como a conformação oligomérica biológica das Lys49-PLA₂s. As moléculas de PEG e BPB, assim como as moléculas de suramina e de alfa-tocoferol, também ficariam expostas ao solvente se as

estruturas fossem resolvidas utilizando o “dímero alternativo” (Figura 23). Além disso, a análise destas estruturas no programa PISA (Krissinel & Henrick, 2007) também mostrou maior área de interface e melhores valores de energia livre para as interações hidrofóbicas para a conformação “dímero alternativo” (Tabela 07). Interessantemente, as estruturas aqui apresentadas que possuem apenas uma molécula na unidade assimétrica (apo-mBthTX-I; mBthTX-I/BPB), ao serem submetidas a análise no PISA, indicaram, com um índice de complexação oligomérica em seu valor máximo (1,0), um dímero estável em solução na conformação “dímero alternativo”, com valores de área de interface e de energia livre próximos aos valores apresentados por todas as Lys49-PLA₂s (Tabela 07). Dessa maneira, tendo em vista os resultados aqui apresentados e os últimos resultados apresentados pela literatura, acreditamos que o “dímero alternativo” é a conformação oligomérica para as Lys49-PLA₂s, sendo, portanto, o dímero biológico deste grupo de proteínas.

Tabela 7: Valores da área de interface e ganho de energia livre de solvatação (Δ^iG) para as duas possíveis conformações oligoméricas das Lys49-PLA₂s

		Dímero Alternativo		Dímero Convencional	
		Área de Interface (Å ²)	Δ^iG (kcal/mol)	Área de Interface (Å ²)	Δ^iG (kcal/mol)
Nativas	apo-BaspTX-II	500,9	-11,2	365,5	-0,3
	BnSP-7	622,9	-10,3	494,2	-1,3
	BnSP-6	604,1	-9,6	505,1	-1,7
	apoPrTX-I	667,5	-12,9	475,3	-0,9
	apo-dBthTX-I	764,0	-15,6	485,7	-2,7
Complexadas	PrTX-I/BPB	573,2	-11,1	406,5	0,8
	dBthTX-I/BPB	487,2	-11,5	390,6	-0,3
	BthTX-I/PEG4K	568,9	-11,5	393,6	3,5
	PrTX-I/ α T	518,6	-11,6	361,9	-0,4
	BthTX-I/ α T	503,7	-11,8	379,9	0,1
	MjTX-II/ácido esteárico	485,6	-8,1	331,1	0,1
	BaspTX-II/suramina	526,1	-10,3	361,3	0
PrTX-II/ácido graxo	692,7	-17,7	429,6	1,4	
Uma molécula ASU	apo-mBtTX-I	528,3	-13,8	401,6	0,2
	mBthTX-I/BPB	638,2	-15,4	384,2	-0,9

Δ^iG indica o ganho de energia livre de solvatação com a formação da interface, em kcal/mol. Valores negativos de Δ^iG correspondem a interface hidrofóbicas ou afinidade protéica positiva. Δ^iG não inclui o efeito pela formação de pontes de hidrogênio e de pontes salinas na interface.

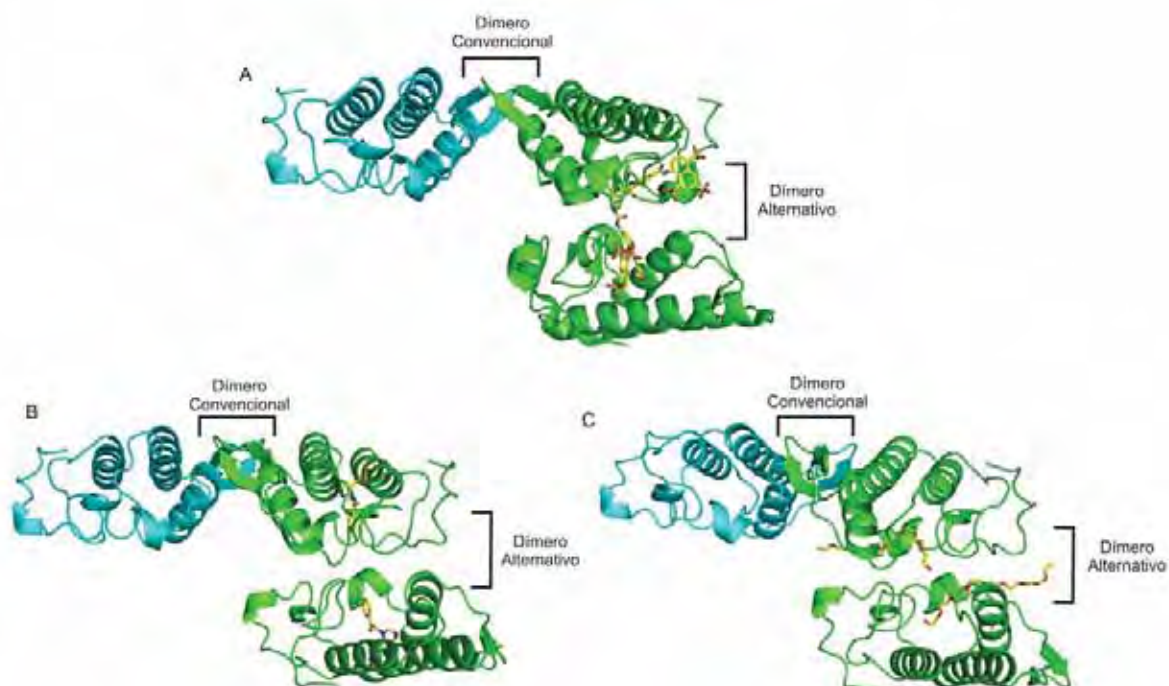


Figura 23: Representação das duas conformações diméricas possíveis para as Lys49-PLA₂s: o “alternativo” (em verde) e “convencional” (azul/verde) dímeros. A. Estrutura da BaspTX-II/suramina, destacando em *sticks* amarelos a molécula de suramina; B. Estrutura da BthTX-I/BPB, destacando em *sticks* amarelos a molécula de BPB; C. Estrutura da BthTX-I/PEG4K, destacando em *sticks* amarelos a molécula de PEG.

4.1.3 Revisão do papel da Lys122 na estrutura das Lys49-PLA₂s

Como observado anteriormente, desde os primeiros estudos com Lys49-PLA₂s, acreditava-se que esta classe de proteínas era cataliticamente inativa devido a sua incapacidade de se ligar ao co-fator Ca²⁺ e da posição do resíduo Lys49. A partir do clássico estudo conduzido por Lee *et al.* (2001), a partir da estrutura da piratoxina II (PrTX-II) de *Bothrops pirajai* cristalizada com ácido graxo, o resíduo Lys122 (conservado nas Lys49-PLA₂s; mas raro nas Asp49-PLA₂s) ganhou grande destaque ao ser apontado como responsável pela ausência da atividade das Lys49-PLA₂s devido a hiperpolarização que este resíduo provocaria na ligação peptídica Cys29-Gly30, que causaria a retenção de uma molécula de ácido graxo no sítio ativo destas proteína, interrompendo o ciclo catalítico. Desde então, um grande número de estruturas de Lys49, em suas formas nativas ou complexadas,

foram elucidadas, tornando necessária uma revisão da posição da Lys122 nestas novas estruturas. Levando-se em conta esse grande número de estruturas elucidadas, poderíamos ainda dizer que a Lys122 seria uma das responsáveis pela ausência da atividade catalítica nas Lys49-PLA₂s? A resposta que temos para essa pergunta é que provavelmente não.

Neste trabalho, nós realizamos uma comparação de 30 monômeros de Lys49-PLA₂s nativas e complexadas com o intuito de determinar se a Lys122 realmente contribuiria para perda da atividade catalítica desta classe de proteínas. Como podemos ver na tabela 08, em 12 monômeros a Lys122 interage com a Cys29, enquanto que em 18 esta interação não ocorre. A polarização descrita por Lee *et al.*(2001) ocorre em ambos os monômeros apenas nos complexos MjTX-II/ácido esteárico e PrTX-II/ácido graxo. Nas estruturas restantes, nativas ou complexadas, a interação Lys122/Cys29 ocorre apenas em um ou em nenhum dos monômeros (Tabela 08; Figura 24).

Em algumas estruturas, não há densidade eletrônica para a cadeia lateral da Lys122 acima de 1,2 σ de corte, provavelmente devido a sua alta flexibilidade, não interagindo, portanto, com a Cys29 ou com qualquer outro resíduo. Além disso, uma análise dos valores de *B-factor* das cadeias laterais da Lys122 (Tabela 08) mostra que apenas sete resíduos apresentam um valor de *B-factor* (fator temperatura) compatível com a média de suas respectivas proteínas, sendo que a maior parte dos casos restantes, os valores de *B-factor* das cadeias laterais da Lys122 é 50% maior que a média de suas respectivas estruturas. Esses resultados indicam uma grande flexibilidade do resíduo Lys122 na maioria das estruturas de Lys49-PLA₂s resolvidas até o momento; o que é incompatível com a proposta da hiperpolarização de Lee *et al.* (2001).

Tabela 8: Comparação dos valores de B-factor (fator temperatura) médio entre os átomos da cadeia lateral do resíduo Lys122 e os valores médios de suas respectivas estruturas e sumarização da posição deste resíduo entre as estruturas de Lys49-PLA2s.

		Média do valor de <i>B-factor</i> de todos os resíduos (Å ²)	Média do valor de <i>B-factor</i> da cadeia lateral da Lys122 (Å ²)		Presença de densidade eletrônica para a Lys122 (corte de 1,2σ)		Polarização da ligação Cys29/Gly30	
			Monômero A	Monômero B	Monômero A	Monômero B	Monômero A	Monômero B
Nativas	dBthTX-I	41.1	62.9	31.7	Sim	Sim	Não	Sim
	mBthTX-I	27.8	60.0	-	Sim	-	Não	-
	PrTX-I	34.1	42.4	31.2	Sim	Sim	Não	Sim
	BaspTX-II	12.1	27.1	23.0	#	#	Yes	Não
	BnSP-7	30.5	51.7	55.4	Sim	Sim	Não	Não
	BnSP-6	38.3	47.5	68.9	Sim	Sim	Sim	Não
Complexadas	dBthTX-I/BPB	48.7	-	-	Não	Não	Não	Não
	mBthTX-I/BPB	29.2	26.1	-	Sim	-	Sim	-
	BthTX-I-PEG4K	27.8	37.5	45.0	Sim	Sim	Yes	Não
	BthTX-I/αT	30.4	-	47.2	Não	Sim	Não	Não
	PrTX-I/BPB	48.9	66.9	65.1	Sim	Sim	Não	Não
	PrTX-I/αT	22.7	37.7	38.1	Sim	Sim	Não	Não
	PrTX-II/fatty acid	31.1	32.8	32.7	#	#	Sim	Sim
	MjTX-II/stearic acid	33.6	39.1	36.0	Sim	Sim	Sim	Sim
	BaspTX-II/suramin	24.0	32.5	48.1	Sim	Sim	Sim	Não
	BthTX-I/PEG 400	41.1	60.4	51.2	Sim	Sim	Não	Sim

[#]Apesar da presença da cadeia lateral do resíduo Lys122 estar presente na estrutura depositada no Protein Data Bank (PDB), nós não demos checká-la na densidade eletrônica.

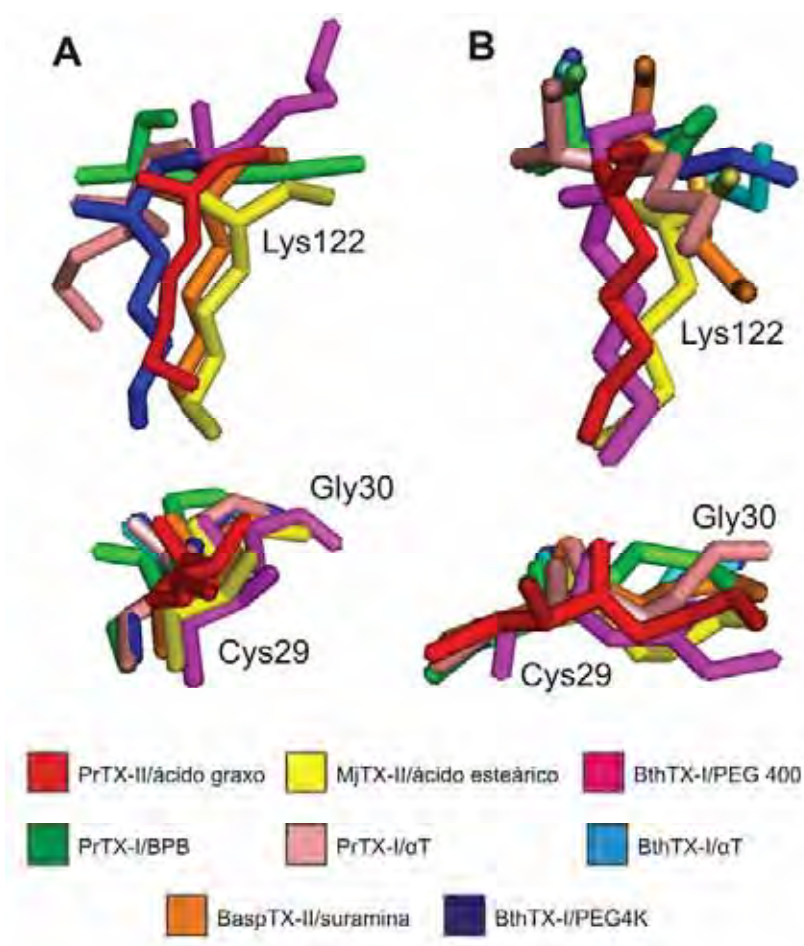


Figura 24: Variação da posição das cadeias laterais dos resíduos de Lys122 frente à ligação peptídica Cys29/Gly30. A. Monômeros A. B. Monômeros B. Como podemos observar, a Lys122 é um resíduo bastante flexível, podendo assumir diversas orientações.

Uma análise mais cuidadosa da posição da Lys122 nestas estruturas também mostra que, além da Cys29, este resíduo também pode interagir com o grupo carboxil de outros resíduos: Tyr25 na estrutura da mBthTX-I/BPB; Gly26 nas estruturas BnSP-6, apo-BaspTX-II e mBthTX-I/BPB; Cys27 nas estruturas BaspTX-II/suramina e apo-mBthTX-I; Leu32 e Gly33 na estrutura da BnSP-7 e Arg34 na estrutura da BaspTX-II/suramina (Figura 25). Dessa maneira, podemos concluir que a Lys122 é um resíduo extremamente flexível, que pode adotar um grande número de configurações, interagindo com diferentes cargas negativas. Por isso, acreditamos que não há um papel específico para as Lys122 para a ausência da atividade catalítica das Lys49-PLA₂s. Acreditamos também que a sua conservação dentro desta classe de proteínas deve estar relacionada à sua participação essencial na expressão da atividade miotóxica, como proposta previamente por Ambrosio *et al.* (2005) e demonstrado por experimentos de mutação sítio dirigida, onde a substituição da Lys122 por Ala na BthTX-I resultou em uma significativa redução da atividade miotóxica (Ward *et al.*, 2002; Chioato *et al.*, 2007).

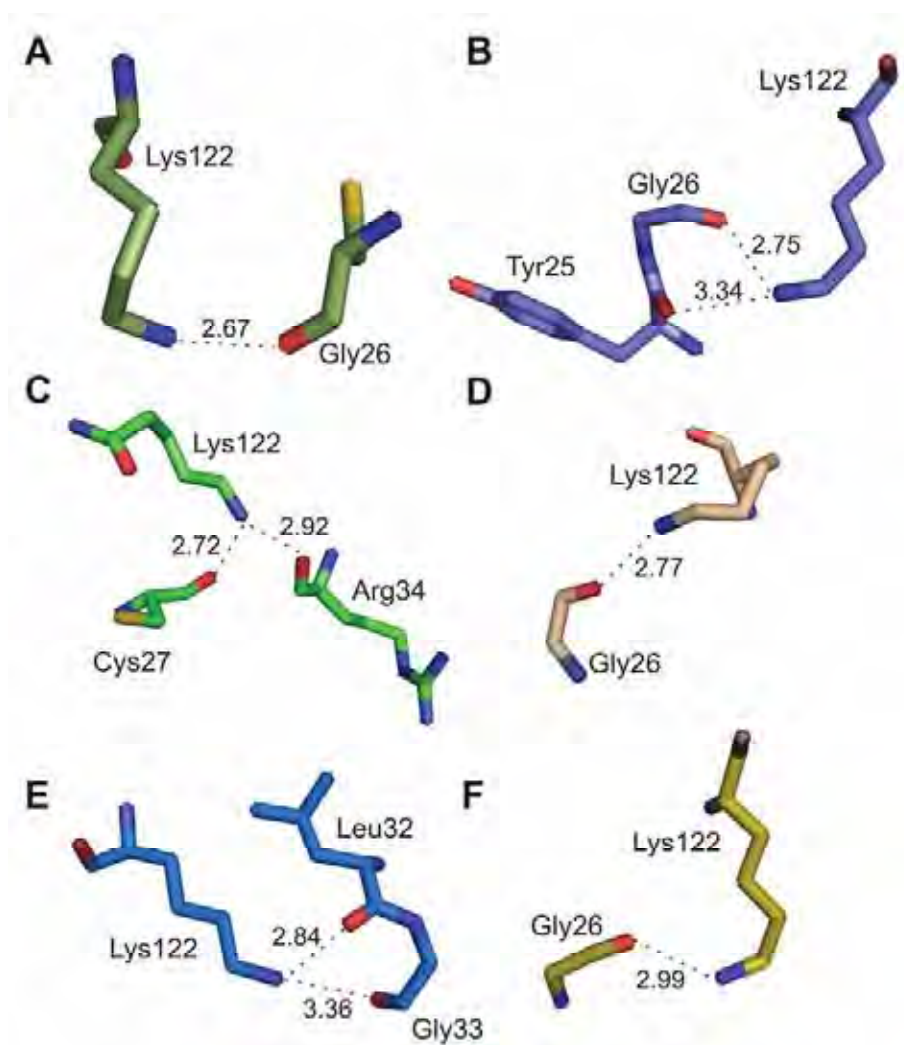


Figura 25: Interações que a Lys122 realiza com outros resíduos, que não a Cys29, entre as mais diversas estruturas das Lys49-PLA₂s. A. apo-mBthTX-I; B. mBthTX-I/BPB; C. BaspTX-II/suramina; D. apo-BaspTX-II; E. BnSP-7; F. BnSP-6.

4.1.4 O papel do loop de ligação do Ca²⁺

As Lys49-PLA₂s é uma classe de proteínas especialmente intrigante, porque apresentam alto grau de similaridade estrutural com as Asp49-PLA₂s e, apesar da ausência de atividade catalítica, com exceção do resíduo Asp49, estas proteínas conservam todos os outros resíduos que participam da hidrólise de fosfolipídios (His48, Tyr53 e Asp99). Entretanto, a mutação reversa Lys49Asp não provoca nenhum efeito sobre a atividade catalítica destas proteínas, indicando que outras alterações estruturais, demonstrando que outras alterações estruturais, além da simples substituição Asp49Lys, devem ser responsáveis pela ausência de

atividade enzimática. Ao analisarmos uma sobreposição dos C_{α} da região do *loop* de ligação do Ca^{2+} (27-35) de um dos monômeros (o outro se comporta de maneira semelhante) entre as Asp49, Lys49 e Arg49-PLA₂s observamos que nessa região, as Lys49 e Arg49 possuem grandes semelhanças entre si e grandes diferenças em relação às Asp49-PLA₂s (Figura 26; Tabela 09). Com relação às Asp49, elas também possuem grandes semelhanças entre si nessa região, com exceção das Asp49 com baixa atividade catalítica (p.ex. BtTX-II e PrTX-III que, da mesma maneira que as Lys49 e Arg49-PLA₂s, possuem atividade miotóxica) que possuem um *loop* de ligação de Ca^{2+} totalmente desordenado (Figura 26; Tabela 09).

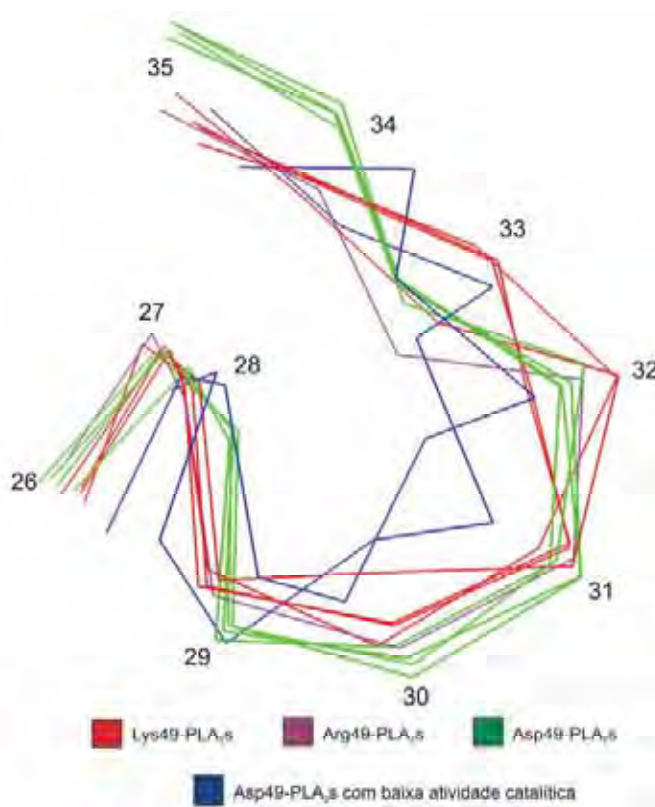


Figura 26: Sobreposição de C α de um dos monômeros entre estruturas de Lys49, Arg49 e Asp49-PLA₂s. Os números referem-se aos números dos resíduos que ali se localizam. As Asp49-PLA₂s, em verde, estão representadas pela BthA-I-PLA₂s de *Bothrops jararacussu* (PDB ID 1U73, Fosfolipase ácida de *Gloydius halys* (PDB ID 1PSJ) DPLA₂s de *Daboia russellii pulchella* (PDB ID 1FB2) e β 2-Bungarotoxin de *Bungarus multicinctus* (PDB ID 1BUN). As Asp49-PLA₂s com reduzida atividade catalítica, em azul, estão representadas pela BthTX-II de *Bothrops jararacussu* (PDB ID 2OQD) e PrTX-III de *Bothrops pirajai* (PDB ID 1GMZ). As Lys49-PLA₂s, em vermelho, estão representadas pela apo-dBthTX-I de *Bothrops jararacussu*, apo-PrTX-I de *Bothrops pirajai* (PDB ID 2Q2J), BnSP-7 de *Bothrops neuwiedi* (PDB ID 1PA0), apo-BaspTX-II de *Bothrops asper* (PDB ID 1CLP), godMT-II de *Cerrophidion goodmani* (PDB ID 1GOD) e Anum-II de *Atropoides nummifer* (PDB ID 2AOZ). As Arg49-PLA₂s estão representadas pela zhaoermiatoxin de *Zhaoermia mangshanensis* (PDB ID 2PH4).

Tabela 9: Valores de r.m.s.d. para a sobreposição de C α da região do loop de ligação de Ca²⁺ entre estruturas de Lys49, Arg49 e Asp49-PLA₂s (Å).

		apo-dBthTX-I
Lys49	PrTX-I	0,372
	BnS P-7	0,491
	BnS P-6	0,498
	PrTX-II/ácido graxo	0,616
	MjTX-II/ácido graxo	0,616
	BthTX-I/ α T	0,412
	PrTX-I/ α T	0,410
	BthTX-I/PEG 4K	0,324
	BaspTX-II	1,094
	godMT-II	1,520
Asp49	BthA-I-PLA ₂	1,899
	Acid-PLA ₂	1,759
	DPLA ₂	1,617
	β 2-Bungarotoxin	1,712
Asp49**	BthTX-II	2,152
	PrTX-III	3,188

** Asp49-PLA₂s com reduzida atividade catalítica

O alinhamento da região do *loop* de ligação de Ca²⁺ entre as sequências de Asp49-PLA₂s, Lys49-PLA₂s e Arg49-PLA₂s revela que há uma substituição de um resíduo de Tyr (conservado em todas as Asp49) por um resíduo de Asn na posição 28 nas Lys49 e Arg49-PLA₂s (Figura 27). A posição da cadeia lateral desses resíduos é extremamente conservada dentre estas estruturas, com exceção para a posição da cadeia lateral da Tyr28 nas estruturas de Asp49-PLA₂s com reduzida atividade catalítica (Figura 28).

Asp49		26 28 35
	Apispis2	: FCYCGW GGQ ER
	Tfla4	: FCYCGW GGQ ER
	Ghal7	: FCYCGW GGQ ER
	Ghal1	: FCYCGG GGQ ER
	Bery1	: FCYCGS GGQ ER
	Bsch3	: FCYCGA GGQ ER
	Tfla5	: FCYCGK GGQ ER
	Ghal3	: FCYCGS GGQ ER
	Dacu2	: FCYCGW GGQ EW
	Pmuc1	: FCYCGW GGQ ER
	Tgra4	: FCYCGK GGH ER
	Ghal6	: FCYCGS GGR ER
	Bsch2	: FCYCGW GGQ EQ
	Cgod4	: FCYCGW GGQ ER
	Ookil	: FCYCGA GGQ ER
	Dacui	: FCYCGW GGH ER
	Ghal9	: FCYCGW GGQ ER
Bjar3	: FCYCGW GGQ EQ	
Basp2	: FCYCGW GGQ EQ	
Bjar1	: FCYCGL GGQ EQ	
Lys49		26 28 35
	Cgod1	: FCNCGV GGSP ER
	Pmuc2	: FCNCGV GNR ER
	Crho1	: FCNCGV GNR ER
	Bsch1	: FCNCGV RRR EQ
	Apispi1	: FCNCGW RRR EQ
	Tfla1	: FCNCGV RRR ER
	Basp1	: FCNCGV LGR ER
	Bpir1	: FCNCGV LGR ER
	Ook12	: FCNCGM RRR ER
	Basp3	: FCNCGV LGR ER
	Anum1	: FCNCGV SR ER
	Dacu3	: FCNCGV GGK EE
	Bmoo2	: FCNCGV GGP ER
	Tgra2	: FCNCGP GGRF ER
	Bmoo1	: FCNCGV LGR ER
	Bpaul	: FCNCGV LGR EQ
	Tgral	: FCNCGP GGRF ER
Batri	: FCNCGV GGK ER	
Bpir2	: FCNCGV LGR ER	
Bjar4	: FCNCGV LGR ER	
Asp49		26 28 35
Zman1	: FCNCGV RRR ER	

Figura 27: Alinhamento da região do *loop* de ligação do Ca^{2+} de sequências de Asp49-PLA₂s, Arg49-PLA₂s e Lys49-PLA₂s presentes no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Destaques para o primeiro resíduo do *loop* de ligação do Ca^{2+} (resíduo 26) e para resíduos envolvidos na estabilização dessa região (resíduos 28 e 35). Para ver os códigos, consultar Tabela 10.

Tabela 10: Códigos utilizados no alinhamento da região do *loop* de ligação do Ca²⁺ de sequencias de Asp49-PLA₂S, Arg49-PLA₂S e Lys49-PLA₂S.

Classe	Serpente	Proteína	Código de quatro letras	Código de acesso no NCBI (GI)
Lys49	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	APP-K-49	Apispis1	129478
	<i>Bothriechis schlegelii</i>	Bsc-K49	Bsch1	3122600
	<i>Atropoides nummifer</i>	Myotoxin II	Anum1	17433156
	<i>Bothrops asper</i>	Myotoxin II	Basp1	166215047
	<i>Bothrops atrox</i>	Myotoxin I	Batr1	40888878
	<i>Bothrops jararacussu</i>	Bothropstoxin-I (BthTX-I)	Bjar4	17433154
	<i>Bothrops moojeni</i>	Myotoxin I (MjTX-I)	Bmoo1	17368325
	<i>Bothrops moojeni</i>	Myotoxin II	Bmoo2	17865560
	<i>Bothrops pauloensis</i>	Bnsp-7	Bpau1	17368328
	<i>Bothrops pirajai</i>	Piratoxin-II (PrTX-II)	Bpir2	17368328
	<i>Bothrops pirajai</i>	Piratoxin-I (PrTX-I)	Bpir1	17433154
	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	G6K49	Crho1	3122600
	<i>Cerrophidion godmani</i>	GODMT-II	Cgod1	265051
	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Dac-K49II	Dacu3	26397573
	<i>Ovophis okinavensis</i>	Phospholipase A2 homolog PLA2-03	Ooki 2	26006828
	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	TMV-K49	Pmuc2	129468
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Basic protein I	Tfla1	400717
	<i>Trimeresurus gramineus</i>	PLA2-V	Tgra1	3914265
	<i>Trimeresurus gramineus</i>	PLA2-VII	Tgra2	20177995
	Asp49	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	APP-D-49	Apispis2
<i>Bothriechis schlegelii</i>		N6 basic phospholipase A2	Bsch2	38230125
<i>Bothriechis schlegelii</i>		acidic phospholipase A2	Bsch3	59726986
<i>Bothrops asper</i>		Myotoxin III	Basp2	166214965
<i>Bothrops erythromelas</i>		BE-I-PLA2	Bery1	86450426
<i>Bothrops jararacussu</i>		Bothropstoxin-II (BthTX-II)	Bjar3	1171971
<i>Bothrops jararacussu</i>		BthA-I	Bjar1	25140377
<i>Cerrophidion godmani</i>		N1E6a phospholipase A2	Cgod4	59727008
<i>Deinagkistrodon acutus</i>		Acid Phospholipase A ₂	Dacu1	90265326
<i>Deinagkistrodon acutus</i>		Phospholipase A2	Dacu2	97180272
<i>Gloydus halys</i>		Phospholipase A2	Ghal1	2460035
<i>Gloydus halys</i>		B-PLA2 phospholipase A2	Ghal6	27151647
<i>Gloydus halys</i>		Phospholipase A2 BA2	Ghal3	27151650
<i>Gloydus halys</i>		Phospholipase A2	Ghal7	27151651
<i>Gloydus halys</i>		Acid Phospholipase A ₂	Ghal8	129399
<i>Ovophis okinavensis</i>		Phospholipase A2	Ooki1	1769398
<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>		Trimucrotroxin	Pmuc1	26006835
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>		Phospholipase A2	Tfla5	28202237
<i>Trimeresurus gramineus</i>		PLA2-II	Tgra4	3914268
Arg49		<i>Zhaoermia mangshanensis</i>	Zhaoermiatoxin	Zman1

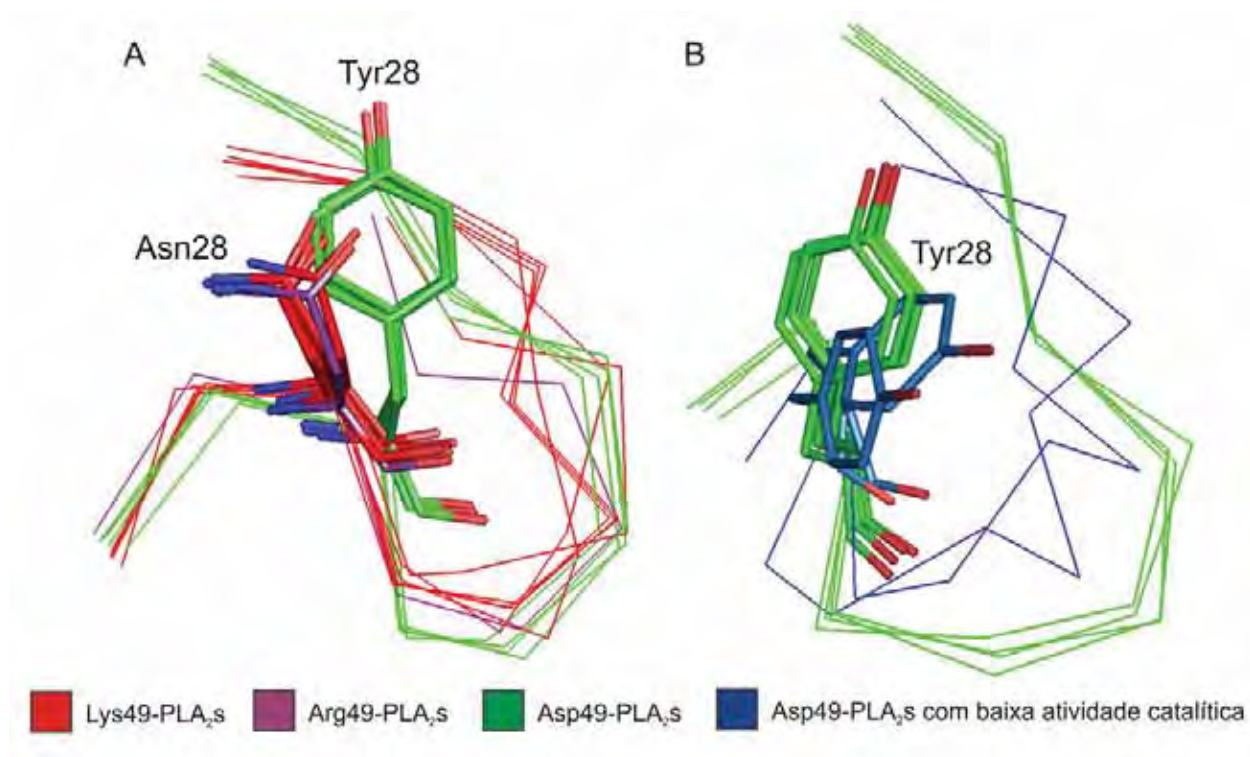


Figura 28: Posição da cadeia lateral dos resíduos Tyr28 (nas Asp49-PLA₂s) e Asn28 (nas Arg49 e Lys49-PLA₂s). As Asp49-PLA₂s, em verde, estão representadas pela BthA-I-PLA₂s de *Bothrops jararacussu* (PDB ID 1U73), Fosfolipase ácida de *Glycydium halys* (PDB ID 1PSJ) DPLA₂s de *Daboia russellii pulchella* (PDB ID 1FB2) e β 2-Bungarotoxin de *Bungarus multicinctus* (PDB ID 1BUN). As Asp49-PLA₂s com reduzida atividade catalítica, em azul, estão representadas pela BthTX-II de *Bothrops jararacussu* (PDB ID 2OQD) e PrTX-III de *Bothrops pirajai* (PDB ID 1GMZ). As Lys49-PLA₂s, em vermelho, estão representadas pela apo-dBthTX-I de *Bothrops jararacussu*, apo-PrTX-I de *Bothrops pirajai* (PDB ID 2Q2J), BnSP-7 de *Bothrops neuwiedi* (PDB ID 1PA0), apo-BaspTX-II de *Bothrops asper* (PDB ID 1CLP), godMT-II de *Cerrophidion goodmani* (PDB ID 1GOD) e Anum-II de *Atropoides nummifer* (PDB ID 2AOZ). As Arg49-PLA₂s estão representadas pela Zhaoermiatoxina de *Zhaoermia mangshanensis* (PDB ID 2PH4).

Ao analisarmos as ligações que o resíduo Tyr28 realiza dentro da estrutura, observamos que para as Asp49-PLA₂s (com exceção para as enzimas com baixa atividade catalítica), o oxigênio H da Tyr28 forma um ponte de hidrogênio com o N da cadeia principal da Gly35 (Figura 29). Essa ponte parece ser conservada em todas as Asp49-PLA₂s já que a estrutura da fosfolipase A₂ bovina também apresenta essa ligação (Figura 29). Essa ponte de hidrogênio deve levar a uma estabilidade do *loop* de ligação de Ca²⁺, demonstrado pela distância d (Figura 30) que reflete a abertura do *loop* de ligação de Ca²⁺. Essa distância d é calculada pela distância entre os C _{α} da Tyr28 e Gly33. Nas estruturas de Asp49-PLA₂s essa distância é da ordem de 4,3Å (Tabela 11). Já nas Lys49-PLA₂s, com a substituição do resíduo

de Tyr por um de Asn na posição 28, ocorre a perda dessa ponte de hidrogênio, levando à uma desestabilização do *loop* de ligação do Ca^{2+} deve impedir a ligação do co-fator Ca^{2+} , demonstrado pela distância d da ordem de $6,3\text{\AA}$, exceção apenas para godMT-II, provavelmente devido à sua limitada resolução ($2,8\text{\AA}$), que pode provocar dúvidas quanto à modelagem de regiões flexíveis, como é o caso do *loop* de ligação de Ca^{2+} . Interessantemente, as Arg49-PLA₂s, apesar da presença de um resíduo Asn na posição 28, possuem uma distância d de $4,83\text{\AA}$. Provavelmente isso se dê devido à substituição, nessas proteínas do resíduo de Gly por um resíduo de Arg na posição 33 (Figura 27) que deve levar uma nova configuração dessa região. Com relação às Asp49-PLA₂s com baixa atividade catalítica, apesar da presença da Tyr28, elas apresentam um *loop* de ligação de Ca^{2+} totalmente distorcido. Entretanto, se olharmos a posição da cadeia lateral deste resíduo perceberemos que ela não possui a mesma orientação que a cadeia lateral destes resíduos nas demais Asp49-PLA₂s (Figura 28) provavelmente devido à interação deste resíduo com o resíduo Asp49. Dessa maneira, não há a formação da ponte de hidrogênio entre a Tyr27 e a Gly35, causando um desarranjo no *loop* de ligação do Ca^{2+} .

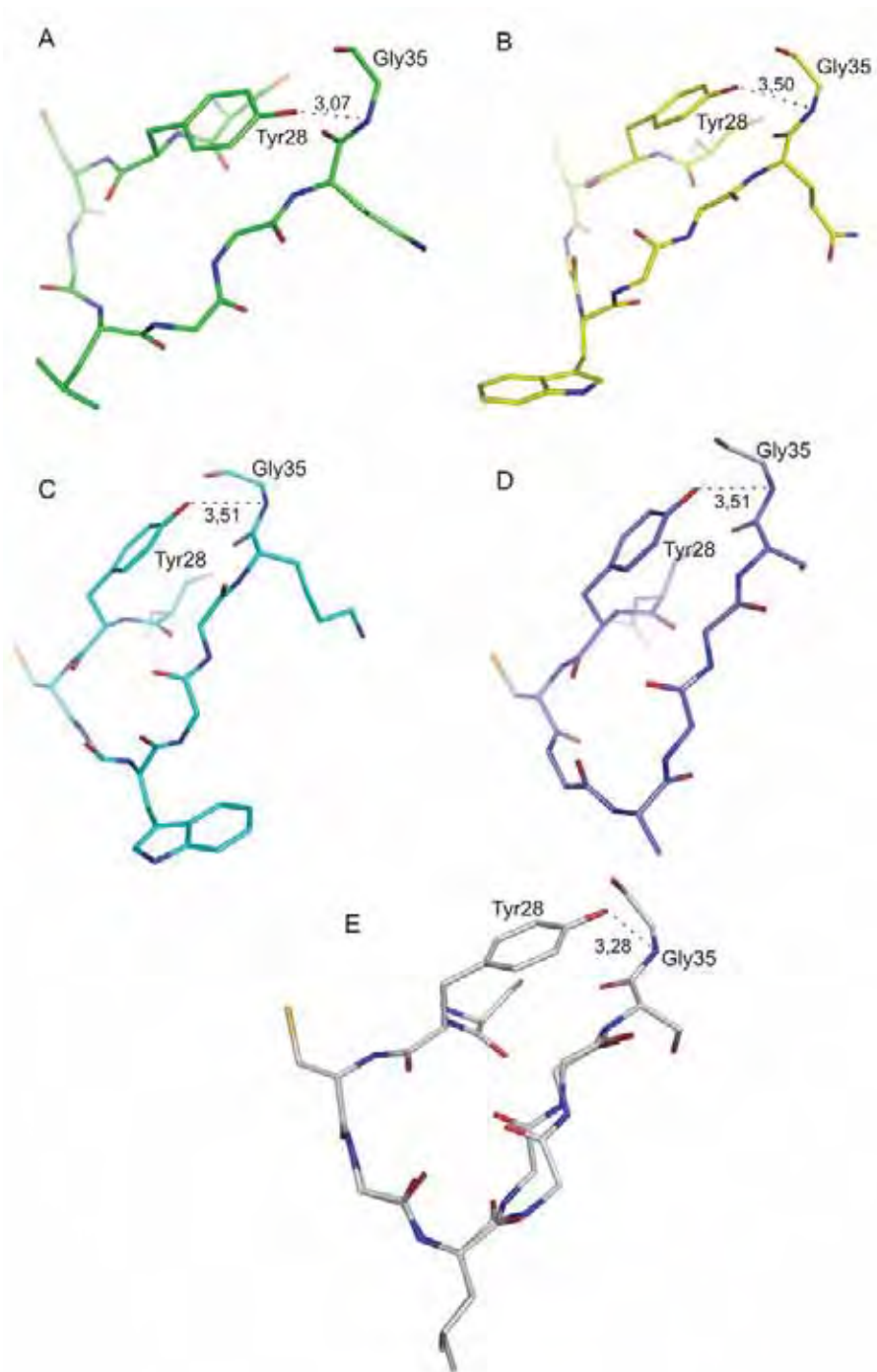


Figura 29: Ponte de hidrogênio formado pelo oxigênio H da Tyr27 com o N da cadeia principal da Gly35, que leva a estabilização do *loop* de ligação de Ca^{2+} nas Asp49-PLA₂s. *A.* BthA-I-PLA₂s (PDB ID 1U73), *B.* Fosfolipase ácida (PDB ID 1PSJ), *C.* DPLA₂s (PDB ID 1FB2), *D.* β 2-Bungarotoxin (PDB ID 1BUN), *E.* Fosfolipase pancreática bovina (PDB ID 1G4I).

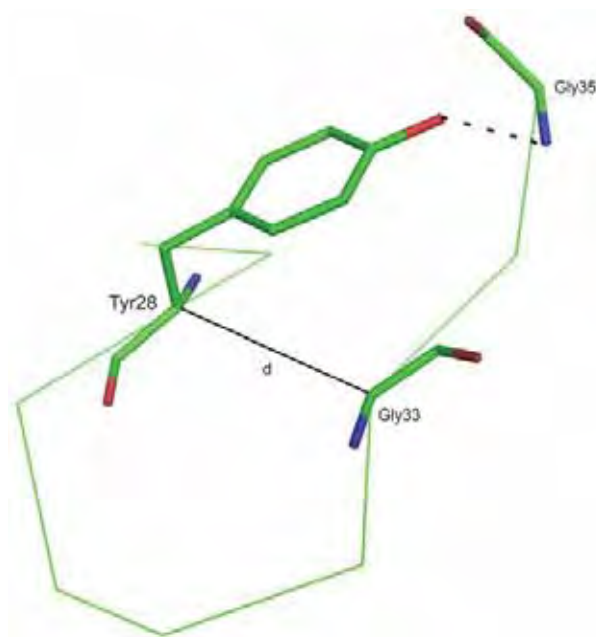


Figura 30: Distância d que reflete a abertura do *loop* de ligação de Ca^{2+} estabilizado pela ponte de hidrogênio formada pelo oxigênio H da Tyr com o N da cadeia principal da Gly35. Figura gerada a partir da estrutura da BthA-I-PLA₂s de *Bothrops jararacussu* (PDB ID 1U73).

Tabela 11: Valor da distância d que reflete a abertura do *loop* de ligação de Ca^{2+} em estruturas Asp49, Arg49 e Lys49-PLA₂s (Å)

Classe	Proteína	d
Lys49	apo-dB thTX-I	6,05
	PrTx-I	6,22
	BnSP-7	6,46
	BaspTX-II	6,26
	Anum-II	6,30
	godMT-II	5,06
Arg49	Zhaoermiatoxina	4,83
Asp49	BthA-I-PLA ₂	4,20
	Acida-PLA ₂	4,41
	DPLA ₂	4,58
	β 2-Bungarotoxin	4,33
	PLA ₂ pancreática bovina	3,91

4.2 Estudos evolutivos

4.2.1 Inferências evolutivas de serino proteases de venenos de répteis da ordem Squamata

Como já abordado na introdução, as serino proteases de veneno de serpentes, apesar de um alto grau de similaridade estrutural e sequencial, são capazes de promover a catálise de macromoléculas bastante distintas entre si e a análise filogenética dessas proteínas poderia fornecer dados interessantes a respeito da história evolutiva desse grupo bem como ajudar no entendimento do mecanismo de ação dessas enzimas. Neste trabalho, realizamos uma análise filogenética, utilizando inferência bayesiana, a partir de sequências de aminoácidos de serino proteases de veneno de répteis da ordem Squamata (Figura 31). Essa ordem contém os répteis peçonhentos representados pelas famílias Varanidae e Helodermatidae, bem como todas as serpentes peçonhentas, representadas pelas famílias Viperidae, Elapidae (mais conhecidas), Colubridae e Hydrophiidae, sendo que sequências representantes de todos esses grupos foram encontrados nos bancos de dados. A árvore filogenética (Figura 31) mostra que as sequências representantes da família Elapidae – admitindo que o veneno de répteis das famílias Varanidae e Helodermatidae são mais primitivos que os das serpentes (Fry *et al.*, 2006) e por isso escolhido como grupo externo – se agrupam fora da árvore, não mantendo relacionamento filogenético com sequências de nenhuma das outras famílias.

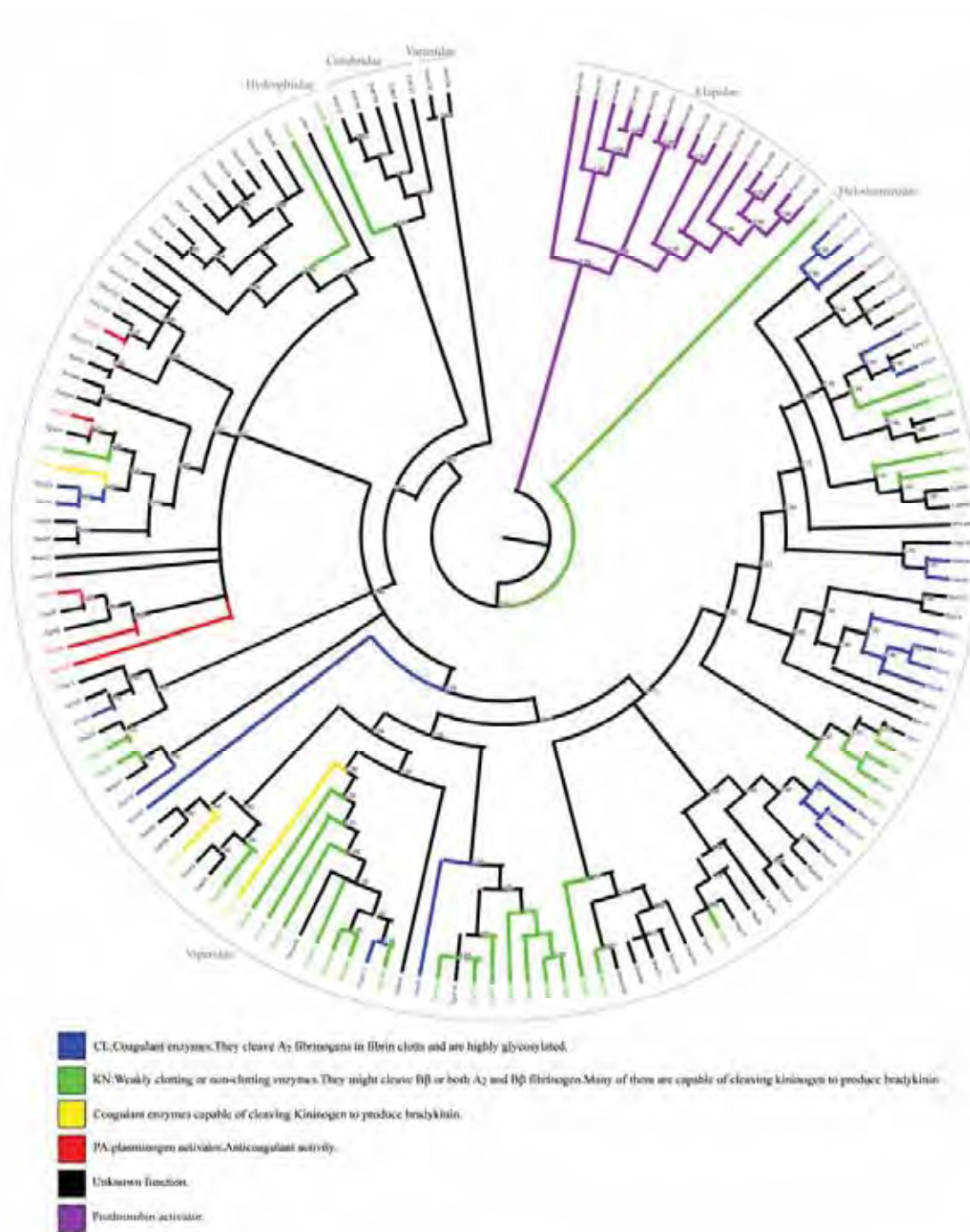


Figura 31: Árvore filogenética de serino proteases de veneno de vertebrados da ordem Squamata. As cores dos nomes e dos ramos correspondem à atividade farmacológica das enzimas. Os valores de probabilidade posterior após 1.000.000 ciclos estão indicados nos nós. Para ver os códigos, consultar tabela 12. E-value mínimo de 1e-15.

A análise dos domínios conservados utilizando o programa *on line* Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) (Finn *et al.*, 2006) mostrou que as sequências da família Elapidae possuem três domínios, um domínio tripsina, um domínio *EGF-like* e um domínio de carboxilação vitamina K-dependente (GLA); enquanto que as sequências de todas as outras famílias de serpentes e de répteis venenosos possuem apenas o domínio tripsina conservado. Além disso, enquanto que nas outras famílias de serpentes, há sequências com diferentes ações tóxicas sobre a cascata de coagulação, na família Elapidae, todas as sequências funcionam apenas como ativadoras de protrombina. Por fim, a busca por sequências homólogas nos bancos de dados utilizando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), retorna diferentes resultados quando comparamos as sequências de Elapidae e as demais famílias de serpentes.

Na família Elapidae, a busca por sequências homólogas em outros vertebrados resulta em sequências correspondentes ao fator de coagulação Xa de mamíferos e, inclusive de fatores de coagulação Xa de serpentes da própria família Elapidae (Tabela 13), corroborando anteriormente apresentada (Reza *et al.*, 2006) onde as serino proteases do veneno destas serpentes seriam originadas de duplicações do fator de coagulação Xa do fígado. Entretanto, todas as sequências de serino proteases da família Elapidae que encontramos nos bancos de dados pertencem a espécies endêmicas da Austrália e, portanto, não sabemos se podemos extrapolar estes dados para todas as espécies da família Elapidae devido ao isolamento geográfico que a Austrália sofreu há 23 milhões de anos, no período Oligoceno (Salgado-Laboreau, 1998). Utilizando como grupo externo três sequências de trombinas isoladas do fígado de *Cynos puyrrhorgaster* (Salamandra, Cpuy1), *Elaphe* sp. (Serpente, família Colubridae, Ela1) e de *Gekko gecko* (Lagarto asiático, Ggec1) construímos uma árvore filogenética para as sequências encontradas de serino proteases da família Elapidae (Figura 32). Na árvore, é possível visualizar a duplicação gênica a partir do fator Xa presente no fígado, com a presença de sequências desse tipo em ramos ancestrais ou em ramos irmãos das

sequências oriundas do veneno dessas serpentes. Além disso, podemos observar também que a ativação de protrombina do tipo D parece ser o caráter ancestral, pois só requer uma transformação de caráter (sendo que se fosse a do tipo C requereria duas transformações, ou seja, é menos parcimonioso) e que as enzimas ativadoras de protrombina do tipo C parecem ser uma duplicação exclusiva da subfamília Acanthophiinae.

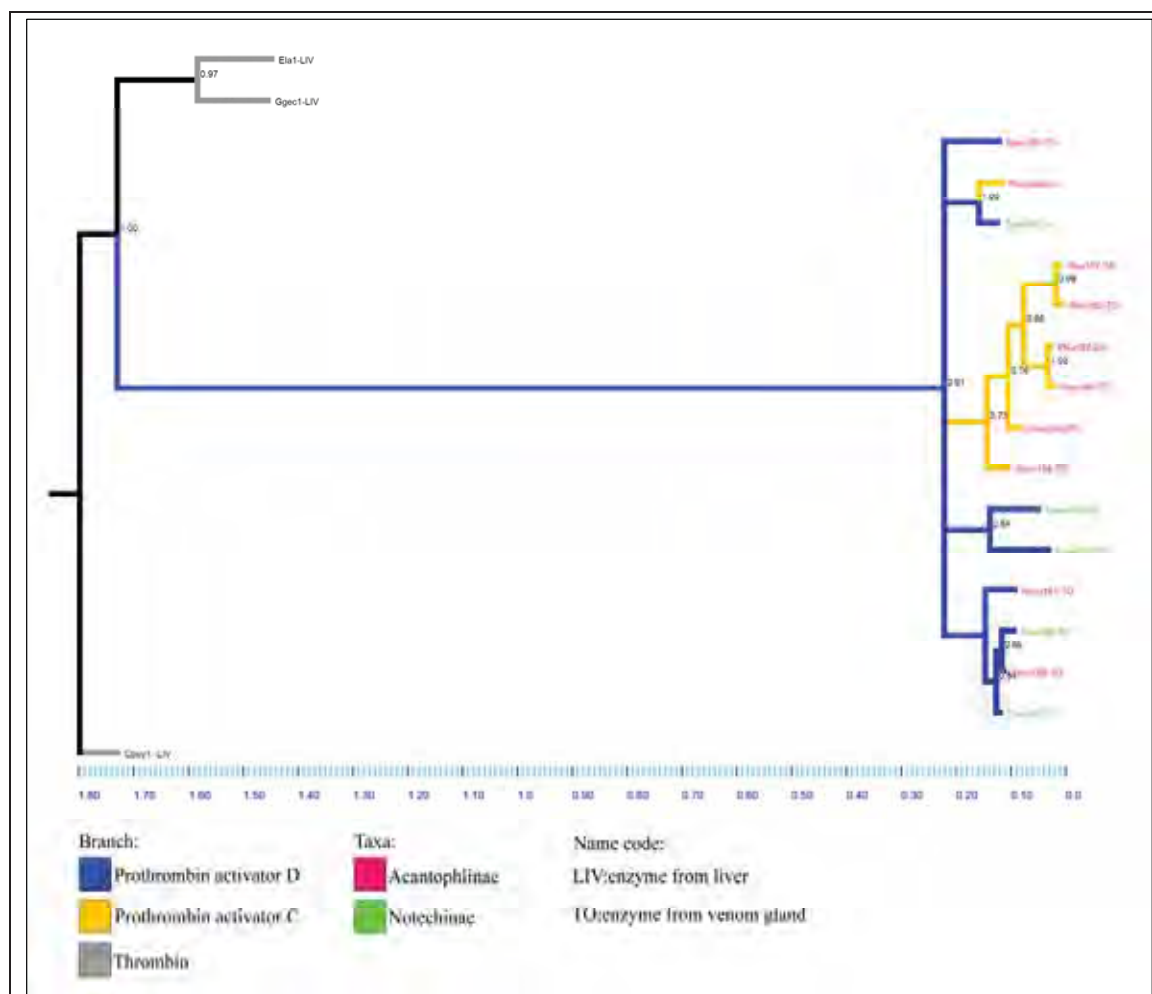


Figura 32: Árvore filogenética de serino proteases de serpentes da família Elapidae. A cor do ramo corresponde pela atividade farmacológica da enzima. A cor do nome da seqüência corresponde à subfamília a qual a serpente que possui esta enzima pertence. No nome de cada seqüência há um código que identifica o tecido de origem da enzima. Os valores de probabilidade posterior após 500.000 ciclos estão indicados nos nós. Para ver os códigos, consultar tabela 12. Ramos com valores de probabilidade posterior menor que 0,70 foram colapsados. E-value mínimo de 4e-28.

Tabela 13: Sequências homólogas às serino proteases do veneno de Elapidae encontradas no banco de dados do NCBI através do programa BLAST (Altschul et al., 1990).

Organismo	Proteína	Código de acesso (NCBI)	Identidade (%)	E-value
<i>Danio rerio</i>	coagulation factor X	34783784	53	3e-74
<i>Takifugu rubripes</i>	coagulation factor X	74095913	51	4e-73
<i>Gallus Gallus</i>	coagulation factor X	45384308	61	2e-89
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	coagulation factor X	9837158	53	5e-80
<i>Bos taurus</i>	coagulation factor X	75773761	58	8e-84
<i>Sus scrofa</i>	coagulation factor X	113205818	56	1e-81
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	coagulation factor X	126723388	57	2e-83
<i>Mus musculus</i>	coagulation factor X	6665716	56	3e-81
<i>Homo sapiens</i>	coagulation factor X	4503625	56	1e-81

Já com relação às outras famílias de serpentes, a busca por sequências homólogas em outros vertebrados resulta em sequências correspondentes às enzimas presentes na saliva de diversos animais (Tabela 14). Esses dados indicam, portanto, uma origem evolutiva diferente entre as serino proteases presentes no veneno das serpentes da família Elapidae e as presentes no veneno de outras famílias de serpente peçonhentas. Mais uma vez, graças à falta de sequências de serino proteases de serpentes da família Elapidae de outros locais do planeta, não podemos concluir se isso pode ser extrapolado para toda a família Elapidae. De qualquer maneira, por conta da particularidade observada nessas serpentes australianas, podemos concluir que as serino proteases não constituem um ramo monofilético² nos venenos de serpentes, já que dois ancestrais para essa classe de proteínas no veneno de serpentes: um para as serpentes da família Elapidae australianas e outro para as demais famílias de serpentes.

Tabela 14: Sequências homólogas às serino proteases do veneno de Viperidae, Colubridae, Hydrophiidae, Varanidae e Helodermatidae encontradas no banco de dados do NCBI através do programa BLAST (Altschul et al., 1990).

Organismo	Proteína	Local de origem ^a	Código de acesso (NCBI)	Identidade (%)	E-value
<i>Bos taurus</i>	Kallikrein I	Paratóide salivar	56606017	40	1e-44
<i>Rattus norvegicus</i>	Kallikrein 1-related peptidase b3	Glândulas salivar e pituitária	13994131	40	9e-42
<i>Mus musculus</i>	Kallikrein I	Glândulas salivar e pituitária, testículo, língua, ovário	31980868	40	3e-42
<i>Mus musculus</i>	Kallikrein 1-related peptidase b3	Glândula salivar, testículo, pâncreas	52851403	38	1e-41
<i>Mus musculus</i>	Kallikrein 1-related peptidase b4	Glândula salivar	8659572	36	9e-3E
<i>Mus musculus</i>	Kallikrein 1-related peptidase b22	Glândula salivar	52693913	40	2e-41
<i>Mus musculus</i>	Epidermal growth factor binding protein type B	Glândula salivar, testículo, células hematopoiéticas	6753734	37	5e-3E
<i>Mus musculus</i>	Kallikrein 1-related peptidase b24	Glândula salivar, testículo	8393675	36	5e-3E
<i>Homo sapiens</i>	Kallikrein I	Pool de glândulas	4504875	39	9e-42

² Conjunto de sequências formado por um único ancestral e todos os seus descendentes.

Por fim, observando a árvore filogenética de serino proteases da ordem Squamata (Figura 31) observamos que todas as sequências se agrupam de acordo com a família a qual a serpente que as possui faz parte. Em relação à família Viperidae, podemos verificar que as três principais atividades farmacológicas das serino proteases presentes em seu veneno – ativação de plasminogênio (PA), liberação de bradicinina (KN) e atividade coagulante (CL) – não formam três ramos monofiléticos distintos, ao contrário de estudos anteriores (Wang *et al.*, 2001). Estes estudos, entretanto, apresentam valores estatísticos questionáveis nos nós dos ramos. Em nossa árvore, há um grande número de cópias com diferentes atividades farmacológicas que possuem diferentes graus de parentesco filogenético indicando um grande número de duplicações ao longo do tempo nas mais diferentes espécies de serpentes da família Viperidae.

4.2.2 Inferências evolutivas de fosfolipases de venenos de serpentes da família Viperidae, subfamília Crotalinae

A evolução das fosfolipases de veneno de serpentes dentro da família Viperidae e as relações filogenéticas dentre os grupos dessa família de fosfolipases (Asp49, Lys49, Arg49, entre outros) já foram objetos de estudos de alguns trabalhos (Ohno *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2006) realizados a partir de métodos de distância e com algumas poucas sequências de aminoácidos. Desde então, novas metodologias de estudos filogenéticos surgiram, e um grande número de novas sequências e estruturas de proteínas foram obtidas, tornando necessária uma revisão dos dados já obtidos. Além disso, em alguns trabalhos os valores estatísticos apresentados nos nós dos ramos nem sempre eram significativos, o que provoca certa desconfiança sobre os resultados apresentados. Neste trabalho, realizamos uma análise filogenética, utilizando inferência bayesiana, a partir de sequências de aminoácidos de fosfolipases A₂ de veneno de serpentes da família Viperidae, subfamília Crotalinae (Figura 33). Essa subfamília contém todas as espécies de serpentes que são responsáveis pela maior

parte dos acidentes ofídicos na América Latina e grande parte dos acidentes, da família Viperidae, na Ásia.

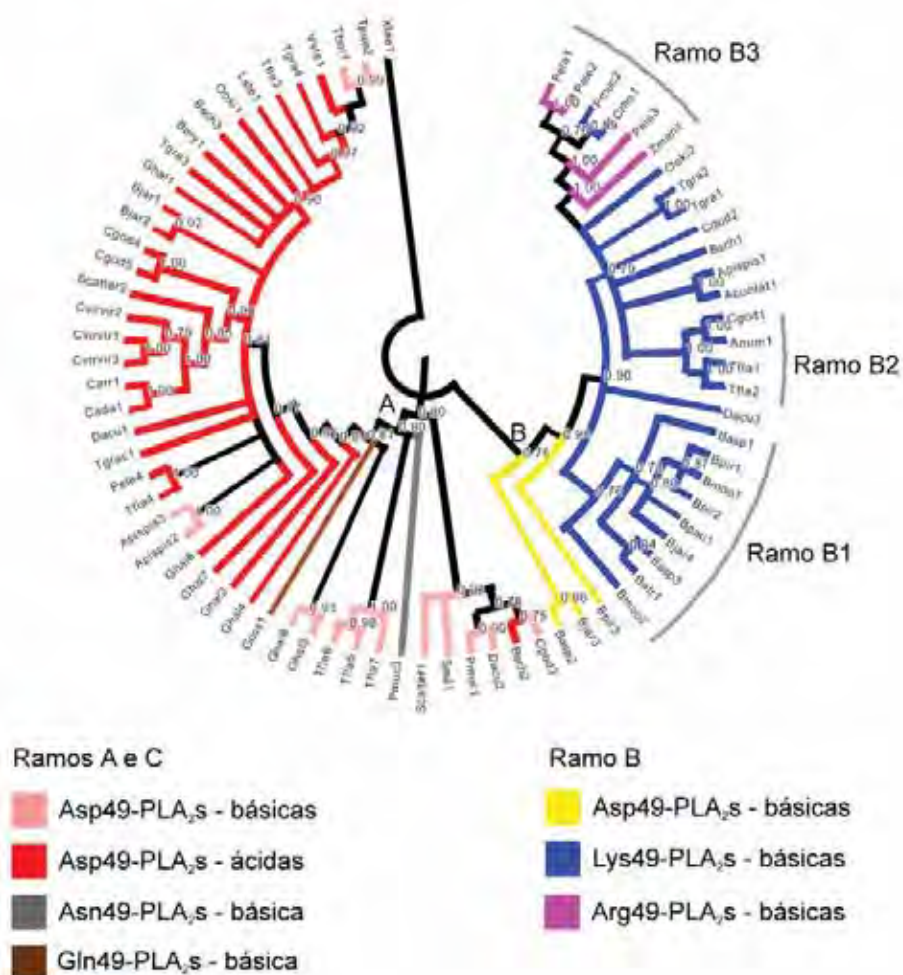


Figura 33: Árvore filogenética de fosfolipases A₂ de venenos de serpentes da família Viperidae, subfamília Crotalinae. A cor do ramo corresponde ao grupo a qual cada seqüência pertence. Os valores de probabilidade posterior após 3.500.000 ciclos estão indicados nos nós. Para ver os códigos, consultar tabela 15. Ramos com valores de probabilidade posterior menor que 0,75 foram colapsados. E-value mínimo de 3e-44.

Estudos realizados por Ohno *et al.* (2003) a partir da seqüência de nucleotídeos, mostraram que a partir de um ancestral comum, divergiram dois ramos, um ramo formado pelas Lys49-PLA₂s e outro formado pelas Asp49-PLA₂s. Entretanto, não há valor estatístico exibido no nó que une esses dois ramos. Wei *et al.* (2006) utilizando a seqüência de aminoácidos chegou a resultados semelhantes. Ambos os estudos utilizaram métodos geométricos na construção de suas árvores. Estes métodos utilizados largamente na década de

90, vêm sendo menos utilizados atualmente devido ao surgimento de métodos estatisticamente mais acurados e que refletem melhor a realidade biológica. Além disso, nos dois estudos são utilizadas poucas sequências para análise. No presente estudo, onde procuramos recrutar todas as sequências de veneno da subfamília Crotalinae disponíveis nos bancos de dados, com a exclusão apenas de sequências redundantes, mostramos que partir de um ancestral comum, divergem dois ramos A e B, e em ambos, diferentemente dos estudos anteriores, estão presentes sequências de Asp49-PLA₂s. Interessantemente, todo o ramo B e as sequências mais primitivas (com exceção de Bsch2) do ramo A são sequências com valores de pI básicos (Tabela 13). Dessa maneira, podemos concluir que o ancestral para as fosfolipases A₂ na subfamília Crotalinae era uma Asp49-PLA₂s básica. Apesar dos trabalhos apresentados por Ohno *et al.* e Wei *et al.* serem inconclusivos quanto ao resíduo que estaria ocupando a posição 49, suas árvores filogenéticas também indicam um ancestral de caráter básico. O ramo A é formado por sequências básicas apenas nos ramos mais primitivos. Grande parte das sequências que formam este ramo proteínas que apresentam pI ácido. Isso pode indicar uma melhor adaptação do caráter ácido para a expressão da atividade fosfolípica, apesar de em alguns casos (Apispis2, Apispis3, Tbor1, Tpun2) observarmos uma reversão para o caráter básico, talvez por conta de pressões evolutivas específicas para os gêneros *Agkistrodon* e *Trimesurus*. Na nossa árvore filogenética, a principal diferença entre os ramos A e B é quanto capacidade de induzir mionecrose. Enquanto que no ramo A, apenas duas sequências (Guss1 e Pmuc3) possuem esta atividade, no ramo B todas as sequências que o formam a possuem. No ramo B, podemos observar que as sequências mais primitivas são formadas por Asp49-PLA₂s miotóxicas, sendo que duas delas (Bjar3 e Bpir3; que correspondem, respectivamente a BthTX-II e PrTX-III) possuem uma atividade catalítica significativamente menor que o restante das Asp49-PLA₂s experimentalmente verificada, indicando um maior parentesco filogenético das Asp49-PLA₂s miotóxicas com as Lys49-PLA₂s do que com o restante das Asp49-PLA₂s, formando com as Lys49-PLA₂s um ramo miotóxico monofilético. Dentro do

ramo B, podemos observar claramente a formação de três ramos monofiléticos, B1, B2 e B3, sendo B1 formado exclusivamente por sequências do gênero *Bothrops*. dos Santos *et al.* (2009) propôs um sítio miotóxico exclusivo para serpentes deste gênero e, como podemos observar em nossa árvore, ele têm consistência evolutiva, graças ao monofiletismo apresentado pelo grupo B1. Dessa maneira, podemos concluir que poderiam haver diferentes sítios responsáveis pela ação da miotoxicidade para cada um dos ramos monofiléticos B2 e B3. O ramo B3 é o ramo mais derivado dentro do ramo B e nele estão presentes as sequências de Arg49-PLA₂s. Estudos anteriores já mostravam este posicionamento filogenético para esse grupo de proteínas, entretanto, em nosso estudo podemos observar também uma reversão do resíduo de Arg para Lys na posição 49, indicando que a substituição natural de Lys para Arg nas Arg49-PLA₂s não é significativa para a expressão da atividade miotóxica, já que ambos os resíduos possuem as mesmas propriedades bioquímicas e longas cadeias laterais. No ramo A podemos observar a presença de duas sequências miotóxicas que surgiram independentemente do ramo B, indicando também um possível novo modo de ação para a expressão da atividade miotóxica das fosfolipases A₂. Apesar disso, da mesma maneira que as Arg49 e Lys49-PLA₂s, elas possuem uma substituição do resíduo Asp49 por outro resíduo (Asn ou Gln), valores básicos de pI e possuem fraca (no caso da Gln49-PLA₂) ou não possuem atividade catalítica (no caso da Asn49-PLA₂) experimentalmente verificada. No caso das Gln49-PLA₂s, além de atividade miotóxica, foi observado também fortes atividades neurotóxicas e coagulantes. Dessa maneira, podemos concluir que, durante o curso evolutivo, as sequências que sofreram substituição do resíduo Asp49, o que implica na perda ou diminuição da atividade catalítica, mantiveram-se no veneno provavelmente à concomitante substituição de outros aminoácidos, de maneira que a proteína fosse capaz de exercer outras atividades, como, por exemplo, a miotoxicidade (na maioria dos casos) e neurotoxicidade e forte capacidade de coagulação sanguínea (no caso da Gln49-PLA₂s). Além disso, o caráter básico parece ser extremamente importante para a expressão da atividade miotóxica. Entretanto, existem relatos de algumas

fosfolipases A₂ ácidas, ainda não inteiramente sequenciadas, capazes de induzir mionecrose. Com vista nos nossos resultados, podemos especular que poderia haver dois posicionamentos filogenéticos possíveis para estas sequencias: dentro do ramo B, como uma sequencia bastante derivada que se tornou ácida, ou dentro do ramo A, como uma sequencia ácida, provavelmente dentro os seus ramos mais derivados, que ganhou atividade miotóxica. Assim que as sequencias inteiras estiverem disponíveis nos bancos de dados, poderemos incluí-las em nossas análises para maior clareza a respeito de seu caminho evolutivo.

Tabela 15: Códigos utilizados na árvore filogenética de fosfolipases A2 de venenos de serpentes da família Viperidae, subfamília Crotalinae.

Classe	Serpente	Proteína	Código de quatro letras	Código de acesso no NCBI (GI)	Ponto isoelétrico ^a	
Ramo B	Lys49	<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>	Myotoxin	Aconlat1	1352702	8,48
		<i>Bothriechis schlegelii</i>	Bsc-K49	Bsch1	3122600	8,61
		<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	APP-K49	Apispis1	129478	8,48
		<i>Atropoides nummifer</i>	Myotoxin II	Anum1	17433156	8,28
		<i>Bothrops asper</i>	M1-3-3 protein	Basp3	6492260	8,86
		<i>Bothrops asper</i>	Myotoxin II	Basp1	166215047	8,87
		<i>Bothrops asper</i>	Myotoxin I	Batr1	40888678	8,48
		<i>Bothrops atrox</i>	Myotoxin I	Bjar4	17433154	8,87
		<i>Bothrops jararacussu</i>	Bothropstoxin-I (BhTX-I)	Bjar2	17865560	8,61
		<i>Bothrops moojeni</i>	Myotoxin II	Bmoo2	17368325	8,61
		<i>Bothrops moojeni</i>	Myotoxin I (MjTX-I)	Bmoo1	17368325	8,61
		<i>Bothrops pauloensis</i>	Bnsp-7	Bpau1	17368328	8,61
		<i>Bothrops pirajai</i>	Piratoxin-I (PrTX-I)	Bpir1	17433154	8,61
		<i>Bothrops pirajai</i>	Piratoxin-II (PrTX-II)	Bpir2	17368328	8,72
		<i>Calloselasma rhodostoma</i>	G6K49	Crho1	3122600	8,48
		<i>Cerrophidion godmani</i>	Pgo-K49	Cgod2	28194118	8,48
	<i>Cerrophidion godmani</i>	GODMT-II	Cgod1	265051	8,15	
	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Dac-K49II	Dacu3	26397573	8,36	
	<i>Ovophis okinavensis</i>	Phospholipase A2 homolog PLA2-03	Ooki 2	26006828	7,76	
	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	TMV-K49	Pmuc2	129468	8,48	
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Basic protein I	Tlla1	400717	8,72	
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Basic protein II	Tlla2	222955	8,87	
	<i>Trimeresurus gramineus</i>	PLA2-VII	Tgra2	20177995	8,43	
	<i>Trimeresurus gramineus</i>	PLA2-V	Tgra1	3914265	8,28	
	<i>Bothrops asper</i>	Myotoxin III	Basp2	166214965	8,28	
	<i>Bothrops jararacussu</i>	Bothropstoxin-II (BhTX-II)	Bjar3	1171971	8,02	
	<i>Bothrops pirajai</i>	Piratoxin-III (PrTX-III)	Bpir3	17865540	7,87	
	<i>Protobothrops elegans</i>	Promutoxin	Pele3	83320482	8,48	
	<i>Protobothrops elegans</i>	Phospholipase A2	Pele2	84578891	8,48	
	<i>Protobothrops elegans</i>	Phospholipase A2	Pele1	84578893	8,48	
	<i>Zhaovermia mangshanensis</i>	Zhaovermiatoxin	Zman1	115502551	8,61	
	Ramo A	Asp49	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	APP-D49	Apispis2	2851578
<i>Bothriechis schlegelii</i>			acidic phospholipase A2	Bsch3	59726986	4,23
<i>Bothriechis schlegelii</i>			N6 basic phospholipase A2	Bsch2	38230125	6,74
<i>Bothrops erythromelas</i>			BE-I-PLA2	Bery1	86450426	4,51
<i>Bothrops jararacussu</i>			BhA-I	Bjar1	25140377	5,21
<i>Bothrops jararacussu</i>			BJ-PLA ₂	Bjar2	3914258	4,41
<i>Cerrophidion godmani</i>			D1E6b phospholipase A2	Cgod5	59727030	4,60
<i>Cerrophidion godmani</i>			N6 basic phospholipase A2	Cgod3	38230123	7,86
<i>Cerrophidion godmani</i>			N1E6a phospholipase A2	Cgod4	59727008	4,82
<i>Crotalus adamanteus</i>			Acid Phospholipase A ₂	Cada1	129507	4,91
<i>Crotalus atrox</i>			Phospholipase A2	Catr1	25108915	4,47
<i>Crotalus viridis viridis</i>			Acid Phospholipase A ₂	Cvirin1	28893826	5,21
<i>Crotalus viridis viridis</i>			Acid Phospholipase A ₂	Cvirin3	28893822	4,76
<i>Crotalus viridis viridis</i>			Acid Phospholipase A ₂	Cvirin2	28893824	4,47
<i>Deinagkistrodon acutus</i>			Phospholipase A2	Dacu2	97180272	8,16
<i>Deinagkistrodon acutus</i>			Acid Phospholipase A ₂	Dacu1	90265326	4,53
<i>Gloydius halys</i>			Phospholipase A2	Ghal1	2460035	4,66
<i>Gloydius halys</i>			Phospholipase A2 BA2	Ghal3	27151650	4,80
<i>Gloydius halys</i>			Phospholipase A2 BA1	Ghal4	27151649	4,80
<i>Gloydius halys</i>			Phospholipase A2	Ghal7	27151651	4,67
<i>Gloydius halys</i>			Acid Phospholipase A ₂	Ghal8	129399	4,67
<i>Gloydius halys</i>			Phospholipase A2	Ghal5	27151648	8,35
<i>Gloydius halys</i>			B-PLA2 phospholipase A2	Ghal6	27151647	8,28
<i>Lachesis stenophrys</i>			LSPA-1	Lste1	76363284	4,76
<i>Ovophis okinavensis</i>			Phospholipase A2	Ooki1	1769398	4,66
<i>Protobothrops elegans</i>			Phospholipase A2	Pele4	84578888	5,89
<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>			Trimucrotoxin	Pmuc1	26006835	8,02
<i>Sistrurus catenatus tergeminus</i>			Phospholipase A2	Scatter2	45934756	4,78
<i>Sistrurus catenatus tergeminus</i>		N6b basic phospholipase A2	Scatter1	38230127	7,86	
<i>Sistrurus mliarius</i>		Phospholipase A2	Smlif1	166012664	7,76	
<i>Trimeresurus borneensis</i>		E6 acidic phospholipase A2	Tbor1	38230145	5,20	
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>		Phospholipase A2	Tlla5	28202237	7,76	
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>		TFV PL-X	Tlla7	129499	8,07	
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>		Phospholipase A2	Tlla3	436249	4,58	
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>		Phospholipase A2	Tlla4	436247	6,75	
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>		Phospholipase A2	Tlla6	28202238	7,87	
<i>Trimeresurus gracilis</i>		Acid Phospholipase A ₂	Tgrac1	59727071	4,53	
<i>Trimeresurus gramineus</i>		Phospholipase A2	Tgra3	3914270	4,56	
<i>Trimeresurus gramineus</i>		PLA2-II	Tgra4	3914268	4,76	
<i>Trimeresurus puniceus</i>		G6D49 phospholipase A2	Tpun2	38230137	5,20	
<i>Viridovipera stejnegeri</i>		PLA2-V	Vste1	13959432	4,57	
Asn 49		<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	TM-N49	Pmuc3	77021843	8,16
Gln49		<i>Gloydius ussuriensis</i>	Gln49-PLA2	Guss1	^a b	7,80
Grupo Externo		<i>Xenopus laevis</i>	Otoconin-22	Xlae1	385670	5,02

^a Calculado utilizando o programa

^b Sequência extraída diretamente de

Concl usão

5. Conclusão

Os resultados aqui mostrados mais uma vez evidenciaram a importância dos estudos estruturais para o entendimento do mecanismo de ação de proteínas. No caso das Lys49-PLA₂s de venenos de serpentes, estes estudos revelaram a sua conformação oligomérica biológica e possibilitaram avançar no entendimento da sua ausência de atividade catalítica. O resíduo Lys122, antes apontado como um dos responsáveis por essa característica das Lys49-PLA₂s por conta da hiperpolarização que causaria na ligação peptídica Cys29/Gly30, teve a sua posição revisada no presente estudo, que, por sua vez, demonstrou que essa hiperpolarização ocorre apenas em algumas poucas estruturas de Lys49-PLA₂s complexadas. Por conta disso, não acreditamos que a Lys122 esteja envolvida no “bloqueio” da atividade catalítica destas enzimas. Por outro lado, reforçamos o envolvimento das Lys122 com a expressão da atividade miótoxica, dada o grau de conservação deste resíduo dentre as Lys49-PLA₂s.

A comparação estrutural do *loop* de ligação de Ca²⁺ entre as Lys49 e Asp49-PLA₂s nos mostra a importância da conservação da Tyr28 dentre as Asp49-PLA₂s para a integridade do *loop* de ligação do Ca²⁺. Este resíduo estabiliza essa região através de uma ponte de hidrogênio com a Gly35. Nas Arg49 e Lys49-PLA₂s, que possuem um resíduo de Asn na posição 28, não ocorre a formação dessa ponte, contribuindo para a desestabilização dessa região, impedindo a ligação do co-fator Ca²⁺. Nas Asp49-PLA₂s com baixa atividade catalítica, que apresenta o *loop* de ligação de Ca²⁺ bastante distorcido, apesar da presença da Tyr28, ela não forma a ponte de hidrogênio com a Gly35, devido a sua cadeia lateral estar em outra orientação por conta de uma interação com o resíduo Asp49.

Por fim, os estudos filogenéticos trouxeram dados inéditos a respeito da evolução das fosfolipases A₂ e serino proteases do veneno de serpentes. No caso das fosfolipases A₂, foi revelado que as Asp49 de baixa atividade catalítica são filogeneticamente próximas as Lys49

do que o restante das Asp49-PLA₂s, formando com as Lys49 um ramo miotóxico monofilético. Isso ajudaria a explicar as razões da baixa atividade catalítica e de sua atividade miotóxica. Já no caso das serino proteases, a análise filogenética mostrou que as serino proteases do veneno de serpentes da família Elapidae possuem uma origem evolutiva diferente que as da família Viperidae. Enquanto que as serino proteases da família Elapidae possuem elevado parentesco filogenético com o fator de coagulação Xa, as da família Viperidae são filogeneticamente próximas às enzimas presentes na saliva de animais, indicando que as serino proteases não constituem um ramo monofilético nos venenos de serpentes.

Publicações e outros
resultados

6. Publicações e outros resultados

Alguns dos resultados estruturais aqui apresentados foram recentemente publicados em um periódico internacional da área (Anexo II). Outra parte deles encontra-se em fase final de preparação, sendo que a sua submissão para publicação deve acontecer nos próximos dias. Com relação aos dados filogenéticos, eles se encontram em fase de preparação e farão parte de um artigo estrutural sobre a estrutura da BthTX-II complexada na presença do co-fator Ca^{2+} . Além disso, foram publicadas também duas revisões sobre fosfolipases A_2 de venenos de serpentes em uma mesma edição de um periódico internacional (Anexo II).

Além das estruturas aqui apresentadas, foram realizadas inúmeras tentativas de cristalização de Asp49-PLA₂s modificadas quimicamente pelo BPB, de Lys49-PLA₂s modificadas quimicamente por outras moléculas, como por exemplo NBSF, NPSC e CNBr e de serino proteases em seu estado nativo, mas sem obter sucesso. Em uma ocasião, foi obtido um cristal da BthTX-I modificada quimicamente pelo NBSF mas que, após o processamento do conjunto de dados coletados, não se observou presença de densidade eletrônica para nenhuma molécula de NBSF e nem de diferenças estruturais relevantes entre ela e a BthTX-I em seu estado nativo. Entretanto, recentemente foi obtido um cristal da crotoxina B *de Crotalus durissus colillineatus* que difratou a 2,20 Å (Anexo II). Esta cristalização foi recentemente aceita para publicação na *Acta Crystallographica section F* e a sua estrutura será resolvida nos próximos meses, no início do projeto de doutorado.

Referências bibliográficas

Referências Bibliográficas

- ADAMS, P. D.;GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.;HUNG, L. W.;IOERGER, T. R.;MCCOY, A. J.;MORIARTY, N. W.;READ, R. J.;SACCHETTINI, J. C.;SAUTER, N. K.; TERWILLIGER, T. C. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.58, p.1948-1954, 2002.
- ALTSCHUL, S. F.;GISH, W.;MILLER, W.;MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v.215, p.403-410, 1990.
- AMBROSIO, A. L. B.;NONATO, M. C.;DE ARAUJO, H. S. S.;ARNI, R.;WARD, R. J.;OWNBY, C. L.;DE SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C. A molecular mechanism for Lys(49)-phospholipase A(2) activity based on ligand-induced conformational change. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.7326-7335, 2005.
- AMICONI, G.;AMORESANO, A.;BOUMIS, G.;BRANCACCIO, A.;DE CRISTOFARO, R.;DE PASCALIS, A.;DI GIROLAMO, S.;MARAS, B.; SCALONI, A. A novel venombin B from agkistrodon contortrix contortrix: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. **Biochemistry**, v.39, p.10294-10308, 2000.
- ANDRILAO-ESCARSO, S. H.;SOARES, A. M.;RODRIGUES, V. M.;ANGULO, Y.;DIAZ, C.;LOMONTE, B.;GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v.82, p.755-763, 2000.
- ANGULO, Y.;GUTIERREZ, J. M.;SOARES, A. M.;CHO, W.; LOMONTE, B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A(2) homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. **Toxicon**, v.46, p.291-296, 2005.
- ARNI, R. K.;FONTES, M. R. M.;BARBERATO, C.;GUTIERREZ, J. M.;DIAZ, C.; WARD, R. J. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-Phospholipase A(2) homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.366, p.177-182, 1999.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A(2) - A structural review. **Toxicon**, v.34, p.827-841, 1996.
- de AZEVEDO JR., W.F.; WARD, R.J.; CANDURI, F.; SOARES, A.M.; GIGLIO, J.R.; ARNI, R.K. Crystal structure of piratoxin-I: a calcium-independent, myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Toxicon**, v.36, p.1395-1406, 1998.
- BAO, Y.;BU, P.;JIN, L.;HONGXIA, W.;YANG, Q.; AN, L. Purification, characterization and gene cloning of a novel phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Int J Biochem Cell Biol**, v.37, p.558-565, 2005.
- BARBOSA, M. D.;GREGH, S. L.; PASSANEZI, E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. **J Periodontol**, v.78, p.2026-2031, 2007.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Arch Biochem Biophys**, v.318, p.247-250, 1995.
- BLUNDELL, T.L. JOHNSON, L.N. **Protein Crystallography**. London: Academic Press, 1976. 565p
- BON, C.;CHANGEUX, J. P.;JENG, T. W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **Eur J Biochem**, v.99, p.471-481, 1979.
- BRUNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v.355, p.472-475, 1992.
- BRUNGER, A. T.;ADAMS, P. D.;CLORE, G. M.;DELANO, W. L.;GROS, P.;GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.;JIANG, J. S.;KUSZEWSKI, J.;NILGES, M.;PANNU, N. S.;READ, R. J.;RICE, L. M.;SIMONSON, T.;

- WARREN, G. L. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v.54, p.905-921, 1998.
- BURKHART, W.;SMITH, G. F.;SU, J. L.;PARIKH, I.; LEVINE, H., 3RD. Amino acid sequence determination of ancrod, the thrombin-like alpha-fibrinogenase from the venom of *Akistrodon rhodostoma*. **FEBS Lett**, v.297, p.297-301, 1992.
- CASTRO, H. C.;SILVA, D. M.;CRAIK, C.; ZINGALI, R. B. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? **Biochim Biophys Acta**, v.1547, p.183-195, 2001.
- CHANG, L. S.;KUO, K. W.;LIN, S. R.; CHANG, C. C. Functional involvement of Lys-6 in the enzymatic activity of phospholipase A2 from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait) snake venom. **J Protein Chem**, v.13, p.641-648, 1994.
- CHIOATO, L.;ARAGAO, E. A.;FERREIRA, T. L.;DE MEDEIROS, A. I.;FACCIOLI, L. H.; WARD, R. J. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A(2) by scanning alanine mutagenesis. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v.1768, p.1247-1257, 2007.
- CONDREA, E.;FLETCHER, J. E.;RAPUANO, B. E.;YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Dissociation of enzymatic activity from lethality and pharmacological properties by carbamylation of lysines in *Naja nigricollis* and *Naja naja atra* snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, v.19, p.705-720, 1981.
- CONDREA, E.;YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Lack of correlation between anticoagulant activity and phospholipid hydrolysis by snake venom phospholipases A2. **Thromb Haemost**, v.45, p.82-85, 1981.
- DA SILVA GIOTTO, M. T.;GARRATT, R. C.;OLIVA, G.;MASCARENHAS, Y. P.;GIGLIO, J. R.;CINTRA, A. C. O.;DE AZEVEDO, W. F.;ARNI, R. K.; WARD, R. J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49 phospholipase A2 homologue. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v.30, p.442-454, 1998.
- DAVIDSON, F. F.; DENNIS, E. A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. **J Mol Evol**, v.31, p.228-238, 1990.
- DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. San Carlos, CA: DeLano Scientific LLC. 2002
- DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **J Biol Chem**, v.269, p.13057-13060, 1994.
- DRENTH, J. **Principles of Protein X-ray crystallography**. New York: Springer-Verlag, 1994.311p.
- EDWARDS, S. H.;THOMPSON, D.;BAKER, S. F.;WOOD, S. P.; WILTON, D. C. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A2 at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v.41, p.15468-15476, 2002.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.60, p.2126-2132, 2004.
- FINN, R. D.;MISTRY, J.;SCHUSTER-BOCKLER, B.;GRIFFITHS-JONES, S.;HOLLICH, V.;LASSMANN, T.;MOXON, S.;MARSHALL, M.;KHANNA, A.;DURBIN, R.;EDDY, S. R.;SONNHAMMER, E. L.; BATEMAN, A. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Res**, v.34, p.D247-251, 2006.
- FLETCHER, J. E.;RAPUANO, B. E.;CONDREA, E.;YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipases A2 from elapid snake venoms. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.59, p.375-388, 1981.
- FLETCHER, J. E.;RAPUANO, B. E.;CONDREA, E.;YANG, C. C.;RYAN, M.; ROSENBERG, P. Comparison of a relatively toxic phospholipase A2 from *Naja nigricollis* snake venom with that of a relatively non-toxic phospholipase A2 from *Hemachatus haemachatus* snake venom--II. Pharmacological properties in relationship to enzymatic activity. **Biochem Pharmacol**, v.29, p.1565-1574, 1980.

- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v.8, p.909-920, 2008.
- FRY, B. G.; VIDAL, N.; NORMAN, J. A.; VONK, F. J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S. F.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S. B.; RICHARDSON, M. K.; HODGSON, W. C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v.439, p.584-588, 2006.
- GUIMARAES, J. A.; CARLINI, C. R. Most cited papers in Toxicon. **Toxicon**, v.44, p.345-359, 2004.
- GUTIERREZ, J. M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Rev Biol Trop**, v.34, p.209-214, 1986.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, p.1405-1424, 1995.
- GUTIERREZ, J. M.; NUNEZ, J.; DIAZ, C.; CINTRA, A. C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp Mol Pathol**, v.55, p.217-229, 1991.
- HALFON, S.; CRAIK, C.S. Families and clans of serino peptidases. In: BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. (Eds.) **Handbook of Proteolytic Enzymes**. p.3-4, 1998.
- HALL, B.G. **Phylogenetic tree made easy**. Sunderland: Sinauer Associates, 2008. 233p.
- HOLLAND, D. R.; CLANCY, L. L.; MUCHMORE, S. W.; RYDE, T. J.; EINSPAHR, H. M.; FINZEL, B. C.; HEINRIKSON, R. L.; WATENPAUGH, K. D. 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, p.17649-17656, 1990.
- HUANG, H. C. Effects of phospholipases A2 from *Vipera russelli* snake venom on blood pressure, plasma prostacyclin level and renin activity in rats. **Toxicon**, v.22, p.253-264, 1984.
- JABEEN, T.; SINGH, N.; SINGH, R. K.; JASTI, J.; SHARMA, S.; KAUR, P.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Crystal structure of a heterodimer of phospholipase A2 from *Naja naja sagittifera* at 2.3 Å resolution reveals the presence of a new PLA2-like protein with a novel Cys 32-Cys 49 disulphide bridge with a bound sugar at the substrate-binding site. **Proteins**, v.62, p.329-337, 2006.
- JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse-Matrix Sampling - a Screening Method for Crystallization of Proteins. **Journal of Applied Crystallography**, v.24, p.409-411, 1991.
- JONES, T. A.; ZOU, J. Y.; COWAN, S. W.; KJELDGAARD, M. Improved Methods for Building Protein Models in Electron-Density Maps and the Location of Errors in These Models. **Acta Crystallographica Section A**, v.47, p.110-119, 1991.
- KINI, R. M. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. **Toxicon**, v.45, p.1133-1145, 2005.
- KOBE, B.; GLEICHMANN, T.; TEH, T.; HEIERHORST, J.; KEMP, B.E. Crystallization of protein kinases and phosphatases. In: HARDIE D.G. (Ed.) **Protein phosphorylation: a practical approach**. 2nd Ed. Oxford: Oxford University Press. 1999. p.127- 151
- KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **J Mol Biol**, v.372, p.774-797, 2007.
- KUIPERS, O. P.; FRANKEN, P. A.; HENDRIKS, R.; VERHEIJ, H. M.; DE HAAS, G. H. Function of the fully conserved residues Asp99, Tyr52 and Tyr73 in phospholipase A2. **Protein Eng**, v.4, p.199-204, 1990.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **Journal of Applied Crystallography**, v.26, p.283-291, 1993.
- LEE, W. H.; DA SILVA GIOTTO, M. T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R. C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A2--a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v.40, p.28-36, 2001.

- LI, Y.; YU, B. Z.; ZHU, H.; JAIN, M. K.; TSAI, M. D. Phospholipase A2 engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. **Biochemistry**, v.33, p.14714-14722, 1994.
- LIU, C. S.; KUO, P. Y.; CHEN, J. M.; CHEN, S. W.; CHANG, C. H.; TSENG, C. C.; TZENG, M. C.; LO, T. B. Primary structure of an inactive mutant of phospholipase A2 in the venom of *Bungarus fasciatus* (banded krait). **J Biochem**, v.112, p.707-713, 1992.
- LIU, S. Y.; YOSHIKUMI, K.; ODA, N.; OHNO, M.; TOKUNAGA, F.; IWANAGA, S.; KIHARA, H. Purification and amino acid sequence of basic protein II, a lysine-49-phospholipase A2 with low activity, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J Biochem**, v.107, p.400-408, 1990.
- LLORET, S.; MORENO, J. J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A2 purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, v.31, p.949-956, 1993.
- 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, p.885-901, 2003.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARIA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. **Toxicon**, v.42, p.307-312, 2003.
- LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MACCARANA, M. 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, p.29867-29873, 1994.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A2 of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v.32, p.1359-1369, 1994.
- LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ARENDALL, W. B., 3RD; DE BAKKER, P. I.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure validation by C α geometry: phi, psi and C β deviation. **Proteins**, v.50, p.437-450, 2003.
- MAGRO, A. J.; FERNANDES, C. A.; DOS SANTOS, J. I.; FONTES, M. R. Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A2s from snake venoms. **Protein Pept Lett**, v.16, p.852-859, 2009.
- MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A(2): quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem Biophys Res Commun**, v.311, p.713-720, 2003.
- MANCIN, A. C.; SOARES, A. M.; GIGLIO, C. A.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. The histamine releasers crotamine, protamine and compound 48/80 activate specific proteases and phospholipases A2. **Biochem Mol Biol Int**, v.42, p.1171-1177, 1997.
- MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KEZDY, F. J.; HEINRIKSON, R. L. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **J Biol Chem**, v.259, p.13839-13843, 1984.
- MARKLAND, F. S., JR. Snake venoms. **Drugs**, v.54 Suppl 3, p.1-10, 1997.
- MARKLAND, F. S.; KETTNER, C.; SCHIFFMAN, S.; SHAW, E.; BAJWA, S. S.; REDDY, K. N.; KIRAKOSSIAN, H.; PATKOS, G. B.; THEODOR, I.; PIRKLE, H. Kallikrein-like activity of crotalase, a snake venom enzyme that clots fibrinogen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.79, p.1688-1692, 1982.
- MAROUN, R. C.; SERRANO, S. M. Identification of the substrate-binding exosites of two snake venom serine proteinases: molecular basis for the partition of two essential functions of thrombin. **J Mol Recognit**, v.17, p.51-61, 2004.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim Biophys Acta**, v.1477, p.146-156, 2000.

- MATSUI, T.;SAKURAI, Y.;FUJIMURA, Y.;HAYASHI, I.;OH-ISHI, S.;SUZUKI, M.;HAMAKO, J.;YAMAMOTO, Y.;YAMAZAKI, J.;KINOSHITA, M.;TITANI, K. Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. **Eur J Biochem**, v.252, p.569-575, 1998.
- McREE, D.E. **Practical Protein Crystallography**. San Diego: Academic Press, 1993. 386p.
- McPHERSON, A. **Introduction to Macromolecular Crystallography**. Hoboken: Wiley-Liss. 2003
- MEBS, D.;KUCH, U.;CORONAS, F. I.;BATISTA, C. V.;GUMPRECHT, A.; POSSANI, L. D. Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese pitviper *Zhafermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A2 myotoxin. **Toxicon**, v.47, p.797-811, 2006.
- MELGAREJO, A. R. **Serpentes Peçonhentas do Brasil**. In: J. L. C. Cardoso, França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr., V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil**. São Paulo: SARVIER, 2003. Serpentes Peçonhentas do Brasil
- MIYAKE, T.;INOUE, S.;IKEDA, K.;TESHIMA, K.;SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T. pH dependence of the reaction rate of His 48 with p-bromophenacyl bromide and of the binding constant to Ca²⁺ of the monomeric forms of intact and alpha-NH₂ modified phospholipases A2 from *Trimeresurus flavoviridis*. **J Biochem**, v.105, p.565-572, 1989.
- MOOLENAAR, W. H.;VAN MEETEREN, L. A.; GIEPMANS, B. N. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. **Bioessays**, v.26, p.870-881, 2004.
- MURAKAMI, M. T.;ARRUDA, E. Z.;MELO, P. A.;MARTINEZ, A. B.;CALIL-ELIAS, S.;TOMAZ, M. A.;LOMONTE, B.;GUTIERREZ, J. M.; ARNI, R. K. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **Journal of Molecular Biology**, v.350, p.416-426, 2005.
- MURAKAMI, M. T.;KUCH, U.;BETZEL, C.;MEBS, D.; ARNI, R. K. Crystal structure of a novel myotoxic Arg49 phospholipase A(2) homolog (zhafermiatoxin) from *Zhafermia mangshanensis* snake venom: Insights into Arg49 coordination and the role of Lys122 in the polarization of the C-terminus. **Toxicon**, v.51, p.723-735, 2008.
- MURAKAMI, M. T.;VICOTI, 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. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA(2)-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA(2) homologues. **Toxicon**, v.49, p.378-387, 2007.
- 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, p.240-255, 1997.
- NAVAZA, J. Amore - an Automated Package for Molecular Replacement. **Acta Crystallographica Section A**, v.50, p.157-163, 1994.
- NUNEZ, C. E.;ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A(2) from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, v.39, p.1587-1594, 2001.
- OHNO, M.;CHIJIWA, T.;ODA-UEDA, N.;OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. **Toxicon**, v.42, p.841-854, 2003.
- 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.;SELISTRE DE ARAUJO, H. S.;WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, v.37, p.411-445, 1999.

- OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin like enzyme, elegaxobin II, with lys-bradykinin releasing activity from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-Habu). **Toxicon**, v.41, p.559-568, 2003.
- PAN, H.;LIU, X. L.;OU-YANG, L. L.;YANG, G. Z.;ZHOU, Y. C.;LI, Z. P.; WU, X. F. Diversity of cDNAs encoding phospholipase A2 from *Agkistrodon halys pallas* venom, and its expression in *E. coli*. **Toxicon**, v.36, p.1155-1163, 1998.
- PARAMO, L.;LOMONTE, B.;PIZARRO-CERDA, J.;BENGOECHEA, J. A.;GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom--synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **Eur J Biochem**, v.253, p.452-461, 1998.
- PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. **Thromb Haemost**, v.79, p.675-683, 1998.
- POLGAR, J.;MAGNENAT, E. M.;PEITSCH, M. C.;WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A2: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A2, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem J**, v.319 (Pt 3), p.961-968, 1996.
- POTTERTON, L.;MCNICHOLAS, S.;KRISSEL, E.;GRUBER, J.;COWTAN, K.;EMSLEY, P.;MURSHUDOV, G. N.;COHEN, S.;PERRAKIS, A.; NOBLE, M. Developments in the CCP4 molecular-graphics project. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.60, p.2288-2294, 2004.
- PRESCOTT, S. M.;ZIMMERMAN, G. A.;STAFFORINI, D. M.; MCINTYRE, T. M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annu Rev Biochem**, v.69, p.419-445, 2000.
- RAO, V. S.;SWARUP, S.; KINI, R. M. The nonenzymatic subunit of pseutarin C, a prothrombin activator from eastern brown snake (*Pseudonaja textilis*) venom, shows structural similarity to mammalian coagulation factor V. **Blood**, v.102, p.1347-1354, 2003.
- RAO, V. S.;SWARUP, S.; MANJUNATHA KINI, R. The catalytic subunit of pseutarin C, a group C prothrombin activator from the venom of *Pseudonaja textilis*, is structurally similar to mammalian blood coagulation factor Xa. **Thromb Haemost**, v.92, p.509-521, 2004.
- REZA, M. A.;MINH LE, T. N.;SWARUP, S.; MANJUNATHA KINI, R. Molecular evolution caught in action: gene duplication and evolution of molecular isoforms of prothrombin activators in *Pseudonaja textilis* (brown snake). **J Thromb Haemost**, v.4, p.1346-1353, 2006.
- ROBERTS, M. F.;DEEMS, R. A.;MINCEY, T. C.; DENNIS, E. A. Chemical modification of the histidine residue in phospholipase A2 (*Naja naja naja*). A case of half-site reactivity. **J Biol Chem**, v.252, p.2405-2411, 1977.
- RODRIGUES-SIMIONI, L.;PRADO-FRANCESCHI, J.;CINTRA, A. C.;GIGLIO, J. R.;JIANG, M. S.; FLETCHER, J. E. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca²⁺ stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A2 myotoxin. **Toxicon**, v.33, p.1479-1489, 1995.
- ROGERS, J.;YU, B. Z.;SERVES, S. V.;TSIVGOULIS, G. M.;SOTIROPOULOS, D. N.;IOANNOU, P. V.; JAIN, M. K. Kinetic basis for the substrate specificity during hydrolysis of phospholipids by secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, v.35, p.9375-9384, 1996.
- ROSENBERG, P.;CONDREA, E.;RAPUANO, B. E.;SOONS, K. R.; YANG, C. C. Dissociation of pharmacological and enzymatic activities of snake venom phospholipases A2 by modification of carboxylate groups. **Biochem Pharmacol**, v.32, p.3525-3530, 1983.
- SALGADO-LABOREAU, M. **História Ecológica da Terra**. São Paulo: Edgard Blunger, 1998. 306p.
- dos SANTOS, J. I.;SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A(2) from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J Struct Biol**, v.167, p.106-116, 2009

- SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v.1761, p.1246-1259, 2006.
- SCHWARTZ, A. S.; PACHTER, L. Multiple alignment by sequence annealing. **Bioinformatics**, v.23, p.e24-29, 2007.
- SCOTT, D. L.; ACHARI, A.; VIDAL, J. C.; SIGLER, P. B. Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. **J Biol Chem**, v.267, p.22645-22657, 1992.
- SCOTT, D. L.; OTWINOWSKI, Z.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. **Science**, v.250, p.1563-1566, 1990.
- SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science**, v.250, p.1541-1546, 1990.
- SERRANO, S. M.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C.; FINK, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **Eur J Biochem**, v.251, p.845-853, 1998.
- SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v.45, p.1115-1132, 2005.
- SERRANO, S. M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A.; FINK, E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v.34, p.7186-7193, 1995.
- SHIMOHIGASHI, Y.; TANI, A.; MATSUMOTO, H.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI, Y. Lysine-49-phospholipases A2 from *Trimeresurus flavoviridis* venom are membrane-acting enzymes. **J Biochem**, v.118, p.1037-1044, 1995.
- SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta**, v.1488, p.1-19, 2000.
- SMITH, C. G.; VANE, J. R. The discovery of captopril. **FASEB J**, v.17, p.788-789, 2003.
- SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v.42, p.855-868, 2003.
- SOARES, A. M.; GUERRA-SA, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, v.378, p.201-209, 2000.
- SOARES, A. M.; MANCINI, A. C.; CECCHINI, A. L.; ARANTES, E. C.; FRANCA, S. C.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A(2) subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.33, p.877-888, 2001.
- SOARES, A. M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; VIEIRA, C. A.; LEITE, G. B.; FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.34, p.668-677, 2002.
- ST PIERRE, L.; MASCI, P. P.; FILIPPOVICH, I.; SOROKINA, N.; MARSH, N.; MILLER, D. J.; LAVIN, M. F. Comparative analysis of prothrombin activators from the venom of Australian elapids. **Mol Biol Evol**, v.22, p.1853-1864, 2005.
- STURA, E.A. Seeding. In: BERGFORS, T.M. (Ed.) **Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips – A Laboratory Manual**. La Jolla: Hardcover, 1999. p.142-162

- TAKASAKI, C.;SUZUKI, J.; TAMIYA, N. Purification and properties of several phospholipases A2 from the venom of Australian king brown snake (*Pseudechis australis*). **Toxicon**, v.28, p.319-327, 1990.
- TOYAMA, M. H.;COSTA, P. D.;NOVELLO, J. C.;DE OLIVEIRA, B.;GIGLIO, J. R.;DA CRUZ-HOFLING, M. A.; MARANGONI, S. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A2 from Bothrops pirajai snake venom, a toxin with moderate PLA2 and anticoagulant activities and high myotoxic activity. **J Protein Chem**, v.18, p.371-378, 1999.
- TSUBOI, K.;SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A. Prostanoid receptor subtypes. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.68-69, p.535-556, 2002.
- VAN, D.; DE HAAS, G. H. The Substrate Specificity of Phospholipase A. **Biochim Biophys Acta**, v.70, p.538-553, 1963.
- VAN DEN BERGH, C. J.;SLOTBOOM, A. J.;VERHEIJ, H. M.; DE HAAS, G. H. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A2. A site-specific mutagenesis study of porcine pancreatic phospholipase A2 and the rationale of the enzymatic activity of [lysine49]phospholipase A2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. **Eur J Biochem**, v.176, p.353-357, 1988.
- VOLWERK, J. J.;PIETERSON, W. A.; DE HAAS, G. H. Histidine at the active site of phospholipase A2. **Biochemistry**, v.13, p.1446-1454, 1974.
- WALLACE, A. C.;LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng**, v.8, p.127-134, 1995.
- WANG, Y. M.;WANG, S. R.; TSAI, I. H. Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. **Biochem J**, v.354, p.161-168, 2001.
- WARD, R. J.;CHIOATO, L.;DE OLIVEIRA, A. H. C.;RULLER, R.; SA, J. M. Active-site mutagenesis of a Lys(49)-phospholipase A(2): biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochemical Journal**, v.362, p.89-96, 2002.
- WARD, R. J.;DE OLIVEIRA, A. H. C.;BORTOLETO, R. K.;ROSA, J. C.;FACA, V. M.; GREENE, L. J. Refolding and purification of bothropstoxin-1, a Lys49 - Phospholipase A(2) homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v.21, p.134-140, 2001.
- WEI, J. F.;WEI, X. L.;CHEN, Q. Y.;HUANG, T.;QIAO, L. Y.;WANG, W. Y.;XIONG, Y. L.; HE, S. H. N49 phospholipase A2, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A2. **Biochim Biophys Acta**, v.1760, p.462-471, 2006.
- WESTERLUND, B.;NORDLUND, P.;UHLIN, U.;EAKER, D.; EKLUND, H. The three-dimensional structure of notexin, a presynaptic neurotoxic phospholipase A2 at 2.0 Å resolution. **FEBS Lett**, v.301, p.159-164, 1992.
- YANG, C. C.; CHANG, L. S. Role of the N-terminal region in phospholipases A2 from *Naja naja atra* (Taiwan cobra) and *Naja nigricollis* (spitting cobra) venoms. **Toxicon**, v.26, p.721-731, 1988.
- YANG, C. C.; CHANG, L. S. Studies on the status of lysine residues in phospholipase A2 from *Naja naja atra* (Taiwan cobra) snake venom. **Biochem J**, v.262, p.855-860, 1989.
- YANG, C. C.; CHANG, L. S. Dissociation of lethal toxicity and enzymic activity of notexin from *Notechis scutatus scutatus* (Australian-tiger-snake) venom by modification of tyrosine residues. **Biochem J**, v.280 (Pt 3), p.739-744, 1991.
- YOSHIZUMI, K.;LIU, S. Y.;MIYATA, T.;SAITA, S.;OHNO, M.;IWANAGA, S.; KIHARA, H. Purification and amino acid sequence of basic protein I, a lysine-49-phospholipase A2 with low activity, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). **Toxicon**, v.28, p.43-54, 1990.
- YU, B. Z.;BERG, O. G.; JAIN, M. K. The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, v.32, p.6485-6492, 1993.

YU, B. Z.;ROGERS, J.;NICOL, G. R.;THEOPOLD, K. H.;SESHADRI, K.;VISHWESHWARA, S.; JAIN, M. K. Catalytic significance of the specificity of divalent cations as KS^* and $kcat^*$ cofactors for secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, v.37, p.12576-12587, 1998.

YUAN, Y.;JACKSON, S. P.;MITCHELL, C. A.; SALEM, H. H. Purification and characterisation of a snake venom phospholipase A2: a potent inhibitor of platelet aggregation. **Thromb Res**, v.70, p.471-481, 1993.