

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

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

ANTONIEL AUGUSTO SEVERO GOMES

BOTUCATU – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

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

ANTONIEL AUGUSTO SEVERO GOMES

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

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

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

BOTUCATU – SP

2019

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gomes, Antoniel Augusto Severo.

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

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

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

Palavras-chave: Bothropstoxina-I; MD; Modos normais; PLA₂s-homólogas; Veneno de serpente.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

Acidentes ofídicos são considerados um problema de saúde pública global, dada sua alta ocorrência de mortes, onde alguns casos resultam em sequelas irreparáveis, deixando o indivíduo desabilitado por toda a vida. Somente no Brasil, em média 20 mil mortes ao ano são registradas. Desta forma, alguns pesquisadores têm buscado estudar a estrutura-função de componentes dos venenos de serpentes peçonhentas à fim de desenvolver alternativas terapêuticas para esse problema de grande interesse médico. Um dos componentes que tem recebido atenção nas últimas décadas é a BthTX-I, uma proteína PLA₂s-homóloga não catalítica, devido seu efeitos farmacológico notadamente miotóxico. Embora diversas técnicas tenham sido empregadas na compreensão do mecanismo de ação dessas proteínas, o conhecimento nessa área permanece controverso, tornando-se necessário a continuidade de estudos. O estudo estrutural e computacional de proteínas constitui uma alternativa viável para identificar as várias conformações de uma dada proteína, bem como seu comportamento dinâmico. Sendo assim, o presente trabalho buscou aplicar métodos computacionais, como simulação de MD, análise de Modos Normais (NM) e Dinâmica Molecular excitada por Modos Normais (MDeNM) à BthTX-I em pH ácido ou básico e nativa ou em complexo com o α -tocoferol – molécula tida como ativadora alostérica – na descrição do seu espaço conformacional, buscando compreender os aspectos estruturais do seu mecanismo de ação. Além disso, foram empregadas técnicas em solução, como Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), a fim de compreender o estado oligomérico da proteína frente ao α -tocoferol. Os resultados de MD mostraram que a BthTX-I possui estabilidade dimérica em pH neutro/básico. Já os experimentos de MDeNM mostraram que esta técnica é mais eficiente que a MD para descrever o espaço conformacional da BthTX-I, especialmente quando movimentos de alta amplitude são desejados, graças à sua combinação com os modos normais, causando altas alterações conformacionais do sítio de Ruptura de Membrana (MDiS), sendo exposto para o solvente e se aproximando do plano de sulfato que mimetiza a membrana celular. Tal movimento é altamente relacionado com a descrição dos ângulos de Euler, sugerindo que a exposição do MDiS é resultado de alterações da estrutura quaternária da BthTX-I. A liberdade do MDiS pode ser explicada pela perturbação da sua interação com a Hélice-I da BthTX-I causada pela presença do α -tocoferol, definindo assim uma característica importante para um ativador alostérico. Por fim, os experimentos de DLS reforçaram o caráter oligomerizante do α -tocoferol frente a BthTX-I, uma característica chave para a miotoxicidade dessa classe de proteínas.

Palavras-chave: Bothropstoxina-I; MD; Modos normais; PLA₂s-homólogas; Veneno de serpente.

ABSTRACT

Ophidian accidents constitute a global public health problem due its high mortality, with some cases leading to permanent sequels. In Brazil, around 20 thousand deaths are registered. Therefore, researchers have been studying the snake venom composition in order to develop therapeutic alternatives to this medical problem. Some components from snake venom are highlighted in the past decades, as BthTX-I, a non-catalytic PLA₂s-homologous protein, due its many pharmacological effects, notably myotoxic. Although many techniques have been employed to better understand the molecular mechanism of action for these proteins, this knowledge remains controversial, emphasizing the need to progress this field. The structural and computational study of proteins is a valuable tool to access the various conformations of a given protein, as well its dynamical behavior. Thus, the present work applied computational methods as MD, Normal Modes (NM) analysis and Molecular Dynamics with excited Normal Modes (MDeNM) to BthTX-I in acidic or basic pH and unbound or bound to α -tocopherol – a molecule identified as an allosteric activator – in order to describe the conformational space of this protein and determine the structural aspects of its mechanism of action. Further, biophysical experiments as Dynamic Light Scattering (DLS) were employed in order to comprehend the oligomeric form of BthTX-I with or without α -tocopherol. MD simulations showed that dimeric form of BthTX-I is stable when in neutral/basic pH conditions. MDeNM showed as a better tool to describe the conformational space of BthTX-I, specially when high amplitude movements are desired, due its mixing with normal modes, leading to high conformational changes of the Membrane-Disruptin site (MDiS), which were exposed to the solvent and approximated to the sulphate plane that mimics the cell membrane surface. This movement is highly related with the Euler angle description, suggesting that the MDiS exposure is result of quaternary movements of BthTX-I. The liberty of MDiS might be explained due the perturbation of its interaction with Helix-I of the protein caused by the presence α -tocopherol, describing an important feature that defines an allosteric activator. Furthermore, DLS experiments reinforced the ability of α -tocopherol to induce the BthTX-I oligomerization, a key property for myotoxicity for this class of proteins.

Keywords: Bothrotoxin-I; MD; Normal modes; PLA₂s-homologous; Snake venom.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação estrutural genérica das PLA ₂ s-homólogas.....	4
Figura 2. Representação dos modelos de citotoxicidade e mitotoxicidade das PLA ₂ s-homólogas. Mecanismo de ação para as conformações de Dímero Aberto e Dímero Compacto.....	6
Figura 3. Modelos para a descrição das alterações conformacionais em proteínas em relação à energia livre (ΔG_0).....	9
Figura 4. Descrição de potenciais energéticos utilizados em simulações de MD: Potencial Harmônico, Potencial de Lennard-Jones e Potencial de Coulomb.....	10
Figura 5. Representação do padrão energético e conformacional de uma proteína.....	15
Figura 6. Representação hipotética para o potencial energético (G) de uma proteína com dois estados, identificados pro cada parábola.....	17
Figura 7. Representação em Cartoon da estrutura cristalográfica do Dímero Compacto da BthTX-I em complexo com o α -tocoferol.....	20
Figura 8. Distâncias entre as Hélices-I e MDiS (HMdist) entre os monômeros da BthTX-I definidas pelo centro de massa de cada uma das regiões.....	27
Figura 9. Determinação dos eixos <i>Roll</i> , <i>Tilt</i> e <i>Twist</i> para uma PLA ₂ s-homólogas e determinação do plano de SO ₄	28
Figura 10. Representação dos resíduos protonados para o pH 4 e 8 da BthTX-I.....	31
Figura 11. Padrão de RMSD e RMSF da BthTX-I em pH 4 e 8.....	32
Figura 12. Padrão de medidas HMdist e Rg para a BthTX-I em pH 4 e 8.....	33
Figura 13. Número de contatos entre os monômeros da BthTX-I para o sistema em pH 4 e 8.....	33
Figura 14. Estruturas da BthTX-I após 100 ns de MD para pH 4 e 8. HMdist estão representados pelas setas em vermelho.....	34
Figura 15. Flutuação dos modos normais 7 ao 20 para os sistemas BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol.....	35
Figura 16. Direções gerais de movimentos da BthTX-I para os modos 7 e 10, indicadas pelas setas em preto.....	36
Figura 17. Cálculo de SASA do MDiS do monômero A da BthTX-I para as trajetórias dos modos 7 e 10.....	37
Figura 18. Temperatura do sistema numa simulação de MDeNM.....	38
Figura 19. Perfil bidimensional de Energia Livre (kcal/mol) da BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol. Estruturas geradas pela MDeNM após relaxamento de 50 ps de MD.....	39
Figura 20. Distribuição dos ângulos <i>Roll</i> e <i>Tilt</i> para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol.....	40
Figura 21. Distribuição dos ângulos <i>Roll</i> e <i>Tilt</i> para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol para as excitações ao longo do vetor da réplica 12 da BthTX-I.....	42
Figura 22. RMSD do relaxamento das estruturas após excitação utilizando o vetor 12 para a BthTX-	

I e BthTX-I/ α -tocoferol.....	43
Figura 23. Distribuição dos ângulos <i>Roll</i> e <i>Tilt</i> para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol durante 10 ns de MD.....	44
Figura 24. Raio de giro (Rg), à esquerda, e SASA, à direita, da BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol durante 10 ns de MD.....	45
Figura 25. HMdist e distância dos MDiS ao plano de SO ₄ (DSO ₄), à direita, da BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol durante 10 ns de MD.....	46
Figura 26. Valores de RMSD e Rg para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol durante 100 ns de MD.	47
Figura 27. HMdist e SASA para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol durante 100 ns de MD.....	47
Figura 28. Perfil bidimensional de Energia Livre (kcal/mol) da BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol, utilizando RMSD e Rg.....	48
Figura 29. Distribuição dos ângulos <i>Roll</i> e <i>Tilt</i> para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol durante 100 ns de MD.....	49
Figura 30. Cromatograma de Exclusão Molecular do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	51
Figura 31. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da Cromatografia de Exclusão Molecular do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	52
Figura 32. Cromatografia de Fase Reversa da fração FR-III proveniente da Cromatografia de Exclusão Molecular do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	53
Figura 33. Distância dos MDiS ao plano SO ₄ (DSO ₄) para a BthTX-I, BthTX-I/ α -tocoferol e BthTX-I em pH 8 durante 100 ns de MD.....	61
Figura 34. Distribuição dos ângulos <i>Roll</i> e <i>Tilt</i> para a BthTX-I, BthTX-I/ α -tocoferol e BthTX-I em pH 8.....	62
Figura 35. Distância do MDoS para a BthTX-I em simulações de MD e MDeNM.....	63
Figura 36. Estrutura final do complexo BthTX-I/ α -tocoferol para 10 ns de simulação da BthTX-I após indução ao estado inativo pela técnica de MDeNM mostrando os contatos importantes na estabilização do complexo.....	66
Figura 37. Modelo dinâmico da atividade da BthTX-I numa bicamada lipídica.....	68

Lista de Tabelas

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

Lista de Abreviações

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

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

Sumário

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

Um levantamento bibliográfico realizado por Cunha e Martins (2012) demonstrou que o veneno das serpentes bothrópicas é constituído por metaloproteinases, serinoproteinases, fosfolipases A₂, desintegrinas, miotoxina e neurotoxinas. Dessa forma, pesquisadores demandam esforços para compreender como esses componentes atuam para que possam ser desenvolvidos

métodos eficazes para garantir o bloqueio/inibição dessas moléculas. Dentre tais moléculas, as miotoxinas chamadas de Lys49-fosfolipases A₂ (Lys49-PLA₂) fazem parte das chamadas PLA₂s-like ou PLA₂s-homólogas, constituindo um grupo de grande interesse médico e científico, dado seu envolvimento em diversos eventos farmacológicos traumáticos, como abordado a seguir.

1.1. Fosfolipases A₂-Homólogas

As PLA₂s-homólogas foram inicialmente identificadas por Maraganore e colaboradores (1984), purificadas do veneno de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Com massa molecular de ~14 kDa e diferenças notáveis na composição do *loop* de cálcio e, em especial, na substituição Asp49Lys, onde foram então classificadas como um novo grupo de fosfolipases A₂. Em 1988, Homsí-Brandeburgo e colaboradores purificaram a Bothropstoxina-I (BthTX-I) do veneno de *Bothrops jararacussu*. Com a mesma massa molecular, a BthTX-I foi identificada com uma fosfolipase cataliticamente inativa de alto ponto isoeletrico (pI 8,2) e, portanto, de caráter básico (Figura 1A); e constitui cerca de 15% do veneno e 40% das proteínas totais presentes nele. Por apresentar atividade necrótica específica em células musculares, a BthTX-I, assim como as demais PLA₂s-homólogas miotóxicas, passou a ser identificada como miotoxinas ou fosfolipases-like miotóxicas. Em acordo com isso, estudos de superfície eletrostática demonstraram que a grande quantidade de resíduos das Lys49 é uma característica importante para a expressão da sua miotoxicidade (MURAKAMI; ARNI, 2003).

A miotoxicidade pode ser definida como uma ação específica do veneno em músculo esquelético que afeta apenas as fibras musculares, deixando os demais tecidos e estruturas – como nervos e vasos – inalterados, resultando na mionecrose. Seu efeito, expressado em 0,25-3 horas após sua administração, em nível celular, é caracterizado pela lise da membrana sarcoplasmática e hipercontração muscular. Após 24-48 horas, as células musculares danificadas se mostram como uma massa amorfa repleta de células fagocíticas, especialmente macrófagos (MEBS; OWNBY, 1990). Já a nível de indivíduo, o progresso da miotoxicidade pode causar lesões teciduais graves e permanentes, capazes de desabilitar o paciente de forma irreversível (GUTIÉRREZ, THEAKSTON, WARRELL, 2006). Portanto, as PLA₂s-homólogas são tidas como um grupo de grande importância médica, e a compreensão do seu real mecanismo molecular pode abrir portas para o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos. Vale ressaltar ainda a relevante contribuição científica gerada a partir do seu estudo molecular e estrutural.

À medida que os estudos na área foram se desenvolvendo, foi observado que, além da miotoxicidade, as PLA₂s-homólogas apresentam ainda diversos efeitos farmacológicos, como: atividade neuromuscular em camundongos através da inibição da liberação de acetilcolina

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

A origem das PLA₂s-homólogas é atribuída a um processo evolutivo à partir do grande grupo das fosfolipases A₂ (PLA₂) – enzimas que promovem catálise de fosfolipídios – que resultou na duplicação desse gene e então mutações foram fixadas, levando a sua inabilidade catalítica, porém apresentando outros efeitos farmacológicos, como citados no parágrafo acima. A expressão de uma variedade de efeitos farmacológicos através de um mecanismo molecular independente de catálise tem despertado interesse nos pesquisadores e, portanto, um número crescente de estudos vem sendo realizado para identificar seu real mecanismo de ação e definição dos seus determinantes estruturais (LOMONTE; RANGEL, 2012).

1.2. Aspectos Estruturais e Funcionais das PLA₂s-homólogas

As PLA₂s-homólogas são identificadas como pequenas proteínas de 119-143 aminoácidos, com massa molecular que varia entre 12 e 15 kDa e arquitetura extremamente similar às PLA₂ cataliticamente ativas. Sua característica estrutural mais notável é a presença de duas hélices- α antiparalelas (Hélice II e III) separadas por uma distância aproximada de 10 Å com características anfipáticas, onde os resíduos hidrofílicos são expostos ao solvente e os hidrofóbicos dispostos para seu interior, com exceção da díade His48/Lys49. As PLA₂ são também constituídas por uma região N-terminal, representada pela Hélice I (resíduos 1 a 12), seguida por uma hélice curta (*short helix*) formada pelos resíduos 18 a 23. Entre os resíduos 25 e 34 está o *loop* ligante de Ca^{++} , seguido pela Hélice II (40 a 55) e uma folha- β antiparalela (55 a 89), onde estes últimos são separados pelo *loop* pancreático. Em seguida é encontrada a Hélice III (90 a 107), e então um *loop* C-terminal bastante flexível (108 a 113), conhecido por cauda C-terminal, finaliza a proteína. Outro aspecto de

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

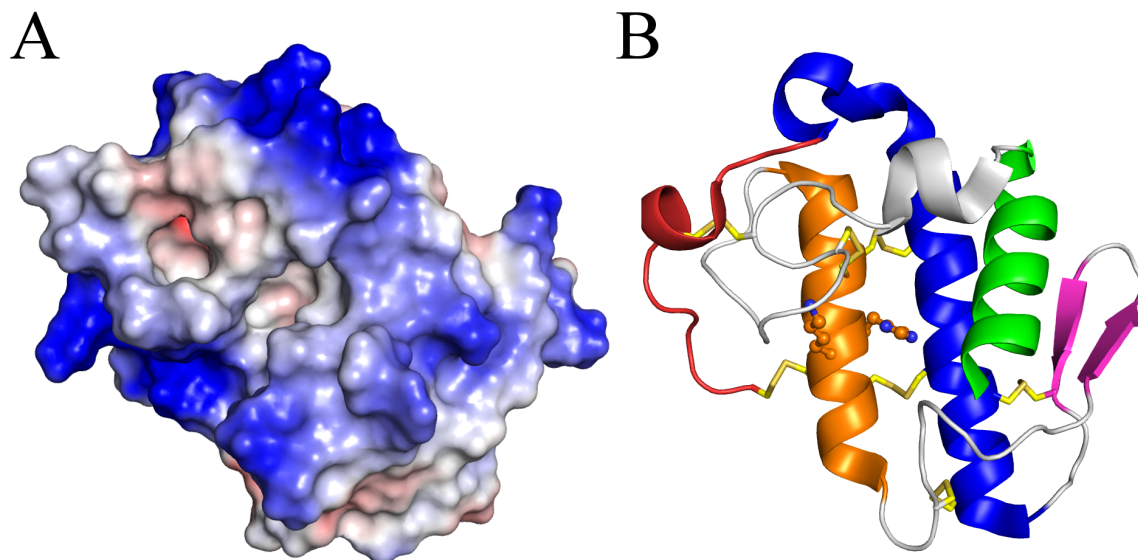


Figura 1: Representação estrutural de uma PLA₂-homóloga (BthTX-I, PDB: 3CXI): (A) superfície eletrostática, onde os resíduos básicos, ácidos e neutros são mostrados nas cores azul, vermelho e branco, respectivamente; (B) e *cartoon*, mostrando as hélices- α I (N-terminal), II e III são representadas nas cores verde, laranja e azul, respectivamente; a folha- β está representada em roxo, enquanto que a cauda C-Terminal está mostrada em vermelho, enquanto que a hélice curta e regiões de *loops* estão representadas em branco. As ligações dissulfeto estão representadas em *sticks* coloridos em amarelo. A díade His48/Lys49, pertencente à Hélice-II, está representada com os átomos de suas cadeias laterais em esferas. Imagem gerada pelo Pymol (DELANO, 2002).

Atualmente, a inabilidade catalítica das PLA₂s-homólogas é atribuída a duas substituições específicas que impedem a coordenação com o cálcio, sendo elas: a) a ocupação do sítio de acoplamento do cálcio pelo nitrogênio ζ da cadeia lateral do resíduo de lisina, ocasionada pela substituição Asp49Lys; e b) a alteração conformacional do *loop* de cálcio resultante da substituição Tyr28Asn (FERNANDES *et al.*, 2010). Embora esse novo grupo de proteínas tenha sido descoberta há mais de 30 anos, seu mecanismo molecular de ação permanece controverso e, portanto, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas por pesquisadores para desvendar este mistério, com o uso de técnicas de modificação química, análise comparativa de sequência, interação com moléculas neutralizantes, estudos de peptídeos sintéticos e mutagênese sítio dirigida, por exemplo (FERNANDES *et al.*, 2014).

Estudos cristalográficos com as PLA₂s-homólogas complexadas a inibidores têm sido uma das ferramentas para a compreensão dos determinantes estruturais dessas moléculas. Tais estudos permitem identificar regiões na proteína que são passíveis de serem bloqueadas e, portanto, podem

corresponder a regiões importantes para a expressão dos seus efeitos farmacológicos. Por outro lado, existem outro grupo de moléculas que são capazes de ligar às PLA₂s-homólogas, auxiliando na sua citotoxicidade, os chamados ativadores alostéricos. Uma relevante revisão (FERNANDES *et al.*, 2014) lista as diferentes estruturas cristalográficas produzidas até então, com a identificação de PLA₂s-homólogas complexadas a ativadores alostéricos, como ácidos graxos, polietileno glicol (PEG), α -tocoferol; e também a bloqueadores, como o ácido rosmarínico, ácido cafeico, suramina e brometo p-bromofenacil.

Outra característica estrutural é a polarização da cavidade hidrofóbica das PLA₂s-homólogas causada pela cadeia lateral do resíduo Lys112 (LEE *et al.*, 2001). Esse resíduo permite a polarização da cavidade hidrofóbica, aumentando sua afinidade a fosfolipídios de membrana e levando à expressão da citotoxicidade. Posteriormente, esse resultado foi reforçado por estudos de mutagênese Lys112Ala, Val102Ala/Leu106Phe e Leu5Phe/Val102Ala/Leu106Phe, capazes de afetar a expressão dos efeitos farmacológicos dessas proteínas (CHIOATO *et al.*, 2002; SÁ *et al.*, 2004). Por outro lado, a polarização do resíduo Lys122 pode também ativar resíduos hidrofóbicos encontrados na cauda C-terminal, expondo-os para o solvente, sendo assim considerados importantes para a expressão da citotoxicidade (AMBROSIO *et al.*, 2005).

A cauda C-terminal das PLA₂s-homólogas é considerada importante para a expressão dos seus efeitos farmacológicos graças a estudos de peptídeos sintéticos (NÚÑEZ; ANGULO; LOMONTE, 2001), onde foi demonstrado sua participação na expressão dos efeitos farmacológicos dessas proteínas, notadamente através dos resíduos Lys115, Lys116, Tyr117 e Arg118. Além disso, outro trabalho demonstrou que mutações da Lys112 também pode reduzir a atividade dessas miotoxinas (CHIOATO *et al.*, 2002). Em 2007, foi observado que tais mutações afetam a atividade das miotoxinas de modo geral, onde foi possível observar alteração da sua atividade contra bactérias, lipossomas e células musculares, esta última sendo bastante sensível aos efeitos das PLA₂s-homólogas (CHIOATO *et al.*, 2007). Ainda, sobre as células musculares, foi descrita a alteração de sensibilidade de acordo com o estágio de desenvolvimento dessas células, sendo os miotubos – células mais desenvolvidas – mais susceptíveis aos efeitos das PLA₂s-homólogas. (ANGULO; LOMONTE, 2005).

De modo geral, os modelos atuais para tentar compreender o mecanismo miotóxico das PLA₂s-homólogas buscam explicá-lo apenas pela via da desestabilização de biomembranas através do reconhecimento de fosfolipídios carregados negativamente. Estudos de inibição com poliânions serviram de base para a proposição do primeiro modelo molecular de atuação das PLA₂s-homólogas, através da perturbação de biomembranas por meio das saliências hidrofóbicas presentes em cada cauda C-terminal (LOMONTE, ANGULO, CALDERÓN, 2003), apresentado na Figura 2

(A). Em acordo com isso, Magro e colaboradores (2003) sugeriram que as PLA₂s-homólogas poderiam agir através de um mecanismo de dobradiça, aproximando as caudas C-terminal ainda mais da membrana. Tal movimento seria observado quando o dímero da miotoxina é formado através da interação das folhas-beta de cada monômero, resultando numa conformação chamada de Dímero Aberto.

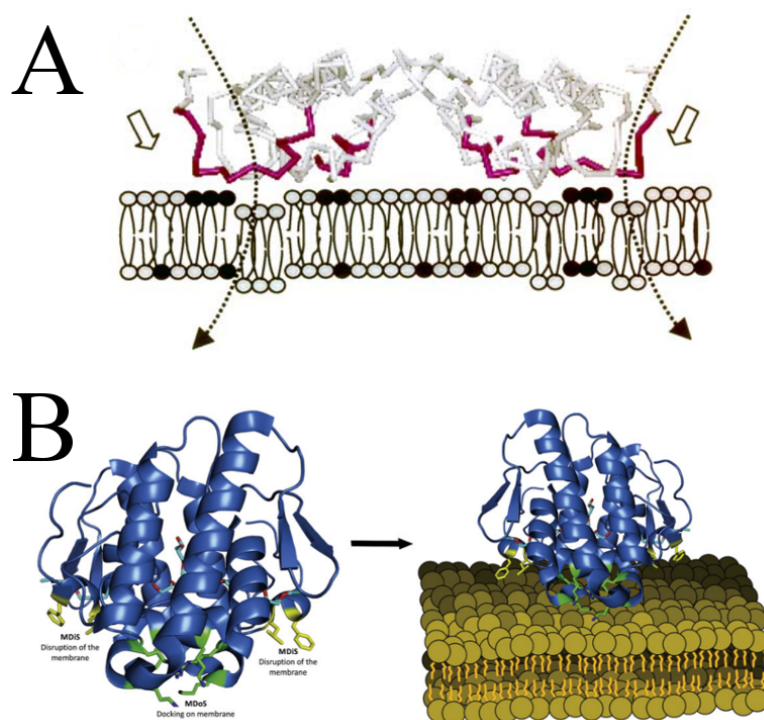


Figura 2. Representação dos modelos de citotoxicidade e miotoxicidade das PLA₂s-homólogas. Mecanismo de ação para as conformações de Dímero Aberto (A) e Dímero Compacto (B). Adaptado de Lomonte, Angulo e Calderón (2003) (A) e Fernandes *et al.* (2013) (B).

Posteriormente, outro modelo (Figura 2B) foi desenvolvido, baseado no estudo cristalográfico de duas miotoxinas (PrTX-I e BthTX-I) complexadas com α -tocoferol (dos SANTOS; SOARES; FONTES, 2009). Tal modelo propõe que as PLA₂s-homólogas se organizam numa outra conformação oligomérica, surgindo então um novo tipo de dímero, sendo então chamado de Dímero Alternativo, enquanto que o dímero anteriormente descrito passou a se chamar de Dímero Convencional. O Dímero Alternativo apresenta conformação de menor energia e alinhamento dos domínios estruturais considerados importantes. Este dímero apresenta os monômeros com interações entre a cauda C-terminal e hélice I, permitindo a formação de uma região de alta densidade catiônica – chamado de sítio de Ancoragem à Membrana (*Membrane-Docking site*, MDoS), que, com o auxílio das saliências hidrofóbicas encontradas em cada região C-terminal – chamado de sítio de Ruptura de Membrana (*Membrane-Disruption site*, MDiS), são capazes de penetrar membranas, levando a sua ruptura e então morte celular (FERNANDES *et al.*,

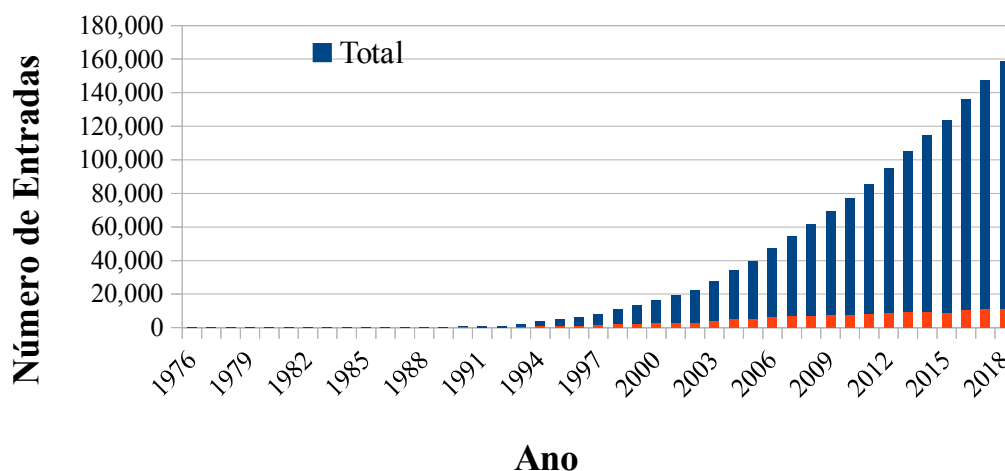
2013). Para evitar problemas de nomenclatura, descartando termos definidos historicamente, optamos por tratar os tipos de dímeros considerando suas características estruturais. Sendo assim, o Dímero Convencional e Dímero Alternativo serão chamados como Dímero Largo e Dímero Compacto, respectivamente.

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

Vale ressaltar que os estudos sobre o mecanismo de ação das PLA₂S-homólogas têm sido desenvolvidos majoritariamente por meio da análise de estruturas obtidas por cristalografia. Esta técnica teve seu início com a resolução da estrutura tridimensional da mioglobina em 1958 (KENDREW *et al.*, 1958) e vem crescendo gradativamente a cada ano, onde estruturas de proteínas são depositadas num banco de dados chamado de *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000). Este banco contém milhares de proteínas depositadas até então, apresentando 147.409 estruturas até 20 de Dezembro de 2018, como mostrado no gráfico 1 (Disponível em: <<https://www.rcsb.org/stats/growth/overall>>. Acesso em: 20 dez. 2018). A título de ilustração, a estrutura da BthTX-I foi elucidada em 2007 através da técnica de Cristalografia pelo grupo do Professor Arni (Murakami *et al.*, 2009). Atualmente, existem dez estruturas depositadas, nativa ou em complexo com diversos ligantes.

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

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



1.3. Biologia Estrutural: Acessando os Estados Conformacionais de Biomoléculas

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

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

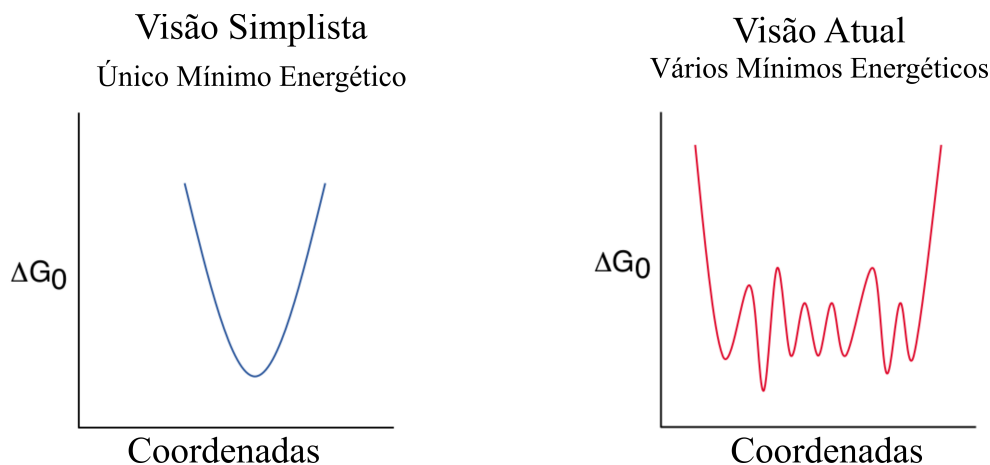


Figura 3. Modelos para a descrição das alterações conformacionais em proteínas em relação à energia livre (ΔG_0). Representação com apenas um mínimo local (A) e representação com vários mínimos locais (B), considerado mais próximo da realidade. Adaptado de JAMES e TAWFIK (2003).

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

1.3.1. Simulação de Dinâmica Molecular (MD)

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

$$F = m a$$

Equação 1. Segunda Lei de Newton.

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

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

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

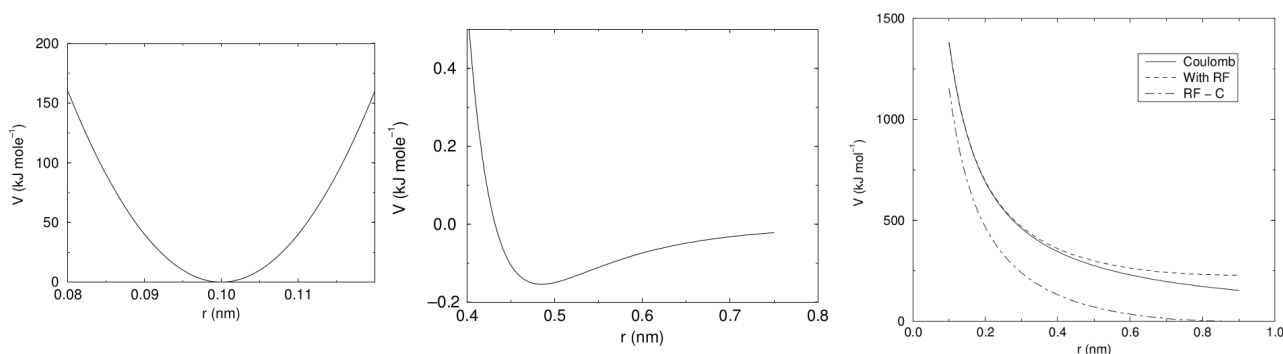


Figura 4. Descrição de potenciais energéticos utilizados em simulações de MD: Potencial Harmônico (A), Potencial de Lennard-Jones (B) e Potencial de Coulomb (C). Retirado do manual do GROMACS versão 5.0.5.

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

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

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

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

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

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

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

Equação 3. Definição de Força ($\mathbf{F}$) considerando variáveis de um sistema de MD.

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

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

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

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

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

Equação 5. Determinação da posição atômica ($\mathbf{r}$) em relação ao tempo (t).

enquanto que sua velocidade ($\mathbf{v}$) pode ser descrita como:

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

Equação 6. Determinação da velocidade atômica ($\mathbf{v}$) em relação ao tempo (t).

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

1.3.1.1. Desenvolvimento de Campos de Força

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

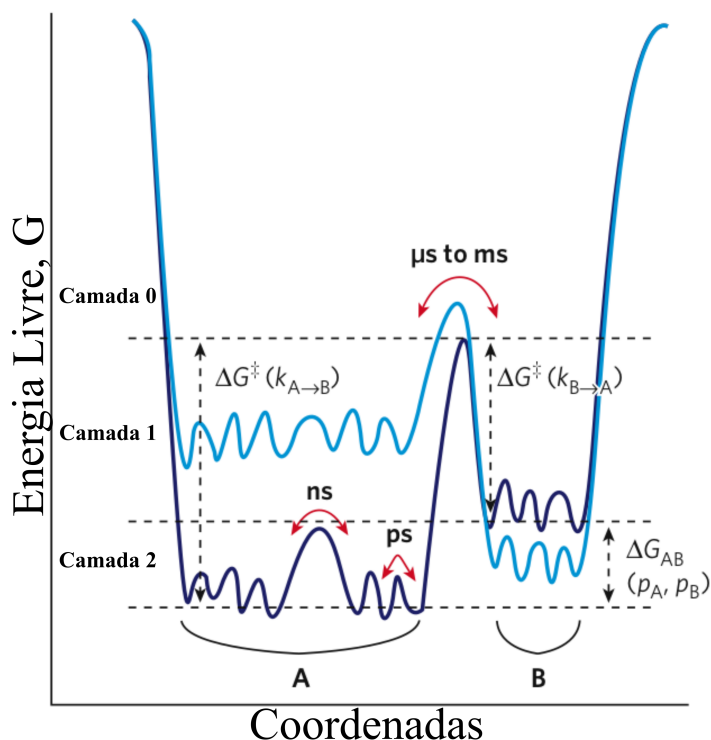


Figura 5. Representação do padrão energético e conformacional de uma proteína. Os diferentes níveis de energia são representados em camadas, que correspondem a regiões de alteração conformacional. A alteração entre estados (A e B) pode resultar na mudança entre camadas, exigindo um gasto energético,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

1.3.3. Modos Normais: Acessando Grandes Alterações Conformacionais em Biomoléculas

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

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

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

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

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

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

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

Equação 8. Energia Potencial para um modo normal.

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

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

Equação 9. Deslocamento atômico para modos normais.

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

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

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

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

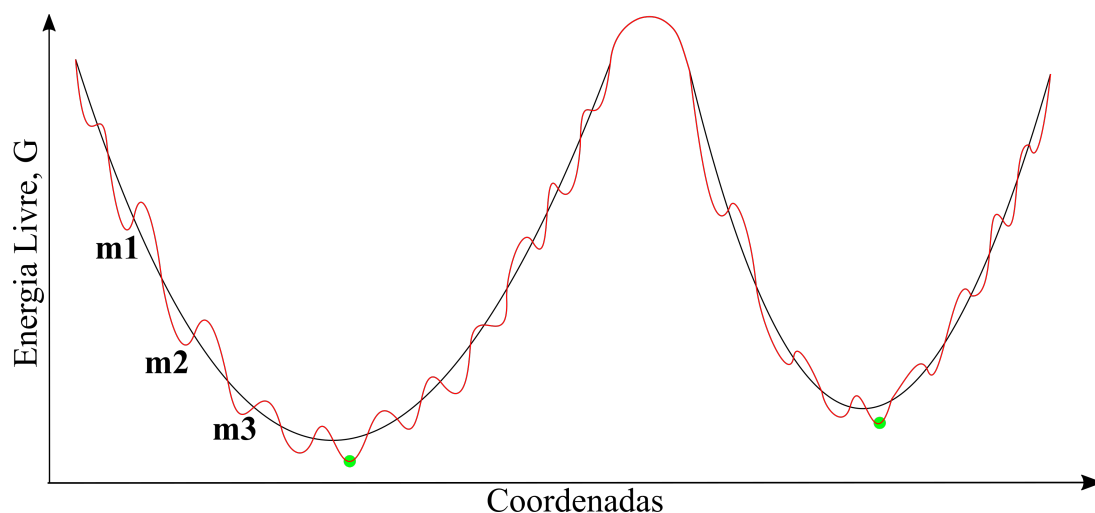


Figura 6. Representação hipotética para o potencial energético (G) de uma proteína com dois estados, identificados por cada parábola (curva em preto). Cada parábola é uma simplificação do potencial, que apresenta vários microestados (m_1 -3). Os círculos em verde correspondem a estruturas pontuais desse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

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

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

1.3.4. Dinâmica Molecular excitada com Modos Normais (MDeNM)

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

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

2. OBJETIVOS

O presente trabalho buscou avaliar o comportamento dinâmico da miotoxina da serpente de *Bothrops jararacussu*, BthTX-I, na sua forma nativa e em complexo com o α -tocoferol, a fim de determinar aspectos estruturais importantes no seu mecanismo de ação. Sendo assim, de forma específica, foi objetivado:

- I. Compreender o comportamento dimérico da BthTX-I em ambiente de pH ácido e básico através de simulações de MD;
- II. Excitar a BthTX-I a atingir vários estados conformacionais, através da técnica de MDeNM;
- III. Compreender a participação de moléculas ativadoras alostéricas, como o α -tocoferol;
- IV. Avaliar o comportamento dinâmico dos sítios considerados importantes para a miotoxicidade da BthTX-I, como o MDiS e MDoS;
- V. Avaliar a disposição dos monômeros constituintes do dímero da BthTX-I de acordo com medidas de Ângulos de Euler;
- VI. Avaliar o comportamento da BthTX-I em solução através de medidas de DLS na presença e ausência do α -tocoferol;
- VII. Discutir os aspectos estruturais encontrados no presente trabalho à luz do mecanismo de ação para o grupo das PLA₂s-homólogas.

3. METODOLOGIA

3.1. Coordenadas Atômicas da BthTX-I e Tratamento Físico-Químico

Para o desenvolvimento do presente trabalho, algumas estruturas cristalográficas da BthTX-I foram utilizadas. A primeira foi a estrutura de PDB ID 3IQ3 (FERNANDES *et al.*, 2010), de resolução de 1,55 Å, contendo íons de sulfato e uma molécula de PEG complexadas com a estrutura da BthTX-I. Para esta, simulações de MD foram executadas a fim de compreender sua dinâmica e estabilidade da BthTX-I em ambientes de pH ácido (4) e básico (8). Além disso, tais simulações foram feitas retirando todas as moléculas ligadas ao dímero da miotoxina.

Outro grupo de experimentos utilizou a estrutura 3CXI (dos SANTOS; SOARES; FONTES, 2009), com resolução de 1,83 Å e complexada com moléculas de α -tocoferol, PEG e também íons de sulfato. As moléculas de α -tocoferol foram encontradas ligadas na cavidade hidrofóbica, próximas ao resíduo de Histidina 48 de cada um dos monômeros, e apenas essas foram retidas na estrutura da BthTX-I (Figura 7). Nesse caso, foram realizadas simulações de MD e MDeNM com finalidade comparativa, considerado o ambiente de simulação em pH 7.

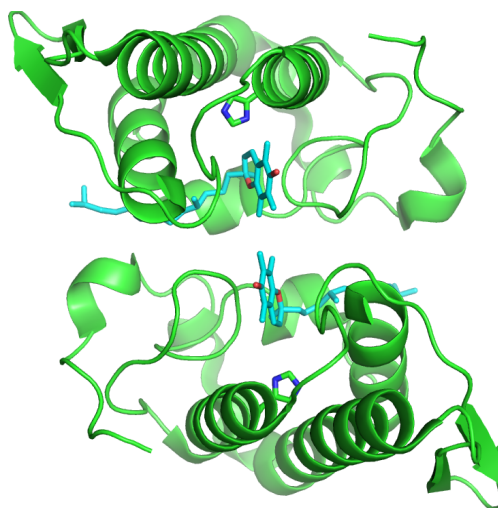


Figura 7. Representação em Cartoon da estrutura cristalográfica do Dímero Compacto da BthTX-I (PDB ID: 3CXI), mostrada em verde, em complexo com o α -tocoferol, em ciano (dos SANTOS; SOARES; FONTES, 2009). Imagem gerada pelo Pymol (DELANO, 2002).

As cadeias laterais da BthTX-I não modeladas pela cristalografia foram adicionadas utilizando o *software* Swiss-PDBViewer (GUEx; PEITSCH, 1997), disponível na plataforma do ExPASy (<https://www.expasy.org/>). Por fim, o grau de protonação foi determinado pelo *software* PROPKA (<http://propka.org/>), que considera a influência da superfície dos resíduos oriunda da disposição dos átomos vizinhos e então define o valor de pKa para cada resíduo passível de protonação (OLSSON *et al.*, 2011).

3.2. Preparação do Sistema para Simulação de Dinâmica Molecular (MD)

Uma vez que cada conjunto de proteínas foi corretamente definido quanto as moléculas/ligantes e grau de protonação, cada um dos conjuntos foi posto numa caixa e então solvatado e equilibrado com íons Na⁺ e Cl⁻, sendo agora chamados de sistemas. Cada um dos sistemas foi posto numa caixa triclínica ou cúbica com borda de 5 ou 10 Å de distância do átomo mais distante em cada eixo cartesiano. Então, etapas de equilibração seguidas de dinâmica molecular propriamente dita (livre de restrições de posição) foram executadas seguindo os protocolos para cada *software* de simulação. Ainda, as informações de topologias para cada átomo foram determinadas de acordo com o campo de força utilizado.

3.3. MD Usando o *Software* Gromacs

Para as simulações realizadas no Gromacs (versão 5.0.5), o Campo de Força utilizado foi o Gromos 54a7 (SCHMID *et al.*, 2011) ou CHARMM36m (HUANG *et al.*, 2017). Após os procedimentos executados na preparação do sistema (Seção 3.2), cada sistema foi minimizado utilizando o algoritmo *Steepest Descent* para abaixo de 100 kJ/mol/nm, então foi aplicada restrição de posição dos átomos da BthTX-I e/ou α -tocoferol para as etapas de NVT (volume e temperatura constantes) e NPT (pressão e temperatura constantes). Para a etapa NVT, foram geradas velocidades de forma randômica, onde a temperatura do sistema foi mantida em 310 K e controlada usado o termostato V-rescale (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007) a cada 0,1 ps durante 1 ns, de modo a equilibrar as velocidades dos átomos do sistema. Na etapa NPT, as posições e velocidades finais da NVT foram utilizadas e foi então adicionado o barostato Berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1984), que acomodou o sistema na pressão de 1 bar durante 1 ns. Por fim, livre de qualquer posição de restrição, a simulação foi continuada para simular 100 ns utilizando o termostato Nosé-Hoover (NOSÉ, 1984; HOOVER, 1985) e barostato Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981) – controlando essas variáveis a cada 0,5 ps – uma vez que esses algoritmos permitem um controle mais fino e realista das variáveis termodinâmicas do sistema.

As interações *non-bonded* foram calculadas considerando os átomos vizinhos dentro de 14 Å, enquanto que para as simulações com o Campo de Força CHARMM36m foram selecionados os átomos dentro da faixa de 10 Å em paralelo com de uma função de *switching* para contabilizar as interações de van der Waals até 12 Å. Além disso, os átomos de hidrogênio foram fixados usando a função LINCS (HESS *et al.*, 1997).

3.4. MD Usando o *Software* CHARMM

A preparação das estruturas para simular no CHARMM (versão 41b1) (BROOKS *et al.*, 2009) foi feita através do servidor online CHARMM-GUI (<http://www.charmm-gui.org/>), que trata a estrutura partindo do formato .pdb até a etapa final de simulação, fornecendo os *scripts* e arquivos necessários para cada etapa (JO *et al.*, 2008). As informações espaciais e geométricas (topologias) dos átomos foram definidas através da ferramenta IC (sigla para *Internal Coordinate*), que utilizou do Campo de Força CHARMM36m em sua versão mais recente; e os hidrogênios foram gerados através da ferramenta HBUILD. As informações geométricas do α -tocoferol foram definida através do gerador de topologias CGenFF (VANOMMESLAEGHE *et al.*, 2008). Então cada sistema foi tratado como abordado na seção 3.2. O cálculo das interações *non-bonded*, como van der Waals e eletrostática, foi definida considerando os átomos vizinhos com distância de 10 Å. Uma função de *switching*, foi aplicada de modo a estender as interações de van der Waals até 12 Å. A constante dielétrica do sistema foi definida em 1,0.

Para a etapa de equilíbrio, foi utilizada uma restrição de posição dos átomos com força 1,0 e 0,1 kcal/mol/Å² para os átomos do *backbone* e não-*backbone*, respectivamente, limitando a movimentação da BthTX-I e/ou α -tocoferol. Então foi executada uma etapa de minimização de energia utilizando os algoritmos SD (*Steepest Descent*) e ABNR (*Adopted Basis Newton-Raphson*) por 50 e 100 *steps*, respectivamente, apenas para dar uma suave acomodada dos átomos do sistema. Em seguida, foi adicionado temperatura ao sistema (NVT) através da geração randômica das velocidades do sistema, que foi controlada para ser mantida em 300 K usando o algoritmo VVER com *timestep* de 0,001 ps durante 100 ps. Para as simulações NPT, com *timestep* de 0,002 ps, foi usada a função SHAKE para controlar a geometria dos átomos e fixar os hidrogênios (RYCKAERT; CICCOTTI; BERENDSEN, 1977).

3.5. Cálculo e Seleção dos Modos Normais da BthTX-I

O cálculo dos modos normais da BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol foi feito após a etapa de equilíbrio de temperatura dos sistemas simulados no CHARMM. Cada uma das estruturas foi

então colocada em vácuo, onde foi alterada a constante dielétrica para 2,0, na tentativa de suavizar os efeitos eletrostáticos causados pelo ambiente. Então uma longa etapa de minimização das estruturas foi feita usando o algoritmo ABNR até atingir o gradiente de energia menor que 10^{-6} com os átomos livres de restrição de posição. Feito isto, as estruturas estiveram prontas para o cálculo dos modos normais, que utilizou a ferramenta VIBRAN – módulo do CHARMM que trabalha com as análises vibracionais de moléculas – através da ferramenta DIMB (*Diagonalization With a Mixed Basis*). O DIMB é um algoritmo de cálculo dos modos normais para macromoléculas, dividindo os átomos da proteína em pequenos blocos de átomos (usualmente, em blocos com 200 átomos) e, para cada modo, são calculadas suas características particulares (frequências, autovetores e autovalores) de cada bloco, então esses blocos são combinados para gerar um fator de convergência chamado de “*calling frequency*”, onde a ótima convergência tende a zero (PERAHIA; MOUAWAD, 1995).

A etapa de seleção dos modos pode ser um pouco empírica, pois, ao visualizar os movimentos dos modos, podemos identificar possíveis relevâncias estruturais neles. Entretanto, também é possível fazer algumas análises para mostrar que determinado modo permite uma alta movimentação dos átomos – sendo assim coletivos – como o estudo da flutuação dos átomos, usando a ferramenta FLUCT disponível no VIBRAN. Para este caso, foram selecionados os modos com flutuação média acima de $\sim 0,01$ Å, utilizando o sistema BthTX-I/ α -tocoferol. Para garantir a replicabilidade dos sistemas, os mesmos modos foram selecionados para o sistema BthTX-I.

A flutuação dos átomos pode ser convertida em unidades de fator B, uma unidade mais familiar na área estrutural, através da seguinte equação:

$$fator\ B = \frac{8\pi^2 RMSF^2}{3}$$

Equação 10. Fator B de uma proteína.

Por fim, os modos salvos num arquivo binário .mod, foram utilizados para processar os modos selecionados para gerar arquivos de coordenadas .crd para cada um deles, coordenadas usadas como direção para a excitação das moléculas na etapa de MDeNM.

3.6. Coletividade dos Modos Normais

Para medir os movimentos coletivos/globais, foi-se aplicado uma medida que define o grau de coletividade, κ , para um dado modo. Essa medida descreve o deslocamento em conjunto para N átomos por um vetor (α) de comprimento $3N$:

$$\kappa = \frac{1}{N} \exp\left(-\sum_{i=1}^{3N} \alpha_i^2 \log \alpha_i^2\right)$$

Equação 11. Coletividade de um modo normal.

Dessa forma, se um modo é capaz de mover vários átomos para uma dada direção, tem-se que ele apresenta alta coletividade e, portanto, κ tendendo a 1. Já os movimentos locais, que deslocam uma pequena quantidade de átomos, apresenta um valor de κ tendendo a 0 (BAHAR *et al.*, 2010).

3.7. Teoria da Dinâmica Molecular excitada com Modos Normais (MDeNM)

A implementação da técnica de MD hibridizada com NM permite que velocidades adicionais, geradas a partir das direções dos modos normais da proteína, sejam incluídas no sistema durante a simulação de MD, impulsionando a proteína para tal direção e, conseqüentemente, ampliando seu espectro conformacional (COSTA *et al.*, 2015). No presente trabalho, essa técnica foi aplicada sofrendo algumas alterações, que serão detalhadas abaixo.

A etapa inicial da técnica consiste em determinar a direção de excitação, determinada pelo vetor $\mathbf{Q}$. Para isso, os n modos selecionados foram combinados/somados com através da multiplicação com um fator randômico (-1 a 1), α , seguindo a equação abaixo:

$$\mathbf{Q} = \sum_{i=1}^n \alpha_i \mathbf{q}_i$$

Equação 12. Definição do vetor ($\mathbf{Q}$) resultante da combinação de n modos normais.

Como as combinações dos n vetores é randômica, uma etapa de seleção dos modos foi aplicada. Uma vez que $\mathbf{Q}_1$ foi gerado, ele é projetado nesta direção por exatamente 1 Å. Então, quando um segundo vetor $\mathbf{Q}_2$ for gerado, sob as mesmas condições, ele será comparado com o vetor $\mathbf{Q}_1$ através do cálculo de RMSD. Quando o vetor $\mathbf{Q}_3$ for gerado, ele será comparado com os vetores $\mathbf{Q}_1$ e $\mathbf{Q}_2$, e assim consecutivamente. Os vetores que apresentarem RMSD abaixo de um determinado corte, será descartado e então um novo $\mathbf{Q}_n$ será gerado até preencher as direções possíveis do espaço conformacional.

Para cada vetor $\mathbf{Q}$ encontrado, deve-se então determinar a velocidade ($\mathbf{v}_{nm}$) que ele fornecerá aos átomos do sistema. Isso é feito pela adição de uma temperatura externa (T_{input}),

definida pelo pesquisador, determinada em Kelvin (K). Essa temperatura é dividida pela temperatura do sistema causada por Q (ΔT_{nm}), medida através de uma curta simulação, usando Q como as velocidades do sistema. Esse fator é multiplicado por Q para obter v_{nm} :

$$v_{nm} = \left(\frac{\sqrt{T_{input}}}{\Delta T_{nm}} \right) Q$$

Equação 13. Velocidade do modo normal (v_{nm}).

Finalmente, essa velocidade é incorporada ao sistema de modo a obter a velocidade total (V_{total}) do sistema, através da soma da velocidade atual do sistema ($v_{sistema}$):

$$V_{total} = v_{sistema} + v_{nm}$$

Equação 14. Definição da velocidade total do sistema para a MDeNM.

Com a velocidade do sistema definida, é então aplicada a simulação propriamente dita, em tempos bastante curtos (ps). O final dessa simulação é então utilizada para uma nova etapa de excitação, adicionando novamente v_{nm} à velocidade do sistema por m vezes.

3.8. Aplicação da MDeNM na BthTX-I

No presente trabalho, foi feita uma busca por 100 vetores – ou réplicas – de excitação Q através da combinação randômica dos modos 7 ao 14 em até 48 horas, o que rendeu em torno de 20 mil tentativas de combinações. Dessa forma, foram encontrados 54 vetores para o sistema BthTX-I e 48 vetores para o BthTX-I/ α -tocoferol. Cada vetor/réplica foi excitado(a) com um T_{input} de 3 K, temperatura necessária para promover o impulsioneamento da estrutura. Por fim, cada réplica foi re-excitada por 10 vezes. As estruturas finais das excitações foram salvas e usadas para uma etapa de 50 ps de simulação livre de qualquer ação externa, com a finalidade de relaxar a estrutura excitada, preenchendo ainda mais o espaço conformacional.

3.9. Análise Estruturais

Para analisar as estruturas geradas das simulações, algumas ferramentas foram utilizadas, como o RMSD (*Root Mean Square Deviation*) e RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) da BthTX-I. O RMSD determina a variação média das posições de N átomos de uma estrutura (r) em relação a uma estrutura referência (w) após o alinhamento delas, sendo assim, todos os frames de uma

trajetória – organizados temporalmente – são alinhados a uma estrutura referência e então calculado o RMSD. O efeito desse cálculo descreve a variação da estrutura ao longo do tempo e pode trazer informações relevantes quanto a modificações estruturais e estados conformacionais. Sua equação pode ser descrita como:

$$RMSD(r, w) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - w_i)^2}$$

Equação 15. Definição da medida de RMSD.

Já o RMSF, descreve o desvio de N átomos durante um dado tempo (T) de várias posições (r) de uma estrutura, após o alinhamento delas, como no RMSD. Uma vez que a medida leva em consideração o tempo, o resultado diz respeito a quanto os átomos da estrutura oscilaram ao longo do tempo, de forma global, trazendo informações de regiões da proteína que sofreram mais ou menos alterações espaciais. Sua equação segue a mesma ideia do RMSD:

$$RMSF = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (r(t_j) - r)^2}$$

Equação 16. Definição da medida de RMSF.

Outra medida levada em conta nas análises foi o Raio de Giro (R_g), que determina a extensão da proteína no espaço euclidiano (X , Y e Z), através das posições (r) de N átomos ao centro de massa (COM) da proteína, podendo trazer informações de alterações do grau de compactação da proteína – se tornando mais globular ou alongada – ao longo da simulação. Essa medida pode ser descrita por:

$$R_g = \sqrt{\sum_{i=1}^N (r_i - r_{COM})^2}$$

Equação 17. Definição da medida de R_g .

Ainda, foi calculada a área acessível ao solvente, chamada de SASA (*Solvent-Accessible Surface Area*), que traz informações de regiões da superfície da proteína que estão em contato com o solvente, tendo sido expostas após alterações conformacionais da molécula. Por fim, na intenção de descrever o padrão conformacional das simulações, foi aplicado uma medida de Energia Livre

(G), que descreve a probabilidade da proteína visitar diversos estados, utilizando a ferramenta *gmx sham*, disponível no GROMACS. Essa medida define um histograma de probabilidades (função densidade de probabilidade) para cada estado alcançado considerando as variáveis selecionadas para a análise – no presente trabalho foi utilizado RMSD e Rg. Dessa forma, é possível fazer uma representação da densidade dos estados da proteína, definindo os estados mais visitados, e, portanto, mais favoráveis energeticamente. Essa medida também é chamada de FEL (*Free Energy Landscape*) ou PMF (*Potential of Mean Force*).

3.10. Análise da Interface Dimérica

O dímero da BthTX-I apresenta duas regiões próximas, que possuem importância estrutural e, portanto funcional. Dessa forma, foi padronizado uma medida de distância, em Ångström (Å), para alguns desses domínios. Por exemplo, a interação entre a região C-terminal e a Hélice-I de cada monômero foi analisada como uma forma de identificar o grau de liberdade do domínio MDiS, considerado importante para a expressão do efeito miotóxico, como previamente discutido. Para isso, foi definido o centro de massa de cada um dos domínios para i) a Hélice-I, os resíduos de 1 a 4; e ii) o MDiS, os resíduos Leu111 e Phe114 (Figura 8). Para esta medida, foi dado o nome de HMdist.

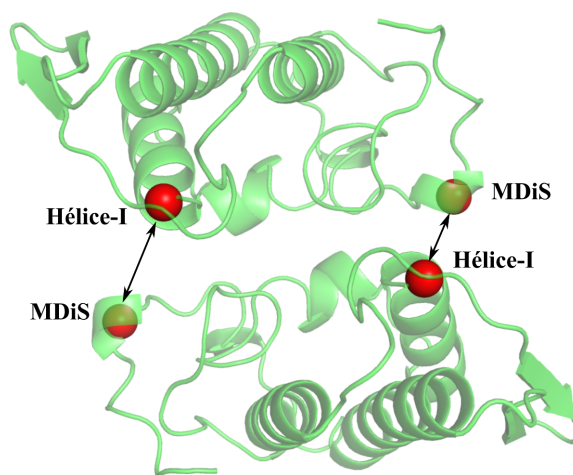


Figura 8. Distâncias entre as Hélices-I e MDiS (HMdist) entre os monômeros da BthTX-I (verde) definidas pelo centro de massa (COM) de cada uma das regiões (esferas vermelhas). Imagem gerada pelo Pymol (DELANO, 2002).

Além disso, também foi contabilizada a quantidade de interações presentes na interface dimérica, onde apenas interações dos átomos (exceto hidrogênio) entre monômeros foram contabilizadas, considerando apenas aquelas com distância abaixo de 4,5 Å.

3.11. Análise dos Ângulos entre Monômeros

Para as medidas de ângulos da BthTX-I, foi calculada a disposição dos monômeros no dímero da BthTX-I com o objetivo de determinar padrões entre os estados considerados nativo e inativo, além de realizar medidas da distância do MDiS para um plano de moléculas de sulfato (SO_4), considerado como a representação da superfície de uma bicamada lipídica. Tais medidas foram desenvolvidas e publicadas por Borges, Lemke e Fontes (2017).

Para determinar a disposição dos monômeros, foram definidos três eixos, chamados de *Roll*, *Tilt* e *Twist*. *Roll* foi definido baseado na Hélice-II, onde sete carbonos (98 ao 108) foram escolhidos para determiná-lo, partindo do carbono- α 98. O segundo eixo foi estendido partindo do carbono- α 98 em direção ao carbono- α 48 (*Twist*) e, por fim, um eixo normal a esse plano gerado foi definido como *Tilt*, atingindo então o espaço euclidiano (Figura 9A). O presente trabalho buscou estudar apenas os ângulos *Roll* e *Tilt*, uma vez que o *Twist* não apresentou relevância na determinação estrutural (BORGES; LEMKE; FONTES, 2017). Já a disposição do plano da membrana foi definido através da seleção dos centros de massa das moléculas de SO_4 co-cristalizadas com miotoxinas PLA_2 s-homólogas (Figura 9B). Esta medida foi chamada de DSO4.

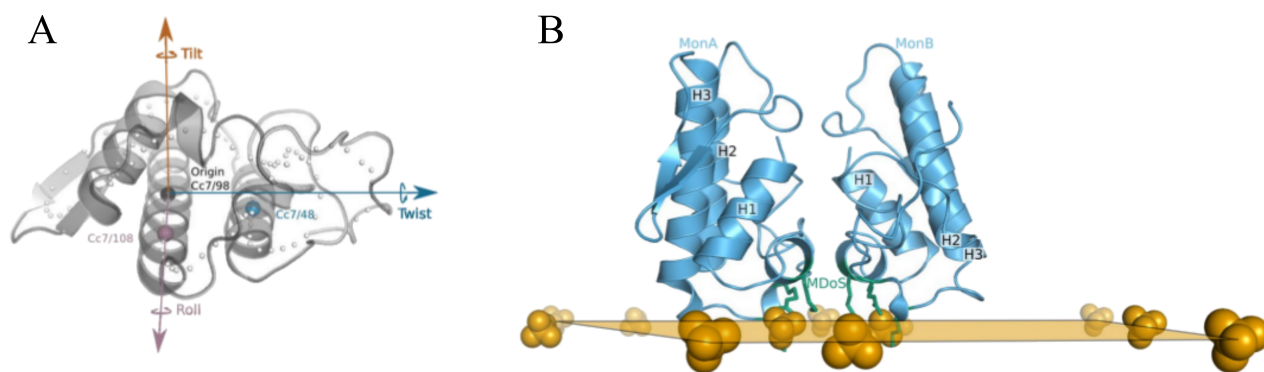


Figura 9. Determinação dos eixos *Roll* (roxo), *Tilt* (laranja) e *Twist* (azul) para uma PLA_2 s-homólogas (A) e determinação do plano (retângulo em laranja) de SO_4 (esferas em laranja). Retirado de Borges, Lemke e Fontes (2017).

Por fim, foi calculado o coeficiente de correlação (R) para as medidas de ângulo e a de DSO4 a fim de buscar alguma relação entre tais medidas, sendo possível relacioná-las com aspectos estruturais e funcionais da BthTX-I. As medidas foram feitas sempre aos pares utilizando a ferramenta CORREL, do Libreoffice (versão 5.2.7.2).

3.12. Experimentos em Solução da BthTX-I

A BthTX-I foi obtida através do isolamento do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*, coletado pelo CETA (Centro de Extração de Toxinas Animais, Morungaba/SP). O veneno foi então submetido a etapas de Cromatografia para obter a BthTX-I em sua forma pura, que foi confirmado por Eletroforese. Em seguida, o estudo do comportamento em solução da BthTX-I e sua forma nativa ou em complexo com o α -tocoferol – obtido pela Sigma Aldrich – foi feito através de medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

3.12.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O procedimento para a obtenção da BthTX-I do veneno bruto foi realizado de acordo com o protocolo desenvolvido por Cardoso e colaboradores (2018), o qual consiste numa etapa de cromatografia de exclusão molecular seguida por outra etapa de cromatografia de fase reversa. A cromatografia de exclusão molecular foi feita utilizando o equipamento de HPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare), utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL(GE Healthcare). 10 mg do veneno bruto foram solubilizados em 500 μ L de uma solução de bicarbonato de amônio (50 mM, pH 7,9) e então injetado no sistema a um fluxo de 0,5 mL/minuto. Apenas os picos correspondentes à BthTX-I foram coletados, dialisados e então submetidos à etapa de cromatografia de fase reversa. Nesta, o equipamento UFLC Prominence (Shimadzu) foi utilizado, com a coluna Shim-Pack CLS-ODS (M) (Shimadzu), realizando um gradiente de acetonitrila de zero a 100% em TFA 0,1% num fluxo de 1 mL/minuto. Em seguida, a amostra de BthTX-I proveniente da exclusão molecular foi solubilizada em 500 μ L de TFA 0,1% e injetada no equipamento. A amostra final foi dialisada novamente e então liofilizada. A confirmação da pureza da BthTX-I foi feita através da técnica de Eletroforese.

3.12.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para confirmar a purificação da BthTX-I, foi realizada uma etapa de Eletroforese em Gel de PoliAcrilamida (PAGE, do inglês, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) com agente desnaturante Dodecil Sulfato de Sódio (SDS, do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate*).

A técnica consiste na construção de um gel de concentração (poliacrilamida 6%, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS 0,1%) e um gel de separação (poliacrilamida 15%, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS 0,1%), além de persulfato de amônio 10% e tetrametiletenodiamina (TEMED). Os géis foram montados num sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). A amostra obtida da etapa de HPLC foi então solubilizada em Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%,

SDS 2% e azul de bromofenol 0,001%; então submetida a aquecimento em 95° C por 5 minutos e então aplicadas no gel. A confirmação da massa molecular da amostra foi feita através da utilização de uma amostra com padrão da Thermo Scientific (com proteínas de massas moleculares de 10 a 250 kDa). A corrida de eletroforese foi feita em potencial constante de 70 V em solução tampão de Tris-HCl 0,025 M, glucina 0,19 M e SDS 0,1% pH 8,3 durante aproximadamente 2,5 horas. Por fim, o gel foi corado em solução de Coomassie Blue R250 (Bio-Rad) 0,1%, ácido acético 10% e etanol 50% e descorado em solução de ácido acético 10% e etanol 30%.

3.12.3. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O DLS é uma técnica que permite determinar o tamanho de moléculas, como as proteínas, numa solução através do comportamento de difusão translacional dessa molécula proveniente do seu movimento browniano. Uma importante medida provida por essa técnica é o raio hidrodinâmico da molécula (R_H), que permite determinar estados oligoméricos ou até conformacionais das moléculas (FERRÉ-D'AMARÉ; BURLEY, 1994).

Os experimentos de DLS para a BthTX-I foram realizados em concentração de 2,5 mg/mL e temperatura de 25° C em condições de solução em pH solução ácida (formato de amônio 50 mM, pH 3,5) e básica (bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,0). Para o pH básico, foram realizados ensaios da BthTX-I nativa ou em complexo com o α -tocoferol. Para os experimentos com o ligante, foram estudadas diferentes proporções dímero/ α -tocoferol, como 1:05, 1:1 e 1:10 de modo a tentar entender o efeito do ligante no comportamento da BthTX-I. Para cada medida, foram realizadas cem aquisições utilizando o equipamento DynaPro™ Titan (Wyatt Technology) e analisadas no *software* Dynamics 6.10.

3.13. Geração de Gráficos, Tabelas e Imagens

A parte gráfica do trabalho foi desenvolvida através da utilização das seguintes ferramentas: (i) Gnuplot (versão 5.0), para a confecção dos gráficos, buscando sempre tratar as curvas de modo a suavizá-las através da ferramenta Bezier; (ii) Inkscape (versão 0.92.1) ou GIMP (versão 2.8.18) para confeccionar e processar imagens; (iii) LibreOffice (versão 5.2.7.2), utilizado comumente para fazer medidas simples de média, somatório e desenvolvimento de tabelas; e (iv) Pymol (versão 1.8.4) (DELANO, 2002) e VMD (versão 1.9.3), na geração dos modelos estruturais, bem como os modelos de direção dos modos normais calculados.

4. RESULTADOS

4.1. Estabilidade Dimérica da BthTX-I

Para estudar a estabilidade da BthTX-I em forma dimérica, foram realizadas simulações de MD de 100 ns com todos os átomos livres de restrição para que as interações físico-químicas deles pudessem chegar a padrões conformacionais em pHs 4 e 8. Para o pH 4, vários resíduos de aminoácidos sofreram protonação, como os resíduos Glu12, Asp38, Asp41, Glu84, Glu87, Asp89 e Glu98 (Figura 10A). A maioria desses resíduos se encontraram localizados na superfície da proteína, interagindo com o solvente; já os resíduos Asp41 e Asp89 se encontraram localizados em regiões internas da proteína consideradas importantes, como a Hélice-I e o *loop* de Ca^{++} (Figura 10B). Além disso, os resíduos de histidina 48 e 110 sofreram protonação (exceto a His48 do monômero B), também localizados nessas regiões (Figura 10B). Já para o estado de pH 8, apenas três resíduos de lisina foram desprotonados, sendo eles Lys49 e Lys60 do monômero A e 112 do monômero B (Figura 10C).

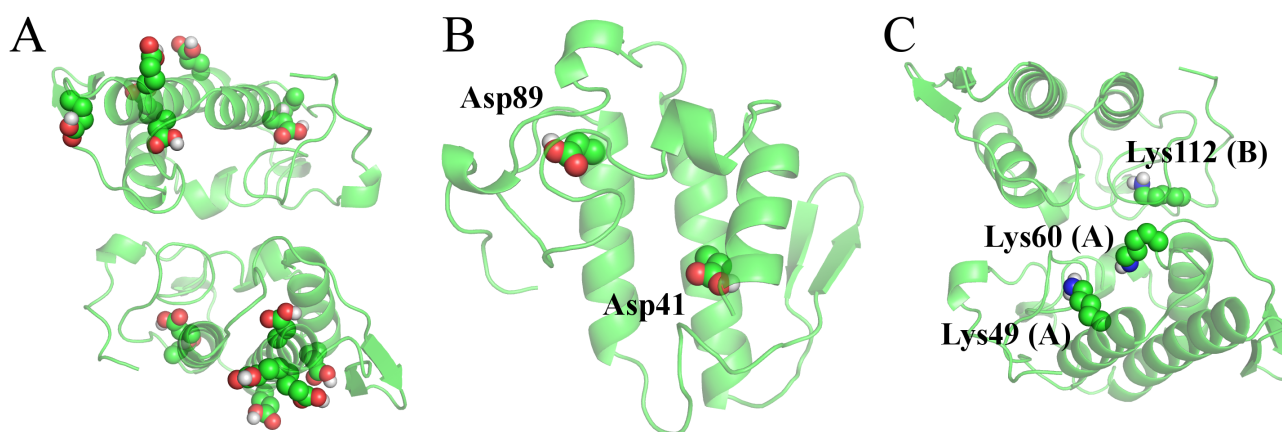


Figura 10. Representação dos resíduos (esferas) protonados para o pH 4 (A e B) e 8 (C) da BthTX-I. Os átomos de oxigênio, nitrogênio e carbono são representados pelas esferas em vermelho, azul e verde, respectivamente. Imagem gerada pelo Pymol (DELANO, 2002) usando transparência de 40% para as estruturas secundárias e escala do tamanho das esferas de 0,7.

O estado de pH 4 indicou que a BthTX-I recebesse grande quantidade de prótons, resultando em sua dissociação dimérica. A instabilidade estrutural da BthTX-I pode ser observada através do padrão de RMSD, que sofre oscilação até 50 ns e então se mantém alto, apresentando

valor médio de $6,17 \pm 1,18$ Å (Figura 11A, linha vermelha). Já as simulações no estado de pH 8 fez com que a BthTX-I apresentasse maior estabilidade, mantendo sua conformação dimérica ao longo de toda a simulação, e, conseqüentemente, apresentou menor valor de RMSD, com $3,83 \pm 0,31$ Å (Figura 11A, linha preta). Em busca das regiões com maiores alterações conformacionais, foi calculado o RMSF da BthTX-I para ambos os estados. Como esperado, o modelo de pH 4 apresentou, de modo geral, maiores valores em todas as regiões quando comparado com o modelo em pH 8; porém vale destacar a alta flutuação nas caudas C-terminal de ambos os monômeros (~ 100 -121 e ~ 220 -242) em relação ao estado de pH 8 (Figura 11B).

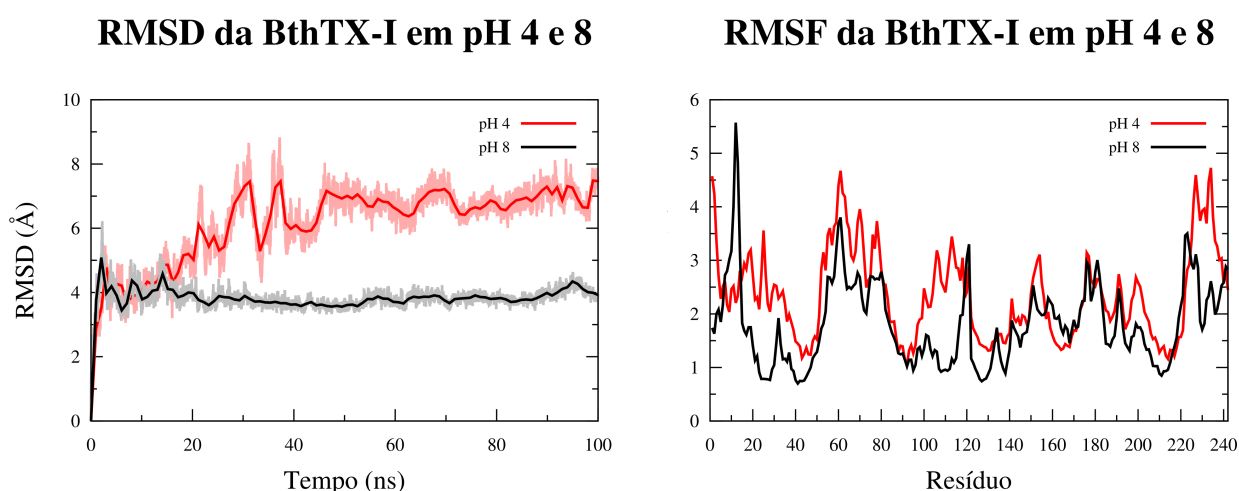


Figura 11. Padrão de RMSD (esquerda) e RMSF (direita) da BthTX-I em pH 4 (linha vermelha) e 8 (linha preta). No gráfico de RMSD foi aplicada uma função de suavização de cada curva (cores claras), chamada bezier. Para o RMSF, os resíduos da BthTX-I de cada monômero (resíduo de 1 a 121) foram colocados em sequência, resultando assim numa faixa de 1 a 242 resíduos.

Outra medida interessante aplicada para essas simulações foi a disposição das regiões de Hélice-I e MDiS – sempre considerando uma região de um monômero em relação a outra região do outro – um bom indicativo na identificação da estabilidade conformacional da BthTX-I, chamada no presente trabalho de HMdist. Novamente, foi possível observar altos valores de distâncias entre tais regiões, destacando-se a distância média entre as regiões (aos pares) de aproximadamente 5 Å a mais, atingindo $17,76 \pm 1,33$ Å, quando comparado com a BthTX-I em pH 8 (Figura 12A). Essa medida está altamente relacionada com um movimento de translação do monômero A e isso pode ser observado também pela medida de Rg do dímero, que tendeu a aumentar. Em contrapartida, o Rg da BthTX-I em pH 8 se manteve ao longo dos 100 ns de MD (Figura 12B).

HMdist da BthTX-I em pH 4 e 8

Raio de Giro da BthTX-I em pH 4 e 8

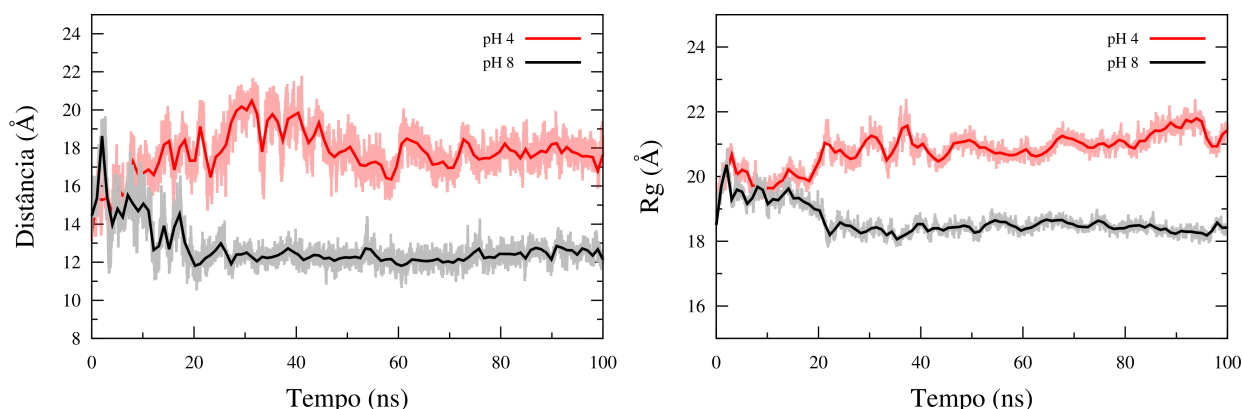


Figura 12. Padrão de medidas HMdist (esquerda) e Rg (direita) para a BthTX-I em pH 4 (linhas em vermelho) e 8 (linhas em preto). Para ambos os gráficos, foi aplicada uma função de suavização de cada curva (cores claras), chamada bezier.

Além disso, a mudança de estado para a simulação em pH 4 pode ser observado também pela contagem do número de interações entre os monômeros, onde o modelo em pH 4 apresentou redução considerável no número de interações enquanto que o número de interações dimérica para a simulação em pH 8 foi capaz de manter e até aumentar o número de interações, mostrando o aumento da interação entre os monômeros (Figura 13).

Nº de Contatos da BthTX-I em pH 4 e 8

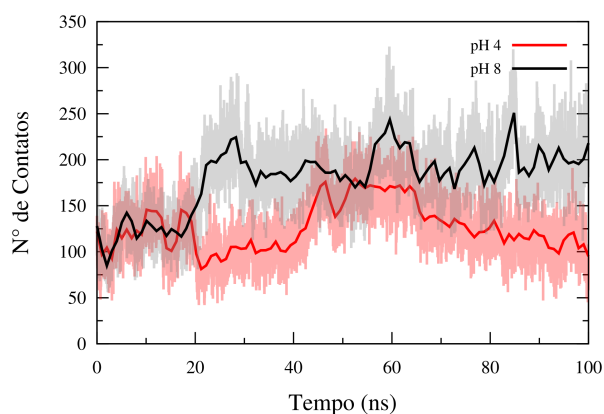


Figura 13. Número de contatos entre os monômeros da BthTX-I para o sistema em pH 4 (linha em vermelho) e 8 (linha em preto). Foi aplicada uma função de suavização de cada uma das curvas (cores claras), chamada bezier.

Todas essas medidas explicam, em detalhes, a diferença do comportamento estrutural da BthTX-I em diferentes condições de pH, onde a instabilidade dimérica é observada em pH 4 ao passo que a BthTX-I em pH 8 apresentou maior estabilidade conformacional. As estruturas após 100 ns de MD podem ser observadas na Figura 14, sendo possível observar o deslocamento do monômero A causando o aumento do HMdist (valor médio = $26,28 \pm 2,95$ Å).

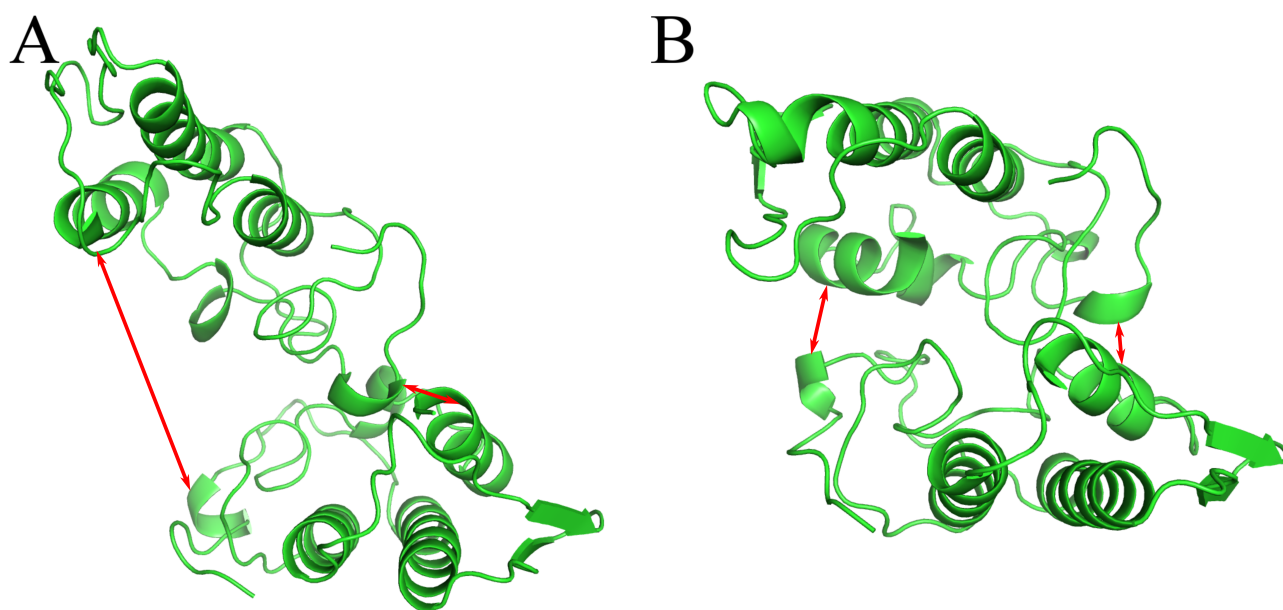


Figura 14. Estruturas da BthTX-I após 100 ns de MD para pH 4 (A) e 8 (B). HMdist estão representados pelas setas em vermelho. Imagem gerada pelo Pymol (DELANO, 2002).

4.2. Modos Normais da BthTX-I

No presente trabalho, foram calculados 200 bases de modos normais, resultando em 103 graus de liberdade/vetores ($(n^{\circ} \text{ de modos} + 6) / 2$). Em busca de estudar os movimentos globais (alta amplitude), os modos foram então selecionados de acordo com a flutuação causada na estrutura e frequência de cada modo. Para a flutuação, é interessante notar que, através do deslocamento dos átomos para cada modo, expresso através de um vetor 3N, pode-se ter ideia do quanto cada modo é capaz de deslocar a proteína. Sendo assim, os modos de alta amplitude seriam identificados por causarem alta flutuação ao passo que os modos de baixa amplitude resultariam em baixa flutuação. Levando em consideração a frequência de cada modo, tem-se que os modos de movimentos globais apresentam baixa frequência, enquanto que os modos de movimentos locais apresentam alta frequência, podendo até desestruturar estruturas secundárias.

Dito isso, inicialmente foi definido o sistema BthTX-I/ α -tocoferol como base para selecionar os modos a serem usados na MDeNM. Assim, foi tomada atenção em selecionar modos de flutuação média até próximo de 0,01 Å, pois abaixo disso os movimentos se tornariam pouco condizentes com modos de movimentos globais. Por isso, foram escolhidos os modos de 7 a 14, com flutuação de 0,3 a 0,08 Å e frequências de 1,67 a 7,06 cm⁻¹, respectivamente. Para o sistema BthTX-I, esses mesmos modos apresentaram flutuação de 0,17 a 0,076 Å e frequência de 2,57 a 5,89 cm⁻¹ (Tabela 2). A figura 15 apresenta a flutuação dos modos normais para a BthTX-I e o complexo BthTX-I/ α -tocoferol. Nota-se que a presença do α -tocoferol favorece uma flutuação mais homogênea dos resíduos da BthTX-I pra os modos mais baixos; por outro lado, sua ausência permite que a proteína alcance flutuações maiores em modos normais mais altos.

Flutuação dos Modos Normais

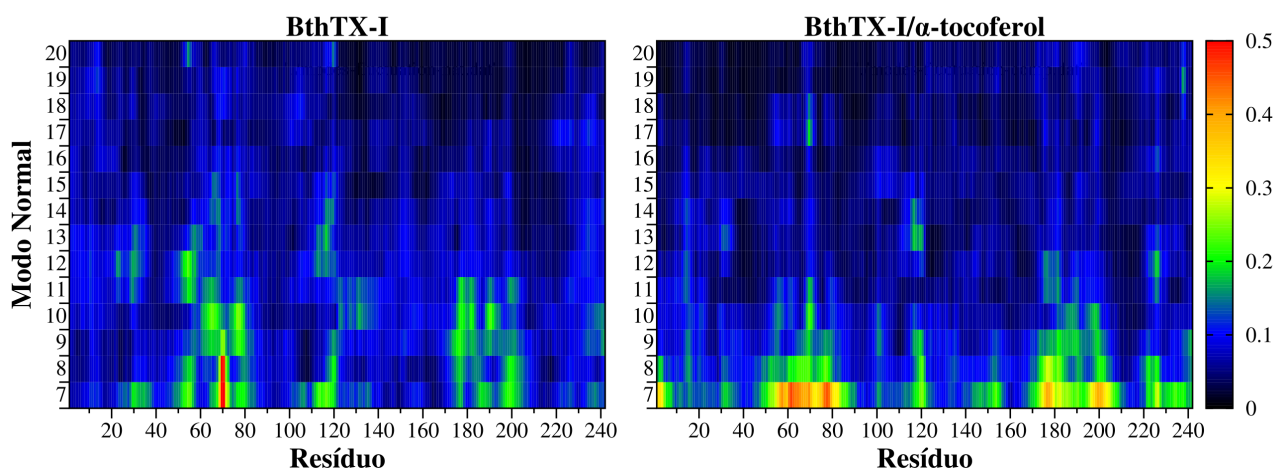


Figura 15. Flutuação dos modos normais 7 ao 20 para os sistemas BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol, onde flutuações baixas tendem para o preto, enquanto que flutuações altas tendem para o vermelho. Os resíduos da BthTX-I de cada monômero (resíduo de 1 a 121) foram colocados em sequência, resultando assim numa faixa de 1 a 242 resíduos.

Outra medida importante na seleção dos modos é a coletividade, que descreve a capacidade de um dado modo mover vários átomos em conjunto para uma dada direção. Dessa forma, os modos selecionados para a BthTX-I/ α -tocoferol apresentaram coletividade entre 0,2 e 0,5. Já o sistema BthTX-I apresentou valores de coletividade maiores, com exceção do modo 8, entre 0,5 e 0,7 (Tabela 2). Em relação ao modo 8, embora tenha apresentado baixa coletividade, sua frequência foi baixa, com um movimento similar ao do sistema BthTX-I/ α -tocoferol, justificando sua manutenção nos cálculos. É interessante notar que o grau de coletividade para a BthTX-I foi maior na ausência do α -tocoferol, o que sugere maior liberdade da proteína na ausência do ligante.

Tabela 2. Flutuação (Å), frequência (cm⁻¹) e coletividade dos modos normais 7 ao 14 para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol.

Modo Normal	Modos Normais					
	BthTX-I			BthTX-I/ α -tocoferol		
	Flutuação	Frequência	Coletividade	Flutuação	Frequência	Coletividade
7	0,20	2,57	0,66	0,30	1,67	0,37
8	0,16	3,31	0,06	0,17	2,99	0,46
9	0,13	3,88	0,54	0,14	3,73	0,42
10	0,13	4,13	0,50	0,11	4,53	0,44
11	0,12	4,32	0,61	0,09	5,74	0,38
12	0,11	4,61	0,68	0,09	5,96	0,30
13	0,09	5,60	0,58	0,08	6,43	0,38
14	0,09	5,89	0,63	0,08	7,06	0,27

Além dessas medidas, também foi levada em consideração a direção de cada modo através da análise visual de suas trajetórias, pois dessa forma é possível selecionar os movimentos provavelmente relacionados com alterações conformacionais importantes para a BthTX-I. Por exemplo, o modo 7 apresentou um movimento de translação dos monômeros para lados opostos, sugerindo que tal modo parece estar relacionado com movimentos de ativação e desativação da BthTX-I, uma vez que ele torce os monômeros de modo a expor/guardar os MDiS (Figura 16A e Apêndice, Vídeo 1). Por outro, o modo 10 apresentou movimentos diferentes, aproximando/distanciando os monômeros nas regiões entre a Hélice-I e o MDiS do monômero oposto. Tal movimento foi responsável por expor/guardar os MDiS, porém num sentido diferente, se distanciando/aproximando da Hélice-I (Figura 16B e Apêndice, Vídeo 2).

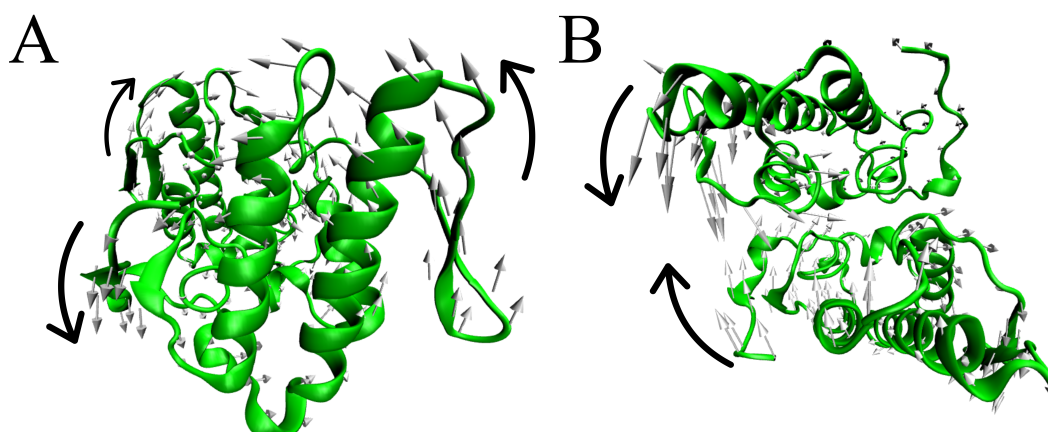


Figura 16. Direções gerais de movimentos da BthTX-I para os modos 7 (A) e 10 (B), indicadas pelas setas em preto. Em B houve uma rotação no plano para mostrar a parte superior da proteína. Setas em cinza representam o sentido de direção para cada carbono alfa. Imagem gerada pelo VMD.

A exposição dos MDiS também pode ser observada através do cálculo de SASA para esses resíduos utilizando as trajetórias (50 estruturas) de cada modo. De acordo com a Figura 17, é possível ver que o modo 7 é capaz de expor o MDiS A com maior eficiência que o modo 10.

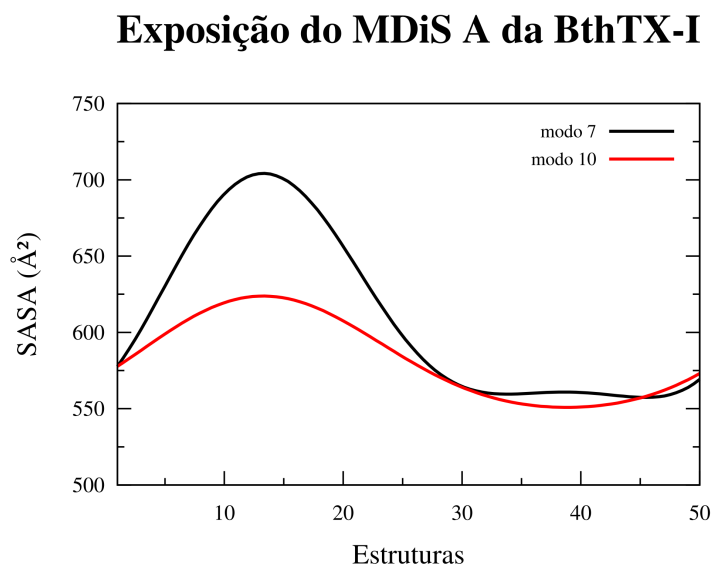


Figura 17. Cálculo de SASA do MDiS do monômero A da BthTX-I para as trajetórias geradas pelos modos 7 e 10.

4.3. MDeNM

As simulações de MDeNM para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol apresentaram uma gama de estruturas, que foram analisadas de forma atemporal, já que a técnica faz simulações curtas partindo do mesmo ponto inicial (estrutura equilibrada), e então impulsionando a proteína para várias direções (vetores), oriundas da combinação dos modos normais. Esse impulso é dado através da adição de temperatura, convertida em energia cinética no sistema simulado, como explicado na metodologia. Tais eventos podem ser observados através da medição da temperatura do sistema, onde cada pico representa uma etapa de excitação da estrutura (Figura 18).

Inicialmente, o conjunto de estruturas foi analisado de forma geral e então alguns aspectos estruturais foram analisados com maior profundidade. Dessa forma, esta seção foi dividida em pequenos fragmentos, com a finalidade de garantir a coesão das etapas realizadas nessa análise.

Temperatura do Sistema na MDeNM

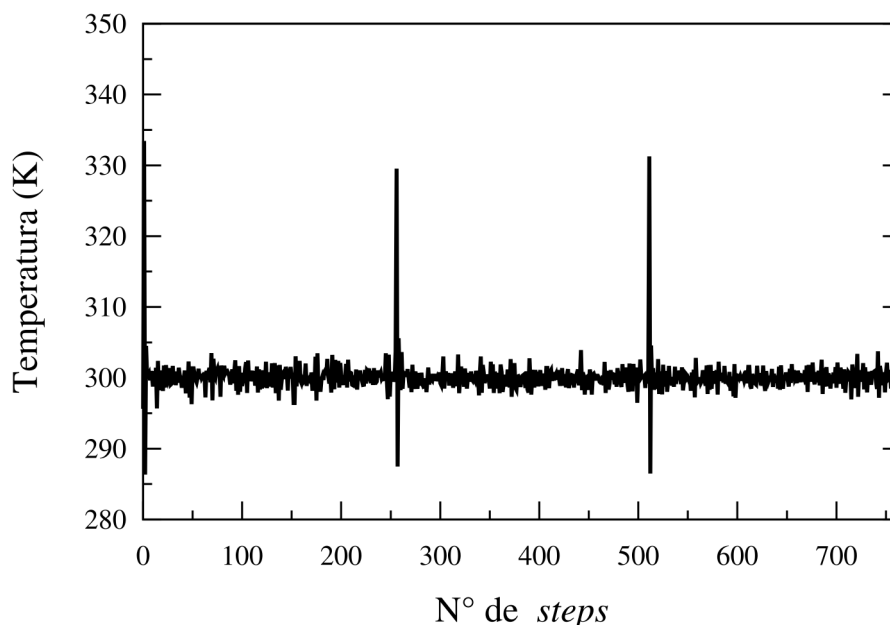


Figura 18. Temperatura do sistema numa simulação de MDeNM, onde é mostrado input de energia cinética proveniente do vetor resultante da combinação dos modos para três etapas de excitação (exc 1, exc 2 e exc 3), representado pelos picos. Exemplo retirado da réplica 1 para o sistema BthTX-I.

4.3.1. Diversidade Estrutural da BthTX-I

Para as simulações de MDeNM, ambas BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol foram excitadas ao longo de várias direções, definidas através da combinação dos modos 7 ao 14. No total, foram geradas 54 e 48 direções para cada sistema, respectivamente. Essas direções foram definidas através de combinações randômicas dos modos normais, onde apenas as combinações que diferiram entre si acima de 1,5 Å foram selecionadas. Essa seleção permite uma melhor distribuição das direções, otimizando o preenchimento do espaço conformacional da proteína. Cada uma das direções foi excitada seguindo o protocolo descrito na seção 3.8: dez excitações adicionando 3 K de temperatura para cada modo combinado; após as excitações, uma etapa de relaxamento das estruturas geradas foi aplicado com duração de 50 ps para cada uma delas.

Como a técnica de MDeNM é atemporal, fez-se necessário analisar as estruturas geradas num contexto de grupo de estruturas. Para medir a diversidade estrutural da BthTX-I, foi realizado um cálculo de Energia Livre das estruturas, utilizando as variáveis RMSD e Rg de modo a descrever a disposição conformacional de cada sistema nessas duas dimensões.

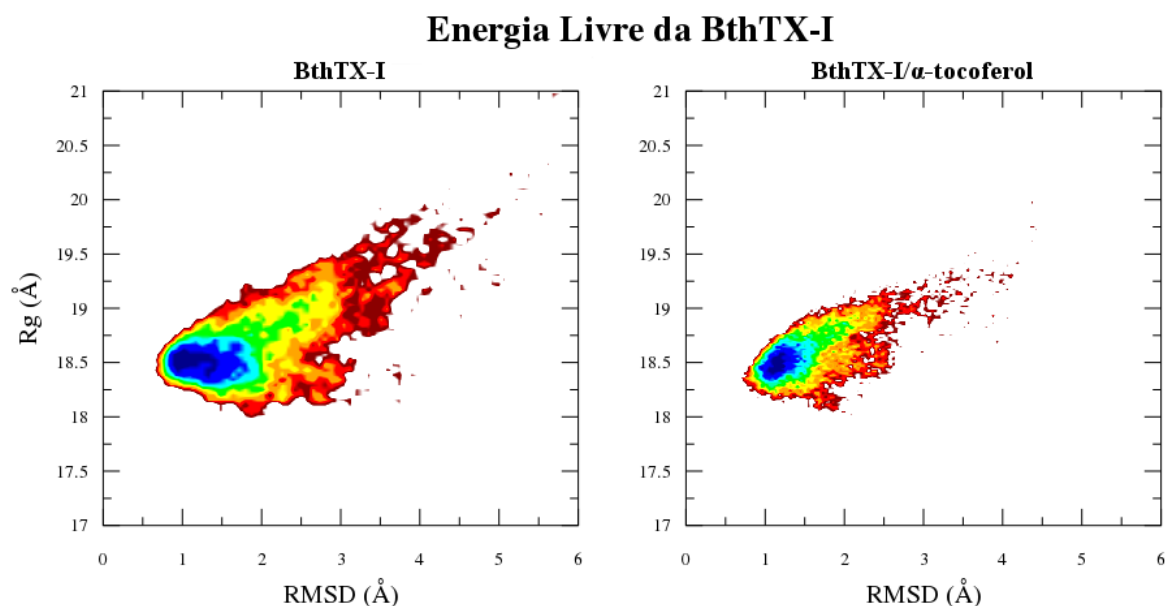


Figura 19. Perfil bidimensional de Energia Livre (kcal/mol) da BthTX-I, à esquerda, e da BthTX-I/ α -tocoferol, à direita, utilizando RMSD (eixo X) e Rg (eixo Y). Estruturas geradas pela MDeNM após relaxamento de 50 ps de MD. Valores de energia variando de zero a 8,77 e 7,77 kcal/mol para BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol, respectivamente. Os estados mais visitados tendem a se localizarem nas regiões tendendo ao azul, enquanto que os menos visitados, nas regiões tendendo ao vermelho.

Como é possível observar na Figura 19, a distribuição conformacional da BthTX-I foi bem maior em comparação ao sistema BthTX-I/ α -tocoferol, onde o primeiro sistema atingiu altos valores de RMSD e Rg, como acima de 5 e 20 Å, respectivamente. Por outro lado, ambos os sistemas apresentaram os estados conformacionais mais visitados próximos, com Rg em torno de 18,5 Å e RMSD próximo da estrutura inicial (~ 1 Å). Isso mostra que, para as simulações de MDeNM, a conformação mais presente encontra-se em torno dessa região. Outro ponto interessante a ser notado é a importância do ligante para estabilizar a BthTX-I, onde o α -tocoferol foi capaz de restringir os movimentos da proteína para as direções excitadas.

Embora essa alta diversidade estrutural tenha sido gerada, deve-se destacar que as conformações geradas pela MDeNM são fruto da diversidade quaternária da BthTX-I, pois as estruturas secundárias e terciárias sofreram baixa alteração conformacional, como é possível observar através dos baixos valores de desvio padrão para o RMSD e porcentagem de estrutura secundária para ambos os sistemas (Tabela 3).

Tabela 3. RMSD (Å) para ambos os monômeros (A e B) e porcentagem (%) de estruturas secundárias para o dímero da BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol.

	BthTX-I	BthTX-I/ α -tocoferol
	RMSD	
Monômero A	0,78 $\pm$ 0,14	0,83 $\pm$ 0,09
Monômero B	0,81 $\pm$ 0,09	0,78 $\pm$ 0,08
	Porcentagem de Estrutura Secundária	
Hélices- α	38,76 $\pm$ 1,62	39,62 $\pm$ 1,44
Folhas- β	7,10 $\pm$ 0,93	8,10 $\pm$ 0,91

A habilidade da BthTX-I atingir vários estados conformacionais utilizando a técnica de MDeNM foi corroborada através da análise dos ângulos entre os monômeros. Nessa medida, a disposição dos monômeros é calculada, permitindo a identificação de estados conformacionais, bem como a oscilação entre estados ativo e inativo. Como discutido por Borges *et. al.* 2017, as PLA₂s-homólogas apresentam dois estados conformacionais definidos pela cristalografia, onde é possível descrever um padrão de orientação dos monômeros diferentes entre os estados ativo e inativo, apresentando *Roll* x *Tilt* de aproximadamente 178° x 28° e 141° x 54°, respectivamente. O padrão de distribuição dos ângulos *Roll* x *Tilt* pode ser observado na Figura 20, onde mostra, novamente, que a BthTX-I foi capaz de atingir configurações de ângulos maiores, notadamente próximas às regiões de *Roll* igual a 200° e *Tilt* igual a -10°.

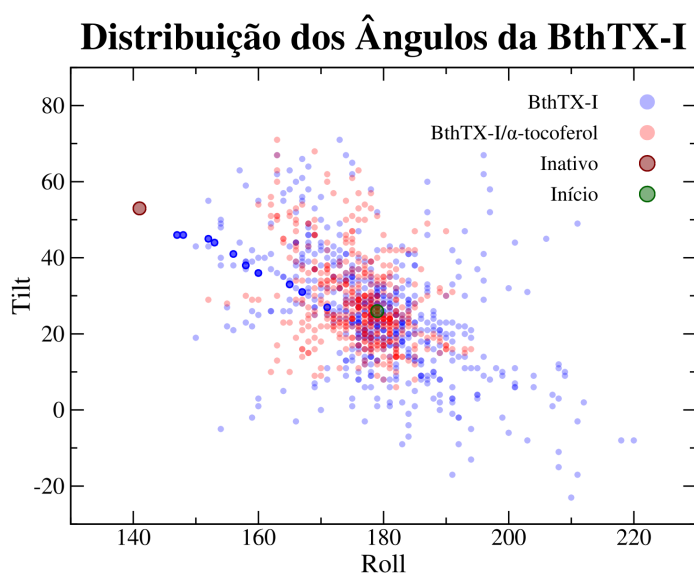


Figura 20. Distribuição dos ângulos *Roll* e *Tilt* para a BthTX-I (círculos em azul) e BthTX-I/ α -tocoferol (círculos em vermelho). Estado inativo (PDB ID: 3HZD) e inicial (estrutura equilibrada, estado ativo) estão representados em círculos vermelho escuro e verde, respectivamente.

Analisando a distribuição dos ângulos do ponto de vista das estruturas cristalográficas consideradas ativas e inativas, pode-se notar que o conjunto de estruturas gerado no presente é capaz de descrever a flutuação estrutural dentro do grupo do estado ativo. Entretanto, quando é levado em conta apenas direções para o estado inativo (PDB ID: 3HZD), uma diferença marcante é notada: apenas o sistema da BthTX-I sem o ligante foi capaz de apresentar alguns vetores que impulsionaram a miotoxina para tal direção. Esse resultado foi explorado com atenção, buscando replicá-lo para o sistema contendo apenas a BthTX-I, bem como tentar forçar o complexo BthTX-I/ α -tocoferol para essa direção.

4.3.2. Induzindo a BthTX-I ao Estado Inativo

Três vetores foram encontrados que em direção ao estado inativo para o sistema BthTX-I, os vetores das réplicas 12, 28 e 29, porém apenas o vetor 12 foi capaz de chegar mais próximo à conformação inativa. Analisando este vetor, foi possível identificar sua composição, onde os modos 10 e 12 contribuíram com pouco mais de 50% para a sua direção, seguido pelo modo 12, com ~17%. Vale ainda destacar que o modo 7 apresentou participação mínima, contribuindo apenas com ~2% do vetor. Como as estruturas dos sistemas BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol estão localizadas na mesma origem, vetor 12 foi então utilizado para excitar o segundo sistema – como este vetor possui apenas informações de direção para a BthTX-I, as direções para o α -tocoferol foram consideradas nulas. Desta vez, ambos os sistemas foram excitados dez vezes, com 20 etapas de excitação em cada, para garantir a replicabilidade do experimento.

De forma interessante, as excitações deste experimento mostraram que ambos os sistemas podem migrar para essa direção, caso eles sejam guiados para a mesma. A distribuição dessas estruturas foi inserida no gráfico considerando as medidas de ângulos, onde é possível ver que ambos os sistemas são capazes de, partindo do padrão *Roll/Tilt* característico do estado ativo, alcançar o estado inativo – reduzindo seus valores em *Roll* e aumentando seus valores em *Tilt* – como observado em algumas réplicas (Figura 21). Sendo assim, as réplicas capazes de atingir exatamente o estado inativo tiveram cada uma de estruturas relaxadas através de 50 ps de MD livre de qualquer força externa, resultando em 50 estruturas.

Distribuição dos Ângulos Para o Vetor 12

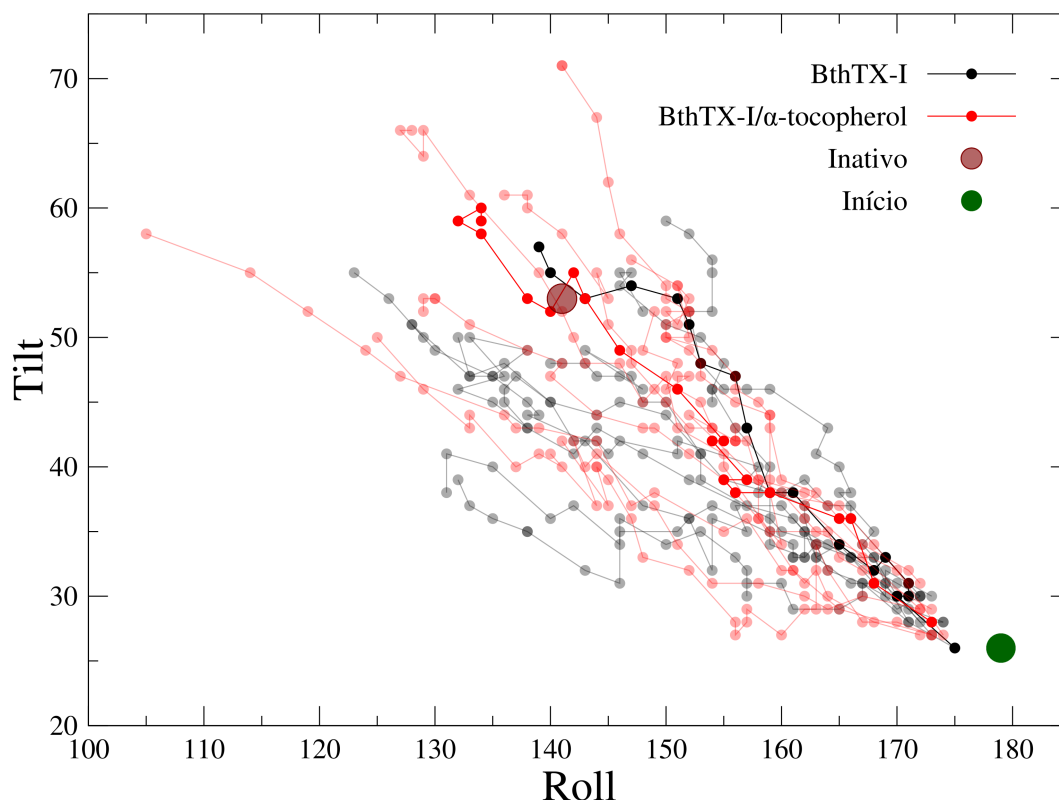


Figura 21. Distribuição dos ângulos *Roll* e *Tilt* para a BthTX-I (círculos em preto) e BthTX-I/α-tocoferol (círculos em vermelho) para as excitações ao longo do vetor da réplica 12 da BthTX-I. Estado inativo e estrutura inicial (estado ativo) representados em vermelho escuro e verde, respectivamente.

O relaxamento dessas estruturas pode ser observado na Figura 22, onde todas elas tenderam a diminuir suavemente seus valores de RMSD em comparação à estrutura de início. Além disso, é possível notar que as estruturas com valores de RMSD abaixo de 2 Å foram mais propensas a voltar ao estado inicial, enquanto que as estruturas que sofreram alto deslocamento, tendem a manter a conformação. Isso é interessante, pois sugere que essa excitação pode promover uma alteração de estado conformacional, cruzando uma barreira energética.

RMSD das Estruturas Excitadas pelo Vetor 12

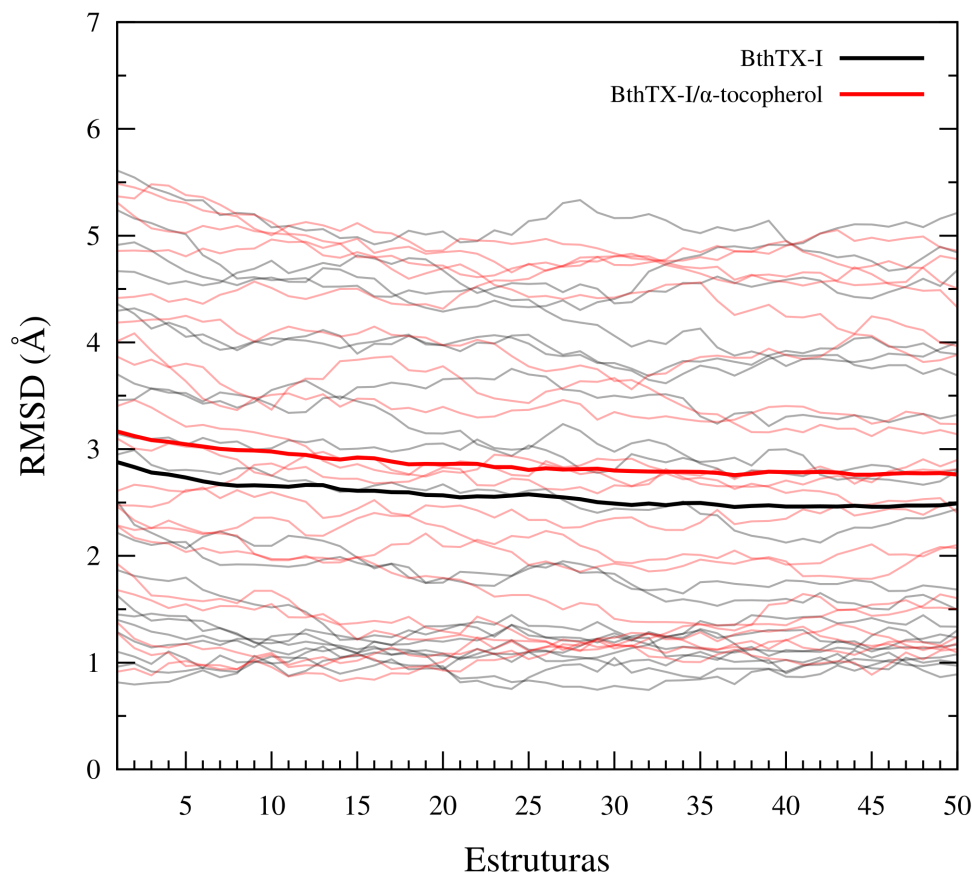


Figura 22. RMSD do relaxamento das estruturas após excitação utilizando o vetor 12 para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol, representados pelas linhas claras vermelhas e pretas, respectivamente. Média de cada grupo está representada nas respectivas cores sólidas.

Como ambos os sistemas atingiram o estado inativo, uma etapa de MD mais longa, de 10 ns, foi aplicada para a estrutura de RMSD mais próximo da estrutura inativa (PDB ID: 3HZD). A alteração da medida para seleção de estruturas se deu porque, embora eficiente num panorama mais amplo, a descrição da interface dimérica considerando apenas ângulos de Euler pode não notar alterações como a dissociação dimérica, evento possível, visto que os sistemas foram excitados o dobro de vezes. Portanto, se fez coerente utilizar a medida de RMSD para o dímero e garantir que a interface foi mantida. Sendo assim, as estruturas selecionadas para o sistema BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol apresentaram RMSD de 2,92 e 2,66 Å em relação à 3HZD, respectivamente. Além disso, suas configurações angulares foram (*Roll* x *Tilt*) 156° x 47° e 154° x 50°, valores próximos da 3HZD (141° x 54°). Ainda, vale destacar que essas estruturas se distinguiram em apenas 1,36 Å, confirmando que ambas as estruturas migraram em direção ao estado inativo.

4.3.3. MD da BthTX-I Após Indução ao Estado Inativo

Uma vez que ambos os sistemas atingiram uma conformação próxima do estado inativo, 10 ns de MD foram aplicados com cada sistema livre de qualquer força externa com a finalidade de identificar aspectos estruturais importantes para BthTX-I, levando em conta a presença e ausência do α -tocoferol. Com isso, as conformações obtidas nesse experimento buscou analisar se tais estruturas encontram-se em estados conformacionais estáveis.

As estruturas geradas foram analisadas considerando sua distribuição angular e, de forma interessante, ambos os sistemas tenderam a migrar para o estado de estruturas próximas à conformação ativa, com valores médios similares para *Roll*, de $171,92^\circ \pm 7,75$ e $173,64^\circ \pm 4,7$ para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol, respectivamente; enquanto que o *Tilt* apresentou valores médios de $35,23^\circ \pm 4,74$ para BthTX-I e $29,12^\circ \pm 11,5$ para BthTX-I/ α -tocoferol. Embora os valores médios de *Roll* tenham sido próximos, os valores médios de *Tilt* sofreram uma sutil alteração, onde o sistema BthTX-I/ α -tocoferol apresentou $\sim 6^\circ$ de diferença do sistema sem o ligante, sugerindo uma diferença estrutural entre tais sistemas (Figura 23).

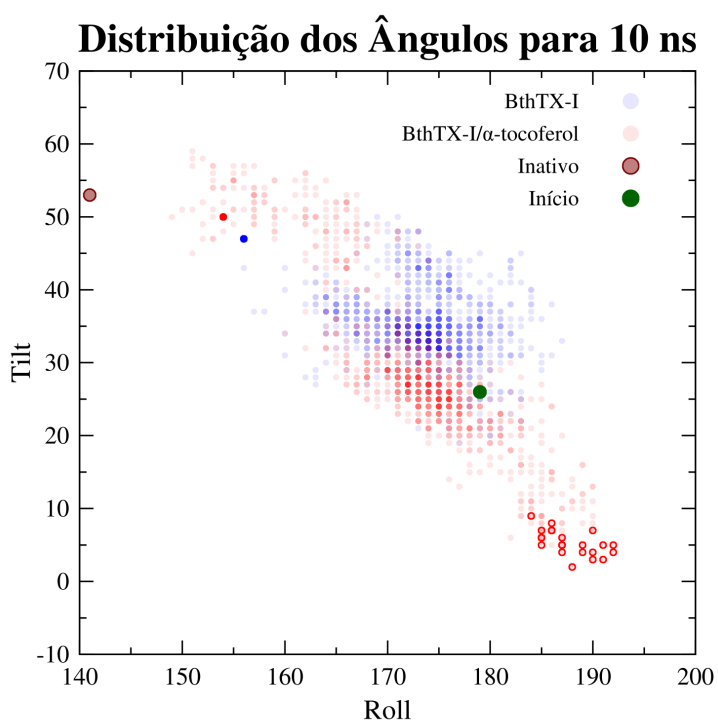


Figura 23. Distribuição dos ângulos *Roll* e *Tilt* para a BthTX-I (círculos em azul) e BthTX-I/ α -tocoferol (círculos em vermelho) durante 10 ns de MD. Estruturas inicial estão representadas por círculos preenchidos das respectivas cores. Estado inativo (PDB ID: 3HZD) e inicial (estrutura equilibrada, estado ativo) estão representados em círculos vermelho escuro e verde, respectivamente. Círculos vazios em vermelho apresentam estruturas com as menores valores de DSO4.

Ao analisar características de superfície de ambos os sistemas, como Rg e SASA, foi possível notar que, embora ambos os sistemas mantiveram valores de Rg próximos, o sistema BthTX-I/ α -tocoferol tendeu a aumentar os valores de SASA, sugerindo um aumento de áreas da BthTX-I expostas ao solvente (Figura 24). Esse resultado pode ser relacionado com a interação entre as Hélices-I e MDiS da miotoxina, onde, claramente, o sistema BthTX-I apresentou uma tendência a aproximar essas regiões, com HMdist médio de $10,44 \pm 1,68$ Å, mantendo-as interagindo ao longo da MD a partir de 2 ns (Figura 25A).

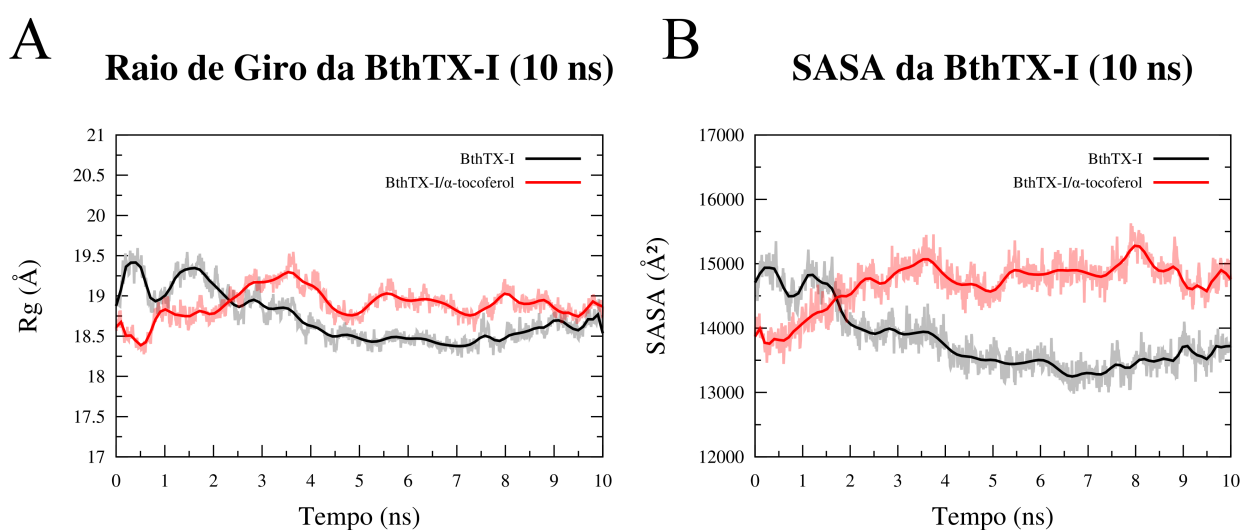


Figura 24. Raio de giro (Rg), à esquerda, e SASA, à direita, da BthTX-I (curva em preto) e BthTX-I/ α -tocoferol (curva em vermelho) durante 10 ns de MD. Foi aplicada uma função de suavização de cada uma das curvas (cores claras), chamada bezier.

O sistema BthTX-I/ α -tocoferol apresentou uma tendência diferente, mantendo as Hélices-I e MDiS mais distantes, com HMdist médio de $17,13 \pm 1,53$ Å (Figura 25A). Esse resultado é interessante, pois sugere que o α -tocoferol pode interferir no reconhecimento dessas regiões da interface dimérica.

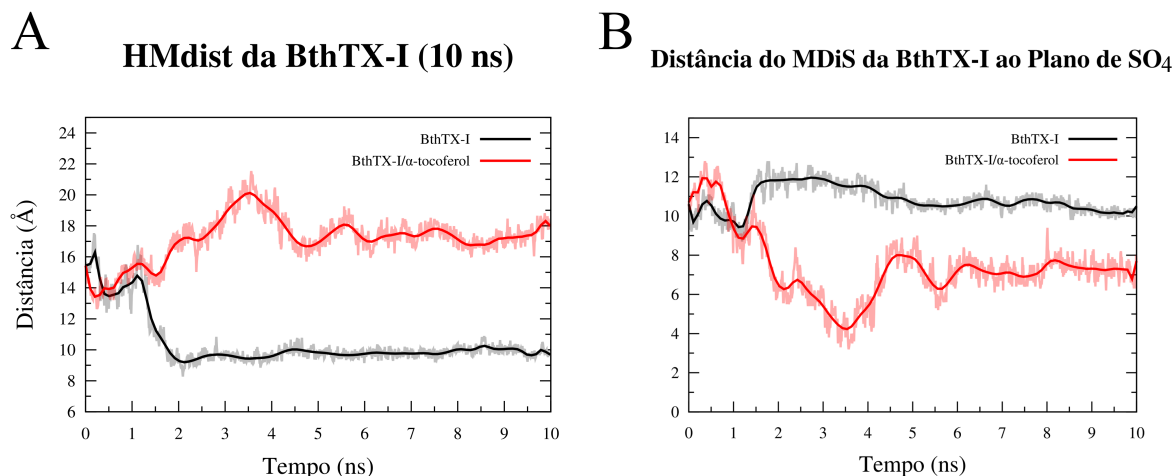


Figura 25. HMdist, à esquerda, e distância dos MDiS ao plano de SO_4 (DSO_4), à direita, da BthTX-I (curva em preto) e BthTX-I/ α -tocoferol (curva em vermelho) durante 10 ns de MD. Foi aplicada uma função de suavização de cada uma das curvas (cores claras), chamada bezier.

Uma vez que a distância entre as Hélices-I e os MDiS da BthTX-I/ α -tocoferol aumentaram, seus MDiS ficaram mais livres e voltados para o solvente. Essa liberdade parece ter um efeito importante para a BthTX-I, pois isso permite que eles movam livremente, podendo se aproximar do plano de SO_4 . Como é possível notar na Figura 25 (B), esse sistema apresentou oscilações na DSO_4 , onde suas distâncias foram sempre abaixo de $7,39 \pm 1,78 \text{ \AA}$. As estruturas que apresentaram baixo DSO_4 foram as que apresentaram maior migração na configuração de ângulos (*Roll* em torno de 190° e *Tilt*, de 5°), localizadas ainda mais distantes do estado inativo (Figura 23, círculos vazios em vermelho). Já para o sistema BthTX-I, a distância dos MDiS ao plano não sofreu mudanças consideráveis, mantendo-se com certa estabilidade e numa distância média próximo de $10,82 \pm 1,73 \text{ \AA}$.

4.4. MD da BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol

Com finalidade comparativa, simulações de MD longas (100 ns) foram realizadas para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol nas mesmas condições onde foi aplicado o método de MDeNM. Como esperado, ambos os sistemas foram capazes de manter a estabilidade dimérica ao longo de toda a simulação, como observado pelos valores médios de RMSD e desvio padrão, apresentando $3,29 \pm 1,03 \text{ \AA}$ e $3,5 \pm 0,93 \text{ \AA}$ para os sistemas BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol, respectivamente. Tal resultado pode ser observado através do baixo RMSD para cada sistema (Figura 26A).

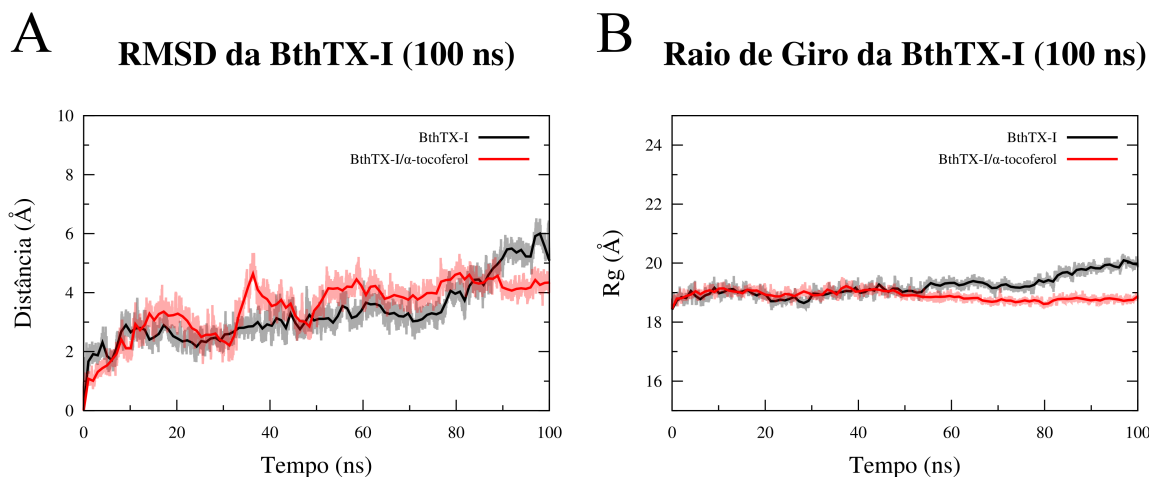


Figura 26. Valores de RMSD (A) e Rg (B) para a BthTX-I (curvas em preto) e BthTX-I/α-tocoferol (curvas em vermelho) durante 100 ns de MD. Foi aplicada uma função de suavização de cada uma das curvas (cores claras), chamada bezier.

De acordo com isso, o comportamento do Rg para ambos os sistemas também foi estável (Figura 26B), embora o sistema BthTX-I tenha apresentado um valor de Rg um pouco acima, com $19,21 \pm 0,37$ Å contra $18,89 \pm 0,17$ Å para o sistema BthTX-I/α-tocoferol.

Outra medida importante para esse experimento é o valor do HMdist, onde o sistema BthTX-I/α-tocoferol apresentou menor interação entre os MDiS e as Hélices-I dos monômeros da proteína, visto pelo maior valor de HMdist para esse sistema em comparação ao sistema BthTX-I (Figura 27A). Embora tenha havido o aumento do HMdist para o sistema BthTX-I/α-tocoferol, os valores de SASA se mostraram bastante similares para ambos os sistemas (Figura 27B).

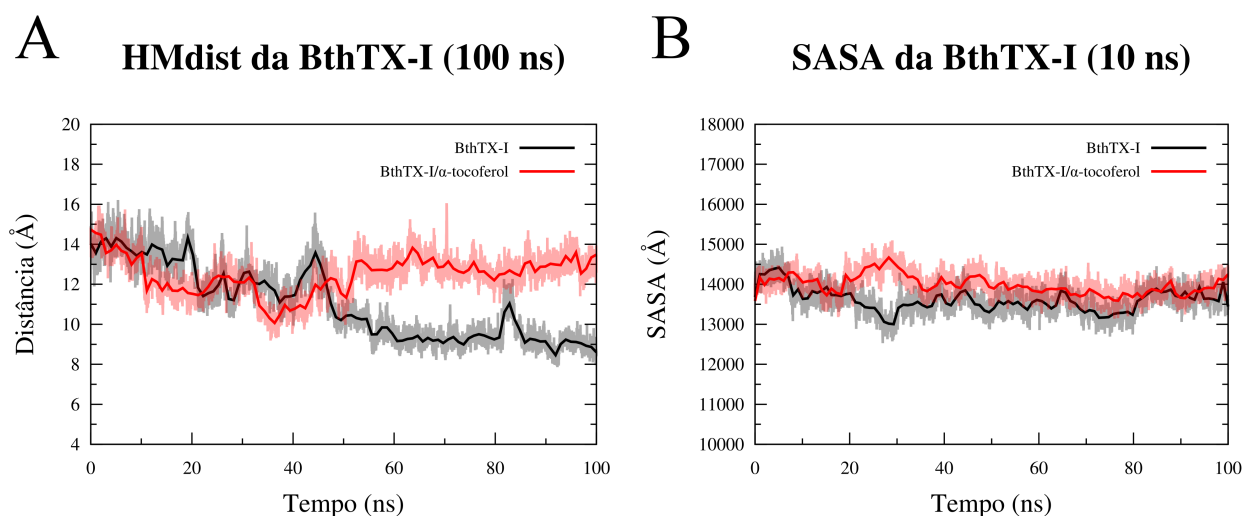


Figura 27. HMdist (A) e SASA (B) para a BthTX-I (curvas em preto) e BthTX-I/α-tocoferol (curvas em vermelho) durante 100 ns de MD. Foi aplicada uma função de suavização de cada uma das curvas (cores claras), chamada bezier.

Graças a alta estabilidade estrutural, ambos os sistemas visitaram poucos estados conformacionais, como é demonstrado pelo padrão de Energia Livre (Figura 28). O sistema BthTX-I foi capaz de atingir um pouco mais de estados, com valores de R_g maiores, em torno de 19 Å, enquanto que a BthTX-I/ α -tocoferol ficou mais restrita a valores de R_g em torno de 18,5 Å. Isto pode ser relacionado com os resultados observados na Figura 26B, onde a BthTX-I atingiu valores de R_g um pouco maiores ao sistema BthTX-I/ α -tocoferol.

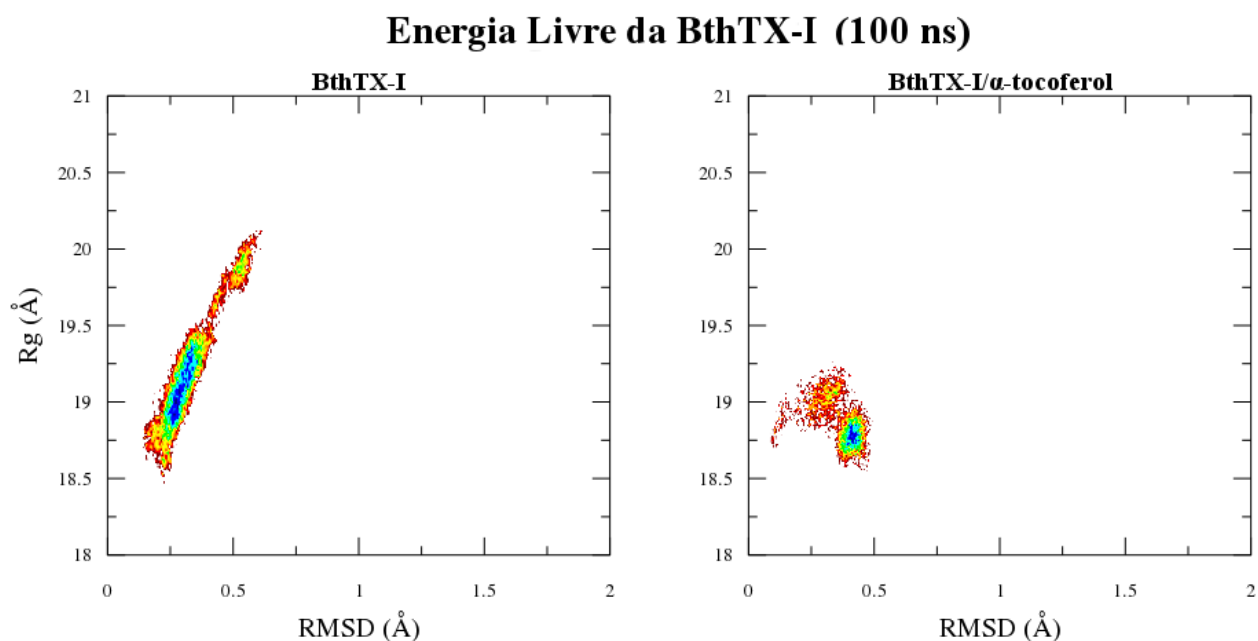


Figura 28. Perfil bidimensional de Energia Livre (kcal/mol) da BthTX-I, à esquerda, e da BthTX-I/ α -tocoferol, à direita, utilizando RMSD (eixo X) e R_g (eixo Y). Estruturas geradas por 100 ns de MD. Valores de energia variando de zero a 5,93 e 5,44 kcal/mol para BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol, respectivamente. Os estados mais visitados tendem a se localizarem nas regiões tendendo ao azul, enquanto que os menos visitados, nas regiões tendendo ao vermelho.

Por fim, a estabilidade estrutural para tais simulações também refletiu na distribuição dos ângulos de Euler para cada um dos sistemas, onde ambos tenderam a oscilar dentro da região entre o estado ativo e inativo, como mostrado na Figura 29.

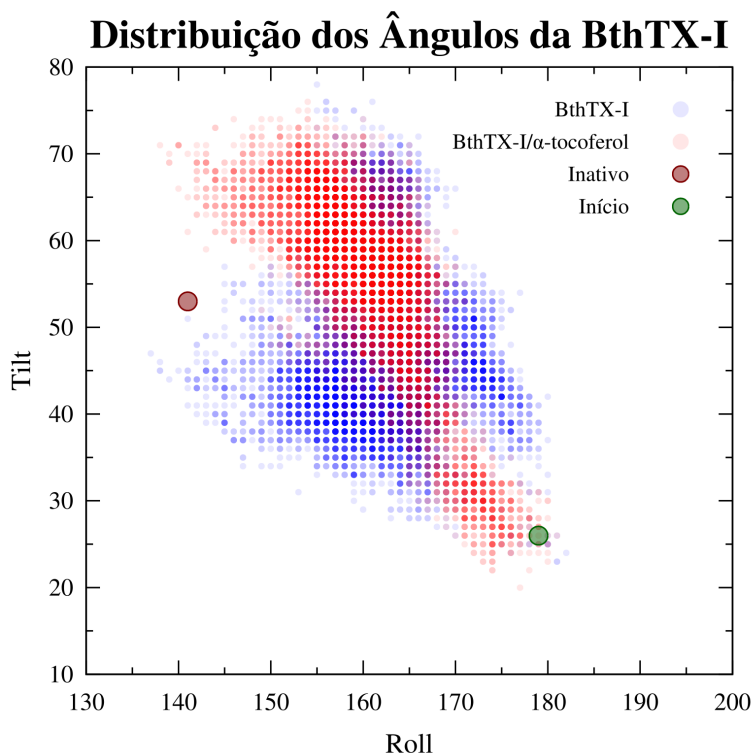


Figura 29. Distribuição dos ângulos *Roll* e *Tilt* para a BthTX-I (círculos em azul) e BthTX-I/ α -tocoferol (círculos em vermelho) durante 100 ns de MD. Estruturas inicial de cada sistema é o estado ativo, representado pelo círculo preenchido em verde escuro (PDB ID: 3CXI), enquanto que o estado inativo (PDB ID: 3HZD) está representado pelo círculo vermelho escuro.

4.5. Contatos Entre a BthTX-I e o α -tocoferol

Na busca de contatos importantes constituintes da interface entre a BthTX-I e o α -tocoferol, foram considerados os resíduos da proteína que estiveram em contato com o ligante abaixo de 4,5 Å, descartando os átomos de hidrogênio. A estrutura utilizada para identificar os resíduos foi a estrutura cristalográfica do complexo (PDB ID: 3CXI) após a etapa de equilíbrio, utilizando o Charmm. Uma vez que a estrutura cristalográfica apresenta simetria estrutural, e a etapa de equilíbrio altera sutilmente as posições atômicas do sistema, os resíduos de um monômero da BthTX-I que estiveram com o ligante também foram considerados no outro monômero a fim de observar a prevalência de seus contatos. Ainda, visto que as simulações de MD longas apresentaram certa estabilidade conformacional, a prevalência dos contatos foi calculada apenas para o conjunto de dados gerados pelo MDeNM e das estruturas geradas após 10 ns de MD com a BthTX-I induzida ao estado inativo. A prevalência dos contatos podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4. Prevalência dos contatos, em porcentagem, entre os resíduos da BthTX-I e o α -tocoferol para as estruturas geradas pelo MDeNM e 10 ns de MD com a BthTX-I induzida ao estado inativo.

	MDeNM		10 ns (MD)	
	Monômero A	Monômero B	Monômero A	Monômero B
Leu 2	99,63	100,00	100,00	100,00
Phe 3	98,71	77,99	99,70	99,40
Leu 5	95,56	99,91	100,00	97,30
Gly 6	100,00	99,88	100,00	100,00
Lys 7	98,08	92,66	96,30	98,30
Leu 10	95,96	89,52	98,60	96,70
Asn 16	72,57	34,47	97,90	98,90
Pro 17	100,00	99,86	100,00	100,00
Ala 18	99,38	99,28	100,00	100,00
Tyr 21	98,79	99,19	99,60	100,00
Gly 22	99,25	95,25	100,00	99,90
Cys 28	50,14	97,12	19,30	86,70
Gly 29	99,32	100,00	99,80	100,00
Val 30	98,11	90,70	100,00	99,90
Leu 31	95,97	76,53	43,60	93,80
His 48	76,18	99,62	67,50	97,30
Lys 49	88,32	99,79	82,40	99,40
Tyr 51	50,56	74,20	27,40	0,70
Lys 60	16,54	15,82	46,50	14,80
Leu 111	92,33	91,58	57,00	31,10
Phe 114	73,74	8,44	0,00	0,00
α -tocoferol	54,40		45,50	

O α -tocoferol apresentou um padrão de interação estável com relação à Hélice-I para os experimentos de MDeNM e simulações de 10 ns de MD, onde foi possível observar a prevalência dos contatos para os resíduos Leu 2, Phe 3, Leu 5, Gly 6 e Lys 7 sempre acima de 90%. Por outro lado, quando a cauda C-terminal é levada em consideração, os resíduos constituintes do MDiS (Leu 111 e Phe 114) apresentaram diferença na prevalência dos contatos quando comparado o MDeNM e os 10 ns de MD, com o primeiro conjunto de dados apresentando mais contatos, especialmente para o resíduo Leu 111 (>90%). Já para os 10 ns, foi observado que o MDiS interagiu menos, com uma situação onde não foi observada interação alguma do resíduo Phe 114 com o α -tocoferol.

Ao considerar os resíduos constituintes da cavidade hidrofóbica, vale destacar a díade Histidina 48 e Lisina 49 – apresentaram contatos entre 50 e 100% – com a Lisina tendo maior presença de interação com o α -tocoferol. Outros resíduos que merecem destaque são a Glicina 29 e Valina 30, presente no *loop* descrito como o responsável pela de ligação ao Cálcio para as PLA₂s

catalíticas. Esses resíduos apresentaram contatos com o α -tocoferol acima de 90% em ambos os conjuntos de estruturas. Por fim, ao observar os contatos entre as moléculas de α -tocoferol, tal interação foi de 54,40 e 45,50% para os experimentos de MDeNM e 10 ns de MD, respectivamente.

4.6. Experimentos em Solução da BthTX-I

Na busca de entender o comportamento da BthTX-I, experimentos em solução foram realizados visando determinar o estado oligomérico da miotoxina na sua forma nativa ou na presença de α -tocoferol em soluções de pH ácido ou básico. Sendo assim, foram realizadas etapas de purificação do veneno de *B. jararacussu* para a obtenção da BthTX-I e então foram realizados experimentos biofísicos de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

4.6.1. Purificação da BthTX-I

O procedimento de purificação da BthTX-I se deu através de uma etapa cromatográfica inicial de exclusão molecular do veneno de *B. jararacussu*. Após a injeção de 500 μ L do veneno na coluna, foi gerado um padrão de picos correspondentes às proteínas constituintes do veneno. O cromatograma dessa etapa cromatográfica pode ser observado na Figura 30.

Cromatografia de Exclusão Molecular

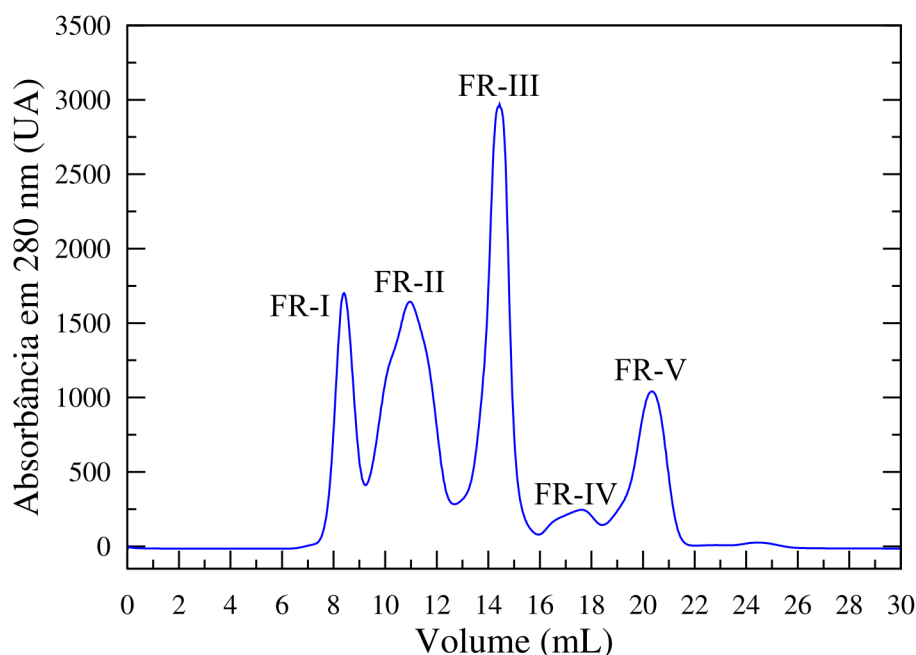


Figura 30. Cromatograma de Exclusão Molecular do veneno de *Bothrops jararacussu*. FR-I a V representam as frações de proteínas de diferentes massas moleculares.

Foram identificadas cinco frações (FR-I a V), onde cada uma delas constitui um grupo de proteínas com massas moleculares parecidas. O pico de maior absorbância foi observado para FR-III, sendo esta a fração que apresenta as fosfolipases A_2 , incluindo a BthTX-I. Embora tal protocolo esteja bem estabelecido, um gel de SDS-PAGE foi gerado com a finalidade de mostrar que a fração FR-III é formado por proteínas de massas moleculares próximos de 14 kDa. Para isto, as frações de alta absorbância FR-I, II e III foram coletadas. Cada uma delas foi revelada no gel eletroforético, que pode ser observado na Figura 31.

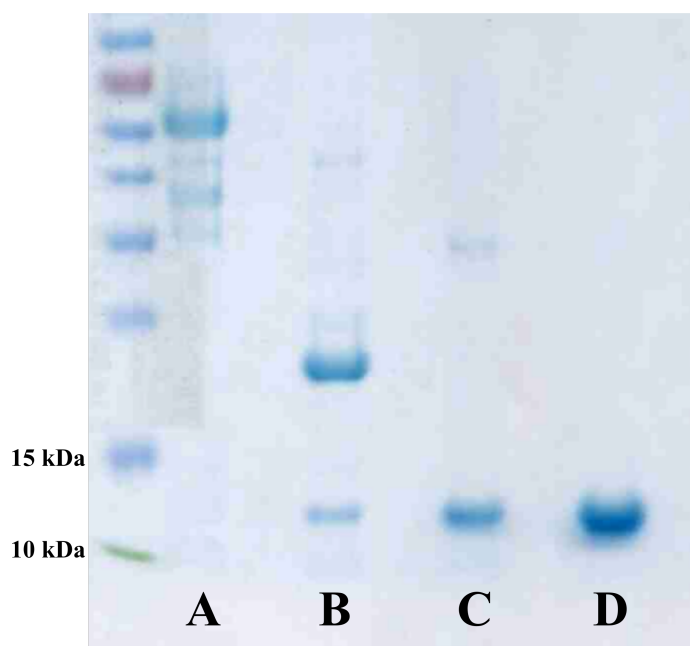


Figura 31. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da Cromatografia de Exclusão Molecular do veneno de *Bothrops jararacussu*. A primeira coluna corresponde ao marcador de moléculas com massas moleculares conhecidas, sendo a penúltima e última proteínas de massas moleculares de 15 e 10 kDa, respectivamente. As colunas seguintes são representadas pelas frações FR-I (A), FR-II (B) e FR-III (C). Já a coluna correspondente à letra D é o pico proveniente da Cromatograma de Fase Reversa da fração FR-III.

Como observado no gel de poliacrilamida, a FR-III apresenta proteínas com massa molecular entre 10 e 15 kDa, de acordo com os marcadores moleculares da primeira coluna do gel. Entretanto, como existem várias fosfolipases A_2 com massas moleculares similares, foi empregada uma etapa posterior de Cromatografia de Fase Reversa para garantir alto grau de pureza da BthTX-I. Nesta fase, um pico foi identificado como sendo correspondente à BthTX-I, como mostrado na Figura 32. Esse mesmo pico foi revelado no SDS-PAGE, identificado pela letra D.

Cromatografia de Fase Reversa

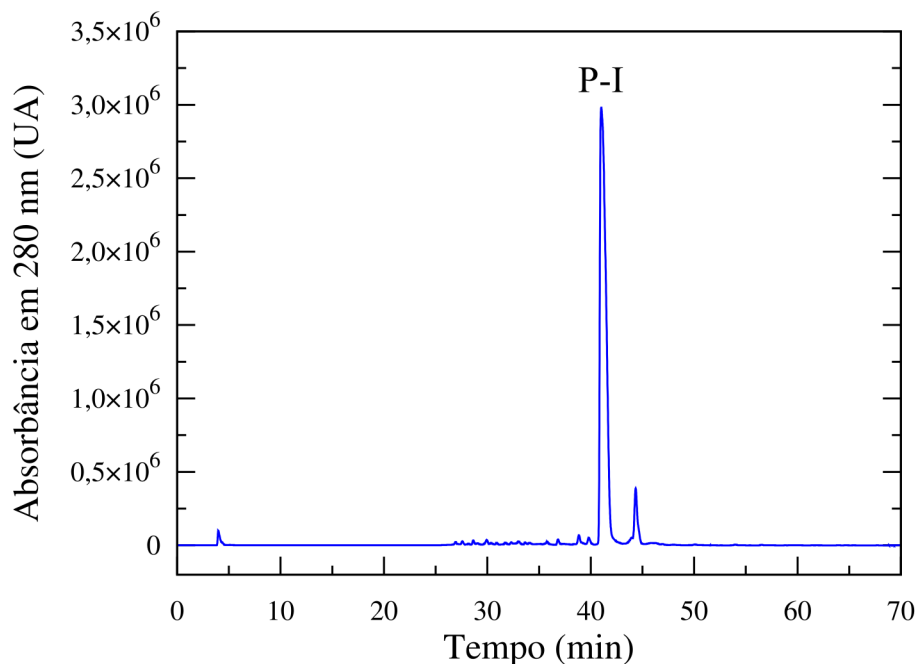


Figura 32. Cromatografia de Fase Reversa da fração FR-III proveniente da Cromatografia de Exclusão Molecular do veneno de *Bothrops jararacussu*. O pico correspondente à BthTX-I foi identificado como P-I.

4.6.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Na busca do estado oligomérico da BthTX-I, foram realizados experimentos de DLS em condições de solução ácida e básica, e, nesta última, na ausência ou presença do α -tocoferol. Para o sistema ácido, a BthTX-I nativa apresentou uma distribuição homogênea com relação ao tamanho molecular das entidades presentes na solução, com polidispersividade baixa de 5,7%. Ainda para esse sistema, foi observado um raio hidrodinâmico (R_H) de 1,9 nm. Já para o sistema básico, a BthTX-I apresentou R_H de 2,0 nm e polidispersividade de 15,7%, valores maiores quando em comparação com o sistema ácido.

A adição do α -tocoferol na solução com a BthTX-I em pH básico resultou em modificações tanto dos valores de R_H quanto da polidispersividade, ambos maiores que quando em comparação com a BthTX-I nativa, evidenciando a oligomerização da proteína. Para as proporções dímero/ α -tocoferol de 1:0,5, 1:1 e 1:10 foram observados valores de R_H /polidispersividade de 2,5 nm/28,9%, 3,5 nm/26,3% e 6,5 nm/22,1%, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

As PLA₂s-homólogas de veneno de serpentes têm sido descritas proteínas sem atividade catalítica, embora elas apresentem uma série de efeitos farmacológicos, sendo a miotoxicidade um dos principais estudados. No presente trabalho, a PLA₂-homóloga estudada foi a BthTX-I, uma miotoxina modelo para tal grupo – encontrada no veneno da serpente *B. jararacussu* – com a finalidade de encontrar aspectos estruturais relevantes para a compreensão da atividade miotóxica desse grupo.

Embora a compreensão de como essas proteínas atuam em nível molecular não é completamente conhecida, alguns trabalhos se propuseram a tentar desvendá-lo. Um detalhamento do possível mecanismo de ação para tais proteínas foi desenvolvido por Fernandes e colaboradores em 2013, onde foi proposto a presença de dois domínios estruturais chamados MDoS e MDiS, conhecidos como importantes para a miotoxicidade da proteína. Enquanto que o MDoS foi tido como um domínio capaz de reconhecer as cabeças de fosfolipídios através de interações eletrostáticas, o MDiS atua reconhecendo as cadeias alifáticas dos fosfolipídios, causando a perturbação da membrana seguido do influxo de íons e então morte celular. A ideia proposta para a execução do seu mecanismo de ação é apresentada na Figura 2B.

Posteriormente, Borges e colaboradores (2017) buscaram refinar mecanismo de ação dessas proteínas, categorizando-o em quatro etapas essenciais: (i) ligação de uma molécula de ácido graxo nas cavidades hidrofóbicas de cada monômero da proteína; (ii) ativação alostérica causada pelos ácidos graxos, resultando numa alteração conformacional da proteína e alinhamento dos domínios MDiS e MDoS; (iii) uma vez que o MDoS foi alinhado, este é capaz de fazer o reconhecimento das cabeças polares dos fosfolipídios de membrana; e (iv) perturbação da membrana através do reconhecimento do MDiS às cadeias alifáticas dos fosfolipídios da membrana.

É interessante que ambos os trabalhos se complementam e propõem uma etapa essencial para a expressão das PLA₂s-homólogas: a presença de um ativador alostérico, comumente identificado como moléculas de ácido graxos (FERNANDES *et al.* 2014). Tais moléculas são formadas por longas cadeias de carbonos alifáticos e apresentam uma porção polar formada por uma substituição carboxílica. Neste contexto, algumas moléculas podem atuar de forma similar aos ácidos graxos, como moléculas de PEG – comumente encontradas co-cristalizadas com as miotoxinas – e também moléculas de α -tocoferol, co-cristalizada com a BthTX-I (dos SANTOS; SOARES; FONTES, 2009). Dessa forma, surgiu a oportunidade de estudar o α -tocoferol como uma molécula auxiliadora na ativação dessas miotoxinas. Sendo assim, o presente trabalho buscou

encontrar aspectos estruturais relacionados a participação dessas moléculas na expressão dos efeitos miotóxicos da BthTX-I.

Dentro deste panorama, o funcionamento da BthTX-I foi estudado através da utilização de técnicas computacionais – como simulações de MD e também a MDeNM – e biofísicas – como o Espalhamento de Luz Dinâmico. Foram desenvolvidos experimentos na tentativa de melhor entender sua estabilidade estrutural da BthTX-I dimérica em solução com pH ácido e básico, bem como na geração de estados de conformações que pudessem trazer *insights* sobre seu mecanismo de ação. Além disso, foram estudados com mais detalhes o comportamento da BthTX-I no contexto de seus domínios tidos como essenciais para a expressão do seu mecanismo de ação, bem como a disposição dos monômeros e presença de moléculas de α -tocoferol na dinâmica do dímero.

5.1. Alteração do pH Influencia a Atividade da BthTX-I

O presente trabalho buscou entender o comportamento da BthTX-I em faixas de pH ácido e básico. O resultado imediato deste experimento é que o pH ácido tende a perturbar a conformação dimérica, modificando sua conformação nativa. Uma série de experimentos demonstraram a desestabilização dimérica, como medidas de RMSD, RMSF e Rg, onde todos mostraram que a BthTX-I em estado ácido apresenta instabilidade estrutural e aumento de tamanho (Figuras 11, 12 e 13), enquanto que o estado básico se mostrou estável para as mesmas medidas. Uma vez que a simulação em pH 4 apresenta tais características, pode ser sugerido que tal simulação leva à dissociação dimérica, visto que a conformação inicial foi fortemente modificada, além de levar em conta o curto tempo num contexto real (de tempo indeterminado). De acordo com isso, os experimentos de DLS demonstraram que quando em pH ácido, a BthTX-I tende a apresentar um R_H de 1,9 nm, enquanto que em pH básico, seu valor de R_H aumenta sutilmente cerca de 1 nm, indicando alterações no seu estado oligomérico de monômero para dímero, respectivamente. Experimentos de fluorescência realizados com a BthTX-I corroboram sua dissociação em pH 5 (de OLIVEIRA *et al.*, 2001), estando assim de acordo com os experimentos realizados no presente trabalho. Resultados similares foram observados para a miotoxina II (*B. asper*), onde a mesma faixa de pH 5 tende a dissociar a miotoxina (ANGULO *et al.*, 2005).

O estado oligomérico das miotoxinas PLA₂s-homólogas é considerado importante para a expressão dos seus efeitos farmacológicos de acordo com uma série de dados experimentais que demonstram que tais proteínas devem expressar seus efeitos quando na forma dimérica, como dados de cristalografia, DLS, SAXS e de bioinformática (MURAKAMI *et al.*, 2007; dos SANTOS; SOARES; FONTES, 2009; FERNANDES *et al.*, 2010). A Figura 10 mostra os resíduos de

aminoácidos de ácido aspártico e ácido glutâmico que sofrem protonação em pH 4, onde dois deles estão localizados na região interna da BthTX-I: Asp41 e Asp89. Esses dois resíduos estão diretamente interagindo com o *loop* de Ca^{2+} , podendo levá-lo a sua desestabilização. É possível observar na Figura 11B que a região de maior flutuação é a cauda C-terminal (resíduos 110-121 e 220-242) e isso pode ser explicado pela proximidade que essa região tem com o mesmo *loop*. Uma vez que essas regiões apresentam maior instabilidade, elas interferem diretamente no estado oligomérico da proteína e da cauda C-terminal (onde está localizado o MDiS), resultando na sua dissociação, como foi possível observar na Figura 14.

Outro ponto importante na desestabilização dimérica é em relação a interação das Hélices-I e MDiS do dímero (medida chamada HMdist). Como observado na Figura 12, o HMdist da BthTX-I em pH ácido tende a aumentar, enquanto que em pH 8 essa distância permanece estável à partir de 20 ns de MD, sugerindo que a Hélice-I parece ser uma região importante na estabilização dimérica da BthTX-I. Resultados gerados por Stábili e colaboradores (2006) mostraram que a clivagem da Hélice-I é capaz de reduzir a atividade das miotoxinas em aproximadamente 75%, o que reforça a importância da interação dessa porção com a cauda C-terminal na estabilização do estado oligomérico dessas proteínas, como observado no presente trabalho.

Na tentativa de identificar efeitos farmacológicos da BthTX-I, como a atividade perturbadora de membranas, foi realizado um experimento com lipossomas em pH 5 e 7, pela medição da atividade de compostos (creatina quinase) nelas guardados: caso a atividade tenha sido detectada, o composto seria retirado dos lipossomas. De forma interessante, foi observado que em pH 5 a BthTX-I é capaz apenas de interagir com as vesículas, enquanto que em pH 7 é observada sua ruptura e então liberação da creatina quinase, confirmando a expressão da sua atividade na perturbação de membranas (de OLIVEIRA; FERREIRA; WARD, 2009). A habilidade da BthTX-I permanecer ligada às lipossomas se relaciona com os resultados encontrados no presente trabalho, uma vez que os resíduos positivos da miotoxina não são alterados e boa parte das alterações ocorrem distantes do MDoS, sendo assim essa região continua com carga disponível para interação com os fosfolipídios aniônicos. Entretanto, como os domínios não estão alinhados, na conformação dimérica, não é possível observar a expressão da sua atividade molecular, reforçando a teoria proposta atual (FERNANDES *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2017).

Em suma, a BthTX-I parece ter uma sensibilidade a alterações de pH, como demonstrado através das simulações de MD em pH ácido e básico e experimentos de DLS, que corroboram experimentos encontrados na literatura, como atividade em lipossomas. Sendo assim, o pH que permite a BthTX-I atingir seu estado nativo e, conseqüentemente, ser capaz de apresentar atividade miotóxica, pode ser considerado em faixas de neutro para básico, permitindo a estabilização do

dímero.

5.2. Comportamento Dinâmico da BthTX-I

Sabendo da importância do estado dimérico para a BthTX-I, a diversidade conformacional dessa estrutura foi estudada através de simulações de MD e MDeNM a fim de determinar aspectos estruturais relevantes para a expressão de sua função. Além disso, tais características também foram analisadas levando em consideração a presença de moléculas de α -tocoferol. Enquanto o experimento de MD visou realizar uma análise temporal do comportamento de cada sistema, o experimento de MDeNM analisou as estruturas geradas de forma atemporal. É importante notar que esses experimentos conservaram a estrutura quaternária da BthTX-I, reforçando a importância do efeito do pH para a estabilidade dimérica, previamente discutido.

5.2.1. Acessando Estados Conformacionais: MD *versus* MDeNM

As simulações de MD para a BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol apresentaram baixa diversidade estrutural em comparação àquelas geradas por MDeNM, como observado no padrão de Energia Livre para ambas as técnicas (Figura 19 e 28), que mostrou as medidas de RMSD e Rg restritas a regiões específicas. A estabilidade dessas medidas pode ser comparável com a simulação da BthTX-I em pH 8, sugerindo que ambos os sistemas tendem a apresentar o mesmo comportamento na faixa de pH 7-8. É interessante notar isso, já que resultados demonstraram a habilidade da BthTX-I desempenhar suas atividades em pH 7, podendo ser estendido para ambientes mais básicos (de OLIVEIRA *et al.*, 2001; de OLIVEIRA; FERREIRA; WARD, 2009). Além da estabilidade observada para as simulações de MD, as medidas de HMdist mostraram que quando a BthTX-I se encontra livre de qualquer ligante, há uma tendência das Hélices-I interagirem com os MDiS; por outro lado, quando na presença de α -tocoferol, essa distância tende a aumentar (Figura 27). Esse comportamento foi similar ao observado nas simulações em pH 8 (Figura 12A) e de 10 ns (Figura 25A).

Enquanto o padrão de Energia Livre observado na MD visitou poucos estados conformacionais, as simulações de MDeNM apresentaram alto espectro conformacional, como observado na Figura 19. Isto demonstra a eficiência da nova técnica aplicada na descrição conformacional da BthTX-I, ao excitar a proteína para várias direções provenientes dos modos normais. Estas características estão de acordo com o observado para outras proteínas quando a técnica foi inicialmente proposta (COSTA *et al.*, 2015). A restrição estrutural da BthTX-I na MD pode ser relacionada com a habilidade da MD manter a proteína em áreas de mínimos locais,

constituindo uma das limitações da técnica (HENZLER-WILDMAN; KERN, 2007). Por outro lado, o MDeNM se mostrou eficiente em preencher o espaço conformacional da BthTX-I, o que pode ser relacionado aos movimentos de alta amplitude resultantes dos modos normais, permitindo ultrapassar barreiras energéticas com maior facilidade e alcançar novos estados conformacionais (BAHAR *et al.*, 2010).

Vale ainda salientar que, embora a MDeNM tenha alcançado diversas conformações, as estruturas secundárias e terciárias da BthTX-I mantiveram conservadas (Tabela 3). Tais dados sugerem que o espaço conformacional explorado é resultante de alterações na estrutura quaternária da BthTX-I, sendo de grande valor para a compreensão do mecanismo de ação dessas proteínas, uma vez que a habilidade de oligomerização das PLA₂s-homólogas é crucial para a expressão dos efeitos na perturbação de membranas (ANGULO *et al.*, 2005; de OLIVEIRA *et al.*, 2010, de OLIVEIRA; FERREIRA; WARD, 2009).

5.2.2. O α -Tocoferol Como um Ativador Alostérico

A participação de possíveis moléculas ativadoras no auxílio da expressão atividade da BthTX-I é relatada há mais de uma década, mostrando que elas influenciam na modificação da estrutura quaternária da proteína, levando à modulação da sua atividade frente a membranas. Experimentos com lipossomas mostraram que a BthTX-I tem sua atividade perturbadora de membranas aumentada quando na presença de moléculas de SDS (dodecil sulfato de sódio, do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate*), onde foi sugerido uma proporção ideal próxima de quatro moléculas de SDS por dímero de BthTX-I (BORTOLETO-BUGS; NETO; WARD, 2004). Entretanto, quando essa proporção é aumentada em torno de dez vezes, a BthTX-I tende a ser inibida (BORTOLELO-BUGS *et al.*, 2007), sugerindo que o excesso dessas moléculas pode inibir regiões importantes da proteína, possivelmente através das regiões de densidade positiva, como o MDoS.

Além disso, a proposição do mecanismo de ação para as PLA₂s-homólogas pressupõe a presença de um ativador alostérico, como moléculas de ácido graxos, além de também considerar moléculas de PEG como potenciais ativadores alostéricos (FERNANDES *et al.*, 2014). A importância do ativador alostérico para as PLA₂s-homólogas foi estudada previamente, onde foi mostrado que a presença de ácidos graxos é importante para garantir que a BthTX-I oscile entre os estados ativo e inativo (BORGES; LEMKE; FONTES, 2017). Ainda nesse contexto, é importante notar que moléculas como ácidos graxos, PEG e até mesmo o SDS é que todas elas são anfipáticas, constituídas por uma longa cadeia carbônica, localizando-se sempre na região hidrofóbica da

proteína. Todas essas características são compartilhadas com a molécula de α -tocoferol, que também possui uma cauda de carbonos alifáticos e interage com a BthTX-I na região hidrofóbica, como mostrado na estrutura cristalográfica utilizada no presente trabalho (PDB ID: 3CXI) (Figura 7). Entretanto, compreender como um ativador alostérico atua auxiliando tais proteínas a expressarem seus efeitos miotóxicos, bem como as características que o distingue de uma molécula inibidora, é uma limitação que o presente trabalho busca solucionar.

As simulações de MD e MDeNM demonstraram que o α -tocoferol garante maior rigidez à BthTX-I, como observado pelo padrão de Energia Livre (Figura 19 e 28) e distribuição dos ângulos (Figura 20 e 29). Porém, a análise dos ângulos sugere que algumas direções parecem não ser limitantes para ambos os sistemas, sugerindo que o α -tocoferol permite alguns padrões de direção, como observado na Figura 21 – migração em direção ao estado inativo após etapas de excitação de MDeNM – e na Figura 23 – migração natural para o estado ativo durante simulações livres de MD. Esse resultado é interessante, pois sugere que a disposição dos monômeros pode oscilar dentro da faixa desses estados conformacionais, partindo do ponto de vista da distribuição dos ângulos proposto por Borges, Lemke e Fontes (2007), e que o α -tocoferol não interfere na movimentação desses estados, embora induza a BthTX-i a permanecer no estado ativo (Figura 23).

Outro ponto importante a ser abordado é a possibilidade de desestabilização dimérica para as excitações do sistema BthTX-I: altos valores de Rg e RMSD (Figura 19) foram observados para esse sistema nas simulações de MDeNM e talvez essas grandes alterações podem estar relacionadas com a perda da estrutura quaternária. Além disso, esse resultado pode ser relacionado com a distribuição dos ângulos da Figura 20, onde a BthTX-I atinge valores extremos de *Roll* e *Tilt*, notadamente nas regiões de *Roll* próximo de 210° e *Tilt* próximo de -20° . Neste contexto, novamente, o α -tocoferol parece ser peça fundamental pra garantir estabilidade ao dímero, ao mesmo tempo que dá liberdade para o domínio MDiS se movimentar. Além disso, essa região (*Roll* em torno de 210° e *Tilt* em torno de -20°) pode ser importante para descrever estruturas conformacionais além do estado ativo (observado na cristalografia), uma vez que essa configuração angular parece estar relacionada com aspectos estruturais importantes, que serão abordados na seção 5.2.3.

Embora a disposição dos monômeros possa oscilar, o comportamento do MDiS apresentou um padrão para as simulações de MD. Como é possível observar nas Figuras 12A e 25A, o MDiS tende a interagir diretamente com a Hélice -I do outro monômero do dímero quando na ausência do α -tocoferol, assumindo um canal hidrofóbico fechado e uma interação estável dessas regiões e, consequentemente, apresentando uma conformação dimérica mais estática. Por outro lado, quando a BthTX-I está em contato com o α -tocoferol, o canal hidrofóbico permanece ocupado e a interação

do MDiS com a Hélice-I é prevenida, com o MDiS tendendo a se distanciar da Hélice-I e ficando mais livre para o solvente, possibilitando movimentos como o de aproximação ao plano de SO₄ (Figura 25B). Esse evento de liberdade do MDiS pode ser diretamente relacionado com o efeito alostérico esperado para moléculas desse tipo, etapa importante para a expressão do mecanismo de ação das Lys49-homólogas (FERNANDES *et al.*, 2013).

Um recente trabalho realizado com a MjTX-II, uma miotoxina de *Bothrops moojeni*, buscou entender o efeito de ácidos graxos de diferentes tamanhos na estabilidade conformacional da proteína e foi observado que aqueles de maiores caudas levaram a uma maior estabilidade dimérica (SALVADOR *et al.*, 2018a). De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, moléculas que ligam na cavidade hidrofóbica e se estendem para fora da mesma conferem estabilidade dimérica e liberdade do MDiS para o solvente e consequente aproximação ao plano de SO₄ apresentam características de ativadores alostéricos. Esses resultados podem explicar como a ocupação do canal hidrofóbico por diferentes moléculas pode resultar em ativação ou inibição da miotoxina, de acordo com as propriedades físico-químicas de tais moléculas. Por exemplo, embora a modificação da BthTX-I por BPB (do inglês, *p-bromophenacyl bromide*) ocorra no canal hidrofóbico, esta modificação leva à inibição da proteína, através da interação do MDiS com a Hélice-I e, portanto, restrição da movimentação do MDiS.

5.2.3. A Exposição do MDiS pode estar Relacionada com a Distribuição Angular

De acordo com dados de cristalografia, existem duas formas estruturais características para a BthTX-I – ativa e inativa – que podem ser descritas através da disposição dos monômeros na constituição do dímero. Basicamente, os ângulos *Roll* e *Tilt* podem fazer essa descrição de forma satisfatória, como previamente reportado (BORGES; LEMKE; FONTES, 2017). Por exemplo, um representante do estado inativo é formado por um padrão *Roll* x *Tilt* 141° x 53° (PDB ID 3HZD), enquanto que o estado ativo pode ser descrito pelos valores 179° x 26° (PDB ID 3CXI).

A descrição dos ângulos *Roll* e *Tilt* para a BthTX-I também foi feita para as simulações de MD e MDeNM. Nas simulações de MD, foi possível observar que os sistemas BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol tenderam a oscilar dentro da faixa que compreende o estado ativo e inativo (Figura 29), indicando que ambas as simulações tendem a se manter nessa região. Dada a estabilidade das estruturas, demais medidas foram também estáveis, notadamente em relação à disposição do MDiS ao plano de SO₄, com valores de DSO₄ acima de 10 Å (Figura 33).

Distância do MDiS da BthTX-I ao Plano de SO₄ (100 ns)

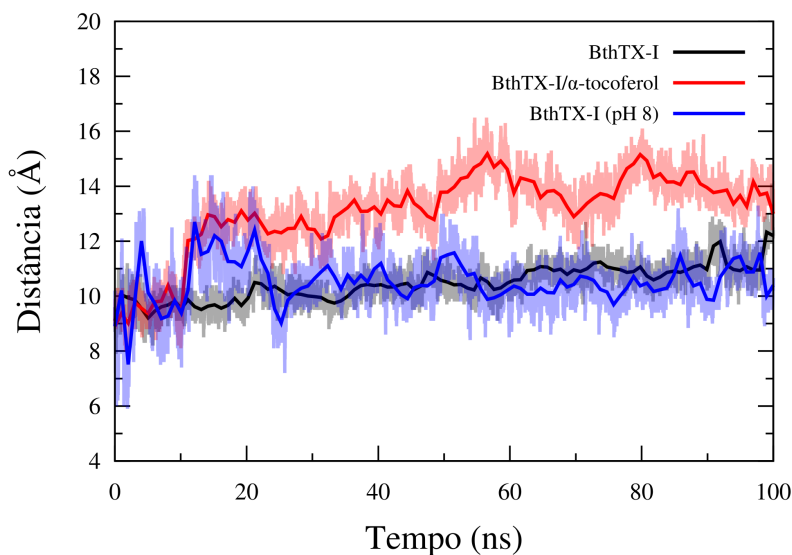


Figura 33. Distância dos MDiS ao plano SO₄ (DSO₄) para a BthTX-I (curva em preto), BthTX-I/α-tocoferol (curva em vermelho) e BthTX-I em pH 8 (curva em azul) durante 100 ns de MD. Foi aplicada uma função de suavização de cada uma das curvas (cores claras), chamada bezier.

Por outro lado, a MDeNM foi capaz de excitar cada sistema para várias outras direções, como já discutido, porém algumas réplicas foram capazes de induzir a BthTX-I para além do estado ativo observado na cristalografia, apresentando valores de *Roll* e *Tilt* próximos de 10° e 190°, respectivamente (Figura 20).

O ângulo *Tilt* parece ter uma certa importância estrutural para a BthTX-I, visto que essa medida se relaciona positivamente com os valores de DSO₄. Tais medidas apresentam alta correlação ($R = 0,73$), enquanto que o ângulo *Roll* apresentou correlação mais baixa ($R < 0,5$) para as simulações de MDeNM. De acordo com isso, o ângulo *Tilt* também apresentou alta correlação para simulações de MD da BthTX-I ($R = 0,7$) e BthTX-I/α-tocoferol ($R = 0,92$). Além disso, as simulações de 10 ns – realizadas após o direcionamento das estruturas para o estado inativo – também apresentou a mesma tendência para os mesmos sistemas, com $R = 0,7$ e $R = 0,92$, respectivamente. Sendo assim, a inspeção desse ângulo pode ser essencial para descrever a movimentação do MDiS em direção à membrana celular, etapa importante para a expressão do mecanismo de ação da BthTX-I (FERNANDES *et al.*, 2013).

Por outro lado, a simulação da BthTX-I em pH 8 mostrou que, embora a proteína possa atingir baixos valores de *Tilt*, a medida DSO₄ não diminuiu (com coeficiente de correlação menor, de $R = 0,53$). A distribuição angular para o sistema em pH 8 e também da BthTX-I e BthTX-I/α-

tocoferol em pH 7 pode ser visto na Figura 34.

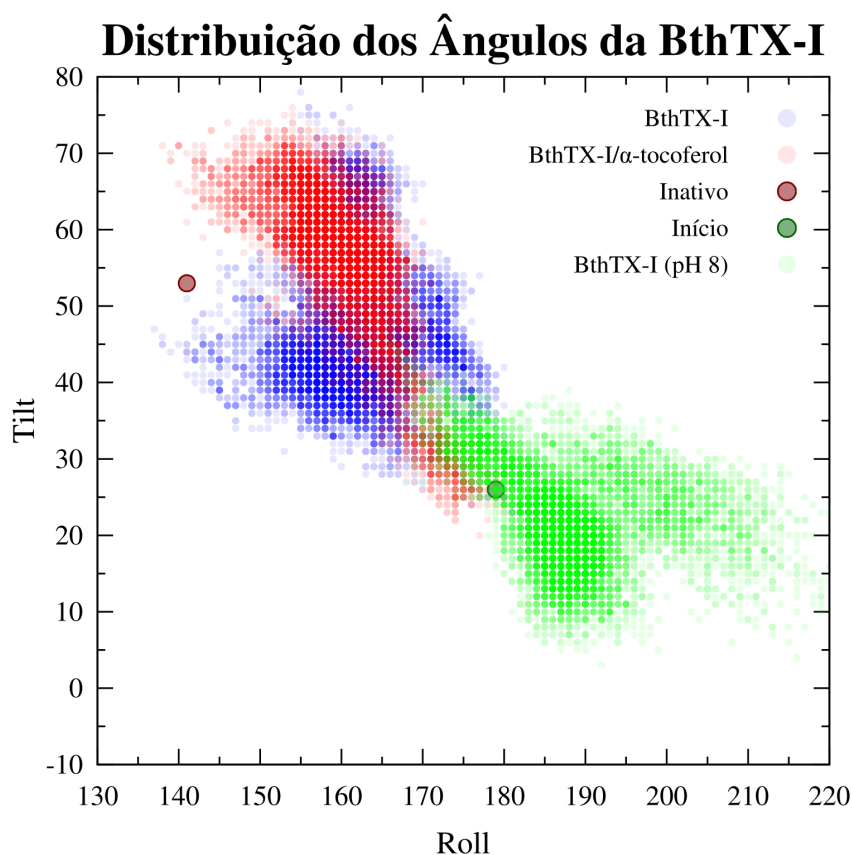


Figura 34. Distribuição dos ângulos *Roll* e *Tilt* para a BthTX-I (círculos em azul), BthTX-I/α-tocoferol (círculos em vermelho) e BthTX-I em pH 8 (círculos em verde). Estado inativo (PDB ID: 3HZD) e inicial (estrutura equilibrada, estado ativo) estão representados em círculos vermelho escuro e verde escuro, respectivamente.

Para este evento, duas explicações podem ser desenvolvidas:

i) visto que a proteína não apresenta qualquer ativador alostérico, a medida HMdist tende a diminuir, impedindo assim a liberdade de movimentação do MDiS. Embora a interface da proteína altere, os MDiS continuarão a interagir com as Hélices-I, visto que o MDiS é uma região dentro de uma área de *loop* – região com alta flexibilidade – ele pode apresentar certa independência estrutural quando movimentos de baixa amplitude são observados;

ii) a aproximação do MDiS ao plano de SO_4 pode estar relacionada com movimentos de alta amplitude, uma vez que as simulações de MD (exceto as de 10 ns) não foram capazes de atingir baixos valores para tal medida. Provavelmente, graças aos movimentos de alta amplitude provenientes da MDeNM, a BthTX-I pode ter atingido um diferente estado energético, onde permite a movimentação do MDiS em direção do plano de SO_4 . Com relação ao comportamento do

MDoS, aparentemente, esta região não apresentou modificações consideráveis. É relatado que essa região necessita de um alinhamento, onde a distância dessa região em cada monômero deve ser em torno de 16 Å (SALVADOR *et al.*, 2018a). Entretanto, para todos os sistemas simulados, incluindo a BthTX-I em pH 8, essa distância se manteve relativamente constante, sugerindo que, nas condições de simulação, talvez essa região não sofra tanta alteração estrutural dentro do contexto conformacional da BthTX-I no estado ativo (Figura 35A). O mesmo foi observado para as simulações de 10 ns após induzir a BthTX-I próximo ao sistema inativo (Figura 35B).

Os resultados obtidos no presente trabalho podem trazer avanços na compreensão do mecanismo de ação da BthTX-I, através de conformações geradas além das estruturas cristalográficas.

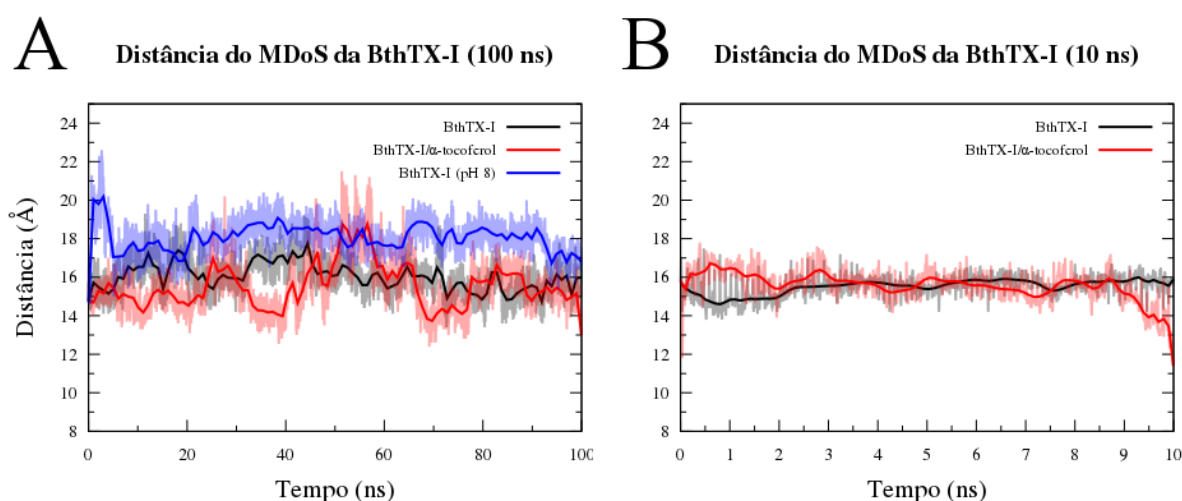


Figura 35. Distância do MDoS para a BthTX-I em simulações de MD (A): sistemas BthTX-I, BthTX-I/α-tocoferol e BthTX-I em pH 8 estão representados pelas curvas em preto, vermelho e azul, respectivamente; MDeNM (B): sistemas BthTX-I e BthTX-I/α-tocoferol representados pelas curvas em preto e vermelho, respectivamente. Foi aplicada uma função de suavização de cada uma das curvas (cores claras), chamada bezier.

5.3. Comportamento Oligomerizante da BthTX-I na Presença do α-Tocoferol

As PLA2s-homólogas apresentam características peculiares quando se trata do seu estado oligomérico. Diversos estudos apontam que essas proteínas assumem estados oligoméricos e tais estados são essenciais para a expressão dos seus efeitos farmacológicos (ANGULO *et al.*, 2005; de OLIVEIRA; FERREIRA; WARD, 2009), entretanto, o comportamento dessas miotoxinas pode ser ainda mais complexo. Por exemplo, foi observado que a MjTX-I (uma miotoxina de *Bothrops moojeni*) possui tendência a oligomerizar à medida que é aumentada sua concentração

(SALVADOR *et al.*, 2013). Outros trabalhos demonstram que tais proteínas podem assumir conformações tetraméricas, como mostrado no estudo da MjTX-II em complexo com a suramina (SALVADOR *et al.*, 2018b). Já para a BthTX-I, é notável sua habilidade em assumir a conformação dimérica em solução (FERNANDES *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2013), mesmo quando em complexo com ligantes, como visto no estudo realizado com o ácido chicórico (Cardoso *et al.*, 2018) ou suramina (MURAKAMI *et al.*, 2007), por exemplo.

No presente trabalho, experimentos de DLS foram essenciais para entender como o α -tocoferol influencia no estado oligomérico da BthTX-I, onde, a medida que a concentração do α -tocoferol é aumentada, a BthTX-I tende a oligomerizar, atingindo conformações oligoméricas maiores que dímero, podendo assumir aglomerados até maiores que tetrâmeros, com R_H de 6,5 nm (proporção 1:10). É importante notar que os efeitos do empacotamento cristalográfico no estudo estrutural da BthTX-I permite a mesma forma tetrâmeros. Esse problema foi alvo de debate por muitos anos, pois tal artefato da cristalografia permitiu que fossem desenvolvidos os modelos diméricos do Dímeros Largo e Dímero Compacto, sendo este último o mais provável, como mostrado por estudos energéticos (dos SANTOS; SOARES; FONTES, 2009). Aparentemente, os contatos observados na cristalografia também podem ser observados em solução, ao menos quando as miotoxinas são tratadas com ligantes com efeito oligomerizante.

O efeito oligomerizante de ligantes de PLA₂s-homólogas miotóxicas também foi observado num estudo recente envolvendo moléculas de SDS, onde esta foi responsável por induzir a oligomerização da BPII (uma miotoxina de *Protobothrops flavoviridis*) (MATSUI *et al.*, 2019), se relacionando com os resultados obtidos por DLS com o α -tocoferol. De forma interessante, o SDS também é considerado um ativador alostérico para esse grupo de proteínas, modulando-as de modo a aumentar sua atividade perturbadora de membranas (BORTOLETO-BUGS; NETO; WARD, 2004; BORTOLELO-BUGS *et al.*, 2007). Sendo assim, o SDS – bem como ácidos graxos e α -tocoferol – são classificados como ativadores alostéricos, visto que compartilham semelhanças estruturais (FERNANDES *et al.*, 2013) e, de acordo com a ideia proposta no presente trabalho (seção 5.2.2), tais moléculas devem atuar de forma similar na perturbação da interação MDiS-Hélice-I, otimizando a atividade das PLA₂s-homólogas.

Estruturalmente falando, a estabilização do dímero da BthTX-I é dado majoritariamente por contatos hidrofóbicos formados pela Hélice-I e o MDiS, como mostrado previamente na figuras 12 e 24, que mostram a interação dessas regiões quando a proteína está em sua forma nativa. Modificações nessa região, como a clivagem da Hélice-I afetam diretamente a atividade da MjTX-II, como mostrado por Stábeli e colaboradores (2006). Além disso, o estudo com o inibidor ácido rosmarínico demonstrou que sua interação com a Hélice-I da PrTX-I, uma miotoxina de *Bothrops*

pirajai, é capaz de reduzir a atividade da proteína consideravelmente (dos SANTOS *et al.*, 2011). Tais resultados reforçam a importância da Hélice-I para as PLA₂S-homólogas e, como mostrado no presente trabalho, essa porção das proteínas é importante para sua estabilização dimérica.

Embora o contato Hélice-I/MDiS seja importante na estabilização dimérica, segundo pontos abordados anteriormente na seção 5.2.2, é necessário que haja o distanciamento dessas duas regiões para que então o MDiS possa mover no solvente e então se aproximar do plano da membrana (Figura 25), notadamente quando a BthTX-I realiza movimentos de alta amplitude, como mostrado pelo cálculo dos modos normais (Figura 16) e estudos de MDeNM (Figura 19). O contato do α -tocoferol com o MDiS é variável, onde sua interação ocorre principalmente com os resíduos de Leu111 de cada monômero e de forma mais sutil para os resíduos de Phe114 nos estudos de MDeNM. Além disso, quando o sistema é simulado por um período mais longo, a interação de ambos resíduos reduz consideravelmente (Tabela 4). Para garantir a estabilidade dimérica após a perda dessa interação, outras regiões da proteína podem fazer esse papel, como por exemplo, resíduos de aminoácidos presentes no *loop* de cálcio ou até mesmo a Hélice-I. Como observado na tabela 4, os contatos da BthTX-I com o α -tocoferol são mantidos com alta prevalência nos resíduos de aminoácido Leu2, Phe3 e Val30. Esses resíduos formam uma interface de interação com o α -tocoferol, apresentando contatos próximos ao ligante, levando a sua estabilização e consequente manutenção do estado oligomérico da miotoxina (Figura 36). Deve-se destacar ainda que esses resíduos (Leu2, Phe3 e Val30) apresentam alto grau de conservação dentro da família das PLA₂S-homólogas, como mostrado previamente por Salvador e colaboradores (2013), reforçando ainda mais a participação e importância desses resíduos para tais proteínas. Finalmente, a interação entre as moléculas de α -tocoferol também parece ter um papel importante na estabilidade dimérica da BthTX-I, visto que seus contatos correspondem a torno de 50% do tempo (Tabela 4).

Graças às interações com outras porções da BthTX-I, como abordado no parágrafo acima, o distanciamento do MDiS do α -tocoferol se torna algo possível para a proteína, sem prejudicar seu estado oligomérico. A dinâmica dessas modificações estruturais parece ser essencial na compreensão do mecanismo de ação da BthTX-I – podendo ser estendido para diversas outras proteínas da mesma família – uma vez que a liberação do MDiS para o solvente resulta na sua aproximação à membrana. Esta aproximação parece estar relacionado com estruturas mais reativas com membranas, onde tais estruturas apresentam características conformacionais relevantes, que também são reforçadas pelo estudo dos ângulos de Euler (Figura 23).

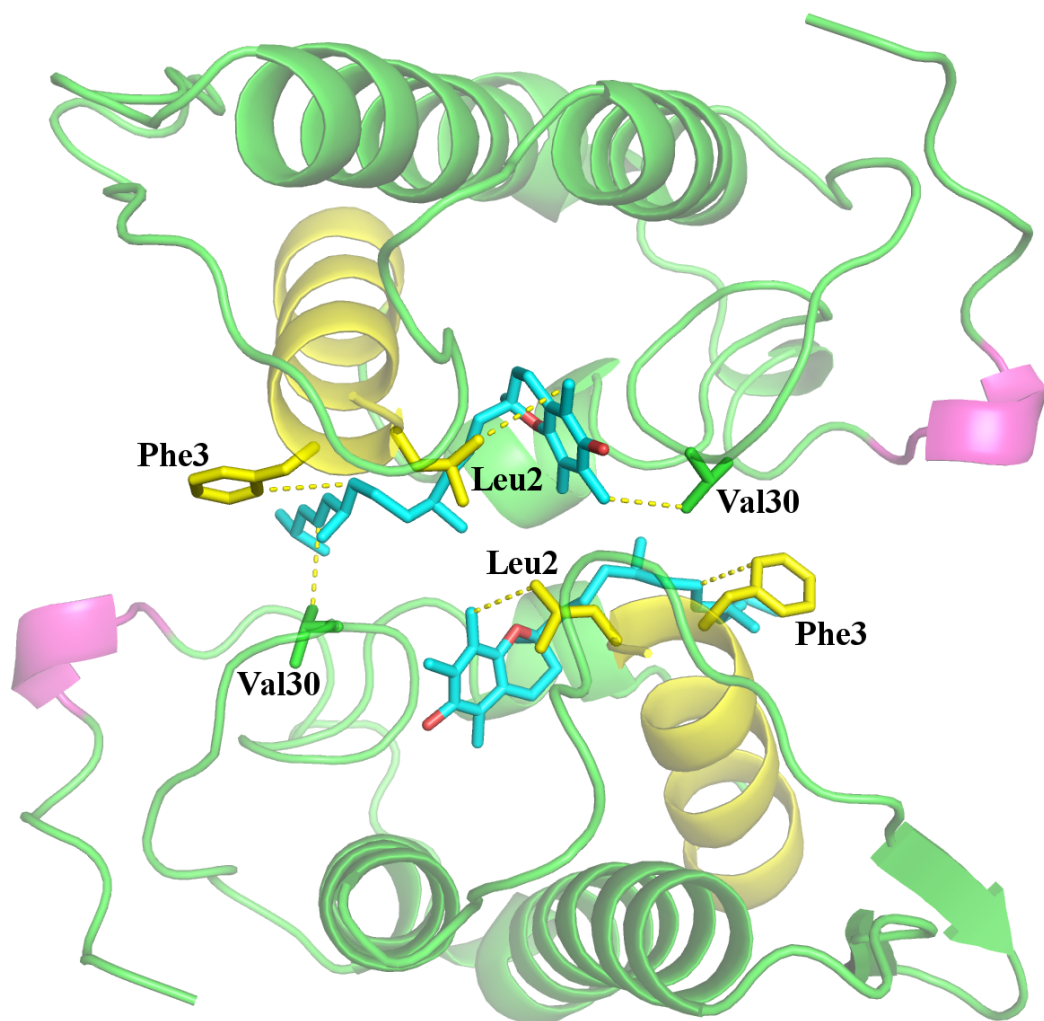


Figura 36. Estrutura final do complexo BthTX-I/ α -tocoferol para 10 ns de simulação da BthTX-I após indução ao estado inativo pela técnica de MDeNM mostrando os contatos importantes na estabilização do complexo. Todas as interações, abaixo de 4,5 Å, são representadas pela linha tracejada amarela. BthTX-I, α -tocoferol, Hélice-I e MDiS estão representados em verde, ciano, amarelo e roxo, respectivamente. Imagem gerada pelo Pymol (DELANO, 2002).

5.4. Aspectos Estruturais na Compreensão do Mecanismo de Ação da BthTX-I

As PLA₂S-homólogas são caracterizadas por apresentarem atividade miotóxica, evento documentado há décadas (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988), porém consolidado com a produção da BthTX-I recombinante, provando sua atividade independente de catálise (WARD *et al.*, 2002). Devido aos testes iniciais terem sido com células musculares, tais proteínas foram identificadas como miotoxinas, embora uma série de efeitos em outros tipos celulares tenha sido observado posteriormente: efeito neurotóxico (GALLATI; CAVALCANTI, 2010); atividade pró-

inflamatória em ratas Wistar (Barbosa *et al.*, 2005); e atividade bactericida e anti-parasítico (STÁBELI *et al.*, 2006; ARAGÃO; CHIOATO; WARD, 2008). Tais efeitos são relacionados atividades nas membranas desses tipos celulares, evento reproduzido em estudos com lipossomas (BORTOLELO-BUGS *et al.*, 2007). Sendo assim, uma série de estudos foi desenvolvido visando compreender como as PLA₂s-homólogas agem em membranas celulares.

Estudos estruturais apontaram a presença de uma região de saliência hidrofóbica na região C-terminal com alto grau de conservação no grupo das PLA₂s-homólogas, observados através do estudo cristalográfico de algumas proteínas do grupo (AMBROSIO *et al.*, 2005). Posteriormente, experimentos de mutagênese demonstraram que essa região C-terminal é responsável por se inserir na membrana, levando a desestabilização de lipossomas e então liberação do seu conteúdo interno (FERREIRA *et al.*, 2008). Graças às contribuições desses trabalhos, foi possível desenvolver o mecanismo de ação proposto por Fernandes e colaboradores (2013), considerando que as PLA₂s-homólogas atuam penetrando sua região C-terminal – chamadas agora de MDiS – e então desestabilizando a membrana, levando à morte celular.

No presente trabalho, foi observado uma alta diversidade conformacional para a BthTX-I (Figura 19), juntamente com alterações conformacionais do MDiS (Figura 25B) e também foi notada uma forte correlação deste domínio com a disposição dos monômeros do dímero, através do ângulo *Tilt*. Sendo assim, foi possível atingir conformações para a BthTX-I onde o MDiS se aproximou bastante do plano de SO₄. Algumas réplicas de MDeNM foram capazes de reproduzir esse movimento em ambos os sistemas (BthTX-I e BthTX-I/ α -tocoferol), além de ter sido observado na simulação de 10 ns para o sistema BthTX-I/ α -tocoferol (Figura 25B). Abaixo, a representação das estruturas geradas para uma das réplicas capazes de gerar tal movimento (sistema BthTX-I), onde é possível notar o movimento de torção do dímero, levando a diminuição das medidas DSO₄ e do ângulo *Tilt*, e consequente aproximação dos MDiS à membrana (Figura 37A). Tal aproximação pode ser melhor observada num modelo com membranas de DMPC/DMPG geradas pelo CHARMM-GUI (JO *et al.*, 2008) apenas para ilustrar o mecanismo de ação proposto para a BthTX-I sobre uma membrana celular (Figura 37B e Apêndice, Vídeo 3).

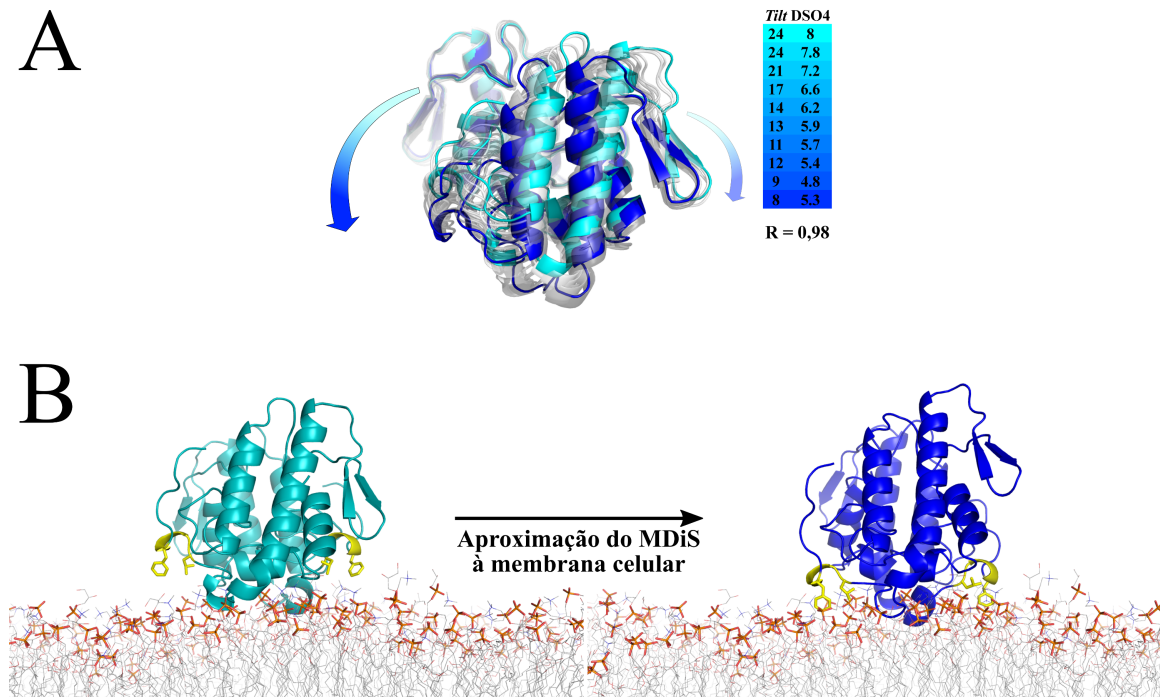


Figura 37. Modelo dinâmico da atividade da BthTX-I numa bicamada lipídica. Em cima (A) estão representadas as dez estruturas da BthTX-I retiradas da réplica 6 da simulação de MDeNM, onde foram sobrepostas a fim de mostrar a movimentação do MDiS em direção à membrana, de acordo com as setas apontando para baixo. Estruturas inicial e final da BthTX-I são representadas em ciano e azul, respectivamente, enquanto que as intermediárias estão representadas em tons de cinza com transparência de 50%. Também é possível observar os valores de *Tilt* e DSO4 migrando com alta correlação (R), seguindo a mesma tendência de cores: inicial em ciano e final em azul. Abaixo (B), a aproximação do MDiS (em amarelo) – com os resíduos Leu111 e Phe114 representados em *sticks* – é observada num modelo de membranas de DMPC/DMPG, com a BthTX-I na conformação “super-ativa” representada em azul escuro. Estruturas da BthTX-I e da membrana lipídica geradas pelo Pymol (DELANO, 2002), seguido de confecção da imagem utilizando o Inkscape.

Dessa forma, é possível propor que o mecanismo de ação da BthTX-I se inicia com a ligação com moléculas alostéricas – como o α -tocoferol ou ácidos graxos, por exemplo – garantindo a estabilidade dos monômeros na conformação do Dímero Compacto. Embora a presença do ativador alostérico garanta coesão ao dímero, os movimentos conformacionais de ativação e inativação ocorrem livremente, como observado previamente nas figuras 20 e 22. Numa etapa seguinte, a BthTX-I seria capaz de oscilar e então atingir o estado ativo, e, com o auxílio do ativador alostérico (discutido na seção 5.2.2), a interação MDiS com a Hélice-I seria perturbada, permitindo a movimentação e exposição do MDiS para o solvente (Figura 25B). A movimentação da interface dimérica e MDiS em direção ao plano da membrana ocorre em sincronia (alta correlação) e esse movimento parece ser fundamental para atingir a conformação mais reativa com

a membrana celular. Em seguida, a BthTX-I seria então capaz de reconhecer a membrana através do MDoS e então aproximar os MDiS da superfície da membrana, atingindo a região transmembrânica. Tal evento ocorrendo por N vezes (N dímeros), leva então à desestabilização da membrana celular com consequente danos à célula.

Embora a cristalografia seja uma técnica de alta confiança para determinar estruturas de proteínas, existem limitações quanto a compreensão dos diferentes estados conformacionais atingidos pela proteína em solução. Uma alternativa a isso é aplicar diferentes técnicas como o RMN (JAMES; TAWFIK, 2003) e/ou então com simulações computacionais (DROR *et al.*, 2012). Neste último caso, o presente trabalho buscou ir além do mecanismo atualmente proposto, na tentativa compreender como a BthTX-I se comporta em solução através de estruturas geradas computacionalmente. É interessante notar que foram encontradas conformações da BthTX-I que oferecem fortes indicativos do aumento da exposição do seu principal domínio relacionado aos seus efeitos farmacológicos. Tais estruturas poderiam ser consideradas “super-ativas”, uma vez que não puderam ser identificadas pela cristalografia até o momento.

Outro aspecto relevante sobre o movimento do MDiS em direção ao plano de SO₄ é que ele pode ser descrito essencialmente pelo modo normal 7 (Figura 16), o de maior amplitude. Além disso, é observado que tal modo é um dos que apresenta maior coletividade dentre os modos utilizados no presente trabalho (Tabela 2). De modo geral, os movimentos das proteínas podem ser descritos de acordo com poucos modos normais, usualmente os de alta amplitude – geralmente os de maior coletividade. Aparentemente, existe uma coerência estrutural que guia as proteínas a desempenharem suas funções através de poucas direções de movimentos, observados pelos modos normais (BAHAR *et al.*, 2010), e a BthTX-I parece se comportar da mesma maneira.

Pensando no ambiente real onde a BthTX-I atua como sendo o momento após a inoculação do veneno na presa, alguns pontos devem ser levados em consideração. É notado que os danos causados pelas PLA₂s-homólogas em tecidos ocasionam em lesões na área atingida, levando à degradação notadamente do tecido muscular e consequente mionecrose (MEBS; OWNBY, 1990). Em resposta, o tecido afetado promove uma reação inflamatória, como previamente observado em ratas Wistar (BARBOSA *et al.*, 2005), bem como a produção de compostos pró-inflamatórios como ciclooxigenase-2 e prostaglandinas, além da expressão do fator de transcrição NF- κ B (MOREIRA *et al.*, 2013). Todas essas atividades constituem numa tentativa do tecido em reverter os efeitos tóxicos das proteínas do veneno de serpentes.

Outra característica que deve ser levada em consideração é que a resposta inflamatória resulta na redução drástica do pH extracelular abaixo de 6,0 (LARDNER, 2001), e nessa faixa de pH a BthTX-I tem sua atividade perturbadora de membranas prejudicada (de OLIVEIRA *et al.*,

2011). Dentro desse panorama, como seria possível observar o efeito miotóxico das PLA₂s-homólogas? Alguns pontos podem ser abordados na tentativa de entender melhor tal problema. Uma possível explicação para esse evento seria a presença de microambientes formados pelos componentes do próprio veneno botrópico quando inoculado na presa, permitindo então a ação miotóxica sobre as células musculares. Outra explicação para tal pergunta seria o rápido tempo de atividade das miotoxinas sobre as células musculares em pH fisiológico, além da ativação de intermediários intracelulares que causam diversas respostas celulares muitas vezes irreversíveis. Um dos efeitos das PLA₂s-homólogas é a ativação de cascatas sinalizatórias intracelulares, resultando na expressão de MAPK p38 (MOREIRA *et al.*, 2013), por exemplo. Essa proteína está relacionada com vários processos celulares, dentre eles apoptose e situações de estresse celular (CUADRADO, A.; NEBRED, 2010). Ainda, foi observado que o as miotoxinas induzem o influxo de Ca²⁺ do de células musculares (CINTRA-FRANCISCHINELLI *et al.*, 2010), e tal evento também leva a produção de intermediários intracelulares, colocando as células numa situação de estado irreversível da mionecrose, como discutido por Fernandes e colaboradores (2013).

Por fim, deve-se notar ainda que a otimização do efeito das PLA₂s-homólogas pode ser favorecida devido o veneno apresentar vários componentes atuando ao mesmo tempo, inclusive as PLA₂ catalíticas – capazes de clivar fosfolípidios, liberando moléculas de ácido graxos no meio. Uma vez que eles são livres, eles podem interagir com as PLA₂s-homólogas e então catalisar sua ativação, como previamente proposto (BORTOLETO-BUGS; NETO; WARD, 2004). Como mostrado, ativadores alostéricos, como o α -tocoferol, favorece a estabilidade dimérica da BthTX-I e isso pode ser outro fator determinante na manutenção do estado oligomérico relevante biologicamente dessas miotoxinas mesmo em condições fisiológicas pouco favoráveis. Em acordo com isto, foi mostrado que existe uma sinergia entre esses grupos de proteínas, onde a presença de PLA₂s catalíticas é capaz de aumentar o efeito da PLA₂s-homóloga bastando a presença de apenas 0,1% da primeira (MORA-OBANDO *et al.*, 2014). É interessante pensar nessas características evolutivamente, onde é possível observar a seleção gradual dos componentes do veneno da serpente, permitindo sua interação e consequente otimização do seu efeito sobre a presa.

6. CONCLUSÕES

I. Ambientes de pH ácido alteram o estado oligomérico da BthTX-I de modo a desfazer a conformação quaternária, impossibilitando-a de expressar seus efeitos farmacológicos;

II. A Hélice-I tem importância estrutural para a BthTX-I, uma vez que participa da estabilização dimérica, através da interação com o MDiS;

III. As simulações de MD foram essenciais para determinar a estabilidade da conformação quaternária da BthTX-I observada na cristalografia, constituindo um resultado que favorece a conformação proposta pelo Dímero Compacto;

IV. A técnica de MDeNM se mostrou mais eficiente que a MD para preencher o espaço conformacional para a BthTX-I;

V. O MDiS pode apresentar conformações mais diversas que as observadas na cristalografia, sendo mais expostos ao solvente e se aproximando do plano de SO_4 . Tais estruturas podem estar relacionadas com conformações da BthTX-I consideradas “super-ativas”;

VI. O α -tocoferol tem papel importante na oligomerização e estabilização quaternária da BthTX-I, além de participar na modulação do MDiS, facilitando sua exposição ao solvente;

VII. A descrição conformacional da BthTX-I através dos ângulos de Euler parece ser mais prudente ao estudar movimentos conformacionais de alta amplitude. Em simulações de MD, onde todos os graus de liberdade estão agindo – apresentando muitos movimentos locais – pode não apresentar um padrão notável;

VIII. O modo normal 7, de alta coletividade, possui um movimento que favorece a movimentação do MDiS em direção ao plano de SO_4 ;

IX. Existe uma forte correlação positiva entre o ângulo *Tilt* e a distância DSO₄, que pode ser observada quando movimentos de alta amplitude são realizados;

X. O espectro conformacional gerado pelas simulações de MDeNM pode gerar artefatos, notadamente observado no sistema BthTX-I. Uma alternativa para evitar tais conformações poderia ser determinar o momento em que a estrutura quaternária é perdida. Tal procedimento pode ser uma encorajadora limitação no presente trabalho, mas que poderia ser resolvida através da definição de uma “área de estabilidade” da proteína considerando as estruturas dentro das regiões mais visitadas no padrão de Energia Livre.

7. REFERÊNCIAS

- AMBROSIO, A. L.; NONATO, M. C.; ARAÚJO, H. S. S.; ARNI, R.; WARD, R. J.; OWNBY, C. L.; SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C. (2005). A molecular mechanism for Lys⁴⁹-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **Journal of Biological Chemistry**, 280(8): 7326-7335.
- ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; SOARES, A. M.; CHO, W.; LOMONTE, B. (2005). Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. **Toxicon**, 46(3): 291-6.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. (2005) Differential susceptibility of C2C12 myoblasts and myotubes to group II phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms. **Cell Biochemistry and Function**, 23(5): 307-313.
- ARAGÃO, E. A.; CHIOATO, L.; WARD, R. J. (2008). Permeabilization of *E. coli* K12 inner and outer membranes by bothropstoxin-I, A LYS49 phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, 51(4): 538-46.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. (1996). Phospholipase A₂ – A structural review. **Toxicon**, 34(8): 827-841.
- BAHAR, I.; LEZON, T. R.; BAKAN, A.; SHRIVASTAVA, I. H. (2010). Normal Mode Analysis of Biomolecular Structures: Functional Mechanisms of Membrane Proteins. **Chemical Reviews**, 110(3): 1463-97.
- BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; HAVT, A.; TOYAMA, D. O.; EVANGELISTA, J. S. A.M.; FERREIRA, D. P. P.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. (2005). Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, 46(4): 376-386.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; van GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK J. R. (1984). Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. **Journal of Chemical Physics**, 81:

3684-90.

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

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

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

BORGES, R. J.; LEMKE, N.; FONTES, M. R. M. (2017). PLA₂-like proteins myotoxic mechanism: a dynamic model description. **Scientific Reports**, 7(1): 15514.

BORTOLELO-BUGS, R. K.; BUGS, M. R.; NETO, A. A.; WARD, R. J. (2007). A micelle nucleation model for the interaction of dodecyl sulphate with Lys49-phospholipases A₂. **Biophysical Chemistry**, 125(1): 213-220.

BORTOLETO-BUGS, R. K.; NETO, A. A.; WARD, R. J. (2004). Activation of Ca²⁺-independent membrane-damaging activity in Lys49-phospholipase A₂ promoted by amphiphilic molecules. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 322(2): 364-72.

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

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

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

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

CHIOATO, L.; ARAGÃO, E. A.; FERREIRA, T. L.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H.; WARD, R. J. (2007). Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A₂ by scanning alanine mutagenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1768(5): 1247-1257.

CHIOATO, L.; OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SÁ, J. M.; WARD, R. J. (2002). Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A₂. **Biochemical Journal**, 366(3): 971-976.

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

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

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

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

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

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

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

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

de OLIVEIRA, A. H. C.; FERREIRA, T. L.; WARD, R. J. (2009). Reduced pH induces an inactive non-native conformation of the monomeric bothropstoxin-I (Lys49-PLA₂). **Toxicon**, 54(3): 373-378.

de OLIVEIRA, A. H. C.; GIGLIO, J. R.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ITO, A. S.; WARD, R. J. (2001). A pH-Induced Dissociation of the Dimeric Form of a Lysine 49-Phospholipase A₂ Abolishes Ca²⁺-Independent Membrane Damaging Activity. **Biochemistry**, 40(23): 6912-6920.

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

dos SANTOS, J. I.; CARDOSO, F. F.; SOARES, A. M.; SILVA, M. P.; Gallacci, M.; FONTES, M. R. M. (2011). Structural and Functional Studies of a Bothropic Myotoxin Complexed to Rosmarinic Acid: New Insights into Lys49-PLA₂ Inhibition. **PloS One**, 6(12): e28521.

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

DROR, R. O.; DIRKS, R. M.; GROSSMAN, J. P.; XU, H.; SHAW, D. E. (2012). Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology. **Annual Reviews of Biophysics**, 41: 429-52.

FERRÉ-D'AMARÉ, A. R.; BURLEY, S. K. (1994). Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. **Structure**, 2: 357-9.

FERNANDES, C. A. H.; COMPARETTI, E. J.; BORGES, R. J.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. (2013). Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1834(12): 2772-2781.

FERNANDES, C. A. H.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SALVADOR, G. M.; SILVA, M. C. O.; COSTA, T. R.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. (2010). Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. **Journal of Structural Biology**, 171(1): 31-43.

FERNANDES, C. A.H.; BORGES, R. J.; LOMONTE, B.; FONTES, M. R. M. (2014). A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1844(12): 2265-2276.

FERREIRA, T. L.; RULLER, R.; CHIOATO, L.; WARD, R. J. (2008). Insights on calcium-independent phospholipid membrane damage by Lys49-PLA₂ using tryptophan scanning mutagenesis of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, 90(9): 1397-406.

FLOQUET, N.; DURAND, P.; MAIGRET, B.; BADET, B.; BADET-DENISOT, MA, PERAHIA, D. (2009). Collective motions in Glucosamine-6-phosphate Synthase: Influence of Ligand Binding and role in Ammonia Channeling and Opening of the Fructose-6-Phosphate Binding Site. **Journal of Molecular Biology**, 385(2): 653-64.

FUNASA (Fundação Nacional da Saúde). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2^a ed. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 120p.

GALLACCI, M.; CAVALCANTE, W. L. G. (2010). Understanding the in vitro neuromuscular

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LEE, W.; GIOTTO, M. T. S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R. C. (2001). Structural basis for low catalytic activity in lys49 phospholipases A₂ – A hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, 40(1): 28-36.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. (2003). An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, 42(8): 885-901.

LOMONTE, B.; RANGEL, J.(2012). Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, 60(4): 520-530.

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

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. (2003). Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 311(3): 713-720.

MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KÉZDY, F. J.; HEINRIKSON, R. L. (1984). A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49: Functional consequences for calcium and substrate binding. **Journal of Biological Chemistry**, 259(22): 13839-13843.

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

MATSUI, T.; KAMATA, S.; ISHII, K.; MARUNO, T.; GHANEM, N.; UCHIYAMA, S.; KATO, K.; SUZUKI, A.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; TANAKA, Y. (2019). SDS-induced oligomerization of Lys490phospholipase A₂ from snake venom. **Scientific Reports**, 9(1): 2330

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

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

MORA-OBANDO, D.; FERNÁNDEZ, J.; MONTECUCCO, .; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. (2014). Synergism between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A₂ Myotoxins of Viperid Snake Venom *In Vitro* and *In Vivo*. **PloS One**, 9(10): e109846.

MORA, R.; VALVERDE, B.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. (2005). A Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops aspers* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, 45(5): 651-660.

MOREIRA, V.; SOUTO, P. C. M. C.; VINOLO, M. A. R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CURI, R.; TEIXEIRA, C. (2013). A catalytically-inactive snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologue induces expression of cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins through selected signaling pathways in macrophages. **European Journal of Pharmacology**, 708(1-3): 68-79.

MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. (2003). A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A₂s. **Toxicon**, 42(8): 903-913.

MURAKAMI, M. T.; VIÇOTI, M. M.; ABREGO, J. R. B.; LOURENZONI, M. R.; CINTRA, A. C. O.; ARRUDA, E. Z.; TOMAZ, M. A.; MELO, P. A.; ARNI, R. K. (2007). Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. **Toxicon**, 49(3): 378-387.

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

NÚÑEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. (2001). Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, 39(10): 1587-1594.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. (2003). Molecular evolution of myotoxic phospholipases A₂ from snake venom. **Toxicon**, 42(8): 841-854.

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

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

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

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

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

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; SIGLER, P. B. (1985). A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **Journal of Biological Chemistry**, 260(21): 11627-11634.

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

SÁ, J. M.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T. L.; OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. (2004). Topology of the substrate-binding site of a Lys⁴⁹-phospholipase A₂ influences Ca²⁺-independent membrane. **Biochemical Journal**, 382(1): 191-198.

SALVADOR, G. H. M.; dos SANTOS, J. I.; BORGES, R. J.; FONTES, M. R. M. (2018a). Structural evidence for a fatty acid-independent myotoxic mechanism for a phospholipase A₂-like toxin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**, 1866(3): 473-481.

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

SALVADOR, G. H. M.; FERNANDES, C. A. H.; MAGRO, A. J.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CAVALCANTE, W. L. G.; FERNANDEZ, R. M.; GALLACCI, M.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, C. L. P.; FONTES, M. R. M. (2013). Structural and Phylogenetic Studies with MjTX-I Reveal a Multi-Oligomeric Toxin – a Novel Feature in Lys49-PLA₂s Protein Class. **PloS One**, 8(4): e60610.

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

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

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. (2006). *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 142(3-4): 371–381.

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

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

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

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

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

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; de OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SÁ, J. M. (2002). Active-site mutagenesis of a Lys⁴⁹-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **The Biochemical Journal**, 362(1): 89-96.

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

8. APÊNDICE

Vídeo 1. Movimentação do modo normal 7 para o sistema BthTX-I/ α -tocoferol, com a proteína representada em Cartoon, em ciano, e MDiS, em amarelo. Vídeo gerado pelo VMD. Link de acesso: <https://drive.google.com/file/d/15xr7YUC8a00jtXBxmxOW1z0VMR0KYESS> (link reduzido: http://bit.ly/modo_normal_7_btthxi).

Vídeo 2. Movimentação do modo normal 10 para o sistema BthTX-I/ α -tocoferol, com a proteína representada em Cartoon, em ciano, e MDiS, em amarelo. Vídeo gerado pelo VMD. Link de acesso: https://drive.google.com/file/d/1q0VVzBJA5pSicmBE5622u3_57As7epY7 (link reduzido: http://bit.ly/modo_normal_10_btthxi).

Vídeo 3. Modelo dinâmico para o mecanismo de ação da BthTX-I, em Cartoon e cor ciano, onde é possível observar a aproximação do MDiS, em amarelo, à membrana celular. Fosfatos estão representados em *sticks* para facilitar a identificação da superfície da membrana. Vídeo gerado pelo VMD. Link de acesso: <https://drive.google.com/file/d/1lvDXcZUe0rXH8OHjQ9ymTFg-tJcObA8v> (link reduzido: http://bit.ly/mecanismo_de_acao_btthxi).

9. ANEXO

Durante o doutoramento, foram realizados trabalhos colaborativos, os quais renderam em publicações de artigos científicos. Tais artigos estão listados abaixo, em ordem cronológica:

DANTAS, N.; AQUINO, T. M. ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; SILVA-JÚNIOR, E.; GOMES, E. A.; **GOMES, A. A. S.**; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B. Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump. **Chemico-Biological Interactions**, 280: 8-14 (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.009>).

Chemico-Biological Interactions 280 (2018) 8–14



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint



Aminoguanidine hydrazones (AGH's) as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpress NorA efflux pump



Natalina Dantas^a, Thiago Mendonça de Aquino^b, João Xavier de Araújo-Júnior^b,
Edeildo da Silva-Júnior^b, Ednaldo Almeida Gomes^b, Antoniel Augusto Severo Gomes^c,
José Pinto Siqueira-Júnior^{a,**}, Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior^{d,*}

SALVADOR, G. H. M.; DREYER, T. R.; **GOMES, A. A. S.**; CAVALCANTE, W. L. G.; dos SANTOS, J. I.; GANDIN, C. A.; NETO, M. O.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. (2018). Structural and Functional characterization of suramin-bound MjTX-I from *Bothrops moojeni* suggests a particular myotoxic mechanism. **Scientific Reports**, 8: 10317 (DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28584-7>).

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Structural and functional characterization of suramin-bound MjTX-I from *Bothrops moojeni* suggests a particular myotoxic mechanism

Guilherme H. M. Salvador¹, Thiago R. Dreyer¹, Antoniel A. S. Gomes¹,
Walter L. G. Cavalcante^{1,2,3}, Juliana I. dos Santos¹, César A. Gandin¹, Mário de Oliveira Neto¹,
Márcia Gallacci³ & Marcos R. M. Fontes¹ 

SALVADOR, G. H. M.; CARDOSO, F. F.; GOMES, A. A. S.; CAVALCANTE, W. L. G.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. (2019). Search for efficient inhibitors of myotoxic activity induced by ophidian phospholipase A₂-like proteins using functional, structural and bioinformatics approaches. **Scientific Reports**, 9: 510 (DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36839-6>).

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Search for efficient inhibitors of myotoxic activity induced by ophidian phospholipase A₂-like proteins using functional, structural and bioinformatics approaches

Guilherme H. M. Salvador¹, Fábio Florença Cardoso¹, Antoniel A. Gomes¹,
Walter L. G. Cavalcante^{1,2}, Márcia Gallacci³ & Marcos R. M. Fontes¹ 