



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

UM NOVO PROTOCOLO *IN SILICO* PARA A PREDIÇÃO DE  
COMPLEXOS FLEXÍVEIS ENTRE PROTEÍNAS: ESTUDO DE  
CASO PARA INIBIDORES PLASMÁTICOS DE FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>  
DE SERPENTES

**FÁBIO FILIPPI MATIOLI**

**BOTUCATU – SP  
2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

UM NOVO PROTOCOLO *IN SILICO* PARA A PREDIÇÃO DE  
COMPLEXOS FLEXÍVEIS ENTRE PROTEÍNAS: ESTUDO DE  
CASO PARA INIBIDORES PLASMÁTICOS DE FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>  
DE SERPENTES

**FÁBIO FILIPPI MATIOLI**

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

**PROF. DR. NEY LEMKE**  
**CO-ORIENTADOR**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biomoléculas: Estrutura e Função (BEF).

**BOTUCATU – SP**  
**2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Matioli, Fábio Filippi.

Um novo protocolo *in silico* para a predição de complexos flexíveis entre proteínas : estudo de caso para inibidores plasmáticos de fosfolipase A<sub>2</sub> de serpentes / Fábio Filippi Matioli. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientador: Ney Lemke

Capes: 20804008

1. Serpente peçonhenta - Peçonha. 2. Fosfolipases. 3. Bothrops. 4. Dinâmica molecular. 5. Simulação (Computadores).

Palavras-chave: Biologia molecular estrutural; Dinâmica molecular; Docking; Interação proteína/proteína; Veneno de serpente.

## **Agradecimentos**

Esse trabalho de mestrado é fruto de anos de incentivo vindo da minha família, orientadores, colegas de trabalho, amigos e minha namorada, por isso, o meu primeiro agradecimento dedico com o mesmo grau de importância para todos vocês. A minha família, em especial os meus pais, Aninha e avós, que me incentivaram a seguir essa carreira e que me mantiveram, dos inúmeros modos possíveis, firme e possibilitado de completar esse passo de minha vida, eu amo muito vocês. Aos meus orientadores, Prof. Dr. Marcos Fontes e Prof. Dr. Ney Lemke, que durante esses meus anos de carreira acadêmica, mostraram o caminho e me ensinaram praticamente tudo que aprendi e usei para elaborar esse e outros trabalhos, além de conhecimentos que usarei para sempre em minha vida, vocês estão para mim entre os melhores orientadores e profissionais que já deparei em minha vida, muito obrigado por tudo, vocês estarão comigo para sempre. Aos meus colegas de laboratório, que diretamente ou indiretamente contribuíram com as minhas pesquisas e aprendizados, além de proporcionarem momentos inesquecíveis dentro e fora do ambiente de trabalho, sempre uso vocês como exemplo de que como um ambiente de trabalho gostoso pode facilitar os problemas. Aos meus amigos, que mesmo não fazendo idéia da contribuição, foram um dos pilares para que tudo isso acontecesse, sou eternamente grato por vocês existirem, BNG, amigos da faculdade, de Botucatu e da vida, o meu muito obrigado por tudo que já aconteceu. E a minha namorada linda, Gabryella Mendes, que é a minha maior companheira e ombro amigo, eu sou eternamente grato por tudo que você já fez por mim, sem você as coisas teriam sido mais complicadas, muito obrigado mesmo, te amo, hoje e sempre, até os 85.

Gostaria de agradecer imensamente ao Professor Doutor Luis Paulo Barbour Scott e a toda sua equipe, em especial ao Erick e a Angélica, que me receberam de braços abertos, pausando as suas obrigações diárias, para desenvolver algumas das idéias apresentadas nesse trabalho.

Gostaria de agradecer a equipe do GridUnesp. Sem o recurso computacional disponibilizado por vocês, esse e outros trabalhos demorariam muito mais, se é que pudessem ser realizados, muito obrigado.

Eu também gostaria de agradecer a todos os grupos musicais dos quais já participei. Vocês foram o escape da minha rotina e dos meus problemas. Quando eu estava com vocês, os problemas pareciam não existir e me davam mais forças para os enfrentarem. Em especial a Bombateria, que além de todos esses benefícios, me apresentou uma nova família da qual estará para sempre comigo.

Gostaria de agradecer também as instituições de fomento, CAPES, CNPQ e Fapesp, que diretamente ou indiretamente contribuíram com o trabalho, em destaque para a CAPES, que foi a instituição que me disponibilizou a bolsa de mestrado durante quase todos os 24 meses.

“O livro é antídoto que neutraliza o veneno da ignorância e da escravidão!”

*Juscelino Vieira Mendes*

## RESUMO

Ainda nos dias de hoje, o envenenamento ofídico é um problema de saúde pública, afetando, sobretudo, regiões de clima tropical, subtropical, particularmente áreas rurais de países da África, Ásia, Oceania e América Latina. No Brasil, os gêneros de serpentes *Bothrops* e *Crotalus* são responsáveis por quase 95% dos acidentes ofídicos, enquanto o segundo gênero apresenta alta taxa de morbidade. O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* contém fosfolipases A<sub>2</sub> ácidas que causam uma considerada mionecrose e severas reações anticoagulantes. De outro lado, os venenos das serpentes do gênero *Crotalus* possuem o complexo crotoxina, o qual é formado pela crotoxina A (não catalítica) e a crotoxina B (PLA<sub>2</sub> catalítica) que possui potente ação neurotóxica. As serpentes peçonhentas, grupo que inclui ambas as famílias citadas, utilizam esse veneno tanto para a captura de sua presa como para sua própria defesa. Inevitavelmente, essas serpentes terão contato com o seu próprio veneno, como por exemplo, na alimentação, pois as presas estarão envenenadas. Por tal fato, as serpentes peçonhentas apresentam alguns mecanismos de defesa, inclusive algumas proteínas encontradas em seu sangue que são chamadas de proteínas inibitórias de PLA<sub>2</sub> (PLIs). Para entender melhor o mecanismo de inibição desses compostos plasmáticos, foi desenvolvido neste trabalho um novo protocolo de *docking* molecular que consiste em analisar as estruturas ao longo dos modos normais, *docking* molecular, simulação de dinâmica molecular e outras ferramentas de bioinformática. Os resultados deste trabalho foram a proposição de uma nova metodologia de *docking* molecular flexível entre duas ou mais proteínas e a sua aplicação para estudar complexos PLA<sub>2</sub>/PLI, com a proposição de duas possíveis regiões de interação entre PLI's e PLA<sub>2</sub>.

Palavras chave: *docking*, dinâmica molecular, veneno de serpente, biologia molecular estrutural, interação proteína/proteína.

## ABSTRACT

Nowadays, snake envenomation is a public health issue that mostly affects tropical and subtropical regions, particularly rural areas of countries from Africa, Asia, Oceania and Latin America. In Brazil, the *Bothrops* and *Crotalus* snake genre are responsible for approximately 95% of all snake bites, and the accidents caused by the latter have a relatively high mortality rate. The venom of *Bothrops* snakes contains a acid phospholipases A<sub>2</sub> that causes drastic local myonecrosis and several anticoagulant reactions. On the other hand, the *Crotalus* genus snake venom contains the the crotoxin complex, which is formed by crotoxin A (non-catalytic) and crotoxin B (catalytic PLA<sub>2</sub>), that have up a strong neurotoxic action. Venomous snakes, including the two afore mentioned genre, use their venoms for capturing their prey and for their own defense. These snakes will inevitably get in contact with their own venom, for example, in alimentation, for the prey itself will be poisoned. For this fact, the poison snakes features in your blood the so-called PLA<sub>2</sub> inhibiting proteins (PLIs). In order to understand the inhibition mechanism of these plasmatic components, it has developed in this study a new molecular docking protocol that consists in analyzing the structures using normal modes, molecular docking, molecular dynamics simulation and other bioinformatics tools. The results of this work was the proposition of a new flexible molecular docking protocol between two or more proteins and your application to studies PLA<sub>2</sub>/PLI complexes that showed two possible interaction regions between the proteins.

Key words: *docking*, Molecular dynamics, Snake venom, Structural molecular biology, protein/protein interaction

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Localização dos acidentes ofídicos no Brasil. Página 3.

**Figura 2.** Representação em *cartoon* da Crotoxina B, CB. Página 4.

**Figura 3.** Representação em *cartoon* do modelo indicado para a modelagem do trímero do inibidor plasmático PLI $\alpha$ . Página 6.

**Figura 4.** Resultados de DLS do inibidor plasmático PLI $\alpha$  de serpente. Página 7.

**Figura 5.** Resultados de SAX do CNF utilizando um modelo tetramérico e uma subunidade  $\beta$ . Página 9.

**Figura 6.** Representação em *cartoon* do modelo tetramérico do CNF com uma subunidade  $\beta$ . Página 9.

**Figura 7.** Representação em *cartoon* de estruturas geradas ao longo de um modo normal. Páginas 12.

**Figura 8.** Fluxograma do novo protocolo de *docking* Proteína/Proteína desenvolvido. Página 19.

**Figura 9.** Modelo excluído pelo critério de MMFP. Página 21.

**Figura 10.** Representações das regiões da PLI $\alpha$  que interagiram com as PLA $_2$ . Página 26.

**Figura 11.** Resultado de *docking* entre uma PLA $_2$  e um inibidor plasmático tipo  $\alpha$ , complexo 1. Página 29.

**Figura 12.** Representação da ancoragem da PLA $_2$  na superfície eletrostática da PLI $\alpha$  no complexo 1. Página 30.

**Figura 13.** Gráfico de rmsd ao longo da dinâmica molecular do complexo 1. Página 32

**Figura 14.** Gráfico de rmsf ao longo da dinâmica molecular do complexo 1. Página 32

**Figura 15.** Resultado de *docking* entre uma PLA $_2$  e um inibidor plasmático tipo  $\alpha$ , complexo 2. Página 33.

**Figura 16.** Representação da ancoragem da PLA $_2$  na superfície eletrostática da PLI $\alpha$  no complexo 2. Página 34.

**Figura 17.** Resultado de *docking* entre uma PLA $_2$  e um inibidor plasmático tipo  $\alpha$ , complexo 3. Página 35.

**Figura 18.** Representação da ancoragem da PLA $_2$  na superfície eletrostática da PLI $\alpha$  no complexo 3. Página 36.

**Figura 19.** Localização dos resíduos Y-144 nos PLI $\alpha$ . Página 37.

**Figura 20.** Resultado de *docking* entre uma PLA $_2$  e um inibidor plasmático tipo  $\alpha$ , complexo 4. Página 38.

**Figura 21.** Representação da ancoragem da PLA<sub>2</sub> na superfície eletrostática da PLI $\alpha$  no complexo 4. Página 38.

**Figura 22.** Resultado de *docking* entre uma PLA<sub>2</sub> e um inibidor plasmático tipo  $\alpha$ , complexo 5. Página 39.

**Figura 23.** Representação da ancoragem da PLA<sub>2</sub> na superfície eletrostática da PLI $\alpha$  no complexo 5. Página 40.

**Figura 24.** Gráfico de rmsd do complexo 5 ao longo da dinâmica molecular. Página 42.

**Figura 25.** Resultado de *docking* entre uma PLA<sub>2</sub> e um inibidor plasmático tipo  $\alpha$ , complexo 6. Página 43.

**Figura 26.** Representação da ancoragem da PLA<sub>2</sub> na superfície eletrostática da PLI $\alpha$  no complexo 6. Página 43.

**Figura 27.** Resultado de *docking* entre uma PLA<sub>2</sub> e um inibidor plasmático tipo  $\gamma$ , complexo 7. Página 46.

**Figura 28.** Representação da ancoragem da PLA<sub>2</sub> na superfície eletrostática da PLI $\gamma$  no complexo 7. Página 47.

**Figura 29.** Resultado de *docking* entre uma PLA<sub>2</sub> e um inibidor plasmático tipo  $\gamma$ , complexo 8. Página 48.

**Figura 30.** Representação da ancoragem da PLA<sub>2</sub> na superfície eletrostática da PLI $\gamma$  no complexo 8. Página 48.

**Figura 31.** Resultado de *docking* entre uma PLA<sub>2</sub> e um inibidor plasmático tipo  $\gamma$ , complexo 9. Página 50.

**Figura 32.** Representação da ancoragem da PLA<sub>2</sub> na superfície eletrostática da PLI $\gamma$  no complexo 9. Página 50.

**Figura 33.** Resultado de *docking* entre uma PLA<sub>2</sub> e um inibidor plasmático tipo  $\gamma$ , complexo 10. Página 51.

**Figura 34.** Representação da ancoragem da PLA<sub>2</sub> na superfície eletrostática da PLI $\gamma$  no complexo 10. Página 51.

**Figura 35.** Superfície eletrostática do inibidor plasmático PLI $\alpha$ . Página 52.

**Figura 36.** Regiões de interações entre as PLI $\alpha$  e as PLA<sub>2</sub> propostas por Okumura 2005 e Nobuhisa 1998. Página 54.

**Figura 37.** Medida do maior raio da estrutura da CNF proposta. Página 56.

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Possíveis locais de interação da PLA<sub>2</sub> ácida com o PLI $\alpha$  descrito na literatura. Página 7.

**Tabela 2.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias do complexo 1. Página 30.

**Tabela 3.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias do complexo 1 após a simulação de dinâmica molecular. Página 31.

**Tabela 4.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias do complexo 2. Página 34.

**Tabela 5.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias do complexo 3. Página 36.

**Tabela 6.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias do complexo 4. Página 39.

**Tabela 7.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias do complexo 5. Página 40

**Tabela 8.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias do complexo 5 após a simulação de dinâmica molecular. Página 41

**Tabela 9.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias do complexo 6. Página 44.

**Tabela 10.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias do complexo 7. Página 47.

**Tabela 11.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias do complexo 8. Página 49.

## **Lista de Quadros**

**Quadro 1.** Análise geral dos resultados selecionados para representar o complexo PLA<sub>2</sub> ácida/PLI $\alpha$ . Página 27.

**Quadro 2.** Análise geral dos resultados selecionados para representar o complexo CB/CNF. Página 44.

## LISTA DE ABREVIATURAS

PLA <sub>2</sub> s	=	Fosfolipases A <sub>2</sub>
BthA-I	=	PLA <sub>2</sub> ácida I de <i>Bothrops jararacussu</i>
C $\alpha$	=	Carbono $\alpha$
CB	=	Crotoxina B, subunidade básica e tóxica do complexo Crotoxina (CTX)
CNF	=	<i>Crotalus Neutralization Factor</i>
DLS	=	Espalhamento de Luz Dinâmico
DM	=	Dinâmica Molecular
PLI	=	Inibidores de Fosfolipases A <sub>2</sub>
PLI $\alpha$	=	Inibidores de Fosfolipases A <sub>2</sub> tipo alfa
PLI $\beta$	=	Inibidores de Fosfolipases A <sub>2</sub> tipo beta
PLI $\gamma$	=	Inibidores de Fosfolipases A <sub>2</sub> tipo gama
rmsd	=	<i>Root mean square deviation</i> ou desvio calculado através da raiz quadrada da média dos quadrados das distâncias entre átomos equivalentes
SAXS	=	Espalhamento de raios X a baixo ângulo

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Veneno de serpente</b>	<b>2</b>
1.1.1. Fosfolipases A <sub>2</sub> - PLA <sub>2</sub>	3
<b>1.2. Inibidores plasmáticos de serpentes</b>	<b>5</b>
1.2.1. PLI $\alpha$ ( $\alpha$ BaltMIP)	6
1.2.2. Gama (CNF)	8
1.2.2.1. Refinamento da estrutura da CNF	8
<b>1.3. Modelagem Molecular</b>	<b>10</b>
1.3.1. Modos Normais	10
1.3.2. Clusterização	12
1.3.3. <i>Docking</i> Molecular	13
1.3.4. Dinâmica Molecular	13
<b>1.4. Novo protocolo de <i>docking</i> proteína/proteína proposto</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Protocolo de <i>docking</i> proposto</b>	<b>18</b>
3.1.1. Fluxograma do protocolo desenvolvido	18
3.1.2. Estruturas geradas ao longo dos modos normais	20
3.1.3. Seleção – Critério MMFP (Potencial Médio de Campo Misto)	20
3.1.4. Clusterização	21
3.1.5. <i>Docking</i> – Receptor/Ligante	21
3.1.6. Novo passo de clusterização	22
3.1.7. Refinamento dos resultados	22
3.1.8. Dinâmica Molecular	22
3.1.9. Recursos computacionais disponíveis	23
<b>RESULTADOS &amp; DISCUSSÃO</b>	<b>24</b>
<b>4.1. Fosfolipase A<sub>2</sub> ácida/<math>\alpha</math>PLI</b>	<b>25</b>
4.1.1. Complexo 1	29
4.1.2. Complexo 2	33
4.1.3. Complexo 3	35
4.1.4. Complexo 4	37
4.1.5. Complexo 5	39
4.1.6. Complexo 6	42
<b>4.2. Crotoxina B, CB/CNF (<i>Crotalus Neutralization Factor</i>)</b>	<b>44</b>
4.2.1. Complexo 7	46
4.2.2. Complexo 8	47
4.2.3. Complexo 9	49
4.2.4. Complexo 10	51
<b>4.3. Discussão</b>	<b>52</b>
4.3.1. PLA <sub>2</sub> /PLI	52
4.3.2. CB/CNF	55
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>57</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>58</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>59</b>
<b>MATERIAL COMPLEMENTAR</b>	<b>63</b>
<b>ANEXO 1 “TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O MESTRADO”</b>	<b>64</b>

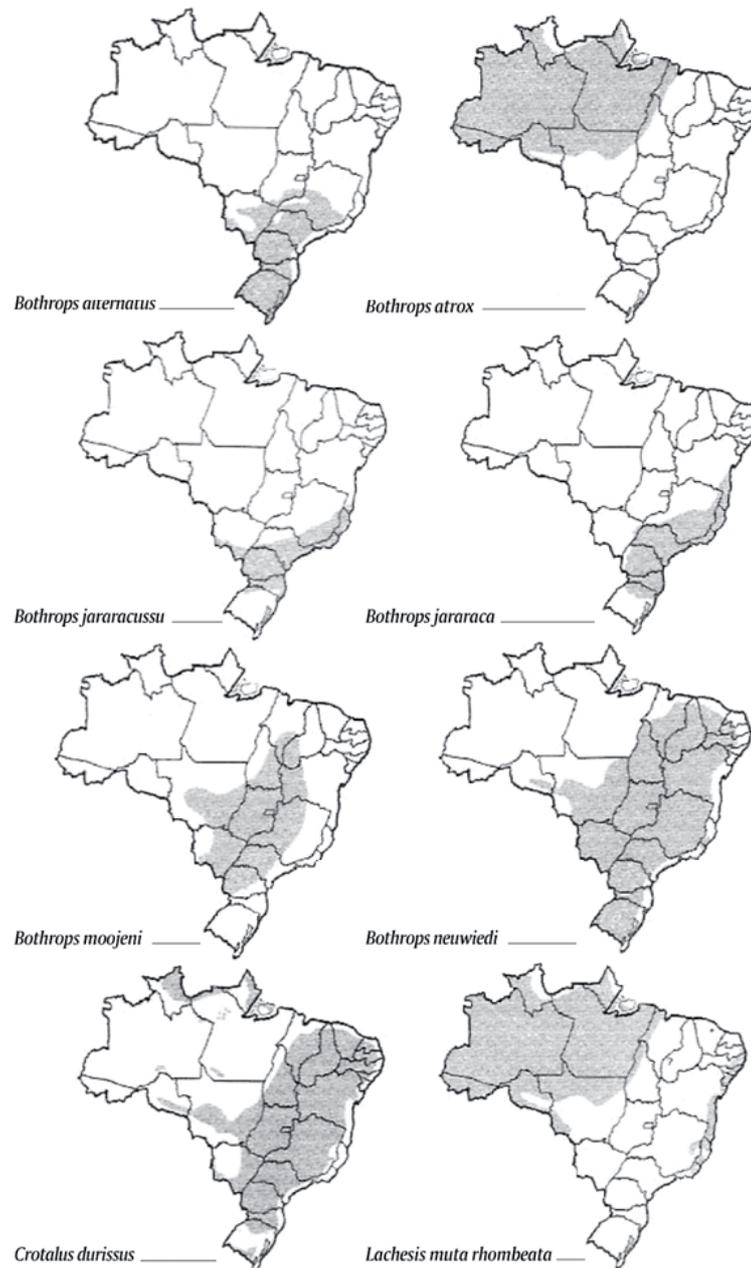
# INTRODUÇÃO

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Veneno de serpente

A substância que é injetada pelas presas das serpentes e que leva o nome de veneno é uma composição de diferentes substâncias, como proteínas (90%), carboidratos, metais, aminoácidos, lipídios, entre outros (Varanda *et al.*, 1999). Das proteínas encontradas, podemos destacar as L-amino-oxidases, fosfolipases, serino proteases e metaloproteases (Varanda *et al.*, 1999). Os estudos a cerca da grande variedade de efeitos farmacológicos e bioquímicos apresentados pelas proteínas e peptídeos que compõem os venenos destes répteis, pode contribuir para a 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 bradicinina isolada do veneno de *Bothrops jararaca* (Smith & Vane, 2003) e 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).

Atualmente, há registros de pelo menos 421.000 envenenamentos de humanos por picada de serpentes resultando em 20.000 mortes todo ano mundialmente (Kasturiratneet *al.*, 2008). No Brasil, os acidentes ofídicos estão concentrados nos gêneros das serpentes *Bothrops* e *Crotalus*, que são responsáveis por 95% dos acidentes ofídicos (figura 1), enquanto que o segundo gênero apresenta alta taxa de mortalidade (Ministério Público, 2010),



**Figura 1.** Distribuição dos acidentes ofídicos pelo Brasil (Melgarejo, 2003).

### 1.1.1. Fosfolipases A<sub>2</sub>– PLA<sub>2</sub>

Dos compostos presentes nos venenos, as proteínas são as substâncias responsáveis pelos efeitos tóxicos dos venenos das serpentes. Dessas proteínas, as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação acil-éster, posição *sn*-2, do fosfolipídio da membrana, iniciando a via metabólica da cascata do ácido araquidônico. Essa via é fundamental no processo inflamatório, tendo ácidos graxos livres e lisofosfolipídios como produtos da reação. Esse mecanismo, por desestruturar a membrana, pode causar inúmeros danos dependendo do

substrato alvo, tais como efeito mionecrótico, anticoagulante, neurotóxico, cardiotoxico, entre outros (Gutiérrez *et al.*, 2007; Santos-Filho *et al.*, 2008).

O sítio catalítico das fosfolipases A<sub>2</sub> é composto por uma histidina (His48, de acordo com o sistema de numeração para PLA<sub>2</sub>s (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 Ca<sup>2+</sup> (Arni & Ward, 1996; Magro *et al.*, 2009).

### 1.1.2. Crotoxina

A crotoxina é uma fosfolipase A<sub>2</sub> que é a principal responsável pelo pronunciado efeito neurotóxico do veneno das serpentes da espécie *Crotalus durissus* por conta de sua potente atividade de bloqueio da transmissão neuromuscular (Changet *al.*, 1977). A crotoxina é formada por duas subunidades, uma ácida, não tóxica e desprovida de ação enzimática; conhecida como crotoxina A (CA) ou crotapotina; e uma básica, tóxica com atividade enzimática; conhecida como crotoxina B (CB) (Faure *et al.*, 2011) (Figura 2).



**Figura 2.** Representação em *cartoon* de um monômero da estrutura cristalográfica da Crotoxina B (CB), cadeia básica, catalítica, do complexo CA/CB. Em preto está representado o íon de cálcio coordenado pelo *loop* ligação de cálcio, resíduos Asp28, Gly30, Gly32 e Asp49. PDB ID 2QOG (Marchi-Salvador *et al.*, 2008).

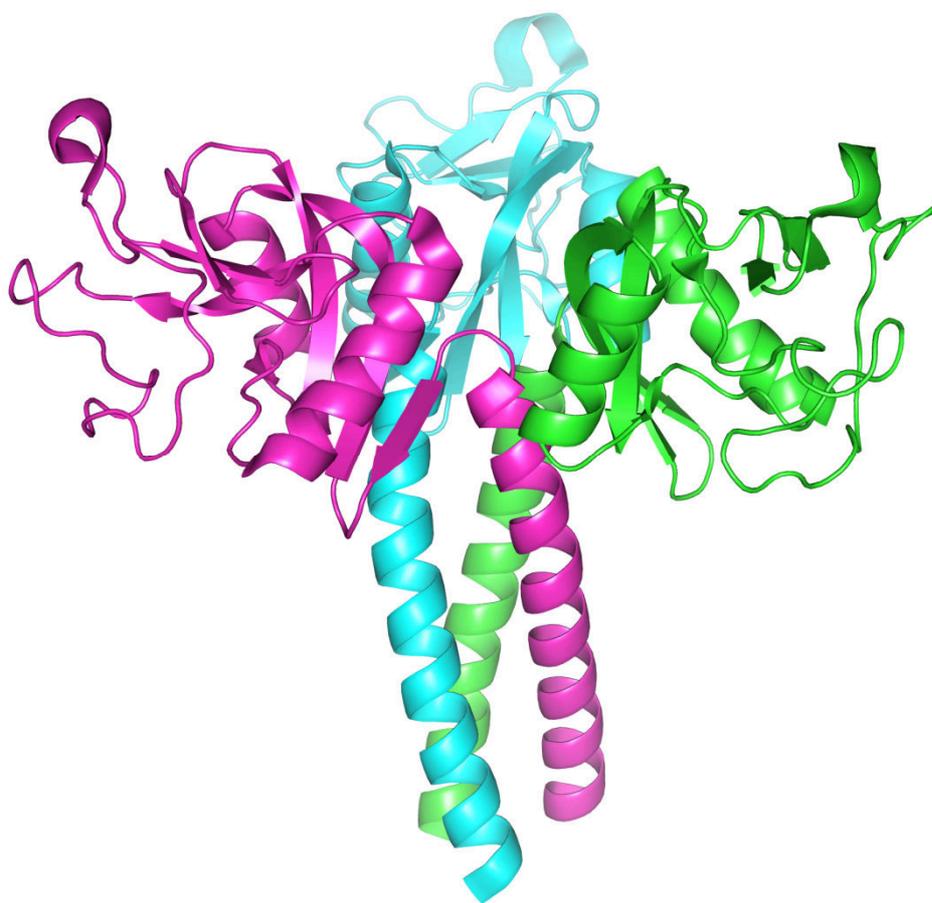
## 1.2. Inibidores plasmáticos de serpentes

O veneno das serpentes é o principal recurso desses animais para busca e apreensão de presas, assim como defesa contra predadores. Entretanto, as serpentes apresentam resistência ao envenenamento ofídico, inclusive as espécies não peçonhentas (Okumura *et al.*, 1999). Um dos mecanismos de resistência é dado pela presença de fatores de neutralização protéicos encontrados no sangue destes animais. Essas proteínas não são somente encontradas em serpentes, há relatos da presença desses inibidores plasmáticos em alguns mamíferos roedores e marsupiais (Fortes-Dias *et al.*, 2002). Estes inibidores, como por exemplo, os inibidores endógenos de fosfolipases A<sub>2</sub> (PLIs), devem ocorrer como autoproteção dessas serpentes contra o próprio veneno (Fortes-Dias *et al.*, 2002; Faure *et al.*, 2000). As PLIs são glicoproteínas ácidas não-proteolíticas com massa molecular de 75 a 180 kDa que podem formar estruturas oligoméricas de três a seis subunidades (Forte-Dias *et al.*, 2002; Lizano *et al.*, 2003). Esses inibidores são classificados em três classes estruturais,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que podem ser encontrados ao mesmo tempo no plasma de uma mesma espécie de serpente (Lizano *et al.*, 2000).

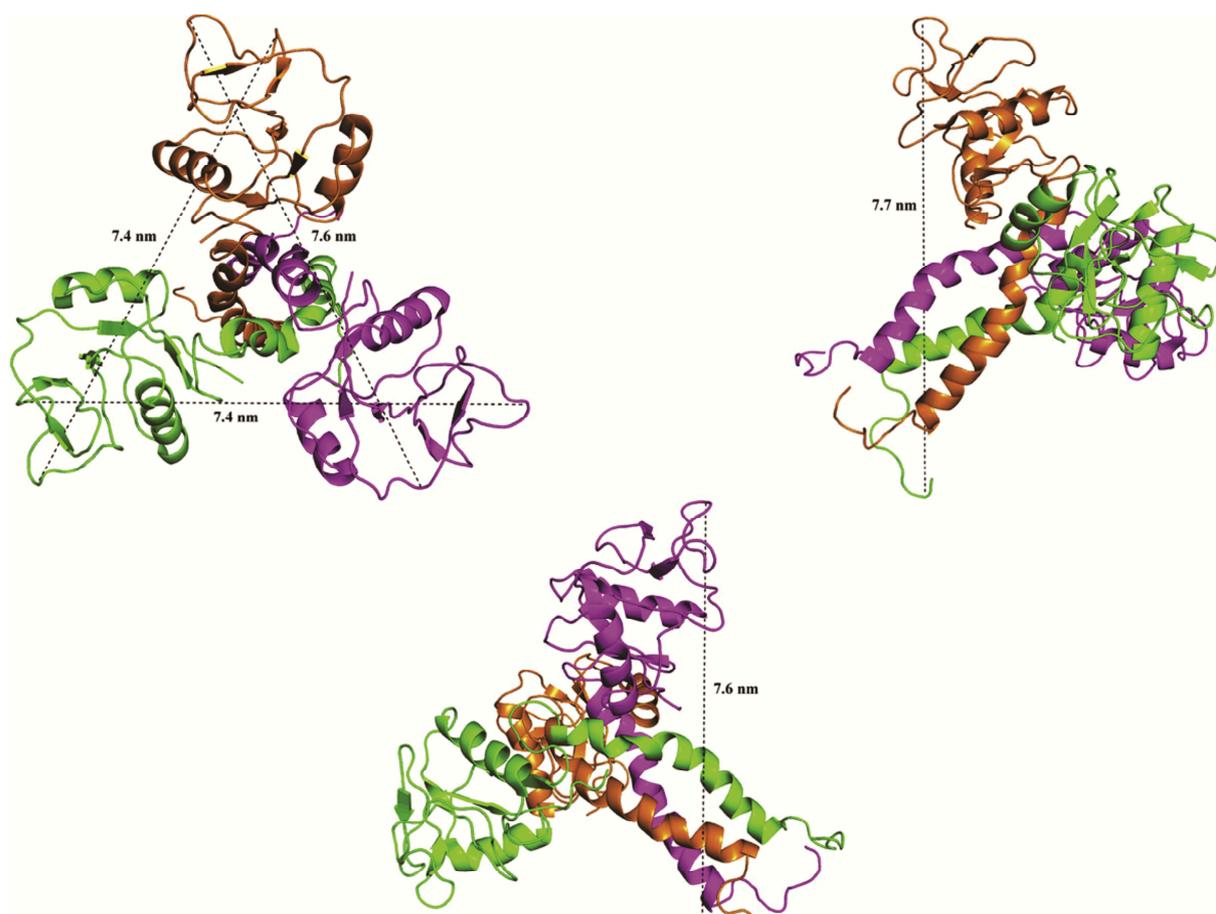
Os  $\alpha$  e  $\gamma$ -PLIs foram encontrados em um grande número de espécies de serpentes, ao contrário das  $\beta$ -PLIs, que foram encontrados em apenas três espécies de serpentes, sendo duas delas não peçonhentas (Forte-Dias *et al.*, 2002; Faure *et al.*, 2002). Cada uma destas classes é caracterizada pela presença de domínios protéicos conhecidos. Os  $\alpha$ -PLIs possuem um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) de lectinas do tipo C, que alguns autores afirmam que podem não se ligar a carboidratos (Okumura *et al.*, 1997), os  $\beta$ -PLIs possuem um domínio de repetição de leucinas (LRR) (Lima *et al.*, 2011) e os  $\gamma$ -PLIs, os mais conhecidos e abundantes, possuem domínios *three-finger* ricos em cisteínas (Nobuhisa *et al.*, 1998). De acordo com a classe que o PLI pertence, ele apresenta diferentes especificidades às fosfolipases A<sub>2</sub>. Entretanto, o modo como se ligam às fosfolipases A<sub>2</sub> ainda é muito pouco conhecido, assim como, a sua conformação oligomérica.

### 1.2.1. PLI $\alpha$ ( $\alpha$ BaltMIP)

A estrutura do inibidor tipo  $\alpha$  encontrado na literatura,  $\alpha$ BaltMIP, foi predita em uma conformação trimérica (DOI: 10.5452/ma-a4btt, disponível no banco de dados público ModelArchive) (Haas *et al.*, 2013). Após a modelagem molecular baseado em uma proteína surfactante pulmonar homóloga, PDB ID 1PWB (figura 3) e otimizado estruturalmente, foram realizados experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) que mostraram um raio hidrodinâmico de 3,6nm para as moléculas de  $\alpha$ BaltMIP, tais dados estão de acordo com o modelo proposto por Santos-Filho *et al.*, 2011 (figura 4).



**Figura 3.** Proteína surfactante pulmonar, PDB ID 1PWB, apontada como homóloga para realizar a modelagem da  $\alpha$ PLI, (score = 203.9; e-value = 1.1e<sub>-32</sub>) (Santos-Filho *et al.*, 2011). Estão representadas em cores diferentes cada uma das cadeias do homotrímero da proteína.



**Figura 4.** Medidas dos raios do modelo *in silico* do trímero de  $\alpha$ BaltMIP por Santos-Filho *et al.*, 2011.

Pesquisas encontradas na literatura tentam descrever as regiões em que os inibidores plasmáticos tipo alfa interagem com as fosfolipases A<sub>2</sub> (tabela 1).

**Tabela 1.** Informações acerca das possíveis regiões de interação entre as PLI $\alpha$  e as PLA<sub>2</sub> ácidas

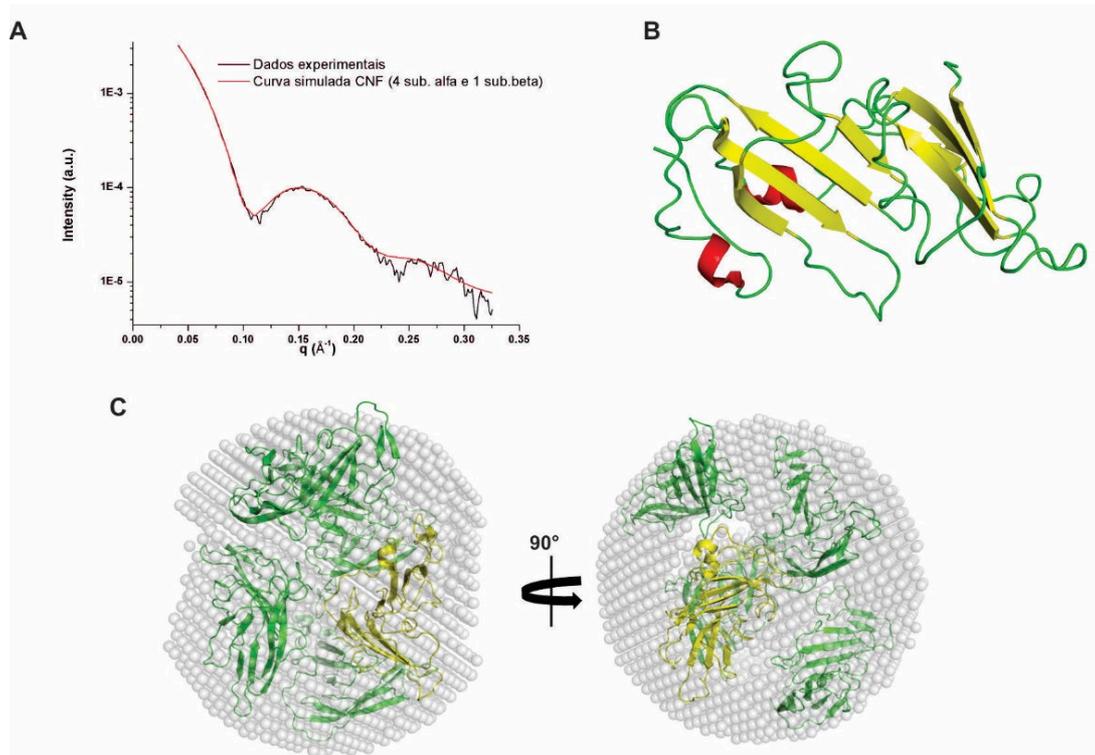
<b>Referência</b>	<b>Região de Interação</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Localização</b>
Nobuhisa <i>et al.</i> , 1998	N-terminal C-terminal	Peptídeos sintéticos	37 resíduos do N-Terminal e 12 últimos resíduos do C-terminal
Okumura <i>et al.</i> , 2005	Poro central	Modelo <i>in silico</i>	Região próxima ao Y-144
Santos-Filho <i>et al.</i> 2011	Poro central	DLS e Modelo <i>in silico</i>	A-30 ao T-50

### 1.2.2. Gama (CNF)

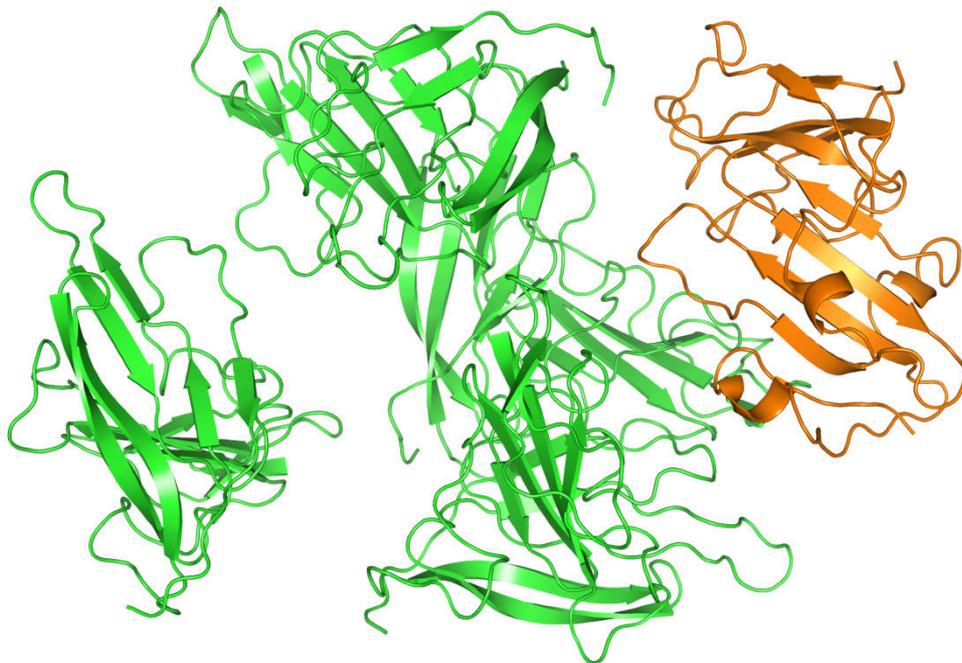
O inibidor  $\gamma$  encontrado no plasma das serpentes do gênero *Crotalus* e que se liga exclusivamente a subunidade básica e tóxica da crotoxina, levou o nome de CNF, *Crotalus Neutralization Factor* (Fortes-Dias *et al.*, 1994). Essas proteínas têm a capacidade de retirar a subunidade básica do complexo crotoxina e se ligar a ela, formando um complexo, CNF/CB, estável e desprovido de qualquer atividade conhecida das PLA<sub>2</sub> (Forte-Dias *et al.*, 2014).

#### 1.2.2.1. Refinamento da estrutura da CNF

O modelo da CNF encontrado na literatura é oligômero monomérico (Forte-Dias *et al.*, 2014). Dados na literatura apontam que proteínas da mesma classe que a CNF, inibidores plasmáticos tipo gama, se encontram como multímeros (Fortes-Dias *et al.*, 1994), além do fato de que experimentos de cromatografia de fase reversa mostraram um segundo pico equivalente a 16% da massa total do complexo CNF. Há relatos que proteínas da mesma classe que a CNF apresentem uma subunidade  $\beta$  em seus complexos (Fortes-Dias *et al.*, 2014). Após essas análises, foi construído um modelo contendo um tetrâmero de moléculas de CNF na presença de uma subunidade  $\beta$ . Tal subunidade foi modelada baseada em uma proteína homóloga, mais especificamente um inibidor gama encontrado no plasma das serpentes da espécie *Protobothrops flavoviridis*. Após a construção do modelo, pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural da UNESP de Botucatu refinaram a estrutura do complexo utilizando dados de SAXS (figuras 5 e 6).



**Figura 5.** (A) Sobreposição da curva de SAXS (linha preta) com a curva de SAXS calculada a partir do modelo estrutural do CNF formado por 4 subunidades alfa e uma subunidade beta (linha vermelha); (B) Modelo *in silico* da subunidade beta do inibidor endógeno gama de *Protothrops flavoviridis* após 50 ns de simulações de dinâmica molecular; (C) Sobreposição do envelope protéico do CNF obtido por SAXS com o da modelo estrutural do CNF formado por 4 subunidades alfa e uma subunidade beta. Dados realizados e refinados por colaboradores do nosso laboratório (Fernandes *et al.*, 2015 – Comunicação pessoal)



**Figura 6.** Representação em *cartoon* do tetrâmero do inibidor gama CNF, verde, modelado com a subunidade  $\beta$ , laranja.

## 1.3. Modelagem Molecular

### 1.3.1. Modos Normais

As análises dos Modos Normais (NMA) é uma técnica que visa calcular a flexibilidade e as mudanças conformacionais em uma proteína (Floquet *et al.*, 2009). Essas análises são úteis, pois as mudanças conformacionais de grande amplitude, ou seja, de baixa frequência, coincidem com as diferenças encontradas nos resultados cristalográficos da mesma proteína (Mouawad e Perahia, 1993). As mudanças baseadas em um modo normal são oscilações em torno de um mínimo de energia potencial, tais vibrações descrevem um estado do sistema onde todas as partículas estão oscilando com a mesma frequência característica (Batista *et al.*, 2010). As três principais etapas das análises dos Modos Normais são a minimização, cálculo da matriz Hessiana e a diagonalização da mesma.

#### 1.3.1.1. Minimização energética

Necessitando da garantia de que a estrutura esteja em um mínimo energético para, conseqüentemente, realizar uma aproximação harmônica, precisamos de um passo de minimização. Nesta etapa garantimos que não existirão frequências negativas, das quais não possuem valor relativo aos movimentos vibracionais (Becker e Karplus, 2006).

#### 1.3.1.2. Cálculo da Matriz Hessiana

Por se tratar de um problema de pequenas oscilações em torno de um mínimo de energia, a função potencial,  $V$ , é expandida em série de Taylor, equação 1, onde  $q_i = \sqrt{m_i}\Delta x_i$ ,  $\Delta x_i$  é o deslocamento da coordenada a partir da energia mínima e  $m_i$  é a massa do átomo correspondente. Os primeiros termos da expansão são zero, até a primeira derivada, o termo referente à segunda derivada é não nulo e são assumidos para caracterizar a superfície de energia uma vez que os termos de mais alta ordem são desconsiderados. Desta forma, os elementos da matriz Hessiana, equação 2, são a segunda derivada do potencial em relação as coordenadas. O

tamanho desta matriz cresce com  $N^2$ , onde  $N$  é o número de átomos (Mouawad e Perahia, 2006; Becker e Karplus, 2006; Hayward *et al.*, 2008).

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^{3N} \left. \frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right|_0 q_i q_j \quad (1)$$

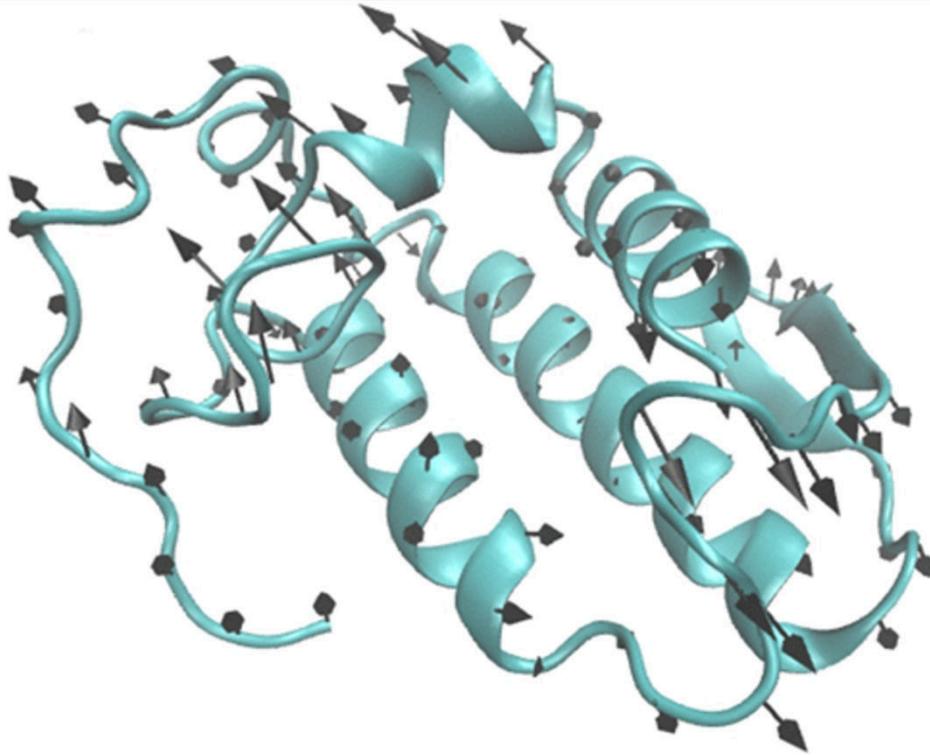
$$H(f) = \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 f}{\partial x_1^2} & \dots & \frac{\partial^2 f}{\partial x_1 \partial x_n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial^2 f}{\partial x_n \partial x_1} & \dots & \frac{\partial^2 f}{\partial x_n^2} \end{bmatrix} \quad (2)$$

### 1.3.1.3. Diagonalização da Matriz Hessiana

A diagonalização da Hessiana conduz para  $3N$  equações de movimento independentes para cada coordenada normal. O padrão de movimento, ou modo normal, é completamente descrito pelos autovetores e autovalores da Hessiana, onde os autovalores fornecem as frequências e os autovetores os deslocamentos. Os seis primeiros modos são de movimentos de rotação e de translação, dos quais possuem frequência zero, ou seja, somente modificam a posição da estrutura, desta forma os modos “representativos” iniciam-se a partir do modo 7, ao ponto em que quanto maior o modo, maior a sua frequência.

### 1.3.1.4. Exemplo de variação ao longo de um Modo Normal

Para melhor representar as mudanças conformacionais de uma proteína por meio das técnicas de análise dos modos normais, foram sobrepostas sete estruturas de uma PLA<sub>2</sub> ácida calculada no modo 10 com deslocamento de -0,7 até -1,3Å. Estes movimentos podem ser caracterizados pelo fator Debye-Waller (fator-B), correspondente à mobilidade local do resíduo em nível atômico (figura 7).



**Figura 7.** Representação em *cartoon* de uma Asp49-PLA<sub>2</sub> ácida (Magro *et al.*, 2004) com os vetores de deslocamento do modo normal 27 do Charmm com variações de -3 até 3Å com passo de 0,1 Å.

### 1.3.2. Clusterização

Quando uma metodologia é aplicada, independente de qual ela seja, e nos gera uma quantidade grande de resultados, nos deparamos com a necessidade de agrupar resultados próximos, tanto para evitar resultados redundantes como para facilitar as análises. Esse procedimento pode considerar alguns parâmetros para realizar o agrupamento, entre eles, o agrupamento baseado no desvio médio quadrático dos átomos, rmsd. Essa forma de análise visa agrupar os complexos de forma a comparar o desvio médio quadrático dos átomos desejados com uma estrutura inicial. Para interpretar esses agrupamentos, os diferentes programas que realizam esses procedimentos dispõem de uma variedade de funções, entre elas está a função *g\_cluster* no modo *gromos* do programa *gromacs* (Hess *et al.*, 2008), que agrupa as soluções colocando-as em posições próximas conforme os valores de rmsd, seleciona os membros com o número máximo de vizinhos e então formaliza os clusters (Van Gunsteren *et al.*, 1998)

### **1.3.3. Docking Molecular**

Essa categoria de análise nos permite estudar e prever interfaces de interação receptor/ligante, descobrir novos sítios de interação dos compostos, entender melhor sua funcionalidade, entre outros benefícios em nível molecular (Trott e Olson, 2010; Pita *et al.* 2008; Bachar *et al.*, 1993). Ao passar dos anos, os programas que realizam análises de *docking* molecular foram mais amplamente utilizados e desenvolvidos para sistemas onde o receptor era o grande composto, no nosso caso as proteínas responsáveis pelos efeitos tóxicos dos venenos de serpentes, PLA<sub>2</sub>, e os ligantes eram estruturas menores e mais simples. A flexibilidade, que é esperada nos sistemas biológicos e por consequência nos sistemas computacionais, era mais fácil de ser calculada e estudada, já que, quanto menor a estrutura, menos conformações ela terá e mais fácil será esse cálculo (Teague, 2003). Além disso, os poucos programas que realizam as análises de *docking* molecular utilizando duas ou mais macromoléculas, raramente dispõem de recursos para prever as flexibilidades das moléculas. Esse recurso quando encontrado, realiza mudanças conformacionais de baixa amplitude, das quais podem ser pouco relevantes quando comparadas com as possíveis conformações que as proteínas assumem e quais modificações esperam-se observar.

### **1.3.4. Dinâmica Molecular**

As simulações de dinâmica molecular têm sido empregadas para analisar sistemas biológicos a nível atômico. Tais análises visam aplicar as leis de Newton para analisar a evolução temporal do sistema, resultando em análises em torno das propriedades estáticas, dinâmicas, estruturais e termodinâmicas.

Para as análises de dinâmica molecular teremos as coordenadas dos átomos das proteínas, ou seja, teremos as interações do sistema, nos dando informações a cerca da energia potencial do sistema. Com essas informações conseguimos extrair valores de força e por consequência a

aceleração, devido ao fato de que a força é o gradiente negativo da energia potencial, onde cada componente do gradiente  $i$ ,  $i = 1, \dots, 3N$ , é dado por:

$$\nabla E(X)_i = \partial E(X)/\partial \alpha_i \quad (3)$$

onde  $\alpha_i$  é a componente  $x$ ,  $y$  e  $z$  de cada átomo. Integrando essa função, conseguimos obter uma sequência de pares de posição e velocidade,  $\{X^n, V^n\}$ , para  $n$  inteiros que são representados por  $n = t/\Delta t$  para o intervalo de tempo  $\Delta t$ . Utilizando esses dados pode-se calcular o deslocamento e esse quando atingido, tem o valor do potencial recalculado, assim como a força, posição e velocidade (Schlick, 2010).

#### **1.4. Novo protocolo de *docking* proteína/proteína proposto**

Utilizando as metodologias computacionais citadas, além de outros recursos computacionais como programação em *Shell script*, esse trabalho propõe um novo protocolo para suprir algumas das limitações computacionais observadas nos programas que realizam as análises de *docking* molecular, tais como flexibilidade das moléculas, agrupamento de resultados e análises dinâmicas. Tal protocolo possui como passos principais a predição de algumas das possíveis conformações estruturais das moléculas envolvidas por técnicas de NMA, exclusão das estruturas preditas que estão fora do corte da energia de restrição, análises de *docking* molecular entre receptor e ligante, agrupamento dos resultados próximos, análise dos complexos gerados, simulação de dinâmica com os melhores resultados.

O protocolo de *docking* elaborado além de considerar possíveis conformações flexíveis das moléculas, agrupamento dos resultados e análises das estruturas, também nos informará dados acerca da estabilidade, energia e termodinâmica do complexo.

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

- Elaborar um novo protocolo de *docking* flexível envolvendo duas ou mais proteínas.
- Aplicar o protocolo para estudar as interações entre duas PLA<sub>2</sub> presentes nos venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* contra os seus respectivos inibidores plasmáticos.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Partindo da limitação citada dos programas de *docking* molecular e visando a elaboração de um novo protocolo que envolvesse macromoléculas e suas possibilidades conformacionais, em colaboração com o Laboratório de Biologia Computacional e Bioinformática da UFABC que tem como coordenador o Prof. Dr. Luís Paulo Barbour Scott, foi desenvolvida uma sequência de *scripts* que sugerem um novo protocolo. Essa nova metodologia computacional proposta tem como arquivos de entrada as coordenadas estruturais da proteína receptora e da proteína ligante e gera como resultados os sistemas complexados dessas duas estruturas considerando suas possíveis conformações e flexibilidades. Para facilitar as análises dos dados, tais resultados estarão agrupados considerando o posicionamento das proteínas.

O novo protocolo desenvolvido e citado está representado no tópico a seguir.

#### **3.1. Protocolo de *docking* proposto**

##### **3.1.1. Fluxograma do protocolo desenvolvido**

Um fluxograma foi realizado para ilustrar o novo protocolo proposto de *docking* Proteína/Proteína (figura 8).

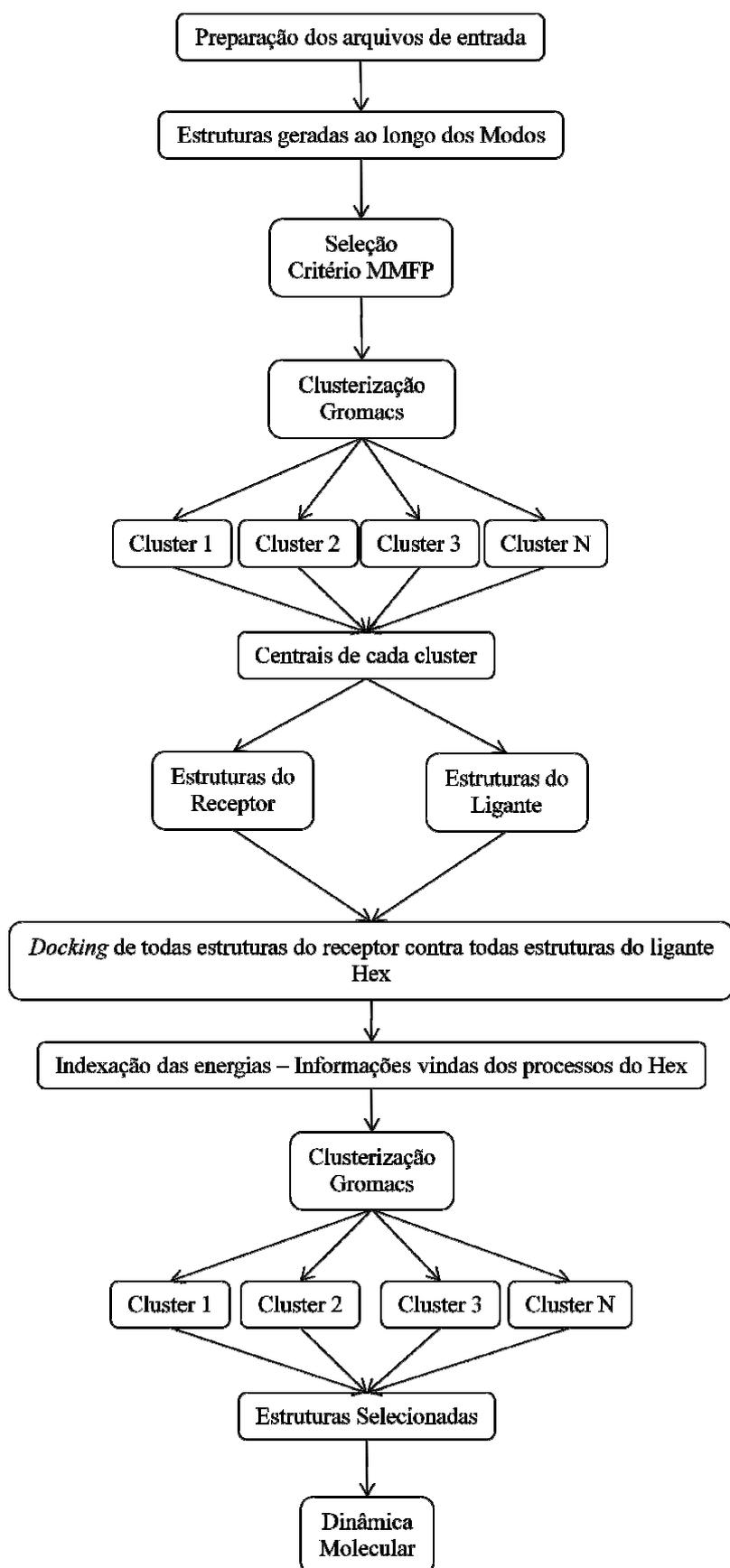


Figura 8. Fluxograma do novo protocolo desenvolvido.

### 3.1.2. Estruturas geradas ao longo dos modos normais

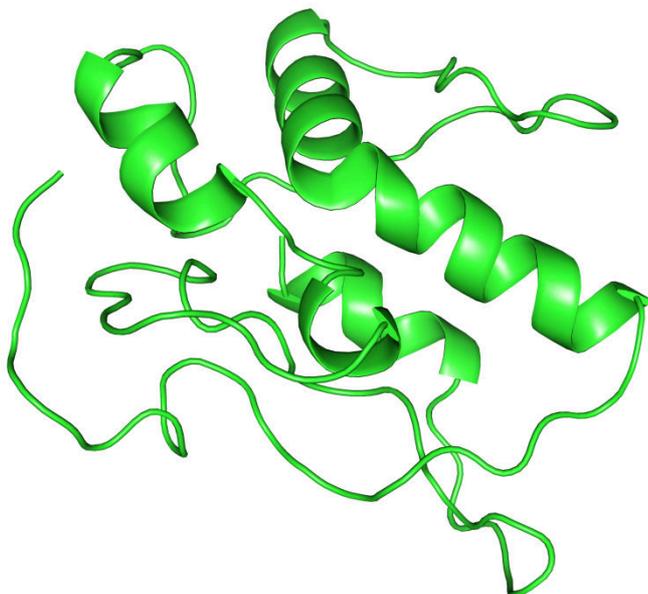
Tendo as estruturas do receptor e do ligante disponíveis, o primeiro passo do novo protocolo foi o cálculo das estruturas ao longo dos modos normais e os seus devidos deslocamentos seguindo os passos de minimização energética, cálculo da matriz Hessiana e a diagonalização da mesma, como demonstrado na introdução.

#### 3.1.2.1. Parâmetros das análises dos Modos Normais

Para a realização das nossas análises, consideramos os cálculos dos padrões de vibração, modos, de 7 a 67, variando de -3 a 3Å com passo de 0,1Å. Para calcular as estruturas ao longo dos modos utilizamos o *software* Charmm (Brooks *et al.*, 1983), sendo que os *inputs* foram gerados no servidor [www.charmm-gui.org](http://www.charmm-gui.org) (Kim *et al.*, 2008).

#### 3.1.3. Seleção – Critério MMFP (Potencial Médio de Campo Misto)

Ao calcular as estruturas ao longo dos modos normais, inevitavelmente, pode-se dizer que algumas estruturas serão energeticamente desfavoráveis, pois computacionalmente conseguimos realizar algumas modificações que seriam inviáveis e impossíveis biologicamente (figura 9). Nele pode-se observar uma perda de estrutura secundária, hélices-alfa e folhas betas, e uma torção incomum de uma hélice-alfa. Por isso, um primeiro passo de seleção das estruturas foi adicionado. Tal passo elimina as estruturas fora do limite estabelecido baseado nos cálculos energéticos, energia de restrição, que em outras palavras poderia ser descrito pelo quão possível é o deslocamento da estrutura até uma dada conformação. Para o cálculo foi utilizado a função de MMFP, potencial médio de campo misto, do *software* Charmm com o parâmetro *mmfpcut*, que fornece os valores de corte para a seleção, em 0,8 (Brooks *et al.*, 1983).



**Figura 9.** Representação em cartoon de uma estrutura calculada da PLA<sub>2</sub> ácida que foi rejeitada pelo critério MMFP de seleção.

#### **3.1.4. Clusterização**

Para agrupar estruturas semelhantes, selecionamos o modo *gromos* da função *g\_cluster* do programa *gromacs* (Hess *et al.*, 2008). Após o agrupamento, selecionamos a estrutura central de cada cluster, abrangendo todos os clusters, pois como cada cluster contém estruturas parecidas, se selecionarmos a estrutura central teremos considerado a média daquele grupo, estatisticamente, a melhor representante do grupo, desconsiderando os casos de borda.

#### **3.1.5. Docking – Receptor/Ligante**

Tendo as estruturas geradas ao longo dos modos normais e selecionadas pela função MMFP, utilizamos o programa *Hex*, v.8.0.0, para realizar as predições dos complexos entre os receptores e os ligantes. As configurações da execução dos experimentos utilizando o *Hex* foram deixadas na configuração padrão, exceto o modo do *docking* que foi configurado para considerar as propriedades eletrostáticas e geométricas das moléculas. Ambas as moléculas foram consideradas como um todo como local de interação, não havendo casos onde regiões das proteínas foram descartadas para realizar os experimentos.

Utilizando as estruturas selecionadas, tanto do receptor, PLA<sub>2</sub>s, quanto dos ligantes PLIs, realizamos experimentos de *docking* utilizando todas as estruturas do receptor contra todas as estruturas do ligante.

### **3.1.6. Novo passo de clusterização**

Uma nova etapa de clusterização foi adicionada para, novamente, agruparmos os resultados próximos. O protocolo usado foi o mesmo que o passo de clusterização anterior.

### **3.1.7. Refinamento dos resultados**

Para o refinamento dos resultados foi adotada uma série de *softwares* e servidores para nos selecionar os melhores resultados. Dos *softwares* utilizados, o foco central foram as análises acerca das informações estereoquímicas, interações entre proteínas, energéticas, conformacionais e de estabilidade. Os programas utilizados foram: LigPlot (Wallace *et al.*, 1995), PISA (Krissinel *et al.*, 2005), *Protein Interaction Calculator* – PIC (Tina *et al.*, 2007), Prosa (Wiederstein *et al.*, 2007) e Binana (Durrant *et al.*, 2011).

### **3.1.8. Dinâmica Molecular**

Utilizando os complexos protéicos gerados pelos passos anteriores, foram realizadas dinâmicas moleculares. Para a realização das dinâmicas moleculares foi adotado o programa *gromacs* v.5.0.5 (Berendsen *et al.*, 1995, Hess *et al.*, 2008) seguindo os seguintes passos:

- Solvatação do complexo utilizando uma caixa cúbica de moléculas de água.
- Neutralização iônica do sistema, além da troca de 5% da quantidade de moléculas de água por quantidades iguais de íons de cálcio e de sódio.
- Minimização de energia do sistema pela metodologia *steepest descent*
- Simulação de dinâmica molecular curta, 1 ns, com restrição de posicionamento (PRMD) com o objetivo de relaxar o sistema de forma gradual.
- Simulação de dinâmica molecular longa, 100 ns, com as posições livres.

Todas as simulações de dinâmica molecular foram realizadas em uma caixa periódica cúbica de solvente sob temperatura (298 K) e pressão (1,0 bar) constantes (Berendsen *et al*, 1984).

### **3.1.9. Recursos computacionais disponíveis**

Para realizar os cálculos computacionais das etapas das análises dos modos normais e a execução do novo protocolo de *docking*, foram utilizados um *cluster* computacional e três computadores da Faculdade Federal do ABC. Seguem as configurações:

Cluster – Universidade Federal do ABC

- 12 nós de processamento, cada um com dois processadores Intel série 5600
- 24 gigabytes de memória RAM
- 7 GPU's nvidia modelo tesla 1060
- 8 GPU's nvidia modelo fermi 2050

Computador – Universidade Federal do ABC

- Processador Core i7 e 16 gigabytes de memória RAM

Para realizar as etapas de dinâmica molecular, foram utilizados computadores da Universidade Estadual Paulista e o GridUNESP, seguem as configurações:

GridUNESP

- 256 servidores SUN X4150
- 2048 cores de processamento (Intel Xeon 2.83 GHZ) e 4096 gigabytes de memória RAM

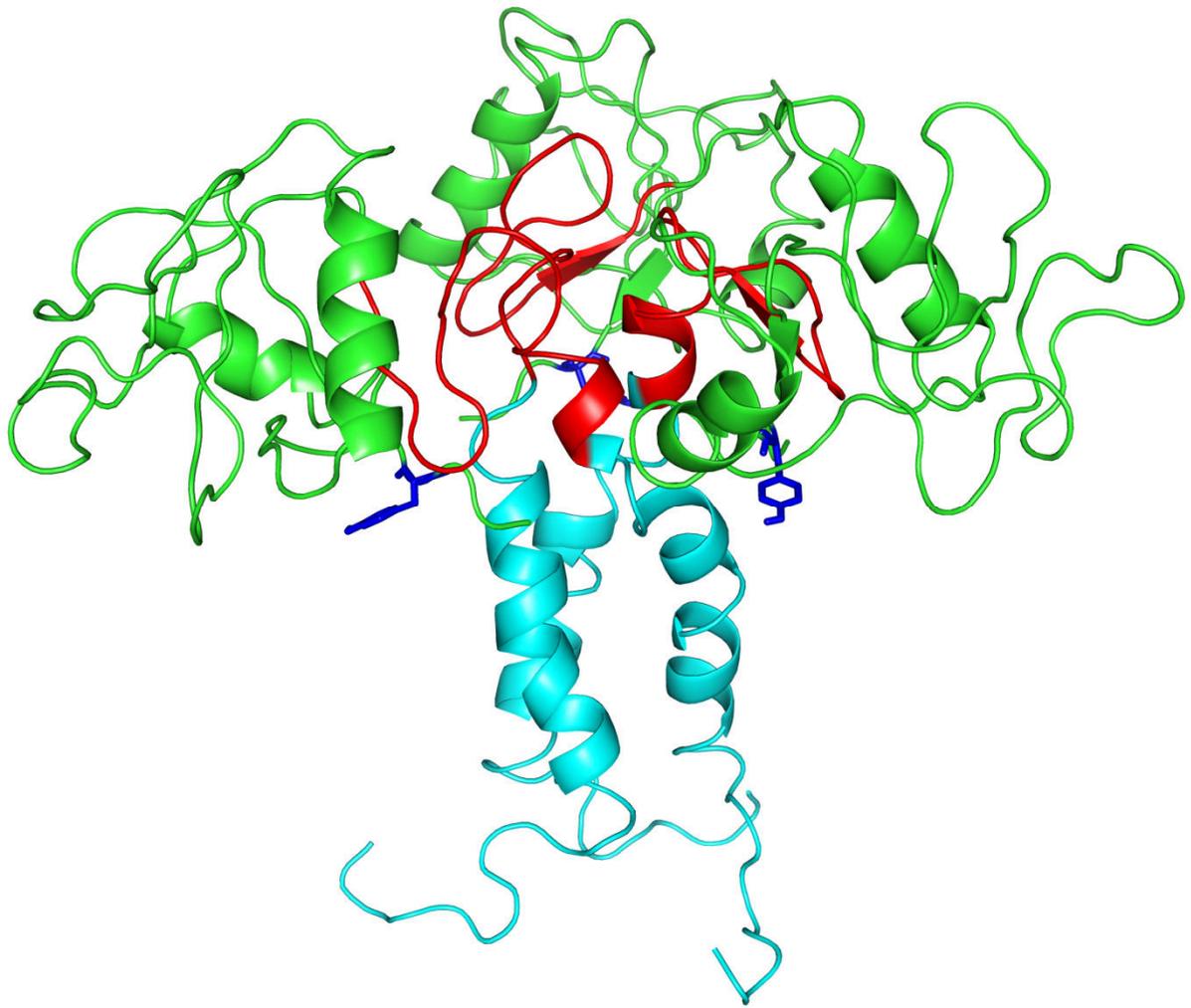
# **RESULTADOS & DISCUSSÃO**

## 4. RESULTADOS

Nos tópicos a seguir estão apresentados os resultados e discussões sobre as análises de *docking* e dinâmica molecular. As análises foram realizadas com o novo protocolo de *docking* utilizando as estruturas da PLA<sub>2</sub> ácida complexada com o inibidor plasmático de PLA<sub>2</sub> tipo  $\alpha$ ,  $\alpha$ BaltMIP, e as estruturas da crotoxina B, CB, complexada com a CNF. Para melhor análise dos resultados, os complexos gerados pelo novo protocolo de *docking* e as estruturas que foram submetidas a simulações de dinâmica molecular foram adicionadas ao CD em anexo ao trabalho, apresentado na seção “Material complementar”.

### 4.1. Fosfolipase A<sub>2</sub> ácida/ $\alpha$ PLI

Ao final das análises dos modos normais (NMA) e seleção pelo critério de restrição energética obtivemos 24 estruturas da PLA<sub>2</sub> e 86 estruturas do inibidor tipo  $\alpha$ ,  $\alpha$ BaltMIP, resultando em 20.640 execuções com 10 soluções de *dockings* em cada e separadas em 228 clusters. Filtrando os resultados de *docking* baseado na energia do complexo, ligações de hidrogênio entre receptor/ligante, acomodação do ligante entre outros parâmetros, pode-se observar uma predominância de algumas regiões de interação entre o receptor e o ligante. As regiões de interação observadas no inibidor tipo alfa foram as seguintes: Poro central superior, regiões envolvendo os resíduos tirosina 144 e regiões em torno do N-terminal (figura 10).

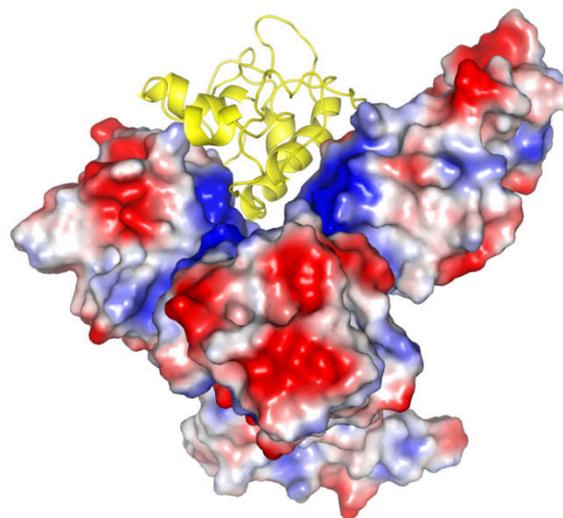
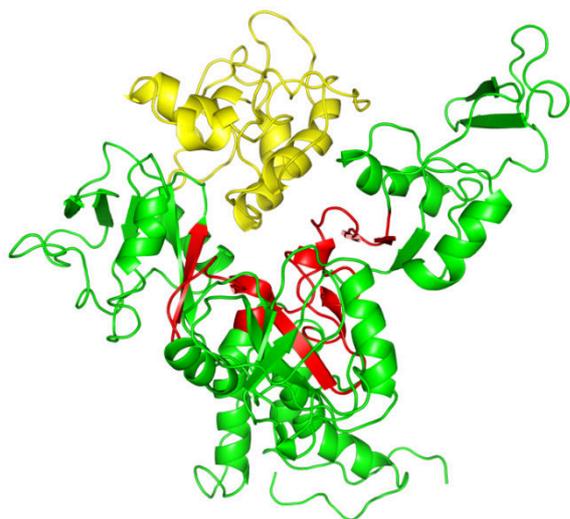


**Figura 10.** Representação das regiões observadas de interação das PLI $\alpha$  com as PLA<sub>2</sub> ácidas. Em ciano está representada a região N-terminal, em azul as tirosinas 144 e em vermelho o poro central da PLI $\alpha$ .

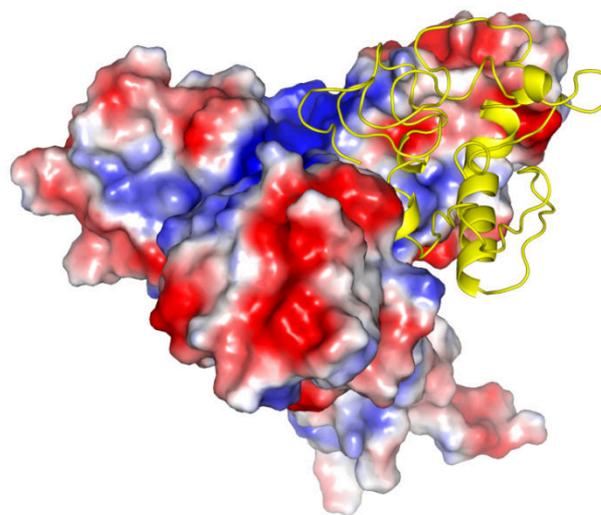
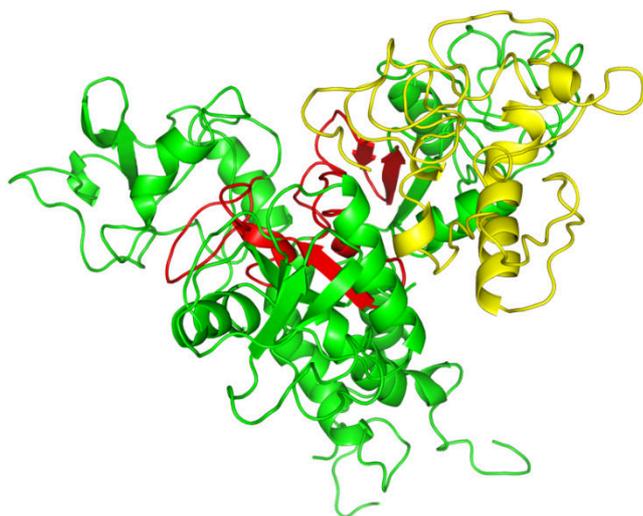
**Quadro 1.** Representação geral dos resultados obtidos e selecionados para representar o complexo BthaA-I/PLI $\alpha$ . As imagens foram realizadas com a PLI $\alpha$  na mesma posição, tal representação foi realizada para facilitar a observação da diferença entre os complexos. PLI $\alpha$  representado em *cartoon* verde, PLA $_2$  em *cartoon* amarelo. Em vermelho está representado o poro central, em azul os Y144 e em ciano a região do N-terminal. A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul. Figuras geradas do *software* PyMol.

## Complexo

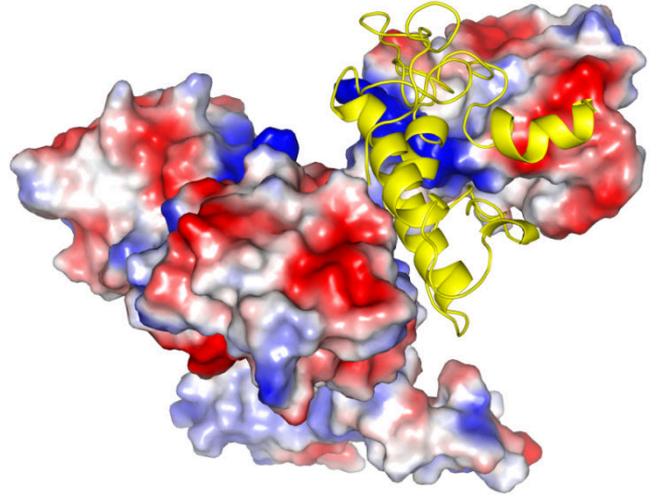
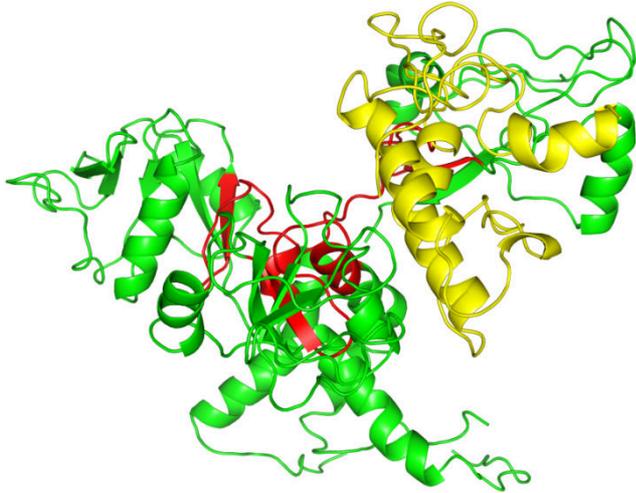
1



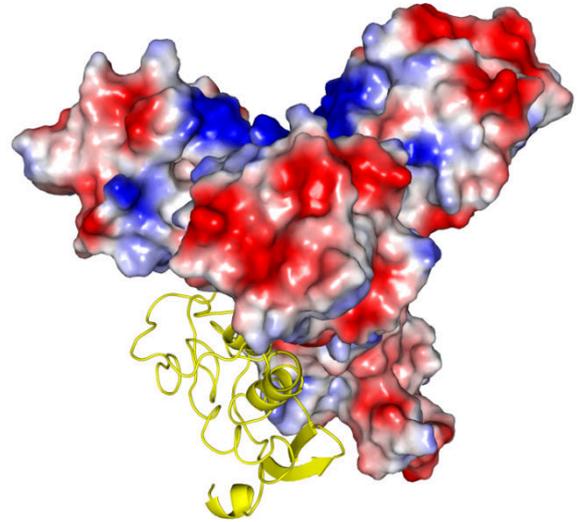
2



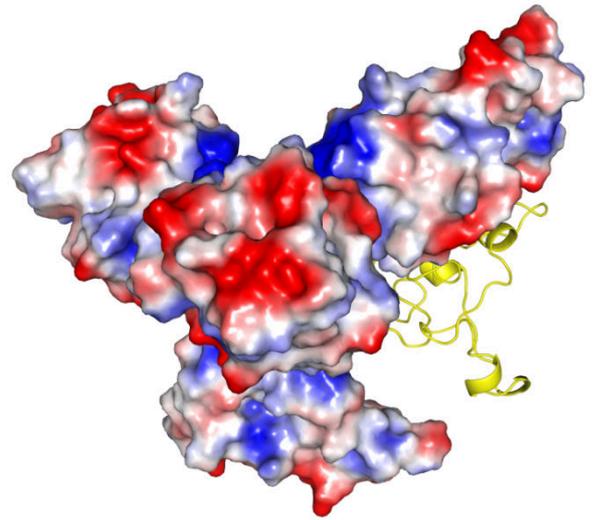
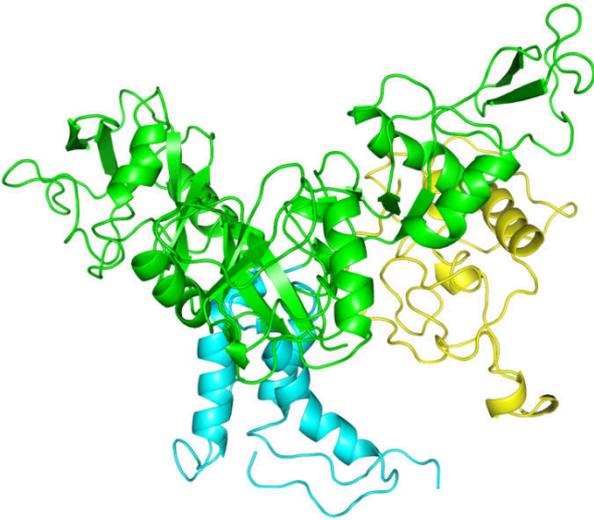
3

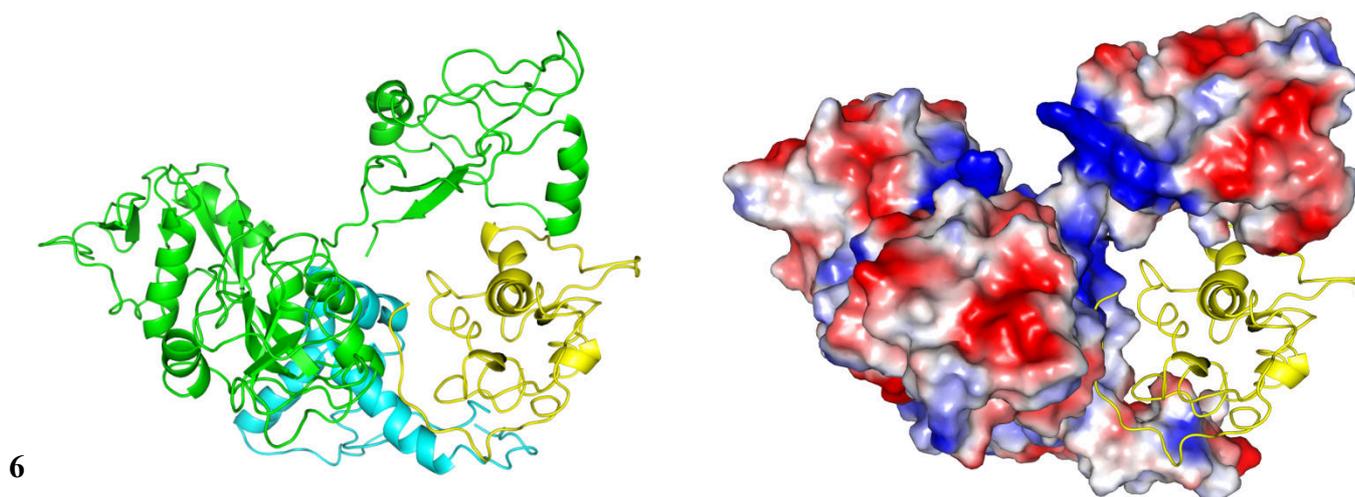


4



5



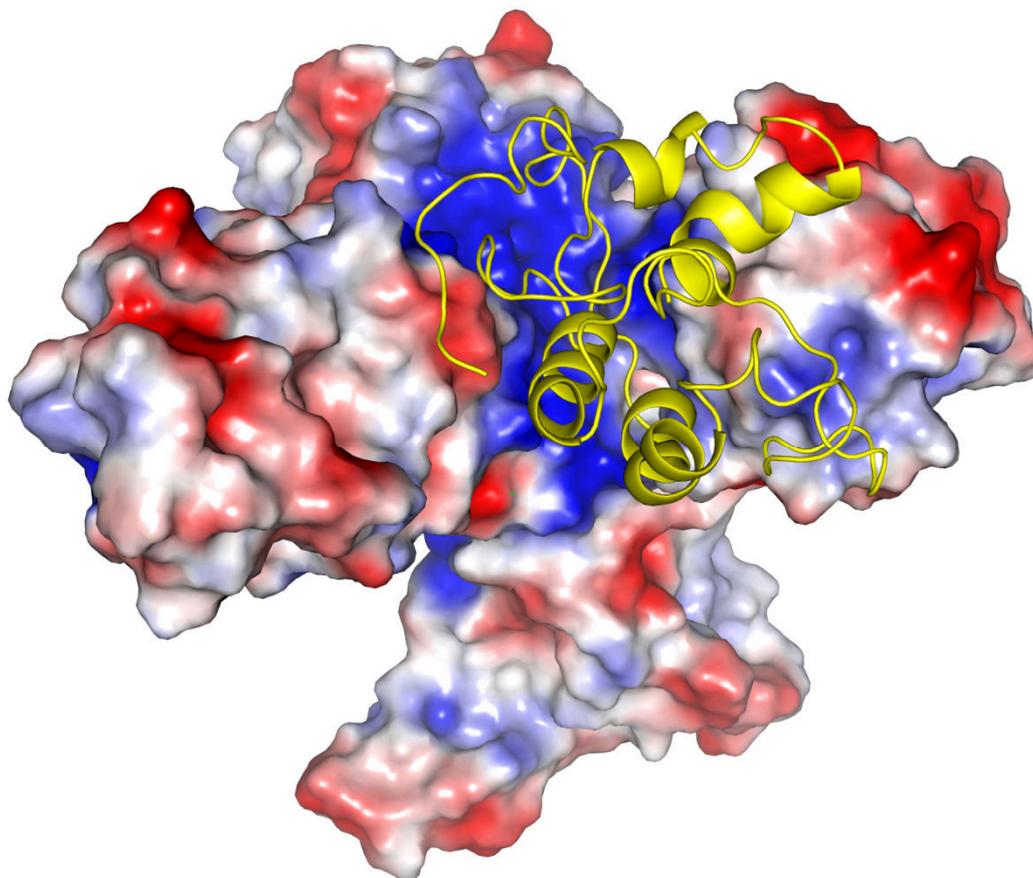


#### 4.1.1. Complexo 1

A teoria mais consistente é que a interação entre as PLA<sub>2</sub> ácidas e a PLI $\alpha$  deva ocorrer pelo poro central (Santos-Filho, 2011) (figura 10). O primeiro complexo analisado foi escolhido considerando o poro central como local de interação e as quantidades de interações entre receptor e ligante (figuras 11 e 12) (tabela 2).



**Figura 11.** Representação em *cartoon* do complexo PLA<sub>2</sub> ácida(Amarelo)/PLI $\alpha$ (Verde). Complexo 1.



**Figura 12.** Representação da superfície eletrostática da PLI $\alpha$  e a PLA $_2$  ácida em *cartoon* amarelo. A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul.

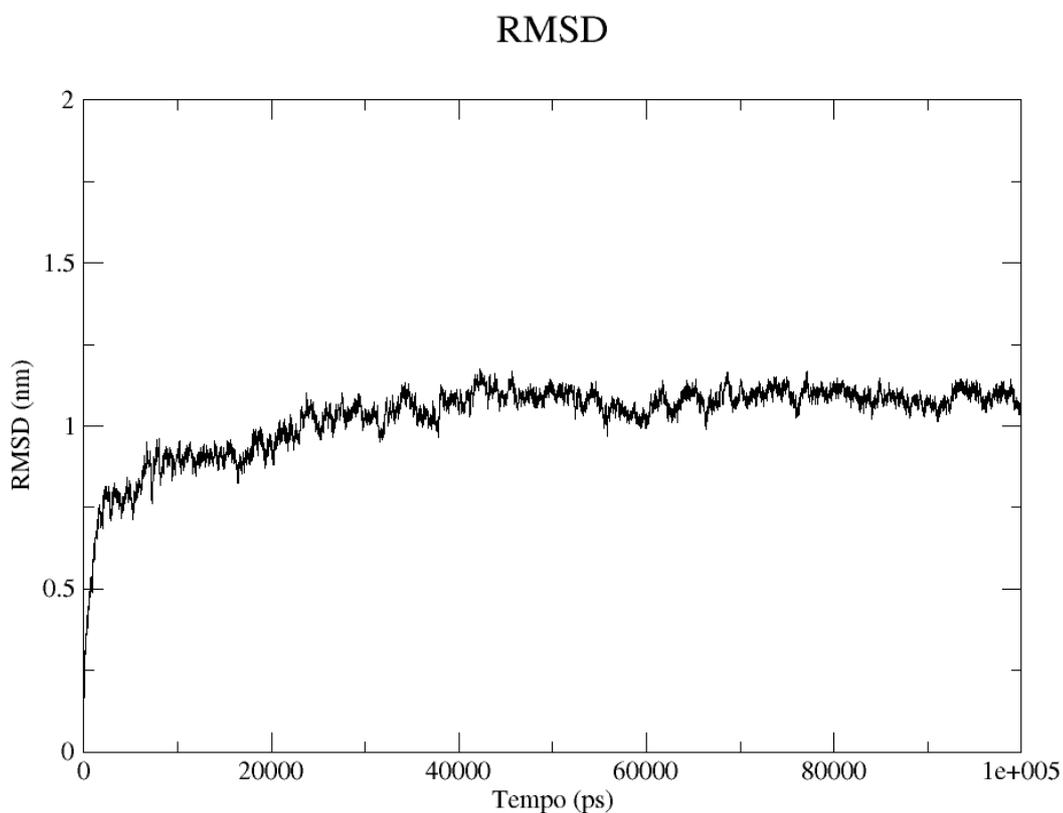
**Tabela 2.** Ligações de hidrogênio entre cadeias principais e cadeias laterais, estas estão localizadas mais externamente, do complexo PLI $\alpha$ /PLA $_2$ . As cadeias A, B e C são referentes as cadeias do PLI $\alpha$  e a cadeia D ao monômero da PLA $_2$ . Dados gerados pelo servidor *online* PIC (Tina *et al.*, 2007). Dados do complexo 1.

RECEPTOR				LIGANTE				DISTÂNCIA(Å)
POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	
88	C	GLU	N	36	D	GLN	NE2	2,88
88	C	GLU	N	131	D	GLU	OE1	3,35
20	D	LEU	N	91	A	ASN	ND2	2,88
21	D	GLN	N	91	A	ASN	ND2	3,41
36	D	GLN	NE2	87	C	LEU	O	1,35
36	D	GLN	NE2	87	C	LEU	O	1,35
36	D	GLN	OE1	87	C	LEU	O	2,77
36	D	GLN	OE1	87	C	LEU	O	2,77
36	D	GLN	NE2	88	C	GLU	O	3,29
36	D	GLN	NE2	88	C	GLU	O	3,29
43	D	ARG	NH1	36	C	LYS	O	3,50
43	D	ARG	NH1	36	C	LYS	O	3,50
131	D	GLU	OE1	87	C	LEU	O	2,24
131	D	GLU	OE1	87	C	LEU	O	2,24

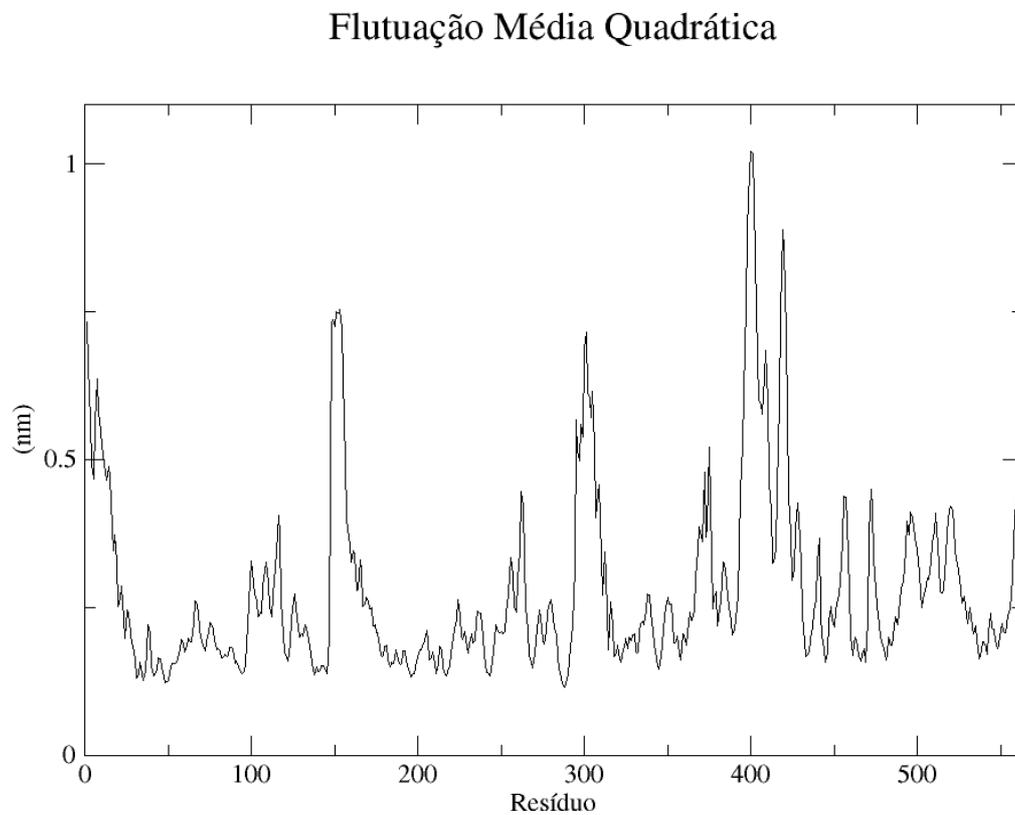
Após a simulação de dinâmica molecular utilizando o complexo 1, pode-se observar uma mudança da quantidade de regiões de interação entre as proteínas (tabela 3). Comparando as estruturas antes e depois da dinâmica molecular, podemos um ganho de interações entre as moléculas, além do posicionamento da fosfolipase, que após a dinâmica molecular, se aproximou do inibidor, fortalecendo as interações (tabela 3). Ao analisar o complexo ao longo da dinâmica, pode-se observar uma estabilidade do complexo por ferramentas como a análise do gráfico de rmsd, desvio médio quadrático, calculado utilizando o posicionamento da cadeia principal do complexo antes e após a dinâmica molecular, além do alinhamento entre os dois sistemas (figura 13) e a flutuação média de cada resíduo (figura 14).

**Tabela 3.** Ligações de hidrogênio entre cadeias principais e cadeias laterais do complexo PLI $\alpha$ /PLA $_2$ . As cadeias A,B e C são referentes as cadeias do PLI $\alpha$  e a cadeia D ao monômero da PLA $_2$ . Dados gerados pelo servidor PIC (Tina *et al.*, 2007). Dados do complexo 1 após a simulação de dinâmica molecular.

RECEPTOR				LIGANTE				DISTÂNCIA(Å)
POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	
54	A	ILE	N	4	D	GLN	OE1	2,99
55	A	LYS	NZ	1	D	SER	O	3,34
91	A	ASN	ND2	18	D	VAL	O	3,37
91	A	ASN	ND2	18	D	VAL	O	3,37
91	A	ASN	OD1	18	D	VAL	O	3,39
91	A	ASN	OD1	18	D	VAL	O	3,39
91	A	ASN	N	20	D	GLN	OE1	2,75
92	A	LYS	N	20	D	GLN	OE1	3,26
33	C	THR	N	101	D	ASP	OD1	2,74
33	C	THR	N	107	D	TYR	OH	3,31
34	C	VAL	N	107	D	TYR	OH	2,97
51	C	ASN	ND2	37	B	ALA	O	3,09
51	C	ASN	ND2	37	B	ALA	O	3,09
89	C	ARG	NE	117	D	GLU	O	2,94
89	C	ARG	NH2	117	D	GLU	O	3,03
89	C	ARG	NH2	117	D	GLU	O	3,03
4	D	GLN	NE2	52	A	LYS	O	2,70
4	D	GLN	NE2	52	A	LYS	O	2,70
20	D	GLN	N	91	A	ASN	OD1	2,65
97	D	ARG	NE	62	A	GLN	O	3,24
97	D	ARG	NH1	62	A	GLN	O	2,88
97	D	ARG	NH1	62	A	GLN	O	2,88
101	D	ASP	OD1	31	C	PHE	O	3,32
101	D	ASP	OD1	31	C	PHE	O	3,32
102	D	THR	OG1	31	C	ALA	O	3,36



**Figura 13.** Gráfico representando o rmsd do complexo 1 ao longo da dinâmica molecular de 100ns.



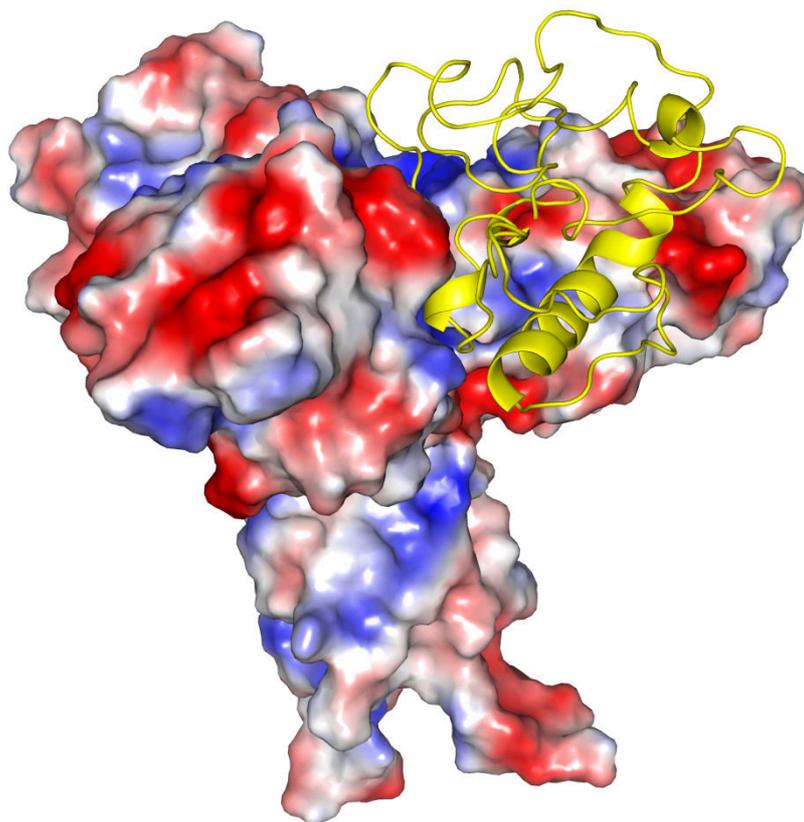
**Figura 14.** Gráfico representando a flutuação média quadrática de cada resíduo do complexo 1 ao longo da dinâmica molecular de 100ns. A contagem dos resíduos é seqüencial, sendo os resíduos de 1 a 147 cadeia A, 148 a 294 cadeia B e 295 a 441 a cadeia C do inibidor tipo alfa, e os resíduos de 442 a 563 são referentes a fosfolipase.

#### 4.1.2. Complexo 2

Analisando a teoria do poro central, podemos evidenciá-la analisando os resultados dos experimentos de *docking* que convergiram para essa região. Abaixo está representado o complexo 2 com suas ligações de hidrogênio (tabela 4) e posicionamento da PLA<sub>2</sub>ácida (figuras 15 e 16).



**Figura 15.** Representação em *cartoon* do complexo PLA<sub>2</sub>ácida (Amarelo)/PLI $\alpha$ (Verde). Complexo 2.



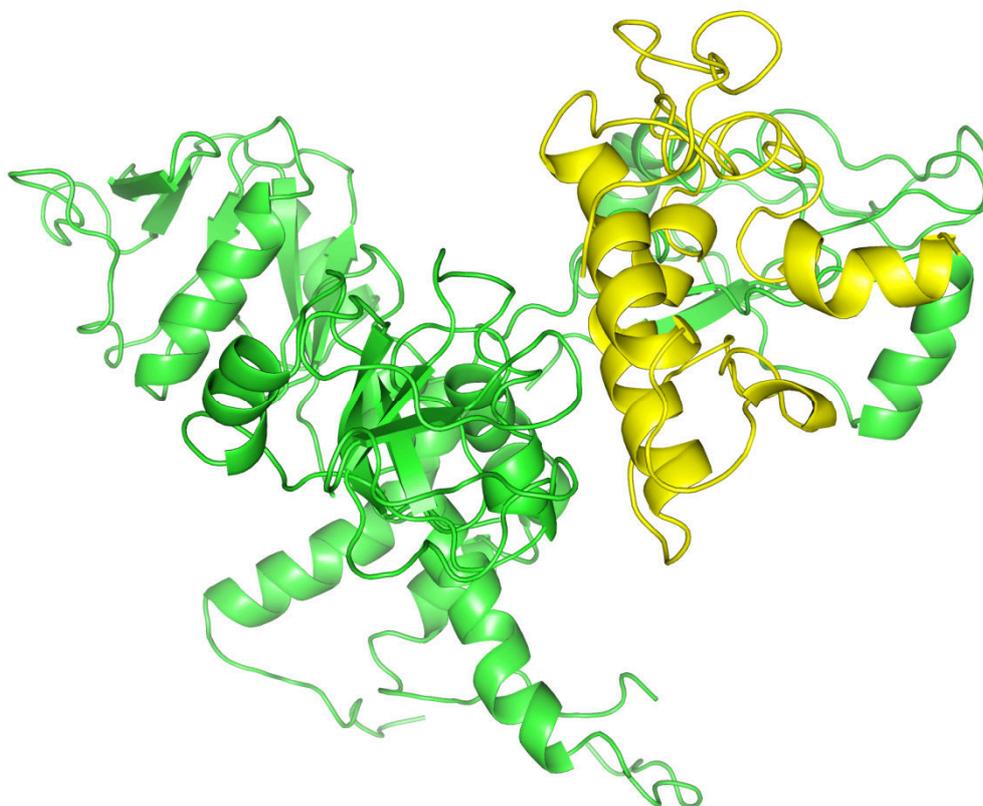
**Figura 16.** Representação da superfície eletrostática da PLI $\alpha$  e a PLA $_2$  ácida em *cartoon* amarelo. A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul.

**Tabela 4.** Ligações de hidrogênio entre cadeias principais e cadeias laterais, estas estão localizadas mais externamente, do complexo PLI $\alpha$ /PLA $_2$ . As cadeias A,B e C são referentes as cadeias do PLI $\alpha$  e a cadeia D ao monômero da PLA $_2$ . Dados gerados pelo servidor *online* PIC (Tina *et al.*, 2007).

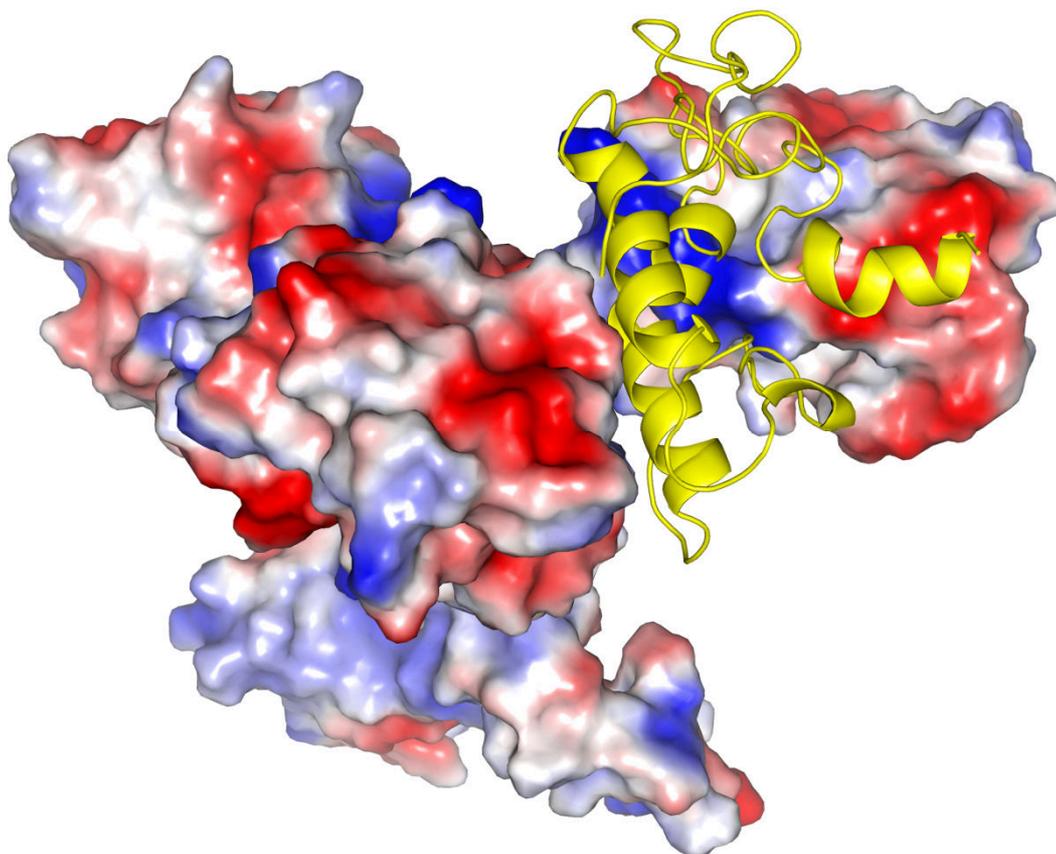
RECEPTOR				LIGANTE				DISTÂNCIA(Å)
POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	
42	B	ASN	ND2	50	D	CYS	O	3,02
42	B	ASN	ND2	50	D	CYS	O	3,02
44	B	SER	OG	57	D	LYS	O	2,42
85	B	ASN	ND2	52	D	TYR	O	3,39
85	B	ASN	ND2	52	D	TYR	O	3,39
85	B	ASN	OD1	52	D	TYR	O	3,17
85	B	ASN	OD1	52	D	TYR	O	3,17
53	C	GLU	OE2	43	D	ARG	O	2,77
53	C	GLU	OE2	43	D	ARG	O	2,77
56	C	ASN	ND2	100	D	ARG	O	3,28
56	C	ASN	ND2	100	D	ARG	O	3,28
91	C	ASN	ND2	40	D	ALA	O	3,09
91	C	ASN	ND2	40	D	ALA	O	3,09
136	C	ASN	OD1	101	D	VAL	O	3,13
136	C	ASN	OD1	101	D	VAL	O	3,13
46	D	PHE	N	53	C	GLU	OE2	3,39
47	D	VAL	N	53	C	GLU	OE1	2,90
53	D	GLY	N	85	B	ASN	OD1	2,53

### 4.1.3. Complexo 3

Ainda analisando a teoria do poro central, observamos que alguns *clusters* apontaram a região do poro central como local de interação, além de uma expansão do poro positivo devido a movimentação dos resíduos que o formam. Abaixo está representado o complexo 3 que foi selecionado como representativo dos clusters que apontavam o poro expandido (figuras 17 e 18). As suas ligações de hidrogênio estão demonstradas na tabela 5.



**Figura 17.** Representação em *cartoon* do complexo PLA<sub>2</sub> (Amarelo)/PLI $\alpha$  (Verde). Complexo 3.



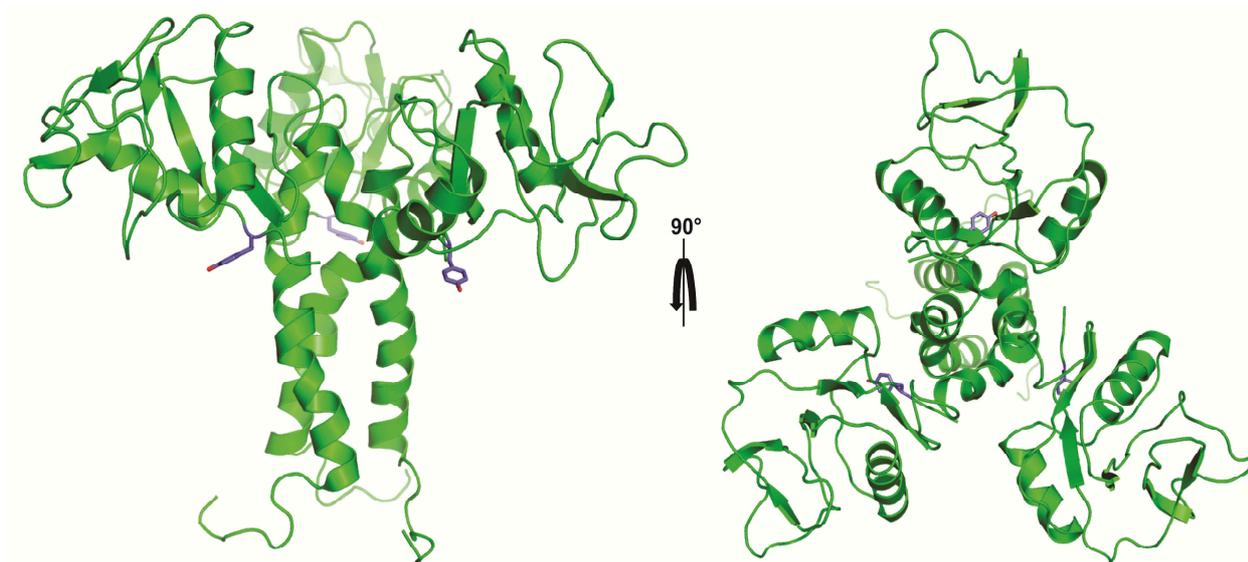
**Figura 18.** Representação da superfície eletrostática da PLI $\alpha$  e a PLA $_2$  ácida em *cartoon* amarelo. A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul.

**Tabela 5.** Ligações de hidrogênio entre cadeias principais e cadeias laterais, estas estão localizadas mais externamente, do complexo PLI $\alpha$ /PLA $_2$ ácida. As cadeias A, B e C são referentes as cadeias do PLI $\alpha$  e a cadeia D ao monômero da PLA $_2$ . Dados gerados pelo servidor *online* PIC (Tina *et al.*, 2007)

RECEPTOR				LIGANTE				DISTÂNCIA(Å)
POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	
126	B	GLY	N	51	D	CYS	SG	3,84
51	D	CYS	SG	125	B	HIS	O	2,90
59	D	THR	OG1	107	B	TRP	O	3,36
100	D	ARG	NH1	81	B	LYS	O	3,40
100	D	ARG	NH1	81	B	LYS	O	3,40

Seguindo a literatura que aponta diferentes locais de interação entre o receptor e o ligante (tabela 1), Okumura 2005 aponta que os resíduos tirosina144 das PLI $\alpha$  (figura 19) seriam importantes para a interação com as PLA $_2$  ácidas, pois quando no trabalho citado realizou-se uma mutação sítio dirigida ao resíduo, a proteína não conseguiu se ligar ao alvo. Não podemos desconsiderar o fato de que essa mudança de afinidade pode ocorrer pela reorganização

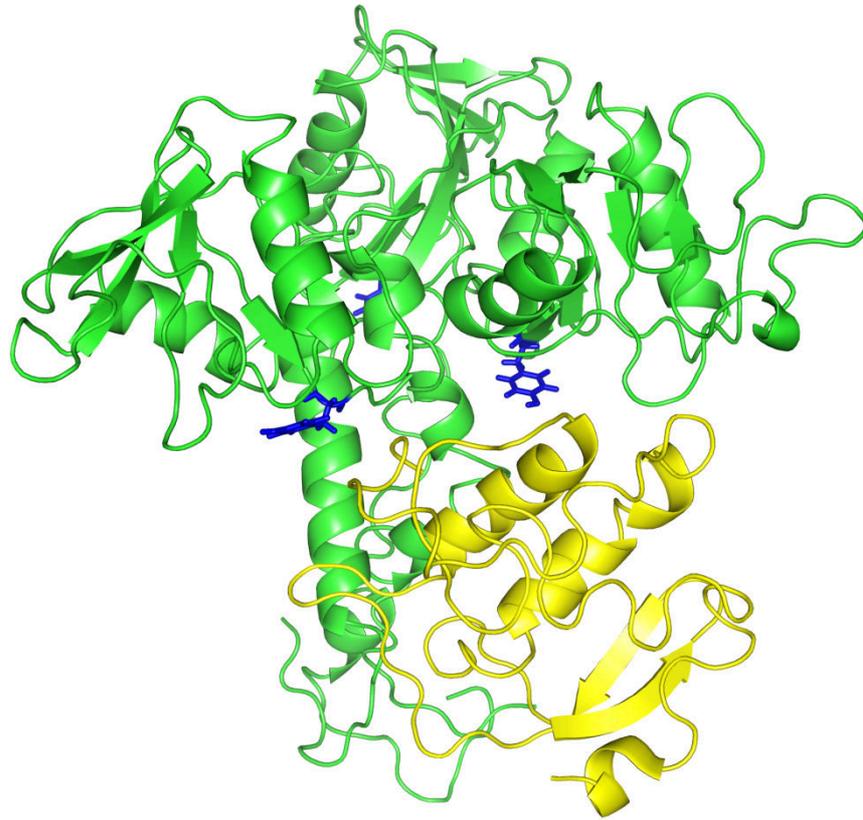
conformacional da região devido a troca do resíduo, e não especificamente que o citado resíduo participa da interação e a mudança da afinidade química do local.



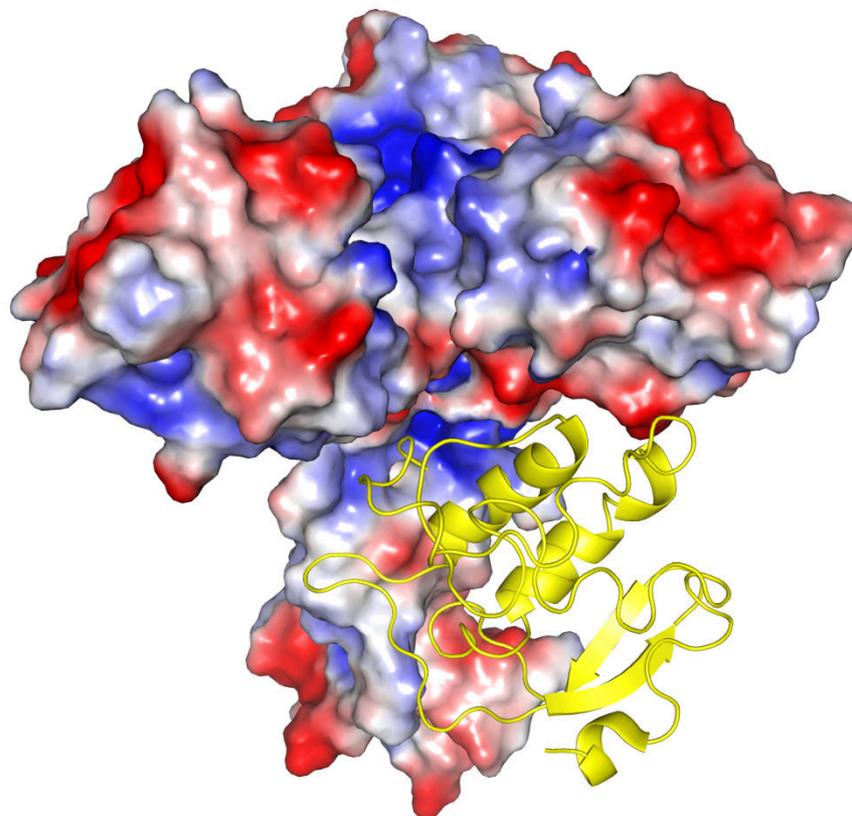
**Figura 19.** Representação em *cartoon* da PLI $\alpha$  e em *sticks* roxos cada um dos Y-144 de cada cadeia.

#### 4.1.4. Complexo 4

Analisando os resultados de *docking* que apontaram uma região hidrofóbica, alfa hélices localizadas no N-terminal, resíduos de 1 a 37, da PLI $\alpha$  como local de interação, pode-se observar que a maioria das soluções continha o resíduo Y-144 na interface de interação. Abaixo está representado o resultado que obteve a melhor combinação entre os valores de energia, ligações de hidrogênio (tabela 6), posicionamento da PLA<sub>2</sub> ácida (figuras 20), e posicionamento da PLA<sub>2</sub> ácida na superfície eletrostática do PLI $\alpha$  (figura 21).



**Figura 20.** Representação em *cartoon* do complexo PLA<sub>2</sub> ácida(Amarelo)/PLIα(Verde). Em *sticks* azul estão representados os resíduos Y-144 de cada cadeia da PLIα. Complexo 4.



**Figura 21.** Representação da interação entre a PLA<sub>2</sub> ácida em amarelo e a representação da superfície eletrostática da PLIα. A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul.

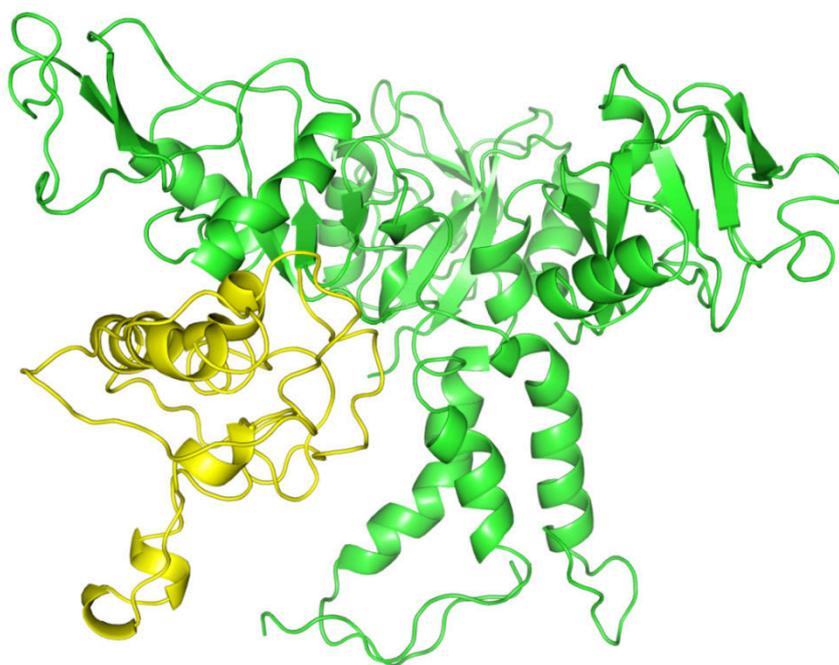
**Tabela 6.** Ligações de hidrogênio entre cadeias principais e cadeias laterais, estas estão localizadas mais externamente, do complexo PLI $\alpha$ /PLA $_2$  ácida. As cadeias A,B e C são referentes as cadeias do PLI $\alpha$  e a cadeia D ao monômero da PLA $_2$ . Dados gerados pelo servidor *online* PIC (Tina *et al.*, 2007).

RECEPTOR				LIGANTE				DISTÂNCIA(Å)
POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	
100	B	ASP	OD1	108	D	ASP	O	2,73
100	B	ASP	OD1	108	D	ASP	O	2,73
36	D	GLN	OE1	45	A	GLU	O	3,30
36	D	GLN	OE1	45	A	GLU	O	3,30
109	D	ASN	OD1	99	B	GLY	O	2,51
109	D	ASN	OD1	99	B	GLY	O	2,51
129	D	LYS	NZ	45	A	GLU	O	2,79

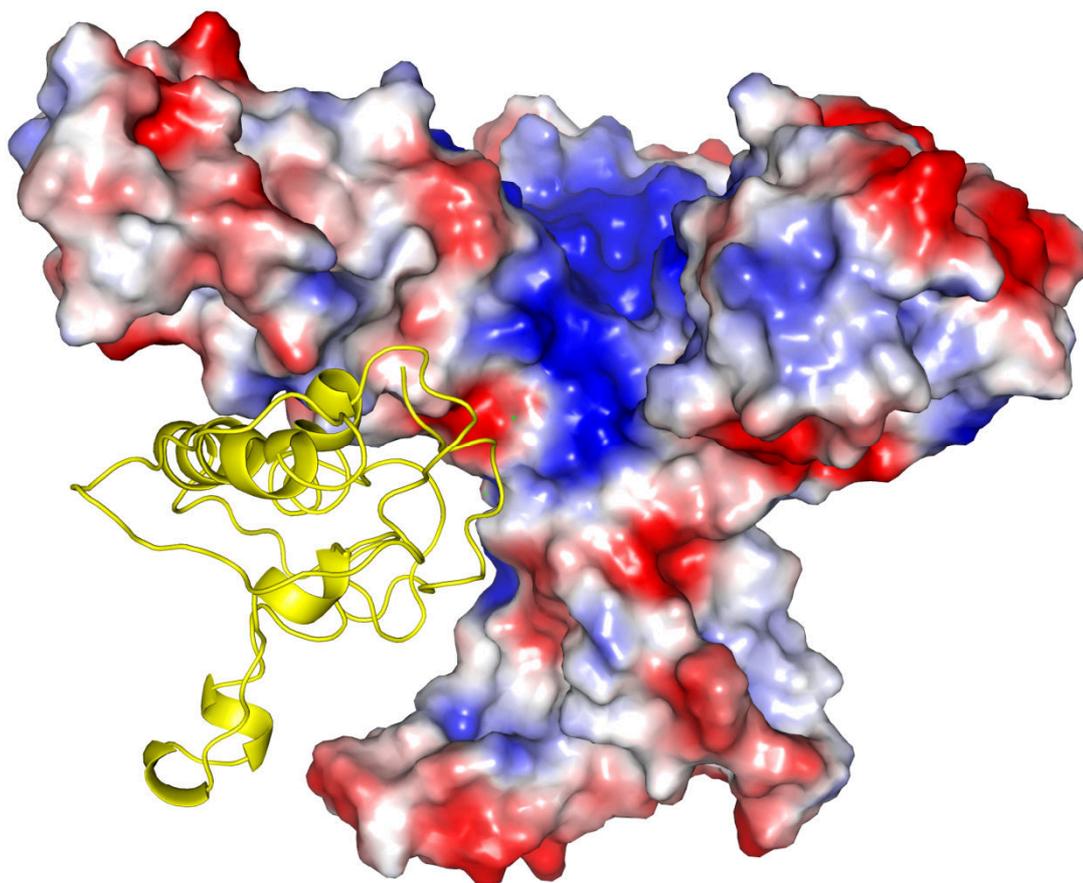
#### 4.1.5. Complexo 5

Continuando com as análises utilizando as estruturas onde a PLA $_2$  ácida ficou posicionada na porção N-terminal do inibidor, alfa hélices, podemos observar um grupo de resultados, complexos 5 e 6, que apontaram uma mudança conformacional nas alfas hélices, onde ela, agora, interage com a proteína, aumentando as interações com a região de contato (tabela 7).

Abaixo estão representados os resultados sobre o complexo 5 (figuras 22 e 23 e tabela 7).



**Figura 22.** Representação em *cartoon* do complexo PLA $_2$  ácida (Amarelo)/PLI $\alpha$ (Verde). Complexo 5



**Figura 23.** Representação da interação entre a superfície eletrostática da PLI $\alpha$  e a PLA $_2$  ácida (Amarelo). A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul.

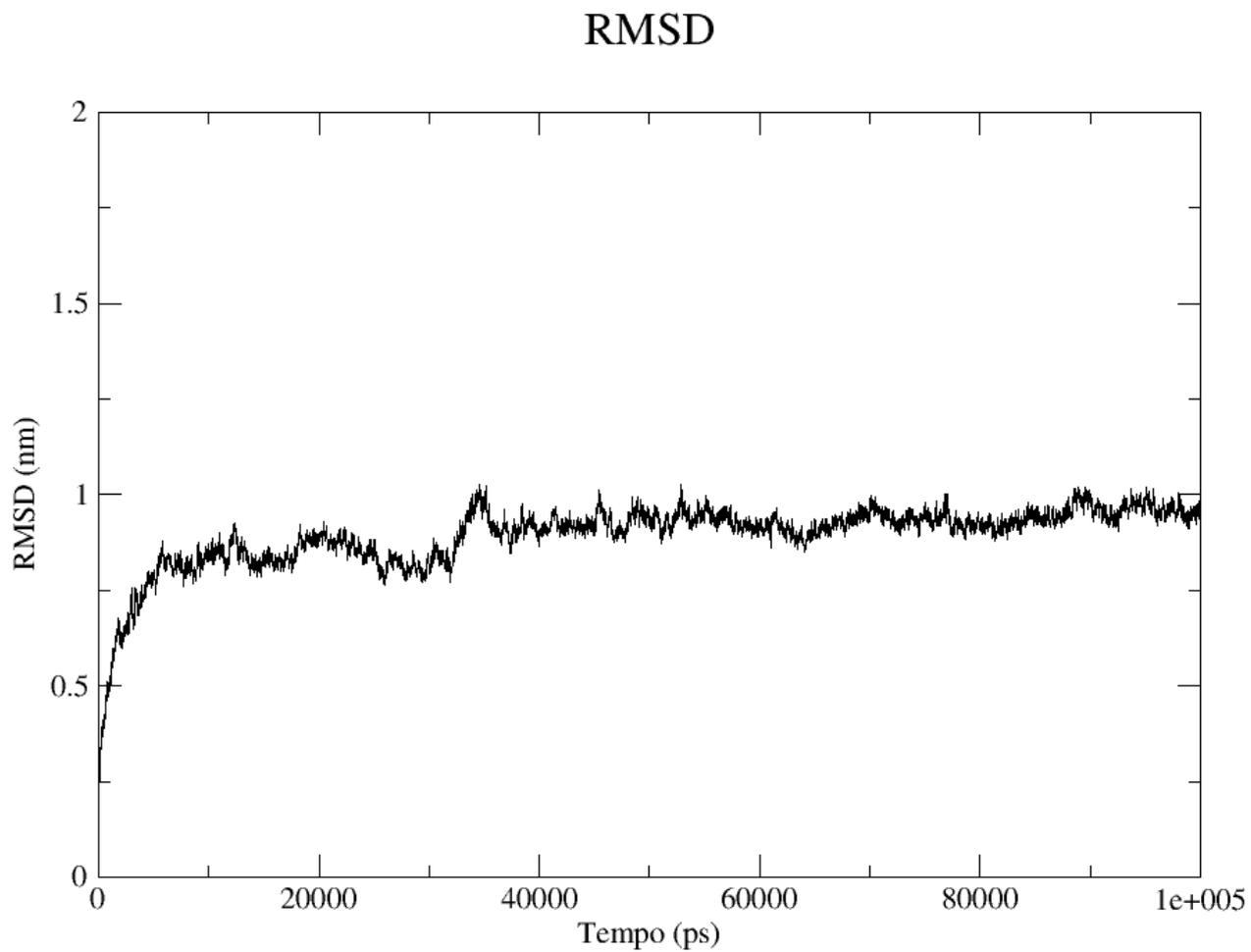
**Tabela 7.** Ligações de hidrogênio entre a PLI $\alpha$ , cadeias A, B e C, e a PLA $_2$  ácida, D, do complexo 5. Dados gerados pelo servidor *online* PIC (Tina *et al.*, 2007).

RECEPTOR				LIGANTE				
POSICÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	POSICÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	DISTÂNCIA(Å)
77	C	GLU	OE2	50	D	CYS	O	2,52
77	C	GLU	OE2	50	D	CYS	O	2,52
144	C	TYR	OH	39	D	ASP	O	3,27
50	D	CYS	SG	78	C	ASN	O	3,28
51	D	CYS	N	77	C	GLU	OE2	3,27
127	D	GLN	NE2	22	B	ARG	O	2,90
127	D	GLN	NE2	22	B	ARG	O	2,90
127	D	GLN	OE1	22	B	ARG	O	2,74
127	D	GLN	OE1	22	B	ARG	O	2,74

Após as análises da dinâmica molecular utilizando o complexo 5 pode-se observar uma maior interação entre as proteínas. Tal fato pode ser observado pelo aumento da quantidade de ligações de hidrogênio (tabela 8) e a mudança de posição da fosfolipase em comparação ao inibidor. O gráfico de rmsd entre as cadeias principais demonstra a estabilidade do complexo ao longo da dinâmica (figura 24).

**Tabela 8.** Ligações de hidrogênio entre a PLI $\alpha$ , cadeias A, B e C, e a PLA $_2$  ácida, D, do complexo 5 após a dinâmica molecular. Dados gerados pelo servidor *online* PIC (Tina *et al.*, 2007).

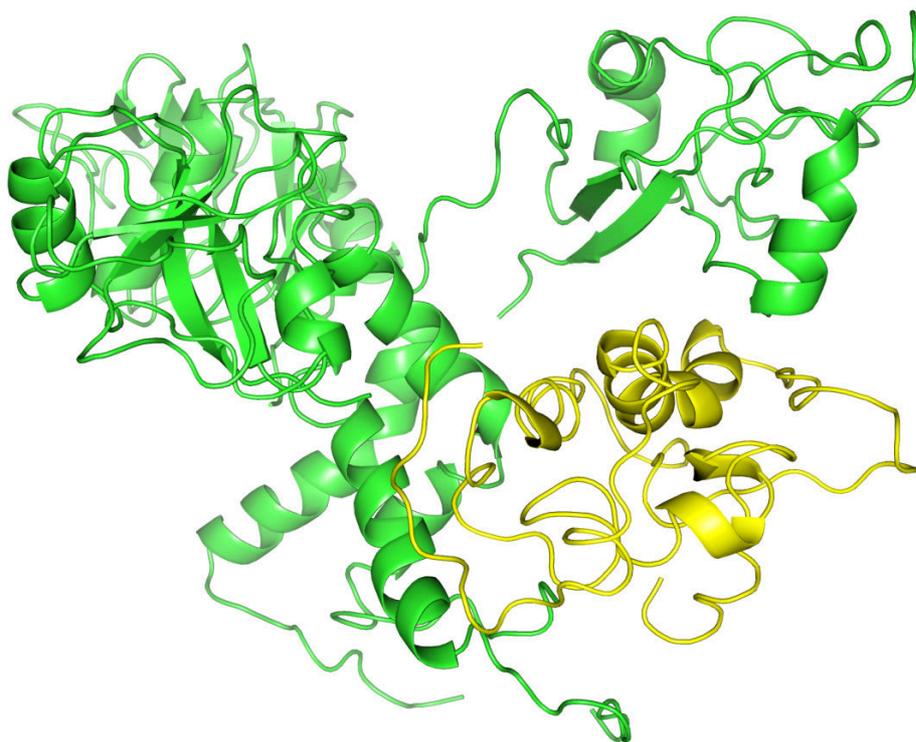
RECEPTOR				LIGANTE				DISTÂNCIA
POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	
28	B	ARG	NE	109	D	PHE	O	3.27
28	B	ARG	NH2	109	D	PHE	O	2.75
28	B	ARG	NH2	109	D	PHE	O	2.75
28	B	ARG	NE	112	D	TYR	O	3.21
28	B	ARG	NE	111	D	GLY	O	3.20
44	C	SER	N	120	D	GLU	OE2	3.12
45	C	GLU	N	120	D	GLU	OE2	2.93
46	C	ARG	N	120	D	GLU	OE2	3.47
46	C	ARG	NH1	120	D	GLU	O	3.05
6	C	ARG	NH1	120	D	GLU	O	3.05
6	C	ARG	NH1	121	D	PRO	O	2.94
46	C	ARG	NH1	121	D	PRO	O	2.94
45	C	GLN	OE1	121	D	PRO	O	3.39
45	C	GLN	OE1	121	D	PRO	O	3.39
79	C	GLN	NE2	122	D	PRO	O	3.41
79	C	GLN	NE2	121	D	PRO	O	3.41
114	D	ASN	ND2	22	B	ARG	O	3.23
114	D	ASN	ND2	22	B	ARG	O	3.23
116	D	GLN	OE1	22	B	ARG	O	3.18
116	D	GLN	OE1	22	B	ARG	O	3.18



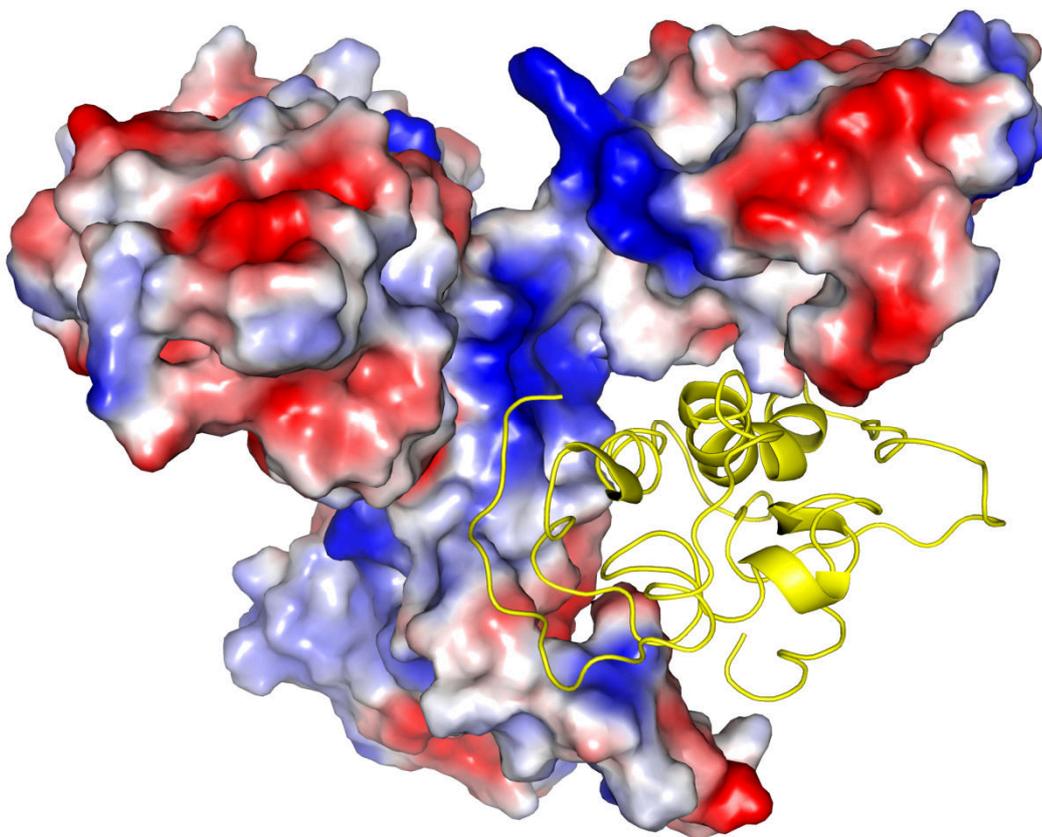
**Figura 24.** Gráfico representando o rmsd do complexo 5 ao longo da dinâmica molecular de 100ns.

#### **4.1.6. Complexo 6**

Abaixo estão representados os resultados sobre o complexo 6 (figuras 25 e 26 e tabela 9).



**Figura 25.** Representação em *cartoon* do complexo PLA<sub>2</sub>ácida (Amarelo)/PLI $\alpha$ (Verde). Complexo 6.



**Figura 26.** Interação da PLA<sub>2</sub> ácida, *cartoon* amarelo, com a superfície eletrostática do trímero da PLI $\alpha$  do complexo 6. A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul.

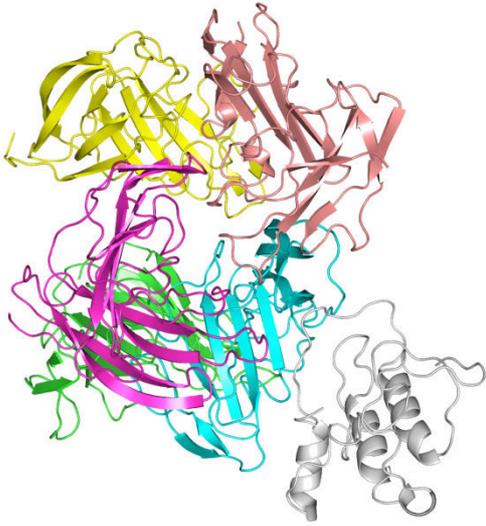
**Tabela 9.** Ligações de hidrogênio entre a PLI $\alpha$ , cadeias A, B e C, e a PLA $_2$  ácida, D, do complexo 6. Dados gerados pelo servidor *online* PIC (Tina *et al.*, 2007).

RECEPTOR				LIGANTE				DISTÂNCIA(Å)
POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	
12	A	SER	N	34	D	GLN	OE1	3,40
2	B	GLU	OE2	33	D	GLY	O	2,87
2	B	GLU	OE2	33	D	GLY	O	2,87
70	C	HIS	ND1	90	D	PRO	O	3,00
70	C	HIS	NE2	90	D	PRO	O	3,40
100	D	ARG	NH1	66	C	GLN	O	2,97
100	D	ARG	NH1	66	C	GLN	O	2,97

#### 4.2. Crotoxina B, CB/CNF (*Crotalus Neutralization Factor*)

Ao final das análises dos modos normais e seleção das estruturas pelo critério de restrição energética, obtivemos 56 estruturas da CB e 76 estruturas da CNF. A realização dos experimentos de *docking* molecular gerou 42.560 rodadas, com 10 complexos em cada, agrupados em 124 clusters. Filtrando os resultados de *docking* baseado na energia do complexo, ligações de hidrogênio entre receptor/ligante, acomodação do ligante entre outros parâmetros, foram escolhidas 4 soluções como resultados representativos (quadro 2).

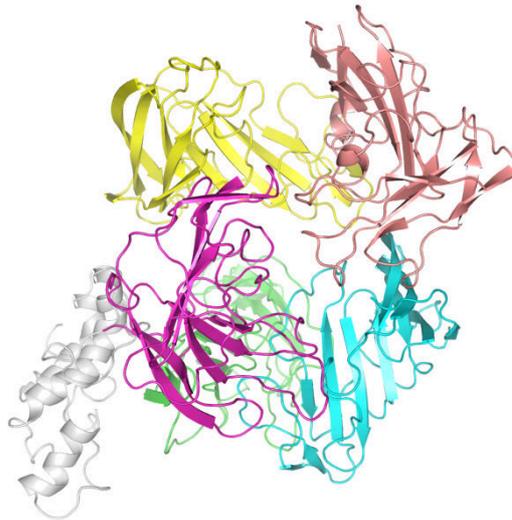
**Quadro 2.** Representação geral dos resultados obtidos e selecionados para representar o complexo CNF/CB. As imagens foram realizadas com a CNF na mesma posição, tal representação foi realizada para facilitar a observação da diferença entre os complexos. CNF representada em *cartoon* verde, roxo, amarelo e azul, a subunidade  $\beta$  em salmão e aCBem *cartoon* cinza.

Complexo	Figura representativa
7	

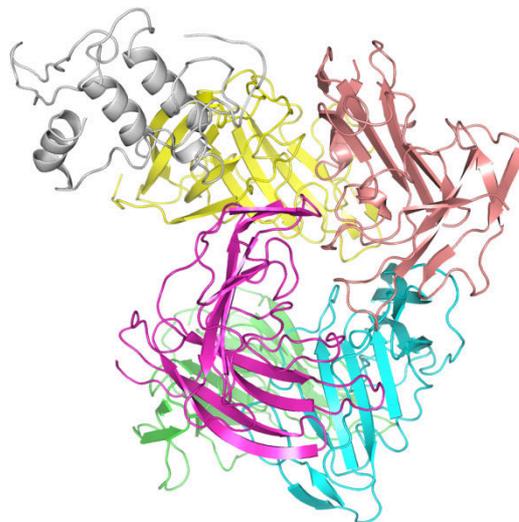
8



9



10

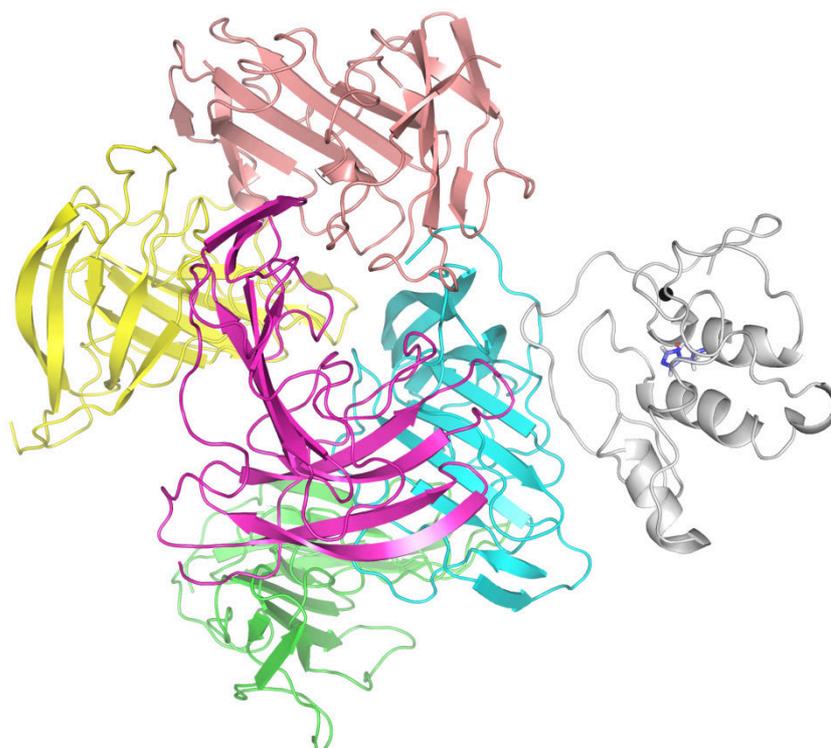


---

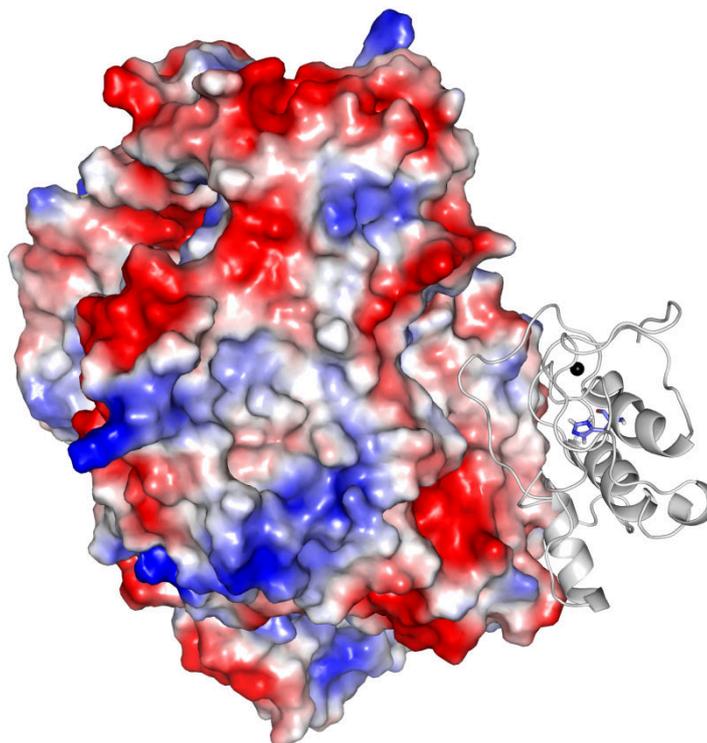
Primeiramente, os resultados com maiores quantidades de ligação de hidrogênio entre receptor e ligante foram selecionados, tais resultados estão representados pelos complexos 7 e 8.

#### 4.2.1. Complexo 7

O primeiro complexo selecionado baseado nas quantidades de ligações de hidrogênio entre as cadeias laterais e principais está representado pelo complexo 7 (figura 27 e 28 e tabela 10).



**Figura 27.** Representação em *cartoon* do complexo 7. Em cinza está representado a CB, em preto o íon de cálcio, em *sticks* azul a H48, resíduo importante da via catalítica das PLA<sub>2</sub>, e em amarelo, verde, roxo, azul e salmão as 4 cadeias do CNF e a subunidade  $\beta$ , respectivamente.



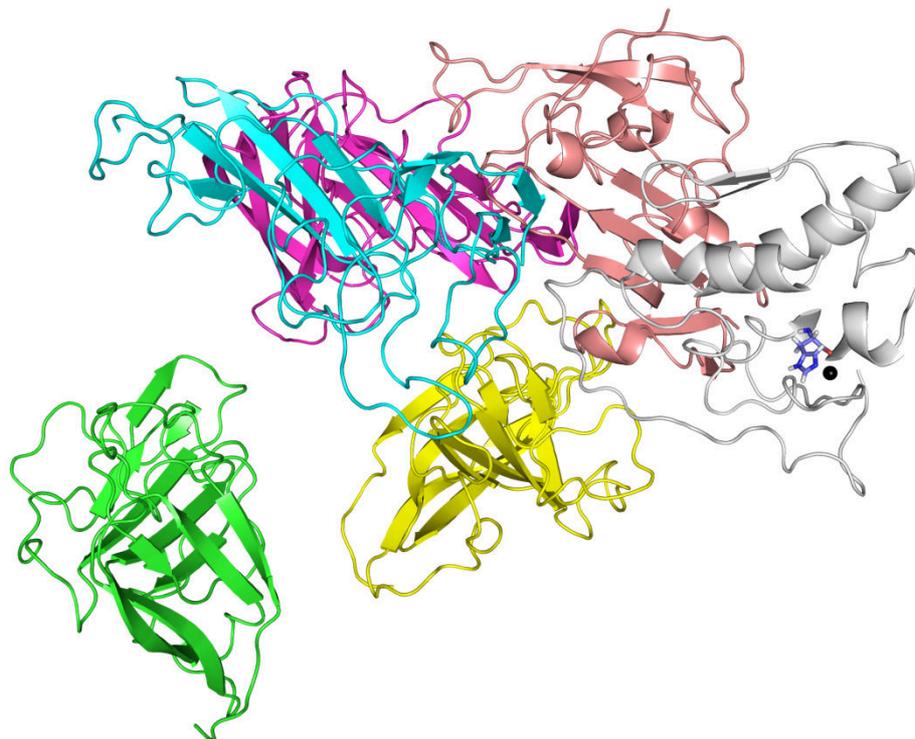
**Figura 28.** Representação da ancoragem da CB na superfície eletrostática da CNF. Em *cartoon* cinza está representado a CB, em preto o íon de cálcio, em *sticks* azul a H48, resíduo importante da via catalítica das PLA<sub>2</sub>. A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul.

**Tabela 10.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias principais e laterais realizadas pela CNF, cadeias de A a E, e a CB, cadeia F. Dados do complexo 7. As análises foram geradas pelo servidor *online* PIC (Tina *et al.*, 2007).

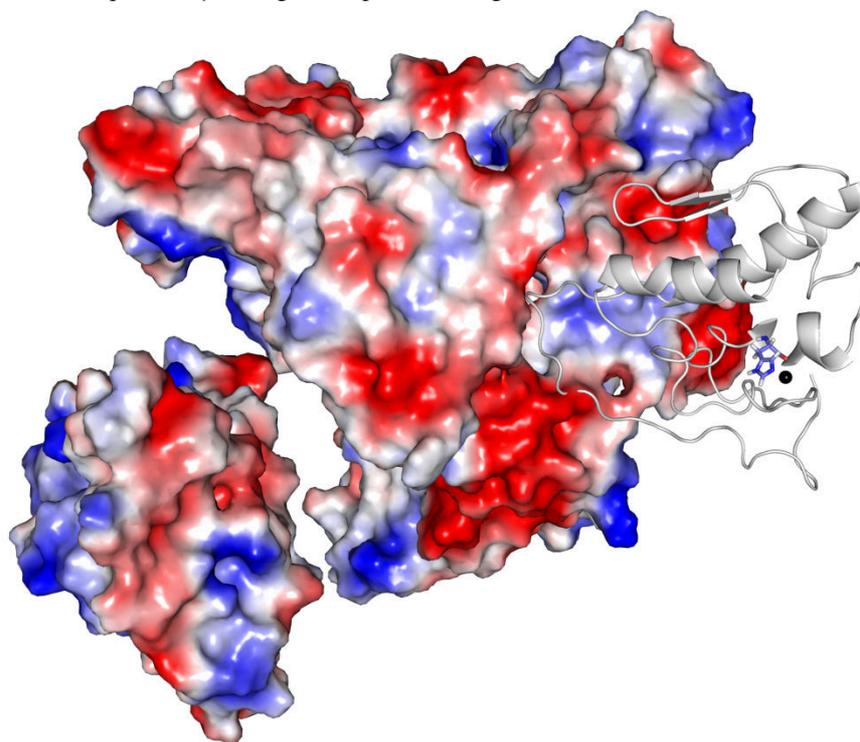
RECEPTOR				LIGANTE				
POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	DISTÂNCIA(Å)
58	F	ASN	ND2	120	B	THR	O	3,48
58	F	ASN	ND2	120	B	THR	O	3,48
58	F	ASN	ND2	148	B	SER	O	3,23
58	F	ASN	ND2	148	B	SER	O	3,23
62	F	ASP	OD1	148	B	SER	O	2,81
62	F	ASP	OD1	148	B	SER	O	2,81

#### 4.2.2. Complexo 8

O segundo complexo selecionado baseado nas quantidades de ligações de hidrogênio entre as cadeias laterais e principais está representado pelo complexo 8 (figuras 29 e 30 e tabela 11).



**Figura 29.** Representação em *cartoon* do segundo complexo CNF/CB selecionado pelas quantidades de ligações de hidrogênio. As cores das representações seguem o padrão da figura 27.



**Figura 30.** Representação da ancoragem da CB na superfície eletrostática da CNF. Em *cartoon* cinza está representado a CB, em preto o íon de cálcio, em *sticks* azul a H48, resíduo importante da via catalítica das PLA<sub>2</sub>. A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul.

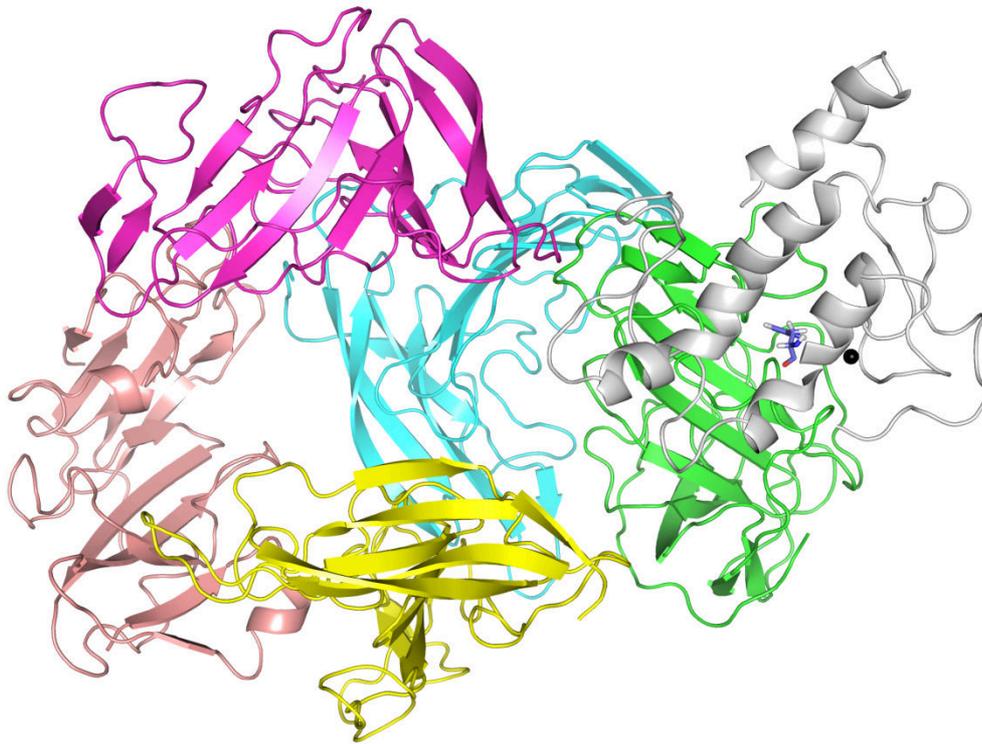
**Tabela 11.** Ligações de hidrogênio entre as cadeias principais e laterais realizadas pela CNF, cadeias de A a E, e a CB, cadeia F. Dados do complexo 8. As análises foram geradas pelo servidor *online* PIC (Tina *et al.*, 2007).

RECEPTOR				LIGANTE				DISTÂNCIA(Å)
POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	POSIÇÃO	CADEIA	RESÍDUO	ÁTOMO	
31	E	THR	N	103	F	TYR	OH	3,13
36	E	MET	N	40	F	THR	OG1	2,65
38	F	ASP	OD2	36	E	MET	O	3,39
38	F	ASP	OD2	36	E	MET	O	3,39
40	F	THR	OG1	35	E	THR	O	3,24
40	F	THR	OG1	36	E	MET	O	2,53
103	F	TYR	OH	30	E	GLU	O	2,55
106	F	GLY	N	18	D	GLU	OE2	3,29
107	F	TYR	N	7	D	HIS	ND1	2,42
107	F	TYR	N	7	D	HIS	NE2	3,22
107	F	TYR	N	18	D	GLU	OE1	2,61

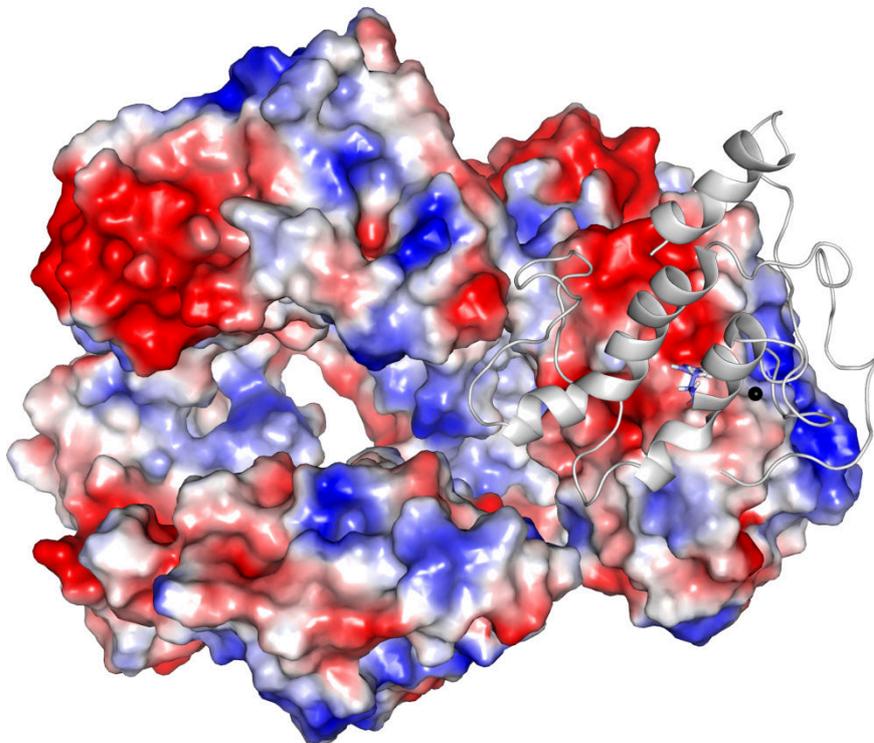
Foram selecionadas duas estruturas em que os monômeros da CNF apresentavam uma maior distância entre si, possibilitando um acesso interno a CB, região onde a PLA<sub>2</sub> realizaria o máximo de interações com a CNF.

#### 4.2.3. Complexo 9

A primeira estrutura selecionada visando escolher complexos em que os monômeros da CNF estavam mais distantes está representada pelo complexo 9 (figura 31 e 32)



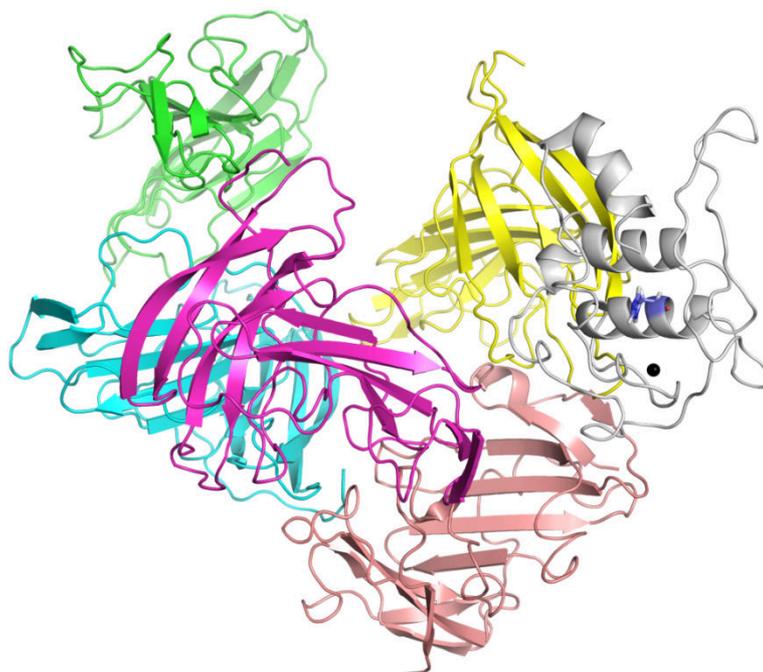
**Figura 31.** Representação em *cartoon* do segundo complexo CNF/CB selecionado pelas quantidades de ligações de hidrogênio. As cores das representações seguem o padrão da figura 27.



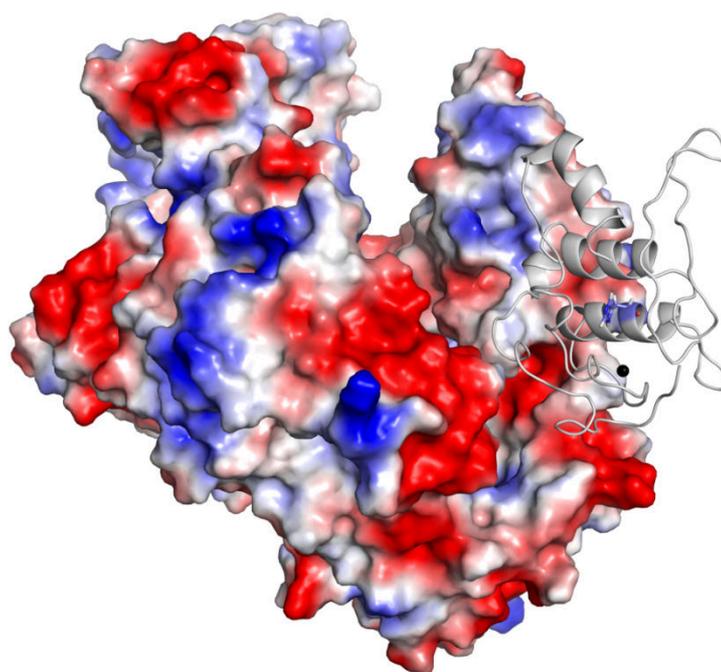
**Figura 32.** Representação da ancoragem da CB na superfície eletrostática da CNF. Em *cartoon* cinza está representado a CB, em preto o íon de cálcio, em *sticks* azul a H48, resíduo importante da via catalítica das PLA<sub>2</sub>. A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul.

#### 4.2.4. Complexo 10

Seguindo a proposta de interação interna da CNF com a CB, outra estrutura foi selecionada e está representada pelo complexo 10 (figuras 33e 34).



**Figura 33.** Representação em *cartoon* do segundo complexo CNF/CB selecionado pelas quantidades de ligações de hidrogênio. As cores das representações seguem o padrão da figura 30.

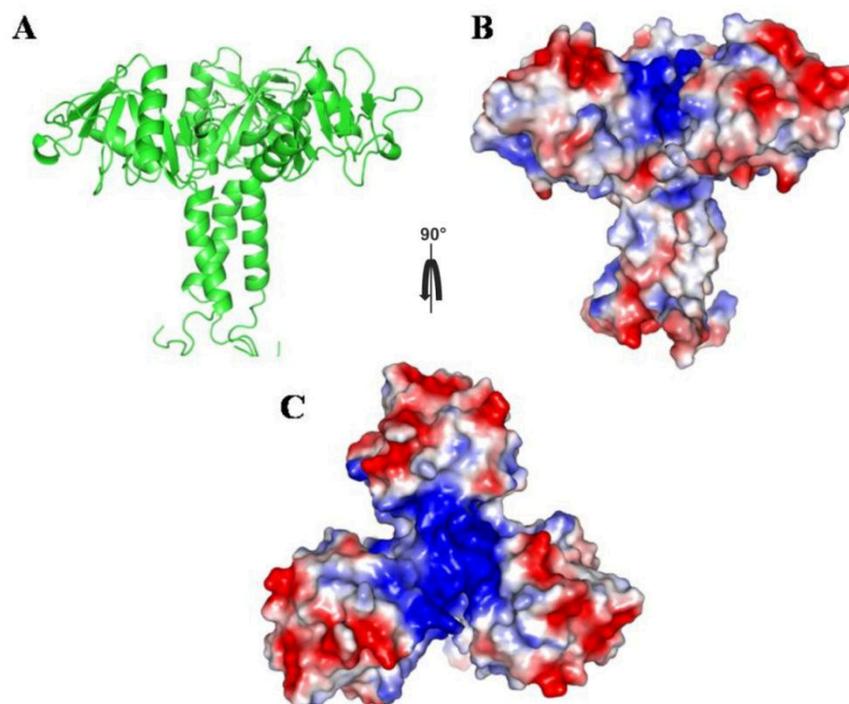


**Figura 34.** Representação da ancoragem da CB na superfície eletrostática da CNF. Em *cartoon* cinza está representado a CB, em preto o íon de cálcio, em *sticks* azul a H48, resíduo importante da via catalítica das PLA<sub>2</sub>. A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul.

### 4.3. Discussão

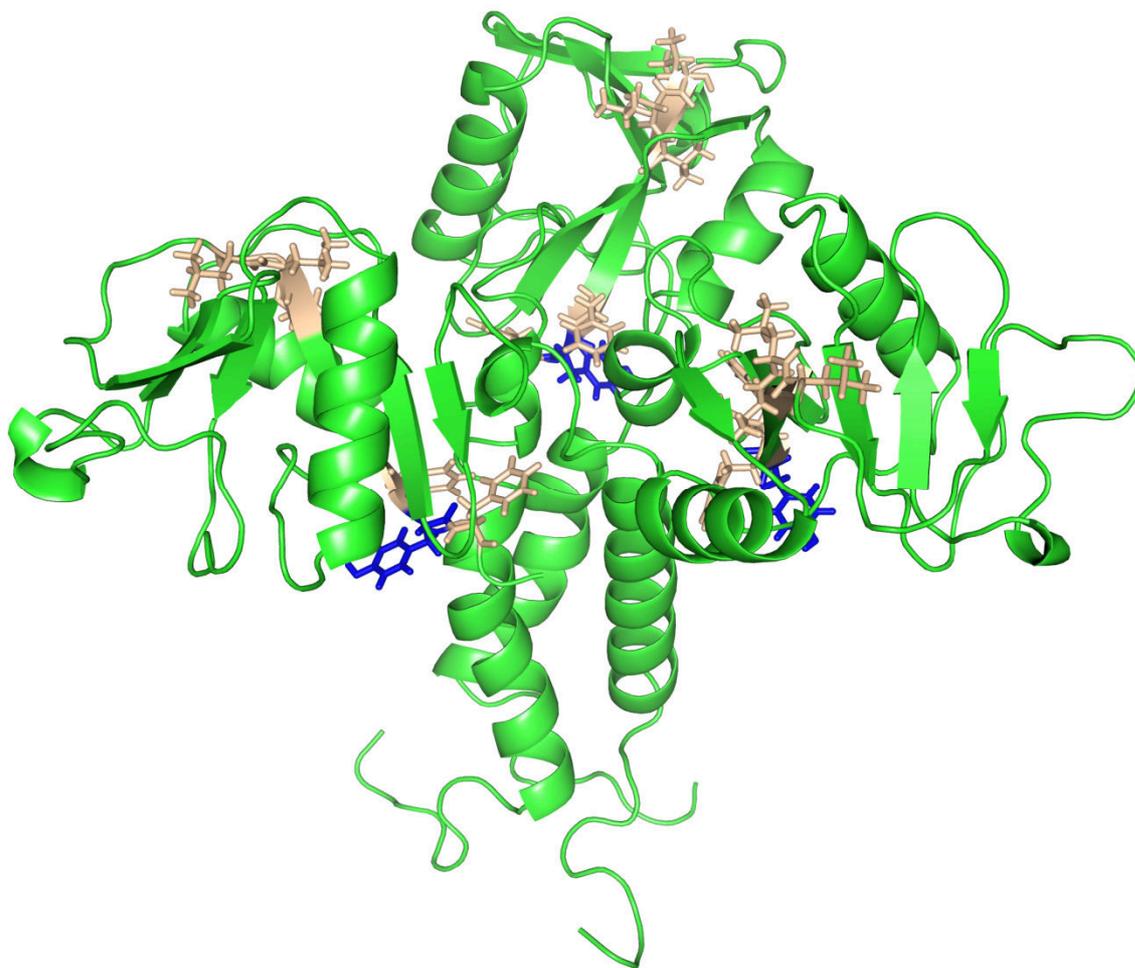
#### 4.3.1. PLA<sub>2</sub>/PLI

Os complexos 1, 2 e 3 apresentaram alta interação da PLA<sub>2</sub> com o poro central do inibidor tipo alfa. Analisando as interações com as superfícies eletrostáticas, pode-se observar também que as PLA<sub>2</sub> ácidas dos complexos 1, 2 e 3 interagiram em uma região mais positiva do inibidor, fato esperado (Santos-Filho *et al.*, 2011) e predominante no poro central (figura 35). Além disso, houve uma reprodutibilidade dos resíduos envolvidos na interação entre as proteínas, resíduos da região Y35 - N91 do inibidor, tendo um ganho ainda maior após a simulação de dinâmica molecular no complexo 1. Observando essa reprodutibilidade da região do inibidor e das quantidades de interações e afinidade e que após a dinâmica molecular do complexo 1 a região observada é maximizada, é possível propor que esses resíduos estejam localizados em uma importante região de interação com as PLA<sub>2</sub> ácidas, além de que o complexo 1 é a estrutura que, nesse trabalho, melhor representou a interação PLA<sub>2</sub>/αPLI.



**Figura 35.** A Representação em *cartoon* e B superfície eletrostática do inibidor PLI $\alpha$ ,  $\alpha$ BaltMIP, em conformação trimérica. C Superfície eletrostática do poro central, sua possível função foi descrito por Santos-Filho *et al.*, 2011. A superfície eletrostática é representada pelas cargas negativas em vermelho e as cargas positivas em azul.

Outros grupos de resultados apontaram uma região diferente do poro central como região de interação com as PLA<sub>2</sub> ácidas, complexos 4, 5 e 6. Essa região está localizada próxima ao N-terminal, resíduos de 1 a 37. Analisando na literatura trabalhos que corroborariam com essa região de interação, Okumura *et al.*, 2005 aponta o resíduo tirosina 144 como importante resíduo de interação entre as proteínas e Nobuhisa *et al.*, 1998 aponta duas regiões importantes de interação, regiões da leucina 137 a leucina 139 e fenilalanina 143 a fenilalanina 145, observamos que ambos realizaram mutações sítio dirigidas para chegar a conclusão que após esses experimentos, os inibidores tipo  $\alpha$  perderam afinidade com as PLA<sub>2</sub>, mas quando analisamos mais a fundo esses dados, e levamos em conta que as mutações garantem uma maior flexibilidade a essa região, como por exemplo mutações com resíduos de alanina, e que essas regiões estão próximas ao poro central (figura 36), podemos propor que não necessariamente esses resíduos/regiões participam da coordenação com as PLA<sub>2</sub>, mas que essa mutação poderia desestruturar o poro central, não permitindo a sua interação com as proteínas.



**Figura 36.** Representação em *cartoon* verde do inibidor tipo  $\alpha$  utilizado com as regiões descritas por Nobuhisa 1998 em bege e os resíduos propostos por Okumura 2005 em azul.

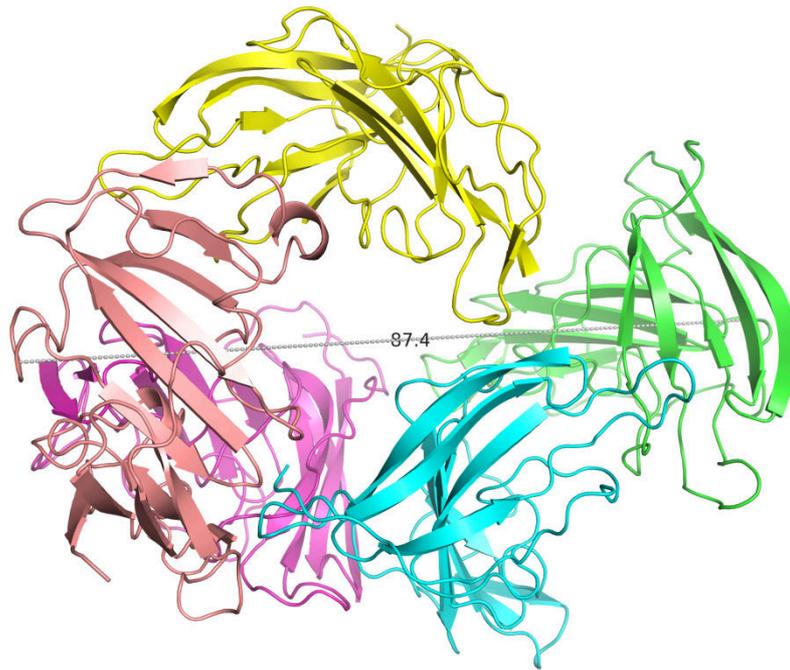
Após as análises e levando em conta questões como a incerteza da participação de resíduos do N-terminal descritos por experimentos anteriores, tal incerteza comentada inclusive nos trabalhos que apontam tais regiões, concluímos que as interações entre as proteínas devam ocorrer pelo poro central. Analisando a quantidade de ligações de hidrogênio e enovelamento da PLA<sub>2</sub> dos complexos 1, 2 e 3, o complexo 1 foi escolhido como a melhor estrutura representativa da interação entre PLA<sub>2</sub> ácidas e a  $\alpha$ BalMIP que o novo protocolo de *docking* gerou. As análises da dinâmica molecular do complexo 1 mostraram uma relativa estabilidade do complexo e um melhor posicionada da PLA<sub>2</sub> em relação ao inibidor.

### 4.3.2. CB/CNF

Analisando os resultados acerca do complexo CB/CNF pode-se observar que as moléculas da crotovina B, em sua grande maioria, interagiram em regiões de interface entre os monômeros de CNF. Isso pode indicar que alguns resíduos localizados nessa região possam ser importantes para a complexação da CNF com a CB.

Alguns *clusters* de resultados possibilitaram a visualização de uma conformação diferente das proteínas envolvidas, essa diferença possibilitou a formulação de uma nova hipótese de interação, propondo que a interação das proteínas possa ser realizada pelos resíduos internos da CNF com a CB, tal posicionamento das proteínas geraria a condição com a maior quantidade de interações entre as cadeias, ou pelo menos, o maior contato entre elas, retirando o acesso da CB ao substrato. Isso se deve ao fato da superfície da molécula de CB, quando posicionada internamente a CNF, estar em maior contato com a superfície do inibidor.

Os resultados envolvendo as estruturas da CB e da CNF foram menos conclusivos, já que encontramos uma menor quantidade de trabalhos envolvendo essas interações, dificultando a análise e a convergência dos resultados. Mas analisando os resultados acerca da melhoria da estrutura da CNF, pode-se observar que os dados estavam de acordo com a literatura novamente. Experimentos que isolaram a CNF mostraram que ela se apresentava como um composto oligomérico de 4 a 8 monômeros e resultados desenvolvidos por colaboradores do nosso laboratório mostraram por meio de experimentos de DLS que a proteína apresentava um raio hidrodinâmico de  $4.4 \pm 0,1$  nm, medidas que coincidem com o modelo tetramérico proposto (figura 37) (Forte-Dias *et al.*, 1994). Como citado anteriormente, os melhores modelos refinados utilizando os dados de SAXS apontaram uma conformação tetramérica da CNF contendo uma subunidade  $\beta$  (Forte-Dias, 2014).



**Figura 37.** Medida do maior raio, 43,7Å ou 4,37nm, do tetrâmero da CNF, representação em *cartoon* verde, roxo, amarelo e azul, na presença da subunidade  $\beta$  em salmão.

# CONCLUSÃO

## 5. CONCLUSÃO

Durante as análises utilizando o novo protocolo de *docking*, pode-se observar que o mesmo funcionou como esperado, gerando bons resultados. Para concluir isso, foram analisados alguns passos e como o protocolo os desenvolveu. A seleção das estruturas pelo critério de restrição energética foi realizada de forma funcional, ao ponto em que estruturas energeticamente acessíveis não foram excluídas e estruturas energeticamente desfavoráveis não foram consideradas. Todos os passos de clusterização após os ajustes de corte de rmsd agruparam somente resultados próximos, não possibilitando clusters em que se encontraram estruturas muito divergentes, facilitando as análises. O passo em que se utiliza o *software* Hex, *docking* molecular, pode-se observar que quando os resultados estavam convergindo para um mesmo local de interação ou não estavam sendo relevantes as diferenças entre as tentativas, o mesmo parava os cálculos e nos geravam as soluções realizadas com as energias respectivas. Analisando esses pontos podemos concluir que a metodologia desenvolvida e proposta funcionou como esperada. Alguns desses resultados convergiram com os dados encontrados na literatura, reforçando o bom desempenho do protocolo.

Pensando em uma metodologia mais eficiente e sólida, experimentos de validação estão sendo planejados para testar o protocolo. Planeja-se utilizar como resultado referência um complexo proteína/proteína conhecido e para testar a metodologia, utilizar como arquivos de entrada as proteínas do complexo conhecido em sua forma nativa.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arni, R. K.; Ward, R. J. Phospholipase A(2) - A structural review. **Toxicon**, v.34, p.827-841, 1996.
- Bachar, O., Fischer, D., Nussinov, R., & Wolfson, H. A computer vision based technique for 3-D sequence-independent structural comparison of proteins. **Protein Engineering**, 6(3), 279-287, 1993.
- 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.
- Batista, P. R.; Robert, C. H.; Maréchal, J. D.; Hamida-Rebaï, M. B.; Pascutti, P. G.; Bisch, P. M.; Perahia, D. Consensus modes, a robust description of protein collective motions from multiple-minima normal mode analysis—application to the HIV-1 protease. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 12(12), 2850-2859, 2010.
- Becker, O. M. & Karplus, M. Guide to biomolecular simulations. **Springer Science & Business Media**. 2006.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. **Intermolecular Forces**, 331-342, 1981.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. **J. Chem. Phys.** 1984.
- Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; Van Drunen, R. GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation. **Comp. Phys. Commun.** 91, 43-56, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso**. 8. ed. Brasília, DF, pp. 431e437, 2010
- Brooks, B.R.; Bruccoleri, R.E.; Olafson, B.D.; States, D.J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **J. Comput. Chem.** 4, 187-217, 1983.
- Chang, C. C., & Lee, J. D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like  $\beta$ -bungarotoxin. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, 296(2), 159-168, 1977.
- Durrant, J. D.; McCammon, J. A. BINANA: A novel algorithm for ligand-binding characterization. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 29(6), 888-893, 2011.
- Faure, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A2. **Biochimie**, v.82, pp.833e840, 2000
- Faure, G.; Xu, H.; Saul, F.A. Crystal Structure of Crotoxin Reveals Key Residues Involved in the Stability and Toxicity of This Potent Heterodimeric  $\beta$ -Neurotoxin. **JMB**, v. 412, I. 2, pp. 176e191, 2011
- Floquet, N., Durand, P., Maigret, B., Badet, B., Badet-Denisot, M. A., & Perahia, D. Collective motions in glucosamine-6-phosphate synthase: influence of ligand binding and role in ammonia channelling and opening of the fructose-6-phosphate binding site. **Journal of molecular biology**, 385(2), 653-664, 2009.

Fortes-Dias, C. L., Lin, Y., Ewell, J., Diniz, C. R., & Liu, T. Y. A phospholipase A2 inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. **Journal of Biological Chemistry**, 269(22), 15646-15651, 1994.

Fortes-Dias, C.L. Endogenous inhibitors of snake venoms phospholipases A2 in the blood plasma of snakes. **Toxicon**, v.40, pp. 481e484, 2002

Fortes-Dias, C. L., Ortolani, P. L., Fernandes, C. A. H., Lobo, K. R., de Melo, L. A., Borges, M. H., ... & Fontes, M. R. M. Insights on the structure of native CNF, an endogenous phospholipase A 2 inhibitor from *Crotalus durissus terrificus*, the South American rattlesnake. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, 1844(9), 1569-1579, 2014.

Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Phospholipases A2 myotoxins from Bothrops snake venoms, in: *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. **John Wiley and Sons**, pp. 321e352, 1997

Goffe, W. L., Ferrier, G. D., & Rogers, J. **Global optimization of statistical functions with simulated annealing**. **Journal of Econometrics**, 60(1), 65-99, 1994.

Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **J. Chem. Theory Comput.** 4, 435-447, 2008.

Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V.G.; Im, W. CHARMM-GUI: A Web-based Graphical User Interface for CHARMM. **J. Comput. Chem.** 29:1859-1865, 2008.

Lima, R.M.; Estevão-Costa, M.I.; Junqueira-de-Azevedo, I.L.; Ho, P.L.; Diniz, M.R.; Fortes-Dias, C.L. Phospholipase A2 inhibitors (bPLIs) are encoded in the venom glands of *Lachesis muta* (*Crotalinae*, *Viperidae*) snakes. **Toxicon**, v.57, pp.172e175, 2011

Lizano, S.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Fox, J.W.; Lambeau, G.; Lazdanski, M.; Gutiérrez, J.M. Two phospholipase A2 inhibitors from the plasma of *Cerrophidion* (*Bothrops*) *godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A2 myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. **Biochem J.** v.346, pp.631e639, 2000

Lizano, S.; Domont, G.; Perales, J. Natural phospholipase A2 myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants, **Toxicon** v.42, pp.963e977, 2003

Magro, A. J.; Murakami, M. T.; Marcussi, S.; Soares, A. M.; Arni, R. K.; Fontes, M. R. M. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric. **BBRC**, v. 323, pp. 24e31, 2004

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.

McCammom, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. Dynamics of folded proteins. **Nature**, 267(5612), 585-590, 1977.

Melgarejo, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C. et al. *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. **Sarvier, FAPESP**, p.33-61, 2003.

Mouawad, L.; Perahia, D. Motions in hemoglobin studied by normal mode analysis and energy minimization: evidence for the existence of tertiary T-like, quaternary R-like intermediate structures. **Journal of molecular biology**, 258(2), 393-410, 1996.

Nobuhisa, I.; Chiwata, T.; Fukumaki, Y.; Hattori, S.; Shimohigashi, Y.; Ohno, M. Structural elements of Trimere surus flavoviridis serum inhibitors for recognition of its venom phospholipase A2 isozymes. **FEBS Lett.** v.429, pp.385e389, 1998.

Okumura, K.; Masui, K.; Inoue, S.; Ikeda, K.; Hayashi, K. Purification, characterization and cDNA cloning of a phospholipase A2 inhibitor from the serum of the non-venomous snake *Elaphequadrivirgata*. **Biochem. J.** v.341, pp.165e171, 1997

Okumura, K.; *et al.* cDNA cloning and bacterial expression of phospholipase A2 inhibitor PLI from the serum of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1441, p. 51–60, 1999.

Okumura, K.; Inoue, S.; Ikeda, K.; Hayashi, K. Identification of b-type phospholipase A2 inhibitor in a nonvenomous snake *Elaphequadrivirgata*. **Arch. Biochem. Biophys.** v.408, pp.124e130, 2002

Okumura, K.; Ohno, A.; Nishida, M.; Hayashi, K.; Ikeda, K.; Inoue, S. Mapping the region of the  $\alpha$ -type phospholipase A2 inhibitor responsible for its inhibitory activity. **Journal of Biological Chemistry**, 280(45), 37651-37659, 2005.

Oostenbrink, C.; Soares, T. A.; Van der Vegt, N. F. A.; Van Gunsteren, W. F. Validation of the 53A6 GROMOS Force Field. **Eur. Biophys. J.**, 34, 273-284, 2005.

Pierce, B.G.; Wiehe, K.; Hwang, H.; Kim, B.H.; Vreven, T.; Weng, Z. ZDOCK Server: Interactive Docking Prediction of Protein-Protein Complexes and Symmetric Multimers. **Bioinformatics** 30(12): 1771-3, 2014.

Pinho, F.M.O.; Pereira, I.D. Ofidismo, **Revista da Associação Médica Brasileira** 47, pp. 24e29, 2001  
Ritchie, D.W.; Kemp, G.J.L. Protein Docking Using Spherical Polar Fourier Correlations, **PROTEINS: Struct. Funct. Genet.** 39, 178-194, 2000.

Santos-Filho, N.A.; Silveira, L.B.; Oliveira, C.Z.; Bernardes, C.P.; Menaldo, D.L.; Fuly, A.L.; Arantes, E.C.; Sampaio, S.V.; Mamede, C.C.; Beletti, M.E.; Oliveira, F.; Soares, A.M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I2 inducer phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, **Toxicon** 52, pp. 908e917, 2008

Santos-Filho, N. A., Fernandes, C. A., Menaldo, D. L., Magro, A. J., Fortes-Dias, C. L., Estevão-Costa, M. I., ... & Soares, A. M. Molecular cloning and biochemical characterization of a myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma. **Biochimie**, 93(3), 583-592, 2011.

Schlick, T. Molecular modeling and simulation: an interdisciplinary guide: an interdisciplinary guide (Vol. 21). **Springer Science & Business Media**. 2010.

Smith, C. G.; Vane, J. R. The discovery of captopril. **FASEB J**, v.17, p.788-789, 2003.

Söding, J.; Biegert, A.; Lupas, A. N. The HHpred Interactive Server for Protein Homology Detection and Structure Prediction. **Nucl. Acids Res.** 33, 244-248, 2005.

Steven Hayward and Bert L. de Groot. Normal Modes and Essential Dynamics. in: Methods in molecular biology, vol 443, **Molecular modelling of proteins** 89-106, 2008.

Tina, K. G.; Bhadra, R.; Srinivasan, N. PIC: protein interactions calculator. **Nucleic acids research**, 35(suppl 2), W473-W476, 2007.

van Gunsteren, W. F., Daura, X., Mark, A. E. GROMOS force field. **Encyclopedia of computational chemistry**, 1998.

Varanda, E.A.; Gianini, M.J.S. Bioquímica de venenos de serpentes. **Venenos. Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**, pp. 205e223, 1999

Verheij, H. M., Volwerk, J. J., Jansen, E. H. J. M., Puyk, W. C., Dijkstra, B. W., Drenth, J., & De Haas, G. H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**, 19(4), 743-750, 1980.

Wallace, A. C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein engineering**, 8(2), 127-134, 1995.

Wiederstein, M.; Sippl, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic acids research**, 35 (suppl 2), 2007.

## **MATERIAL COMPLEMENTAR**

Em anexo, esse trabalho contém um CD com os 11 complexos gerados pelo novo protocolo de *docking* molecular proposto. Além disso, contém as estruturas dos inibidores plasmáticos, CNF e  $\alpha$ BaltMIP, as estruturas das PLA<sub>2</sub> anteriores as análises, ácida e CB e os resultados das dinâmicas moleculares.

## ANEXO 1 “TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O MESTRADO”

1. BARALDI, PATRÍCIA T. ; MAGRO, ANGELO J. ; **MATIOLI, FÁBIO FILIPPI** ; MARCUSSI, SILVANA ; LEMKE, NEY ; CALDERON, LEONARDO A. ; STÁBELI, RODRIGO G. ; SOARES, ANDREIMAR M. ; CORREA, ARLENE G. ; FONTES, MARCOS R.M. . A novel synthetic quinolinone inhibitor presents proteolytic and hemorrhagic inhibitory activities against snake venom metalloproteases. **Biochimie (Paris. Print) 2016.**
2. SALVADOR, GUILHERME ; DREYER, THIAGO ; CAVALCANTE, WALTER ; **MATIOLI, FÁBIO FILIPPI** ; DOS SANTOS, JULIANA ; VELAZQUEZ-CAMPOY, ADRIAN ; GALLACCI, MARCIA ; DE MATTOS FONTES, MARCOS ROBERTO . Structural and functional evidences for membrane docking and disruption sites on phospholipases A2-like. **Acta Crystallographica Section D. 2015**
3. MARCON, HELENA SANCHES ; DOMINGUES, DOUGLAS SILVA ; SILVA, JULIANA COSTA ; BORGES, RAFAEL JUNQUEIRA ; **MATIOLI, FÁBIO FILIPPI** ; DE MATTOS FONTES, MARCOS ROBERTO ; MARINO, CELSO LUIS . Transcriptionally active LTR retrotransposons in Eucalyptus genus are differentially expressed and insertionally polymorphic. **BMC Plant Biology (Online) 2015.**
4. TOYAMA, DANIELA DE OLIVEIRA ; GAETA, HENRIQUE HESSEL ; PINHO, MARCUS VINÍCIUS TERASHIMA DE ; FERREIRA, MARCELO JOSÉ PENA ; ROMOFF, PAULETE ; **MATIOLI, FÁBIO FILIPPI** ; MAGRO, ANGELO JOSÉ ; FONTES, MARCOS ROBERTO DE MATTOS ; TOYAMA, MARCOS HIKARI . An Evaluation of 3-Rhamnosylquercetin, a Glycosylated Form of Quercetin, against the Myotoxic and Edematogenic Effects of sPLA<sub>2</sub> from *Crotalus durissus terrificus*. **BioMed Research International 2014.** 2 Citações.