

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

DEPARTAMENTO DE FÍSICA E BIOFÍSICA

**“Estudos estruturais com fosfolipases A_2 homólogas de veneno
botrópico em presença de íons com importância funcional”**

Rafael Junqueira Borges

Botucatu – SP

Março / 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

DEPARTAMENTO DE FÍSICA E BIOFÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“Estudos estruturais com fosfolipases A₂ homólogas de veneno
botrópico em presença de íons com importância funcional”**

Rafael Junqueira Borges

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas
(Genética) do Instituto de
Biotecnologia de Botucatu –
UNESP, como exigência para a
obtenção do título de Mestre.

Botucatu – SP

Março / 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Borges, Rafael Junqueira.

Estudos estruturais com Fosfolipases A₂ homólogas de veneno botrópico em presença de íons com importância funcional / Rafael Junqueira Borges. – Botucatu : [s.n.], 2012

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

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Capes: 2090100

1. Biologia molecular. 2. Fosfolipases. 3. Serpente peçonhenta - Veneno. 4. Venenos – Análise.

Palavras-chave: Biologia molecular estrutural; Cristalografia de proteínas; Fosfolipases A₂ homólogas; Miotoxinas; Veneno botrópico.

À todos aqueles que lutam pela erradicação da ignorância.

Agradecimentos

Ao universo, por dentre todas as possibilidades, eu surgi e sobrevivi.

Aos meu pais, por todo amor, carinho, apoio e incentivo para que eu lute por meus sonhos.

Ao meu irmão, pelo exemplo que é de *bon vivant*.

Aos amigos mais antigos, pela constância, sinceridade e força que sempre me dedicaram.

Aos novos amigos, por todos os bons momentos que vivemos juntos e por essa forte amizade que formamos.

Aos membros e agregados da Rep. 5 de Paus, por transformarem o tempo fora do trabalho em diversão, descontração e ensinamento.

À Natália Elisa, pelo seu exemplo de simplicidade, carinho, paciência, leveza e autenticidade.

Aos budistas, pela perseverança em sempre manter perspectiva positiva frente aos obstáculos da vida e pelo esforço em manter atitude altruísta.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), pelo apoio técnico.

Ao Prof. Dr. Andreimar Martin Soares pelas amostras de proteínas concedidas.

À todos do meu laboratório, Ângelo, Agnes, Pituta, Guilherme, Patrícia, Andréa, pelas discussões científicas, pelas aulas, pelos ensinamentos e pelas brincadeiras transformando o ambiente de trabalho em um local descontraído, mas não menos produtivo.

À Juliana, pelo apoio, sinceridade e auxílio nos problemas científicos.

Ao meu orientador, pela abertura a novas discussões, por oferecer espaço de participação ativa dos seus alunos, por acreditar em meu potencial e por incentivar meu ingresso na vida acadêmica.

“Existe apenas um bem, o saber, e apenas um mal, a ignorância.”

Sócrates

RESUMO

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) de veneno de serpente são uma das principais toxinas responsáveis pela miotoxicidade e necrose muscular observadas nos acidentes ofídicos. Essas toxinas podem ser separadas em Asp49-PLA₂s, cujo mecanismo é catalítico e dependente de cálcio, e as PLA₂s homólogas, cuja estrutura é semelhante, porém atividade em mecanismo não catalítico e independente de cálcio. Apesar de os detalhes deste mecanismo não serem bem conhecidos, estudos funcionais ressaltam importância da região do C-terminal e estudos cristalográficos propõem, mais especificamente, um sítio miotóxico composto por resíduos básicos e um *hydrophobic knuckle* composto por hidrofóbicos, ambos situados na região C-terminal da toxina. O presente trabalho tem objetivo de oferecer mais detalhes acerca do mecanismo de ação miotóxico independente de cálcio. Para tanto, realizamos estudos cristalográficos com miotoxinas botrópicas BthTX-II (uma Asp-PLA₂s), BthTX-I e PrTX-I (duas PLA₂s homólogas), em presença de íons relevantes para suas atividades. Recentemente, foi demonstrado que íons, tal como manganês, cálcio, zinco entre outros, interferem na atividade biológica de PLA₂s e PLA₂s homólogas. Assim, estudo cristalográfico da PrTX-I e BthTX-I com íons manganês e zinco foram elucidados no estado nativo e complexado. Experimentos *in vivo* indicam que tais íons promoveriam efeito inibitório da miotoxicidade. Enquanto os íons manganês não foram localizados no modelo cristalográfico, os íons zinco foram identificados interagindo apenas no modelo nativo com uma His48 e com as His120 de ambos monômeros. Estudos comparativos destas estruturas com a PrTX-II (PLA₂s homóloga) com ácidos graxos foi desenvolvido e guiaram para elaboração de nova hipótese do mecanismo de ação independente de cálcio de PLA₂s homólogas. Nesta, relação é estabelecida entre sítio miotóxico e *hydrophobic knuckle* e propõe-se participação inédita da His120. Diferentemente de maioria de PLA₂s de veneno de serpentes, a BthTX-II aparenta possuir ambos mecanismos miotóxicos, o catalítico e o independente de cálcio. O modelo cristalográfico da BthTX-II nativa e em presença de íons cálcio indicaram distorção no *loop* de ligação de cálcio que impede a coordenação do co-fator da atividade catalítica. Estudos comparativos com outras PLA₂s de veneno de serpentes auxiliaram a conclusão de que a distorção observada contribuiria para estabelecimento de nova interface dimérica em que ambos C-terminais estão próximos. O mecanismo de ação independente de cálcio da BthTX-II pode apresentar semelhanças com os de PLA₂s homólogas. Dessa maneira, os resultados desse trabalho podem contribuir sobre papel dos resíduos e da região responsável pelo mecanismo miotóxico independente de cálcio exercido pelas fosfolipases A₂ e PLA₂s homólogas botrópicas.

Palavras chave: Biologia molecular estrutural; Fosfolipases A₂ homólogas; Miotoxinas; Veneno botrópico.

ABSTRACT

Phospholipases A₂ (PLA₂s) from snake venom are among the main toxins responsible for myotoxicity and muscular necrosis observed in offidic accidents. These toxins can be separated in Asp49-PLA₂s, whose catalytic mechanism of action is dependent of calcium, and in homologue PLA₂s or PLA₂s-like, whose tertiary structure is similar, although its activity is not catalytic in a calcium independent mechanism of action. Despite the fact that this calcium independent mechanism is not well known, functional studies highlight the C-terminal region and structural studies point to a myotoxic site, composed by basic residues, and a hydrophobic knuckle, composed by aromatic and hydrophobic, in the C-terminal region. The present study aims to gather more knowledge about this myotoxic calcium independent mechanism of action. For this purpose, the botropic myotoxins BthTX-II (an Asp49-PLA₂), BthTX-I and PrTX-I (homologue PLA₂s) were studied in the presence of divalent ions by X-ray crystallography. Recently, it was demonstrated divalent ions, such as manganese, zinc and calcium, interfere with the biological activity of these toxins. The crystallographic structure of PrTX-I and BthTX-I with manganese and zinc ions in a native and complexed form were elucidated. *In vivo* studies demonstrated that these ions inhibit the myotoxic activity of these proteins. Although manganese ions were not found in the structures, zinc ions were found interacting with His48 and the C-terminal residue His120. Comparative studies of this structure and PrTX-II (a homologue PLA₂) complexed with stearic acid were performed and support a new hypothesis for the myotoxic mechanism of action for homologue PLA₂s which includes both myotoxic site and hydrophobic knuckle and, for the first time, His120. Differently from most PLA₂s of snake venom, BthTX-II seems to present both the catalytic and calcium independent mechanism for myotoxicity. The crystallographic structure of the apo BthTX-II and the one in the presence of calcium showed a distortion in the calcium binding loop which may impair the co-factor coordination. Comparison of this model with other snake venom PLA₂s structures led to the conclusion that this distortion contributes to a new dimeric interface formation in which both basic C-terminal regions would be spatially related. This configuration for the C-terminal region is also found in other PLA₂ homologues. Based on functional and phylogenetic studies, we suggest that the BthTX-II myotoxic mechanism of action independent of calcium may possess similarities with the one from other PLA₂s homologues. Therefore, the results of this work add significant findings about the residues and the region responsible for the myotoxic calcium-independent mechanism exerted by botropic PLA₂s and homologue PLA₂s.

Key words: Botropic venom; Homologue Phospholipases A₂; Myotoxins; Phospholipases A₂; Structural molecular biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupos e subgrupos de miotoxinas de veneno de serpente.....	18
Figura 2. Representação em <i>cartoon</i> da estrutura terciária de Asp49-PLA ₂ s de veneno de serpente, em <i>sticks</i> resíduos envolvidos na catálise.....	20
Figura 3. Mecanismo de ação das PLA ₂ s através de uma água e de duas águas.....	21
Figura 4. Dímero convencional e alternativo das Lys49-PLA ₂ s complexadas com suramina e vitamina E.....	32
Figura 5. Etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios X por substituição molecular a partir do veneno bruto.	39
Figura 6. Processo de cristalização por meio do método de difusão de vapor da gota suspensa.....	43
Figura 7. Diagrama de fases do processo de cristalização com variação de concentração de proteína e de agente precipitante.....	43
Figura 8. Cristais de PrTX-I em presença de cloreto de manganês.....	54
Figura 9. Regiões candidatas de ligação dos íons manganês na estrutura PrTX-I/MnCl ₂	56
Figura 10: Valores teóricos do f' e f'' do manganês, enxofre e cloro.....	62
Figura 11. Cristais de PrTX-I em presença de sulfato de manganês.....	62
Figura 12. Cristais de BthTX-I em presença de sulfato de manganês e de cloreto de zinco.....	65
Figura 13. Regiões candidata de ligação dos íons zinco e manganês na estrutura PrTX-I/MnCl ₂ e BthTX-I/Mn ²⁺ Zn ²⁺	70
Figura 14. Cristais de BthTX-I em presença de cloreto de zinco.....	70
Figura 15. Sobreposição da estrutura PrTX-I/MnCl ₂ e da BthTX-I/Mn ²⁺ Zn ²⁺	74
Figura 16. Sobreposição da estrutura BthTX-I/MnSO ₄ e da BthTX-I/Zn ²⁺ em <i>ribbons</i>	75
Figura 17. Desvio no <i>loop</i> de ligação de cálcio do monômero A em BthTX-I/MnSO ₄ e em BthTX-I/Zn ²⁺ em <i>cartoon</i> com a Val32 direcionada para região oposta à molécula de PEG4000, em <i>sticks</i>	75
Figura 18. Região do C-terminal das estruturas cristalográficas botrópicas em presença de íons.....	76

Figura 19. Superfícies dos C-terminais de Lys49-PLA ₂ s botrópicas em diferentes estados classificados pelos ângulo de abertura (θ_A) e ângulo de torção (θ_T) sugeridos por Dos Santos <i>et al.</i> (2009b).....	81
Figura 20. Comparação da cadeia lateral da arginina 34 em monômeros canônicos de diferentes PLA ₂ s homólogas em estado nativo em <i>ribbons</i>	85
Figura 21. Árvore filogenética de PLA ₂ s e PLA ₂ s de PLA ₂ s de veneno de serpente....	89
Figura 22. Alinhamento de Lys49 e Asp49-PLA ₂ s.....	91
Figura 23. Sobreposição de C ^{α} da BthTX-II nativa e com cálcio.....	98
Figura 24. Presença e/ou ausência de cadeia lateral dos resíduos Glu78/B e Lys115/A nas formas complexada e apo da proteína BthTX-II.....	98
Figura 25. Análise do sítio de coordenação do cálcio de Asp49-PLA ₂ s.....	101
Figura 26. Semelhança em <i>cartoon</i> da estrutura quaternária da BthTX-II e o “dímero convencional” de uma Lys49-PLA ₂ , BnSP-7.....	101
Figura 27. Conformações oligoméricas dos dímeros biológicos de BthTX-II, PrTX-III e DakuTX.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios X da PrTX-I/MnCl ₂ em grupo espacial P3 ₁ 21 em dois comprimentos de ondas diferentes.....	55
Tabela 2. Ocupação e <i>B-factor</i> de possíveis ligantes nas regiões candidatas para interação com íons manganês com respectivas estatísticas de refinamento (R e R _{free}).....	58
Tabela 3. Diferentes sítios de ligação e suas respectivas distâncias a átomos de proteínas e/ou moléculas de água.....	60
Tabela 4. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios-X da BthTX-I/MnSO ₄ em grupo espacial P2 ₁ em dois comprimentos de ondas diferentes.....	63
Tabela 5. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios X da BthTX-I/Mn ²⁺ Zn ²⁺ em grupo espacial P3 ₁ 21.....	66
Tabela 6. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios X da BthTX-I/Zn ²⁺ em grupo espacial P2 ₁	69
Tabela 7. Proporção em número inteiros de ligantes por molécula de proteína em cada um dos conjuntos de dados da PrTX-I e BthTX e íons Mn ²⁺ e Zn ²⁺	72
Tabela 8. Desvio em RMSD da sobreposição dos Cα dos monômeros das estruturas cristalográficas PrTX-I/MnCl ₂ , BthTX-I/Mn ²⁺ Zn ²⁺ , PrTX-I/MnSO ₄ e BthTX-I/Zn ²⁺	74
Tabela 9. Capacidade de toxinas botrópicas de clivar fosfolípidos.....	87
Tabela 10. Diferença entre sequenciamento experimental e modelo cristalográfico da PrTX-I e II e BthTX-I.....	91
Tabela 11. Distribuição de resíduos separados por polaridade, cargas e presença de anel aromático entre Lys49 e Asp49-PLA ₂ s com denominação do C-terminal entre básico e ácido.....	94
Tabela 12. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios X da BthTX-II com a uma resolução de 2,10Å.....	96
Tabela 13. Análise de área de interface e energia livre de solvatação das Asp49 miotóxicas e da Asp49-PLA ₂ complexada com cálcio.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

Å (unidade)	=	ångström
ACL miotoxina	=	PLA ₂ homóloga de <i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>
AhalTX	=	Asp49-PLA ₂ ácida de <i>Agkistrodon halys</i>
Ala (A)	=	Aminoácido alanina
Arg (R)	=	Aminoácido arginina
Arg49-PLA ₂ s	=	Fosfolipases A ₂ homóloga com o resíduo arginina na posição 49
Asn (N)	=	Aminoácido asparagina
Asp (D)	=	Aminoácido ácido aspártico
Asp49-PLA ₂ s	=	Fosfolipases A ₂ com o resíduo ácido aspártico na posição 49
BaspTX-II (Mt-II)	=	PLA ₂ homóloga II de <i>Bothrops asper</i>
BPB	=	<i>p-bromophenacyl bromide</i>
BthA-I	=	PLA ₂ ácida I de <i>Bothrops jararacussu</i>
BthTX-I	=	PLA ₂ s homóloga básica I de <i>Bothrops jararacussu</i>
BthTX-II	=	PLA ₂ básica II de <i>Bothrops jararacussu</i>
Ca ²⁺	=	Íon divalente de cálcio
CRD5	=	Repetição em <i>tanden</i> de tipo-C (domínio de reconhecimento de carboidratos)
Cys (C)	=	Aminoácido cisteína
Ca	=	Carbono α
DacuTX	=	Asp49-PLA ₂ ácida de <i>Deinagkistrodon acutus</i>
DLS	=	Dynamic Light Scattering
DTNB	=	<i>5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)</i>
eV (unidade)	=	Elétron volts
Gln (Q)	=	Aminoácido glutamina
Glu (E)	=	Aminoácido ácido glutâmico
Gly (G)	=	Aminoácido glicina
His (H)	=	Aminoácido histidina
kDa (unidade)	=	Kilodáton
Leu (L)	=	Aminoácido leucina
LD ₅₀	=	Dose capaz de matar de 50% dos indivíduos testados
LNLS	=	Laboratório Nacional de Luz Síncroton
LPC	=	<i>Ligand-Protein Contacts</i>
Lys (K)	=	Aminoácido Lisina
Lys49-PLA ₂	=	Fosfolipases A ₂ homólogas com o resíduo lisina na posição 49
MAD	=	<i>Multiwavelength anomalous diffraction</i>
MDB	=	<i>MetalloScripps Database</i>
MIPS	=	<i>Metal Interactions in Protein Structures</i>
MIR	=	<i>Multiple isomorphous replacement</i>
Mn ²⁺	=	Íon divalente de manganês
MnCl ₂	=	Cloreto de manganês
MnSO ₄	=	Sulfato de manganês

Mt-II (BaspTX-II)	=	PLA ₂ homóloga II de <i>Bothrops asper</i>
Mt-III	=	PLA ₂ básica III de <i>Bothrops asper</i>
NCBI	=	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	=	Organização Mundial da Saúde
PDB	=	Banco de dados de proteínas
PEG	=	Polietilenoglicol
Phe (F)	=	Aminoácido fenilalanina
PISA	=	<i>Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies</i>
PLA ₂ s	=	Fosfolipases A ₂
Pro (P)	=	Aminoácido prolina
PrTX-I	=	PLA ₂ s homóloga básica I de <i>Bothrops pirajai</i>
PrTX-II	=	PLA ₂ s homóloga básica II de <i>Bothrops pirajai</i>
PrTX-III	=	PLA ₂ s básica III de <i>Bothrops pirajai</i>
RMSD	=	<i>Root mean square deviation</i> ou desvio calculado através da raiz quadrada da média dos quadrados das distâncias entre átomos equivalentes
SAXS	=	<i>Small Angle X-ray Scattering</i>
Ser49-PLA ₂ s	=	Fosfolipases A ₂ com o resíduo serina na posição 49
sPLA ₂ s	=	Fosfolipases A ₂ secretadas
Trp (W)	=	Aminoácido triptofano
Tyr (Y)	=	Aminoácido tirosina
Val (V)	=	Aminoácido valina
ZnCl ₂	=	Cloreto de zinco
Zn ²⁺	=	Íon divalente de zinco
θ _A	=	Ângulo de abertura
θ _T	=	Ângulo de torção
λ (unidade)	=	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Serpentes e seu veneno.....	15
1.2	Miotoxinas.....	17
1.2.1	Miotoxinas fosfolipases A ₂ não-neurotóxicas	19
1.3	Fosfolipases A ₂ homólogas ou Lys49-PLA ₂ s.....	22
1.3.1	Região responsável pela atividade miotóxica das Fosfolipases A ₂ homólogas	24
1.3.2	Estudos cristalográficos com PLA ₂ homólogas.....	28
1.4	Fosfolipases A ₂ e íons	33
2	OBJETIVOS	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Proteínas utilizadas.....	40
3.1.1	A proteína PrTX-I	40
3.1.2	A proteína BthTX-I	41
3.1.3	Proteína BthTX-II	41
3.2	Experimentos de cristalização.....	41
3.3	Coleta de dados de difração de raios X	45
3.4	Elucidação de estruturas tridimensionais	46
3.5	Espalhamento anômalo	47
3.6	Localização e análise do sítio de coordenação dos metais	48
3.7	Análise e comparação das estruturas cristalográficas	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Estudos estruturais com a PrTX-I e BthTX-I em presença de íons manganês.....	52
4.1.1	Estudos estruturais com a PrTX-I/Mn ²⁺ em grupo espacial P3 ₁ 21.....	53
4.1.2	Análise das regiões candidatas da PrTX-I de interação dos íons manganês	56
4.1.3	Estudos estruturais da BthTX-I em grupo espacial P2 ₁	61
4.2	Estudos estruturais com a BthTX-I em presença de Mn ²⁺ e Zn ²⁺	64
4.2.1	Análise das regiões candidatas da BthTX-I de interação os íons zinco e manganês.....	67

4.3 Estudos estruturais com a PrTX-I em presença de Zn^{2+}	68
4.4 Estudos comparativos da PrTX-I e BthTX-I em presença de íons.....	71
4.5 Estudos da BthTX-II em presença de íons cálcio.....	85
4.5.1 Estudos funcionais da BthTX-II.....	86
4.5.2 Estudos filogenéticos e comparações de sequências entre PLA ₂ s de veneno de serpentes..	88
4.5.3 Estudos estruturais da BthTX-II em presença de íons cálcio	95
4.5.3 Comparação da BthTX-II/ Ca^{2+} e outras PLA ₂ s.....	97
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	103
REFERÊNCIAS	106
APÊNDICE	113

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Serpentes e seu veneno

As serpentes são animais pecilotérmicos pertencentes ao Filo Chordata, Classe Reptilia e Ordem Squamata (Cardoso *et al.*, 2003, p. 13-32). Possuem corpo alongado, desprovido de patas e recoberto por escamas (Cardoso *et al.*, 2003, p. 13-32). Este réptil rastejante e escamoso está enraizado na cultura do ser humano, seja pela sua presença na natureza, seja pelo símbolo que se tornou. Como símbolo, está presente em praticamente todas e quaisquer épocas dos cinco continentes, sendo visto como morte ou rejuvenescimento, ignorância ou sabedoria, mal ou bem, doença ou terapia, veneno ou cura em uma dicotomia universal (Antonioni *et al.*, 2011). Atualmente, a simbologia da serpente continua sendo observada, como o próprio símbolo da medicina, o bastão de Esculápio, ou o temor da população pela superstição ou pelo perigoso veneno (Retief e Cilliers, 2002). Essa dicotomia da serpente de cura e doença é observada nos avanços científicos a partir do estudo do seu veneno e nas sequelas provocadas pelos acidentes ofídicos, respectivamente.

As serpentes podem ser venenosas sem, contudo, serem peçonhentas, já que este termo implica na capacidade de inocular este veneno. Na área de saúde pública, as diversas estimativas indicam que cerca de alguns milhões de acidentes ofídicos ocorrem por ano. Um recente estudo propondo uma metodologia nova e clara para contabilizar esses números estima que, por ano, ocorrem pelo menos 421 mil envenenamentos ofídicos no mundo, sendo 20 mil evoluídos em mortes (Kasturiratne *et al.*, 2008). Os autores deste trabalho ainda alertam que os números poderiam chegar a mais de 1,8 milhão de acidentes e 94 mil mortes, avaliando que a cada 4 picadas de serpentes, 1 resultaria em envenenamento. Pela distribuição dessas serpentes e pela ocupação humana na agricultura de subsistência, a principal área de risco é o meio rural dos países tropicais. O quadro das vítimas é geralmente prejudicado por alguns fatores, como local de ocorrência do acidente distante de hospitais, hábito popular de recorrer a curandeiros e difícil acesso ao soro antiofídico, que é escasso e necessita de refrigeração para seu armazenamento, impedindo sua ampla distribuição. Uma consequência comum dos acidentes ofídicos é a perda tecidual permanente em decorrência da necrose, fato

que incapacita as vítimas, as quais são geralmente jovens, o que representa um alto custo ao Estado. Diante da alarmidade dos dados levantados e do pouco incentivo governamental, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou os acidentes ofídicos como uma das doenças ou condições tropicais negligenciadas (http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/index.html).

Especificamente no Brasil, as estimativas apontam que há aproximadamente 20 mil acidentes ofídicos por ano, sendo apenas 90 casos evoluídos em morte, destacando então o Brasil como referência no tratamento contra acidentes ofídicos (Ministério da Saúde, 2010). Entre os acidentes ofídicos, os provocados pelas serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae, subfamília Crotalinae) são os mais comuns (84,0%), uma vez que essas serpentes estão distribuídas por todo território nacional e apresentam comportamento agressivo (Ministério da Saúde, 2008). O predomínio dos acidentes ocorre nos meses quentes e chuvosos, em indivíduos adultos jovens, do sexo masculino durante o trabalho em zona rural (Ministério da Saúde, 2010). As serpentes deste gênero com maior importância para a saúde pública compreendem a urutu-cruzeiro ou cruzeira (*Bothrops alternatus*), jararaca ou jararaca-do-norte (*Bothrops atrox*), jararaca-da-seca (*Bothrops erythromelas*), jararaca ou jararaca-preguiçosa (*Bothrops jararaca*), jararacuçu (*Bothrops jararacussu*), jararaca (*Bothrops leucurus*) e caíçaca (*Bothrops moojeni*) (Cardoso *et al.*, 2003, p. 46-50).

Apesar dos acidentes ofídicos provocarem seqüelas e mortes, nas ciências da natureza, o estudo dos componentes dos venenos das serpentes trouxe uma série de avanços, principalmente no desenvolvimento de medicamentos e na compreensão de processos bioquímicos. Haja vista a elucidação de alguns mecanismos farmacológicos, tais como neurotransmissão na junção neuromuscular, estrutura e função de receptores nicotínicos, processo inflamatório, “cascata de coagulação”, dentre outros. O famoso captopril é um exemplo de medicamento originado a partir dos estudos com toxinas botrópicas conforme descreve revisão recente de Antonio C. M. Camargo *et al.* (2011). O marco inicial deu-se em 1949, com a descoberta da bradicinina por um grupo de cientistas brasileiros, Mauricio Rocha e Silva *et al.*, quando estudavam a fisiopatologia do envenenamento de *Bothrops jararaca* (Rocha *et al.*, 1949). Posteriormente, esse mesmo grupo identificou peptídeos presentes no veneno da jararaca que provocavam contração de músculos lisos ao inibir degradação de bradicinina (Ferreira e Rocha, 1962). Este peptídeo é composto por uma cadeia polipeptídica

de nove aminoácidos e provoca hipotensão ao interagir com receptores específicos, antes de ser metabolizado por enzimas somáticas conversoras de angiotensina. Estas descobertas impulsionaram uma série de outros estudos sobre o papel da bradicinina na fisiologia e patologia do sistema cardiovascular. No final da década de 70, o captopril, um inibidor de enzimas somáticas conversoras de angiotensina, foi lançado no mercado e se tornou um importante medicamento utilizado para tratamento de hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva e doença arterial coronária (Cushman *et al.*, 1977). Ainda hoje esses peptídeos botrópicos, conhecidos como peptídeos potenciadores de bradicinina que estão na classe de oligopeptídeos de serpente rico em prolina, ainda surpreendem os toxinologistas e ainda indicam novos alvos e auxiliam no desenvolvimento de novas drogas (Camargo *et al.*, 2011).

O veneno das serpentes é constituído por uma série de compostos, de carboidratos, lipídios, metais (conjugados a proteínas), aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos livres e, em sua maior parte, proteínas. Estas últimas apresentam variadas atividades, podendo ser enzimas, receptores farmacológicos, toxinas não-enzimáticas e proteínas não-tóxicas. Atualmente, o principal tratamento contra o efeito desses constituintes tóxicos no envenenamento provocado pelo veneno da serpente é a administração do soro antiofídico. Este é produzido através da injeção do veneno geralmente em equínos e, posterior, purificação dos anticorpos gerados, sendo então composto de imunoglobulinas ou seus fragmentos (Gutierrez *et al.*, 2006). O soro administrado é eficiente contra os efeitos sistêmicos, contudo é incapaz de reverter a necrose muscular, destacando a carência por um componente complementar ao tratamento atual (Gutierrez *et al.*, 2006). Um dos principais constituintes dos venenos botrópicos responsáveis pelo dano muscular são as miotoxinas.

1.2 Miotoxinas

Miotoxinas podem ser definidas no âmbito geral como compostos naturais (geralmente pequenas proteínas e peptídeos) que provocam danos irreversíveis em fibras dos músculos esqueléticos (mionecrose), conforme é sugerido por Lomonte e colaboradores (2003a). As miotoxinas de venenos de serpentes podem ser separadas em três grupos principais baseando-se em sua estrutura. O primeiro grupo é composto por pequenas

miotoxinas; o segundo por cardiotoxinas e o terceiro de miotoxinas fosfolipases A₂ (PLA₂s). As PLA₂s são as miotoxinas mais abundante e são subdivididos, com base em sua atividade, entre neurotóxicas e não-neurotóxicas (Figura 1).

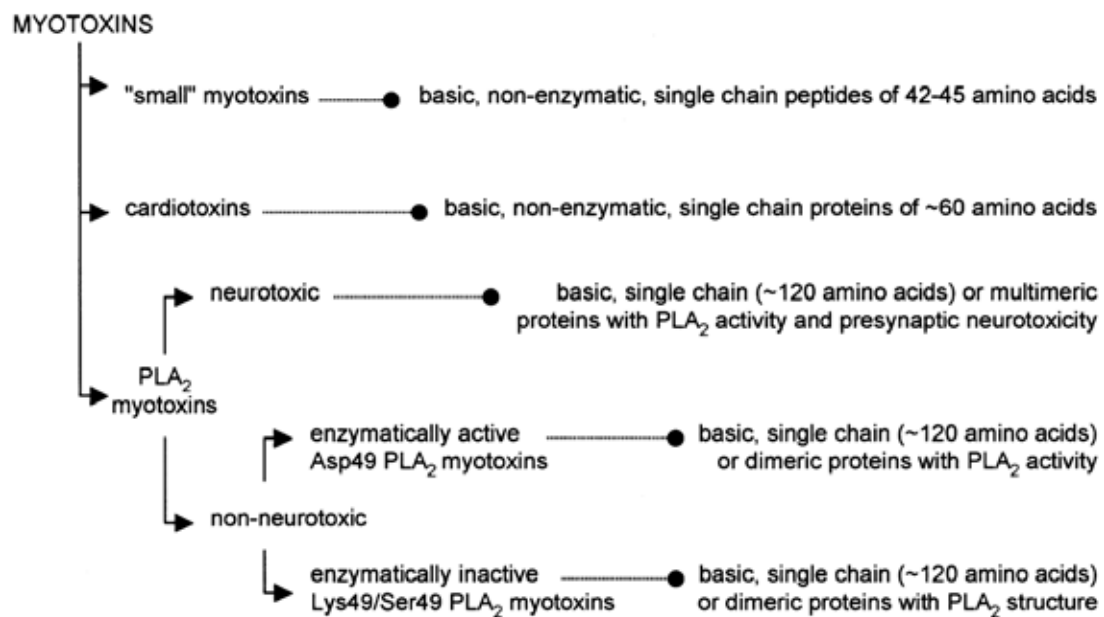


Figura 1. Grupos e subgrupos de miotoxinas de veneno de serpente. Extraído de Lomonte *et al.* (2003a).

As miotoxinas PLA₂s neurotóxicas são principalmente encontradas em venenos de serpentes Elapid, enquanto as não-neurotóxicas em Viperid e Crotalid. Uma grande diferença dessas neurotóxicas em comparação com o outro subgrupo é o dano letal provocado no acidente ofídico, já que apresenta uma LD₅₀ reduzida decorrente de seu potente efeito nas junções neuromusculares pré-sinápticas (Rosenberg, 1990). Se compararmos a miotoxicidade das duas, enquanto as neurotoxinas causam necrose em roedores em baixas doses (1-2 µg), as não-neurotóxicas necessitam de altas doses para provocar mesmo efeito (25-100 µg) (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Rosenberg, 1990). Apesar dessa aparente reduzida atividade das não-neurotóxicas, elas são importantes toxinas no envenenamento ofídico de serpentes Viperid e Crotalid, uma vez que são abundantes na peçonha e o volume de veneno injetado nas presas é alto (Lomonte *et al.*, 2003a).

1.2.1 Miotoxinas fosfolipases A₂ não-neurotóxicas

As fosfolipases A₂ (PLA₂s – E.C. 3.1.1.4) promovem a hidrólise da ligação éster *sn*-2 de fosfolipídios, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos (Schaloske e Dennis, 2006). A liberação destes pode funcionar como estoque de energia, segundos mensageiros (Berk e Stump, 1999; Gijon e Leslie, 1999) e como precursores de eicosanóides, que são potentes mediadores de inflamação (Austin e Funk, 1999; Bingham e Austen, 1999). Já os lisofosfolipídios estão envolvidos na sinalização celular e remodelagem do fosfolipídio, além de estar associado à perfuração de membrana (Moolenaar *et al.*, 1997; Balsinde *et al.*, 1999).

As PLA₂s foram inicialmente classificadas em dois grupos de acordo com o padrão de pontes dissulfeto, sendo o primeiro de serpentes do velho mundo e o segundo do novo (Schaloske e Dennis, 2006; Burke e Dennis, 2009). Posteriormente o número de proteínas conhecidas foi aumentando, levando à necessidade de novas classificações. Atualmente, 15 grupos e diversos subgrupos de PLA₂s são conhecidas (Schaloske e Dennis, 2006). De maneira geral, é possível diferenciá-las em PLA₂s secretadas (sPLA₂s), em PLA₂s citosólicas, em PLA₂s independentes de cálcio e em acetilhidroxilases de fator de ativação plaquetário / lipídio oxidado associado a lipoproteínas (Schaloske e Dennis, 2006; Burke e Dennis, 2009). As sPLA₂s são caracterizadas por possuírem entre 14 e 18 kDa e 5 a 8 pontes dissulfeto, serem estáveis em solução e necessitarem do íon cálcio para exercer sua atividade catalítica (Schaloske e Dennis, 2006). Entre as fosfolipases A₂ de veneno de serpentes destacam-se as da família Elapidae e Viperidae, sendo pertencentes ao grupo IA e IIA/B respectivamente. As subdivisões são baseadas nas pontes dissulfeto e diferentes *loops* (Magro *et al.*, 2009).

As PLA₂s, além da atividade catalítica como já traduz seu próprio nome, apresentam variada ação farmacológica: neurotoxicidade (pós e pré-sináptica), miotoxicidade (local e sistêmica) e cardiotoxicidade; iniciação e inibição de agregação plaquetária; ação hemolítica, anticoagulante, hipotensiva e edematogênica; capacidade de induzir convulsão e hemoglobinúria; além de lesar órgãos e tecidos (i.e. fígado, rim, pulmão, testículos, glândula pituitária) (Kini, 2003). As fosfolipases A₂ apresentam estrutura altamente conservada e sua estrutura cristalográfica já é bem estabelecida, sendo caracterizada por α -hélice do N-terminal (hélice 1), o *loop* de ligação de cálcio, duas longas α -hélices antiparalelas (hélices 2 e 3), β -*wing* ou duas folhas β -pregueadas (β 1 e β 2) e uma região C terminal (Figura 2) (Mais detalhes

no artigo de revisão (Murakami e Arni, 2003)).

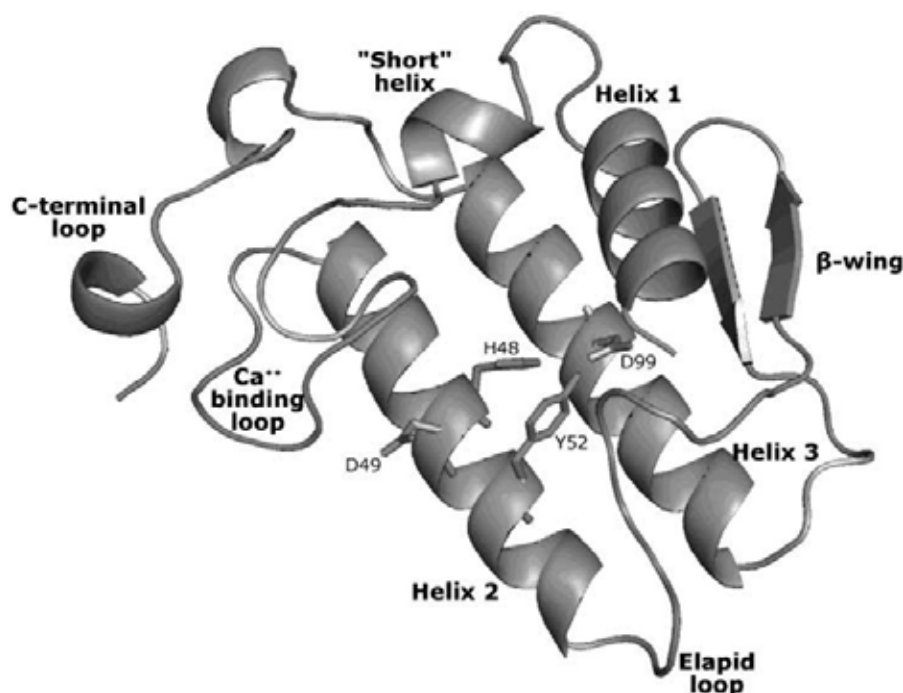


Figura 2 Representação em *cartoon* da estrutura terciária de Asp49-PLA₂s de veneno de serpente, em *sticks* resíduos envolvidos na catálise. Extraído de Magro *et al.* (2009).

O mecanismo da catálise dessas fosfolipases A₂ de veneno de serpente foi primeiramente apontado por Veiheij *et al.* (1980) e posteriormente por Scott *et al.* (1990b) a partir de estudos estruturais com PLA₂s nativas e complexadas com molécula análoga ao estado de transição da clivagem do fosfolipídio (Figura 3 - Single Water). Duas regiões são essenciais a essa atividade, i.e. a rede catalítica, compreendida pelos resíduos His48, Tyr52, Tyr73 e Asp99, e sítio ou *loop* de coordenação do cálcio, Tyr28, Gly30, Gly32 e Asp49 (numeração proposta por Renetseder *et al.* (1985) e adotada em toda essa dissertação). A rede catalítica é importante para manutenção da His48 em sua posição (Figura 3 E*) (Scott *et al.*, 1990a). Na complexação com fosfolipídio, a His48 extrai o próton de uma molécula de água que inicia o ataque nucleofílico na ligação éster *sn*-2 de fosfolipídios após formar um oxiânion tetraédrico intermediário (Figura 3 E*S) (Scott *et al.*, 1990a). Essencial à catálise é interação do co-fator cálcio com um oxigênio do grupo fosfato e com a estabilização do oxiânion (Figura 3 E*) (Scott *et al.*, 1990a). Esse íon nas estruturas nativas é coordenado pelos oxigênios da cadeia principal da Tyr28, Gly30, Gly32, pelos dois oxigênios da cadeia

lateral da Asp49 e por duas moléculas de água (Figura 3 E*). Após a hidrólise da ligação éster *sn*-2 do fosfolípídeo (Figura 3 E*S) desempenhada pela PLA₂, há a formação de lisofosfolípídeo e ácido graxo (Figura 3 E*P).

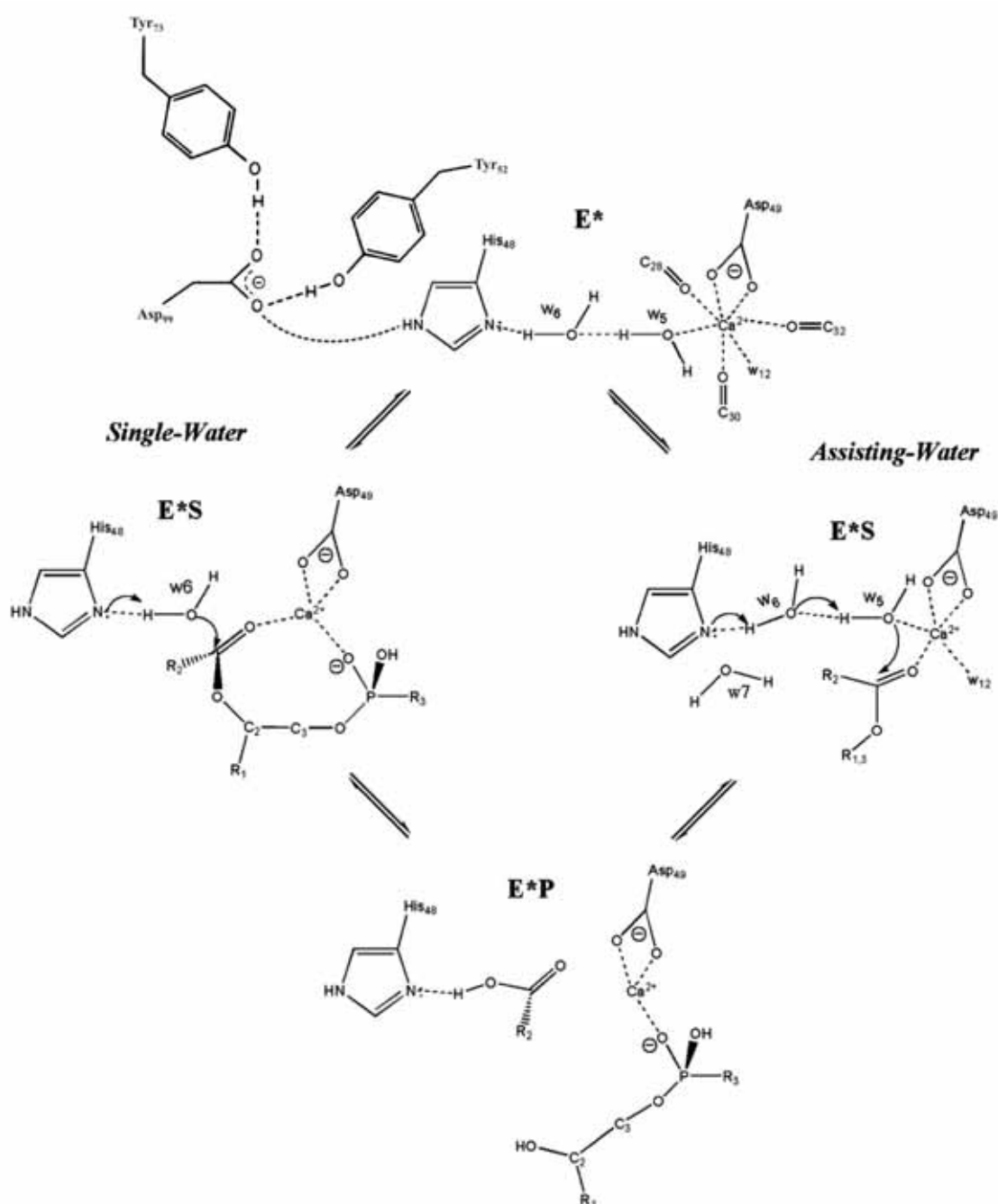


Figura 3 Mecanismo de ação das PLA₂s através de uma água e de duas águas. E é a superfície de interface da proteína livre, E* esta interface interagindo com a membrana biológica, E*S interface com o substrato e E*P é a interface e o produto da catálise. Adaptado de Bahnson (2005).

Posteriormente, um mecanismo alternativo foi proposto por Rogers *et al.* (1996) e Yu *et al.* (1993), sugerindo que duas moléculas de água estariam relacionadas à formação do intermediário tetraédrico (Figura 3 – “Assisting-Water”). Neste modelo, a água que promoveria o ataque nucleofílico estaria participando da coordenação do co-fator cálcio e estaria estabilizada por outra água mantida esta por uma ligação de hidrogênio com a díade His48/Asp99 (Bahnson, 2005). Esse mecanismo alternativo não exclui o anterior, apenas possibilita a existência de dois intermediários tetraédricos (Para mais detalhes, vide artigo de revisão de Bahnson (2005)).

1.3 Fosfolipases A₂ homólogas ou Lys49-PLA₂s

Em 1984, Maraganore *et al.*, estudando o veneno de *Agkistrodon p. piscivorus* e *Bothrops atrox*, identificaram um novo subgrupo das fosfolipases A₂ não-neurotóxicas, que chamaram de Lys49-PLA₂s (Maraganore *et al.*, 1984). Este nome lhes foi atribuído pelo fato dessas toxinas apresentarem a substituição do ácido aspártico na posição 49 por uma lisina (Asp49Lys), resíduo considerado essencial para catálise ao participar da coordenação do co-fator cálcio. Esses autores observaram na época que essas toxinas apresentavam baixa atividade catalítica e interagiam com vesículas bilipídicas mesmo na ausência de cálcio, capacidade esta última ausente nas Asp49-PLA₂s. A diferença entre a atividade de Asp49 e Lys49-PLA₂s também foi observada por outros grupos (Diaz *et al.*, 1991; Rufini *et al.*, 1992), contudo, a atividade catalítica dessa nova classe de toxinas foi refutada por van den Bergh e colaboradores (1988). Estes observaram que uma Asp49-PLA₂s de pâncreas suíno perdia a atividade catalítica quando realizaram a mutação Asp49Lys ou Asp49Glu, no entanto, a afinidade pelo substrato (fosfolípido) era mantida. Van den Bergh e colaboradores atribuíram essa baixa atividade catalítica observada por alguns grupos (Maraganore *et al.*, 1984; Diaz *et al.*, 1991; Rufini *et al.*, 1992) como uma contaminação de Asp49-PLA₂s nas etapas de purificação do veneno, sugerindo que o processo de separação não seria totalmente eficaz. Scott e colaboradores, em 1992, corroboram os dados de van den Bergh *et al.* (1988) através de estudos cristalográficos com uma Lys49-PLA₂s da serpente *Agkistrodon p. piscivorus* (Scott *et al.*, 1992). Diante das opiniões e evidências contraditórias, as Lys49-PLA₂s passaram a ser consideradas como PLA₂s de baixa ou muito baixa atividade catalítica. Outros estudos

defenderam essa baixa atividade catalítica de Lys49-PLA₂s, como descreve a revisão de Lomonte e colaboradores (2003a); porém, importantes passos foram dados para solucionar a dúvida quando Ward *et al.* (2002) produziram uma Lys49-PLA₂ recombinante de *Bothrops jararacussu* (BthTX-I). Ward *et al.* (2002) observaram nesse estudo que tanto a BthTX-I recombinante como essa toxina com substituição de Lys49Asp não apresentaram a atividade catalítica, indicando que outros fatores, além da reversão do Asp49, são necessários para catálise.

As Lys49-PLA₂s apresentam um amplo espectro de ação variando de acordo com os tipos de experimentos realizados conforme sintetiza o artigo de revisão de Lomonte *et al.* (2009). *In vivo*, observa-se miotoxicidade local, edema, liberação de citoquinina, recrutamento de leucócitos, hiperalgesia, analgesia, inibição de crescimento tumoral (Lomonte *et al.*, 2009). *Ex vivo*, observa-se efeitos miotóxicos e de bloqueio neuromuscular (Lomonte *et al.*, 2009). Já nos experimentos *in vitro*, os efeitos tóxicos são vastos, tais como citotoxicidade em diferentes tipos de células humanas, ação bactericida, fungicida e antiparasitária (Lomonte *et al.*, 2009). Especificamente em bactérias, as Lys49-PLA₂s têm a capacidade de se ligar a lipopolissacarídeos da membrana de bactérias (gram negativas) impedindo o efeito pró-inflamatório destas moléculas (Lomonte *et al.*, 2009). Nas células sanguíneas e do sistema imune, tem a capacidade de promover ativação de fagocitose de macrófagos, degranulação de mastócitos, migração ou quimiotaxia de neutrófilos e capacidade de se ligar ao fator de coagulação Xa (Lomonte *et al.*, 2009). Além disso, tem a capacidade de romper lipossomos (membranas artificiais), principalmente os ricos em fosfolípídeos com cargas negativas ou aniônicos (Diaz *et al.*, 1991; Bultron *et al.*, 1993b). Como citado, os efeitos tóxicos são diferentes de acordo com o tipo de experimento, o efeito neurotóxico observado *ex vivo*, por exemplo, não pode ser extrapolado para modelos *in vivo* onde a toxina não exerce tal efeito (Gallacci e Cavalcante, 2010). Assim, é importante analisar cada um dos efeitos separadamente. Os efeitos farmacológicos *in vivo* são relevantes no envenenamento ofídico. Os demais auxiliam na compreensão da ação das toxinas e no desenvolvimento de medicamentos, já que os efeitos ocorrem em ambiente controlados diferentes dos naturais (Lomonte *et al.*, 2009).

As Lys49-PLA₂s atraíram a atenção dos pesquisadores por essa variada gama de efeitos farmacológicos e por promoverem a miotoxicidade por um mecanismo ainda

desconhecido independente de cálcio. Além das Lys49-PLA₂s, foram identificadas outras variantes de acordo com a posição 49, como Asn, Gln, Arg e Ser49-PLA₂s, sendo algumas catalíticas e outras não catalíticas. Uma classificação mais apropriada para as não catalíticas é o de fosfolipases A₂ homólogas já que compartilham de um ancestral comum, nesta inclui-se Lys49 e Arg49-PLA₂s. Portanto, diante dessas peculiaridades, essa classe passou a ser estudada através de diferentes abordagens.

1.3.1 Região responsável pela atividade miotóxica das Fosfolipases A₂ homólogas

Um dos primeiros estudos que apontou uma região responsável pela atividade miotóxica das fosfolipases A₂ homólogas de veneno de serpentes foi a análise destas com inibidores. Lomonte e co-autores, em 1994, após as evidências de que a heparina neutralizaria tanto o efeito tóxico do veneno de *Bothrops jararacussu* (Melo e Suarez-Kurtz, 1988) como da abundante BthTX-I (Lys49-PLA₂) (Melo *et al.*, 1993), selecionam segmentos candidatos da miotoxina-II (Mt-II) de *Bothrops asper* para interagir com a heparina (Lomonte *et al.*, 1994). Através da síntese de peptídeos idênticos a esses segmentos, Lomonte e colaboradores concluem que a região do C-terminal (mais especificamente resíduos 115-129) é o sítio de interação com a heparina. Ainda neste artigo é mostrado o efeito citotóxico deste peptídeo (115-129), apesar de menor do que o provocado pela toxina inteira, efeito este inibido pela presença da heparina. Posteriormente, Nunez e co-autores (2001) sintetizaram um peptídeo baseado nessa mesma região (115 a 129) de uma Lys49-PLA₂ de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* e observaram que, diferentemente do peptídeo da Mt-II (Lomonte *et al.*, 1994), o mesmo efeito tóxico da toxina inteira era obtido, resultado que indica que este seria um domínio miotóxico da proteína. Interessantemente, esses últimos autores testaram também peptídeos baseados no C-terminal de duas Asp49-PLA₂s, a Mt-III de *Bothrops asper* e outra de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, contudo não observaram efeitos tóxicos (Nunez *et al.*, 2001).

Diante da observação de que alguns peptídeos sintéticos seriam capazes de reproduzir atividade tóxica parcial ou total de Lys49-PLA₂s, Lomonte e colaboradores (2003b) decidiram analisar se essa característica poderia ser extrapolada para demais toxinas desta classe. Então, novos peptídeos foram sintetizados baseando-se na sequência do C-

terminal de outras fosfolipases A₂ homólogas e submetidos a testes de miotoxicidade (Lomonte *et al.*, 2003b). Porém, os autores não conseguiram encontrar um padrão nos resultados, uma vez que alguns peptídeos foram capazes de provocar ação miotóxica em igual ou menor intensidade, enquanto outros se mostraram inócuos (Lomonte *et al.*, 2003b). Ainda, observaram que a ordem dos resíduos desses peptídeos é importante para a atividade miotóxica e que a síntese de aminoácidos iguais com disposição da cadeia lateral diferente (dos naturais levógenos para os destrógenos) não o é. Uma provável explicação para tal incongruência de resultados é que outros resíduos da toxina seriam importantes para a atividade miotóxica, seja na própria interação com a membrana ou na manutenção de uma conformação específica do C-terminal, o qual não seria observada em alguns peptídeos sintéticos.

A região do C-terminal não é muito conservada entre PLA₂s homólogas de mesma família, com exceção das lisinas 115 e 122 (Lomonte *et al.*, 2003a). Regiões responsáveis por mecanismos de ação são denominadas domínios e geralmente têm seus resíduos conservados entre proteínas de mesma classe, já que mutações implicariam em mudança conformacional e eventual perda de função. Apesar de a região do C-terminal de PLA₂s homólogas não ser conservada, essa região é rica em resíduos básicos e com anéis aromáticos (Lomonte *et al.*, 2003a). A importância desse caráter básico foi ressaltada por Díaz e colaboradores (1991), quando mostraram que Lys49-PLA₂s são capazes de romper lipossomos ricos em fosfolípídeos aniônicos e não o são em catiônicos. Nesse mesmo sentido, Falconi e co-autores (2000) destacaram a importância de uma superfície positiva nessas toxinas para interação e desestabilização da membrana bilipídica, seja no rompimento dos lipossomos ou na citotoxicidade. Esses estudos indicam que, neste caso em particular das miotoxinas PLA₂s homólogas, a combinação do caráter hidrofóbico e básico desses resíduos é possivelmente o responsável pela desestabilização da membrana. Dessa maneira, contanto que o caráter dos resíduos seja mantido, variabilidade desta região não implica em ausência de atividade como é observado nas diversas toxinas. Diferentemente dos indicativos do C-terminal como responsável pela toxicidade, outras regiões foram levantadas em estudos com PLA₂s catalíticas como destaca Kini (2003). Além disso, há ainda alguns grupos de pesquisa que defendem um mecanismo miotóxico mediante receptor de membrana (Lambeau e Lazdunski, 1999; Delatorre *et al.*, 2011) ao estabelecer uma semelhança entre a atividade de PLA₂s de serpentes e a de mamíferos (Valentin e Lambeau, 2000).

Em 1990, Lambeau *et al.* (1990) identificam interação de alta afinidade de uma PLA₂ de *Oxyuranus scutellatus* com receptores de células musculares esqueléticas de coelho, conhecidos como “receptores do tipo M” (M de muscular). Em artigo de revisão de 1999, Lambeau e Lazdunski organizaram os estudos acerca da afinidade das sPLA₂s por diferentes tipos de receptores. De acordo com sua estrutura, o “receptor do tipo M” está classificado em uma superfamília de lectinas do tipo C, cuja exata função ainda não é conhecida; contudo, elas estão relacionadas com um processo de internalização celular. Portanto, o suposto mecanismo da ação de fosfolipases A₂ homólogas através da interação com esses receptores seria relacionado a um processo de internalização destas toxinas e eventual dano em região intracelular. Cabe ressaltar que o “receptor do tipo M” não é específico de músculo, sendo encontrado em outros tecidos, como pulmão, rim e fígado. Esse indício é fundamental para sustentar a hipótese de um mecanismo mediante receptor, já que é observada ação farmacológica em diferentes células e tecidos (Lomonte *et al.*, 2009). Uma região do “receptor do tipo M” foi destacada como responsável pela interação com PLA₂s, o CRD5 (repetição em *tandem* de tipo-C), que é um domínio de reconhecimento de carboidratos já bem estabelecido. Além disso, esse domínio, quando sintetizado em forma solúvel, apresenta atividade inibitória de PLA₂s homólogas. Curiosamente, o CRD5 apresenta semelhança com inibidores tipo α de PLA₂ presentes no plasma sanguíneo das serpentes. Esses últimos inibidores possuem papel protetor das PLA₂ endógenas das serpentes. Uma conclusão preliminar é que o “receptor do tipo M” apresentaria afinidade pela toxina unicamente pela semelhança estrutural com inibidores naturais das serpentes. Então, a afinidade da PLA₂ homóloga pelo receptor não teria necessariamente relação com seu mecanismo de ação, mesmo porque nenhuma evidência de que a toxina seria internalizada foi encontrada. Para mais detalhes e referências, vide o artigo de revisão de Lambeau e Lazdunski (1999).

Algumas evidências contrariam a hipótese de a atividade das PLA₂s homólogas serem relacionadas a receptores de membrana. A toxicidade em diferentes culturas celulares e em procariotos em conjunto com a capacidade de romper lipossomos aniônicos dessas toxinas são evidências de caráter inespecífico do mecanismo de ação, já que em tais membranas não há a presença do “receptor do tipo M” (Diaz *et al.*, 1991; Rufini *et al.*, 1992) (para mais referências, vide sessão 7 do artigo de revisão de Lomonte *et al.* (2003a)). Outra forte evidência é a manutenção da toxicidade quando peptídeos são sintetizados com aminoácidos

destrógenos ao invés dos naturais levógenos (Lomonte *et al.*, 2003b), uma vez que se sabe que a mudança da natureza do aminoácido leva a alteração da especificidade.

Os estudos das PLA₂s homólogas com mutação sítio-dirigida contribuiu também para determinar quais seriam os resíduos responsáveis pelo mecanismo miotóxico entre outras atividades. Essa técnica consiste em substituir alguns resíduos na proteína alvo possibilitando submeter os mutantes a experimentos funcionais e estruturais, analisando as eventuais alterações. Van den Bergh *et al.* (1988) e Ward *et al.* (2002) utilizaram-se dessa técnica com uma mutação na posição 49 de Asp49 e Lys49-PLA₂ para caracterizar essa última classe em não catalíticas conforme citado anteriormente. Chioato *et al.*, em 2007, desenvolveram um estudo com 31 mutações pontuais na BthTX-I e submeteram os mutantes a testes de miotoxicidade, de ruptura de lipossomos e de avaliação da atividade bactericida. Segundo os resultados obtidos, a região C-terminal (115 a 125) foi destacada como importante para todas as atividades avaliadas, contudo houve diferenças entre alguns poucos resíduos. Por exemplo, a miotoxicidade foi reduzida na proteína recombinante com o mutante Pro37Ala enquanto observou-se a atividade bactericida nos mutantes Lys7Ala, Glu86Gly, Lys100Ala, o que indica diferentes regiões participando das diferentes toxicidades. Outro achado importante foi a manutenção das atividades testadas com a mutação preservando caráter hidrofóbico de Phe125Trp, o que ressalta a importância da característica eletrostática do resíduo e não sua especificidade.

As proteínas de veneno de serpentes têm sido estudados por diversas técnicas e, apesar de o mecanismo de ação das PLA₂s homólogas não ter sido elucidado, muitos resultados já foram obtidos, conforme há pouco descrito. Os avanços nesses estudos estão mais adiantados se comparados com PLA₂s de outros seres vivos. Apesar de haver diferenças entre estas, alguns resultados da PLA₂s de serpentes guiam e inspiram o estudo das de mamíferos (Valentin e Lambeau, 2000). Por exemplo, PLA₂s de mamíferos foram clonadas e mostraram diversidade de função e afinidade a inibidores semelhante às observadas em serpentes (Valentin e Lambeau, 2000). Outro exemplo é o efeito dessas toxinas contra o vírus HIV-1, câncer ou isquemia, o que destaca novas perspectivas para desenvolvimento de medicamentos, como o exemplo bem sucedido do captopril anteriormente descrito no **item 1.1**. Tais perspectivas ressaltam a importância dos estudos com PLA₂s de serpente, contudo é necessário a compreensão dos seus mecanismos de ação. Os resultados funcionais com

peptídeos, proteínas recombinantes, entre outros indicam a região do C-terminal e alguns outros resíduos pontuais como responsáveis pela miotoxicidade e outras atividades farmacológicas, contudo por meio de estudos cristalográficos maiores detalhes podem ser observados acerca dos átomos em interação desses eventuais mecanismos.

1.3.2 Estudos cristalográficos com PLA₂ homólogos

Uma estratégia eficiente para a inferência do mecanismo de ação é a utilização da técnica de cristalografia de raios X para determinar estruturas protéicas. Com a presença de modelos cristalográficos de uma proteína em diferentes estados, como o nativo, o complexado com um inibidor, com o substrato e com moléculas intermediárias, é possível analisar as interações e diferentes conformações em uma escala de tempo nos diferentes estágios da ação da proteína. Foi essa a estratégia utilizada por Bahnson (2005) no artigo de revisão sobre mecanismo catalítico das Asp49-PLA₂s. Este ressaltou a importância da oligomerização na atividade catalítica das Asp49-PLA₂s com a formação de um dímero quando a toxina entra em contato com a membrana (estado E*S da Figura 3).

Entre as Lys49-PLA₂s, a oligomerização também é importante. Da Silva Giotto *et al.* em 1998, estudando a BthTX-I (Lys49-PLA₂) através da cristalografia de raios X e espectroscopia de fluorescência, estabeleceram dois estados diméricos diferenciados por uma variação entre a angulação de seus monômeros, chamando-os de “aberto” e “fechado” (Da Silva Giotto *et al.*, 1998). Segundo os autores, a interface dimérica funcionaria como uma dobradiça quando a proteína interagisse com a membrana, havendo exposição diferente da região do C-terminal, sendo esta então importante para sua atividade.

Em 2001, Lee *et al.* geraram um modelo cristalográfico da PrTX-II (Lys49-PLA₂) contendo um ácido graxo (produto da catálise) presente no canal hidrofóbico da toxina. Segundo os autores, esse dados indicam que essas toxinas poderiam ser catalíticas, sendo essa atividade interrompida pela incapacidade de liberar o ácido graxo (Lee *et al.*, 2001). O ácido graxo encontrado na estrutura foi atribuído como vindo da purificação, uma vez que não estava presente na condição de cristalização. No modelo, os oxigênios de uma extremidade do ácido graxo interage com uma molécula de água e esta por sua vez com a His48 catalítica.

Estes autores observaram através da sobreposição de Lys49 com Asp49-PLA₂s diferente posição ocupada pelo *loop* de ligação de cálcio entre esses dois grupos, sendo entre as catalíticas menor variação observada. Outro aspecto observado, foi a conservação da Lys122 entre Lys49-PLA₂s, já que este resíduo estaria aumentando a afinidade da proteína pelo ácido graxo por meio da interação com Cys29. Magro *et al.* (2003), complementando os estados diméricos aberto e fechado apontados por da Silva Giotto *et al.* (1998), afirmaram existir pelo menos 6 diferentes conformações. Contudo, essas toxinas poderiam ser divididas entre inativas, com Lys122 hiperpolarizando a Gly32, e ativas, com essa interação fraca ou inexistente (Magro *et al.*, 2003).

Em 2005, Ambrosio *et al.* contribuíram para esclarecer a dúvida de como seria a interação com membrana ao propor uma relação entre sítio catalítico e C-terminal (sítio miotóxico) (Ambrosio *et al.*, 2005). Nesse trabalho, três diferentes cristais foram obtidos da mesma proteína, ACL miotoxina (uma Lys49-PLA₂ de *Agkistrodon contortrix laticinctus*), sendo diferenciadas pelos ligantes nela presentes. Em um dos conjuntos de dados dos cristais coletados, Ambrosio *et al.* (2005) encontraram densidade eletrônica na mesma região do ácido graxo da PrTX-II. Após investigarem qual molécula estaria ocupando o canal hidrofóbico, refinaram tanto um ácido láurico como um polietileno glicol de baixa massa molecular presente na condição de cristalização obtendo resultados semelhantes, então optaram pela manutenção do ácido graxo pela relevância biológica. Os outros dois cristais eram isomorfos (apresentaram mesmas características), cuja diferença foi o comprimento de onda da coleta de dados, já que em um dos cristais foi explorado o fenômeno de espalhamento anômalo do enxofre para localização de íons sulfato (maiores detalhes acerca do espalhamento anômalo no **item 3.5**). A elucidação dessas duas estruturas mostrou a ausência de ligantes no canal hidrofóbico e presença de íons sulfato adicionais ao modelo anterior, sendo essa diferença provocada possivelmente pelo aumento da concentração do sulfato de amônio na condição de cristalização. Os sulfatos foram encontrados interagindo com His33, Arg34, Lys49 e Tyr52 ou Tyr53, no entanto nenhuma explicação foi encontrada. Com a comparação dos modelos protéicos da ACL miotoxina, o grupo identificou duas posições da Lys122, uma nativa onde esse resíduo estaria exposto ao solvente e outra complexada com ácido graxo, onde a Lys122 estaria voltada para região interna da proteína interagindo com Cys29, interação esta que aumentaria o número de ligações de hidrogênio entre o *loop* de ligação de cálcio e o C-terminal. Essa conformação estrutural específica foi denominada de

estrutura canônica. Uma observação interessante nos estudos estruturais com Lys49-PLA₂s é que, nos modelos nativos (estado ativo sugerido por Magro *et al.* (2003)), os C-terminais apresentam maior flexibilidade e algumas das cadeias laterais de seus resíduos não possuem densidade eletrônica clara tanto que são omitidas, já nas complexadas com ácidos graxos (estado inativo sugerido por Magro *et al.* (2003)), C-terminais estão mais estáveis. Ambrosio *et al.* (2005) explicam tal estabilidade pela interação da Lys122 com Cys29. Além disso, estes autores propõem um *hydrophobic knuckle*, um motivo comum das miotoxinas desprovidas de atividade catalítica, que no caso da ACL miotoxina seria composto pela fenilalaninas 121 e 124 que ficam expostas quando há a presença do ligante. O *hydrophobic knuckle* seria acompanhado por resíduos básicos ao seu redor que auxiliariam na formação de uma interface catiônica. Segundo os autores, ainda, o *hydrophobic knuckle*, o sítio ativo e o sítio de ligação do sulfato estão dispostos no mesmo lado da proteína, o que poderia indicar um aumento na afinidade de ligação pela membrana, já que diferentes regiões interagiriam simultaneamente. Enquanto o *hydrophobic knuckle* interagiria com a membrana via caráter hidrofóbico, o sítio ativo via ligação do lipídio e o sítio de ligação do sulfato via interação com o fosfato do fosfolípido. Esse modelo sinérgico de interação com a membrana seria a razão da manutenção dos resíduos do sítio ativo nas não catalíticas Lys49-PLA₂s. Os resultados dos peptídeos sintéticos e das mutações sítio-dirigidas estão em acordo com essas idéias (Lomonte *et al.*, 2003b; Chioato *et al.*, 2007). O mecanismo miotóxico então proposto por Ambrosio *et al.* (2005) seria pelos seguintes passos: i) interação da toxina com um ácido graxo; ii) Lys122, que estava exposta ao solvente, é direcionada e estabilizada na posição canônica através da interação com ligante e resíduos Cys29 e Cys30; iii) rearranjo do C-terminal com formação do *hydrophobic knuckle* e resíduos básicos ao seu redor; e iv) interação desta região com a membrana biológica. Apesar de as estruturas anteriores desse estudo serem monoméricas, Ambrosio *et al.* (2005) levantam a possibilidade de haver um dímero que os C-terminais estariam dispostos lado a lado.

Em 2005, Murakami *et al.* publicaram a primeira estrutura cristalográfica de uma proteína complexada com a molécula de suramina, no caso a Mt-II ou BaspTX-II (Murakami *et al.*, 2005). O dímero escolhido é diferente e mais compacto do que os anteriormente adotados para resolução das estruturas cristalográficas de Lys49-PLA₂s (Arni *et al.*, 1995; Da Silva Giotto *et al.*, 1998; Arni *et al.*, 1999; De Azevedo *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Magro *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2005). Uma das explicações para tal mudança é a localização do

inibidor suramina entre os monômeros; caso o dímero antigo fosse escolhido para elucidação da estrutura, o ligante estaria voltado para o solvente, enquanto no modelo escolhido o mesmo está voltado para o canal hidrofóbico (Dos Santos *et al.*, 2009b). A interface de contato no dímero antigo é a α -hélice do N-terminal e a β -wing principalmente por meio dos resíduos Glu12, Trp77, Asp79 e Lys80; já no dímero proposto por Murakami *et al.*, pelas ligações de hidrogênio das Tyr119 e Asn17 e interações hidrofóbicas entre *loop* de ligação de cálcio e C-terminal. Em 2007, Murakami *et al.* reforçam a idéia do dímero mais compacto existir em solução com dados de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) com a BthTX-I nativa, de dinâmica molecular do complexo BthTX-I/suramina e de análise estrutural (Murakami *et al.*, 2007). Segundo suas análises estruturais, ao observar as moléculas na unidade assimétrica, a escolha do dímero depende do critério utilizado. No dímero compacto, o canal hidrofóbico não está voltado para o solvente, sendo, então, o indicado pelo programa online PISA (Mais informações no **item 3.7**) (Krissinel e Henrick, 2007). Na dinâmica molecular com suramina, Murakami *et al.* (2007) observam uma maior estabilidade do novo dímero e interação dos resíduos Arg34 e Lys53 com o inibidor, já observada no complexo Mt-II/suramina (Murakami *et al.*, 2005). Além disso, nesse mesmo trabalho (Murakami *et al.*, 2007), moléculas de polietileno glicol 400 (PEG400) mostraram mais de 90% de inibição do efeito miotóxico provocado pela BthTX-I *in vivo* por dosagem de creatina quinase em comparação a 60% da suramina. O modelo cristalográfico da BthTX-I/PEG400 foi gerado e esse inibidor foi observado em mesma região ocupada pelos ácidos graxos da PrTX-II (Lee *et al.*, 2001) e da Mt-II (Murakami *et al.*, 2005).

Em 2009, dos Santos *et al.* propõem um novo sítio miotóxico botrópico presente no C-terminal ao publicar a estrutura da PrTX-I apo (nativa) e complexada com vitamina E, um inibidor natural (Dos Santos *et al.*, 2009b). O dímero escolhido foi o compacto, uma vez que, semelhante à suramina, o ligante estaria voltado para o solvente, situação improvável e energeticamente desfavorável (Figura 4). Dos Santos *et al.* (2009b) realizaram uma revisão dos modelos cristalográficos das Lys49-PLA₂s e fundamentaram que o dímero biológico seria o compacto, chamando-o de “alternativo”, e o antigo, de “dímero convencional”. Dos Santos *et al.* (2009b) propõem uma nova classificação entre Lys49-PLA₂s nativas e Lys49-PLA₂s complexadas baseado na existência única do dímero alternativo em solução e em dois ângulos, o de abertura (θ_A) e o de torsão (θ_T). Esses ângulos são obtidos a partir da construção de dois vetores dos C α das α -hélices H2 e H3, sendo nas complexadas θ_A maior θ_T menor e

nas nativas, o contrário. Dos Santos e colaboradores (2009b) atribuíram o reordenamento dos C-terminais ocorrido nas estruturas nativas para as complexadas à ligação de hidrogênio entre as tirosinas 119 dos monômeros e pelo aumento da simetria, além da alteração do *loop* de ligação de cálcio provocada por um ligante no canal hidrofóbico já apontado por Ambrosio *et al.* (2005). Ainda seria possível caracterizar as nativas como representantes de um “estado inativado” e as complexadas, “estado ativado”, semelhantes à forma aberta e fechada de Silva-Giotto *et al.* (1998) adaptada por Magro *et al.* (2003). Na estrutura em “estado ativo”, os C-terminais estariam dispostos lado a lado, o que facilitaria o contato com a membrana biológica, conforme sugeriram Ambrosio *et al.* (2005). Por último, Dos Santos *et al.* propõem o sítio miotóxico do gênero *Bothrops* analisando, conforme sugerido por Bahnson (2005), os íons sulfato como representantes das cabeças dos fosfolipídeos também negativas. Então, o sítio miotóxico seria formado primariamente pelos resíduos Lys115, Arg118 e, pela primeira vez, Lys20 e auxiliado pelas Lys80 e Lys 127 que teriam papel secundário na “ancoragem” ou direcionamento destas proteínas na membrana (Dos Santos *et al.*, 2009b).

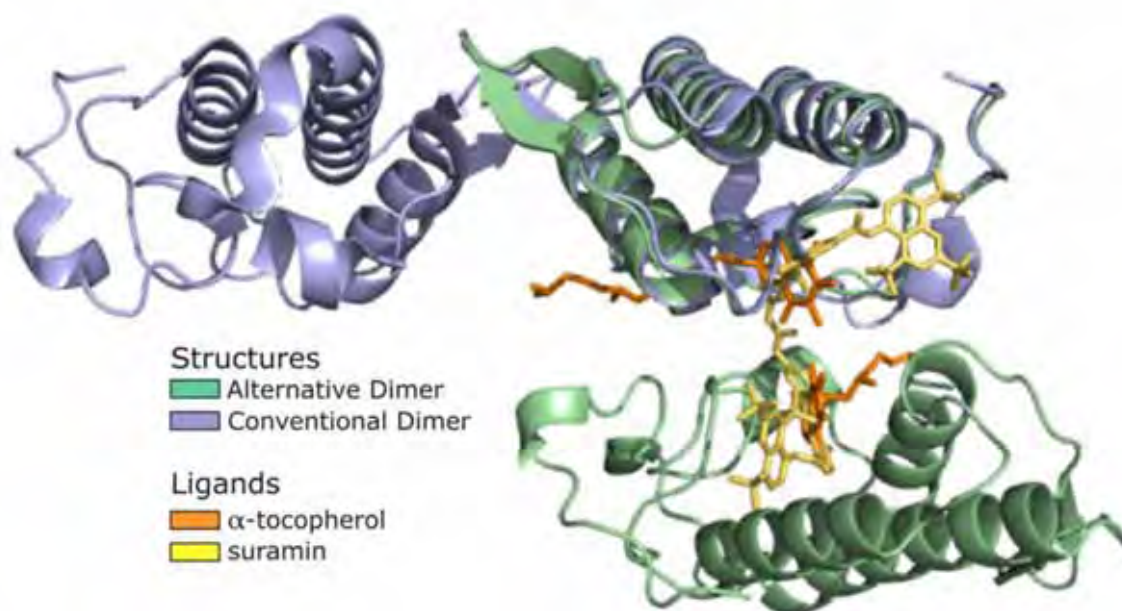


Figura 4 Dímero convencional (em lilás) e alternativo (em verde) das Lys49-PLA₂s complexadas com suramina (em amarelo) e vitamina E (em laranja). Extraído de dos Santos (2009b).

Ainda em 2009, o modelo da PrTX-I modificada quimicamente pelo BPB (*p*-bromophenacyl bromide) foi publicada, inibidor clássico de miotoxinas catalíticas que possui a capacidade de se ligar covalentemente histidinas, no caso a His48 (Marchi-Salvador *et al.*, 2009). Os autores propõem duas regiões de interação das Lys49-PLA₂s e membranas, o sítio miotóxico proposto por dos Santos *et al.* (2009), responsável pela desestabilização da membrana, e o sítio ativo ou canal hidrofóbico, responsável pela ancoragem do fosfolipídio. Os autores ainda sugerem que na miotoxicidade, ambos os sítios estariam relacionados, o que explicaria a inibição parcial da molécula BPB e toxinas Lys49-PLA₂s (aproximadamente 50%). Em 2010, Fernandes *et al.* publicam novas observações com novos modelos cristalográficos, BthTX-I/PEG4000 dimérico e BthTX-I nativa e BthTX-I/BPB tanto na forma dimérica quanto monomérica (Fernandes *et al.*, 2010). Estes autores fazem uma revisão da conservada Lys122 das Lys49-PLA₂s disponíveis até a data e concluem que na realidade esse resíduo estaria relacionado com a ancoragem do fosfolipídio e não necessariamente com a hiperpolarização da Cys29/Gly30. Além disso, observam que a interação entre Oγ Tyr28 e grupo amina da Gly35 é importante para estabilização do *loop* de ligação de cálcio entre Asp49-PLA₂s, sendo a BthTX-II e PrTX-III exceções à regra. Nas Lys49-PLA₂s, há uma substituição Tyr28Asn que impede a interação com Gly35 e desestabiliza essa região.

Apesar de haver muito estudo nessa área com variados resultados, estruturas cristalográficas e diferentes estratégias para propor um mecanismo de ação nos últimos anos, poucas conclusões foram obtidas. Uma forma de auxiliar essa compreensão pode ser a elucidação da estrutura das proteínas em estado inédito, seja este gerado por modificações químicas, complexados com inibidores ou simplesmente diferentes por interagir com íons importantes para sua atividade ou para sua inibição.

1.4 Fosfolipases A₂ e íons

A atividade catalítica das Asp49-PLA₂s é dependente de íons cálcio, contudo foram identificadas duas toxinas botrópicas (BthTX-II e PrTX-III) com resultados controversos (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Mancuso *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2001; Rigden *et al.*, 2003). Estas proteínas são intrigantes e constituem uma exceção, já que, apesar de serem classificadas como Asp49-PLA₂s, apresentam elevada atividade miotóxica e

moderada ou reduzida atividade catalítica se comparadas às outras proteínas de mesma classe (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Mancuso *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 1998; Soares *et al.*, 2001). O modelo cristalográfico da PrTX-III foi gerado por Rigden e colaboradores (2003), sendo observado uma distorção no sítio de ligação de cálcio que inviabilizaria a coordenação deste íon. A justificativa encontrada pelos autores foi que o modelo cristalográfico se tratava de um estado inativo que seria transformado no ativo, observado nos modelos de outras Asp49-PLA₂s, quando houvesse interação com fosfolípídeo. Essa mesma distorção foi observada por Correa e colaboradores (2008) no modelo da BthTX-II e no modelo da BthA-I (Asp49-PLA₂ ácida catalítica e não miotóxica) complexado com BPB (brometo de p-bromofenacil), inibidor que interage com His48 (Magro *et al.*, 2005). A explicação de Correa e colaboradores (2008) para a distorção do sítio de ligação de cálcio observado nessas toxinas foi a ligação de hidrogênio formada entre Asp49 e Tyr28 em conjunto com o Trp31 voltado para um lado oposto quando comparado com outras Asp49-PLA₂s. Um padrão da distância entre Tyr28 e Gly35 para classificar as PLA₂s foi proposto por Fernandes *et al.* (2010), classificando a BthTX-II e a PrTX-III como exceções às Asp49-PLA₂s. Dessa maneira, a reduzida atividade catalítica poderia ser atribuída a uma contaminação de outras PLA₂s como ocorreu nos primeiros estudos de Lys49-PLA₂s (Van Den Bergh *et al.*, 1988). Essa dúvida seria aparentemente esclarecida com a produção da toxina recombinante, garantindo sua pureza. Dois diferentes grupos estudando toxinas semelhantes propuseram hipóteses diferentes para explicar a distorção do sítio de coordenação do cálcio, sendo assim, mais experimentos são necessários para concluir essa questão.

A atividade catalítica das Asp49-PLA₂s é dependente de íons cálcio, enquanto atividade miotóxica das Lys49 é independente deste íon. Em 2002, Soares *et al.*, analisando a atividade da BthTX-I em presença de íons divalentes, observaram uma possível capacidade inibitória do manganês (Soares *et al.*, 2002). Experimentos de edema em pata de rato, liberação de creatina quinase (miotoxicidade), bloqueio neuromuscular do nervo frênico do diafragma e lise em células mostraram que o manganês tem capacidade de inibição do efeito da toxina principalmente quando pré-incubado ou administrado conjuntamente (Soares *et al.*, 2002). Algumas hipóteses foram levantadas para avaliar se o manganês estaria participando indiretamente protegendo a célula ou diretamente inibindo a toxina, contudo até então a interação é desconhecida. Foi analisado também a atividade enzimática e curiosamente o resultado foi positivo para essa PLA₂ homóloga; uma possível explicação levantada é a

ativação de PLA₂s endógenas ou mesmo a contaminação nas etapas de purificação (Soares *et al.*, 2002).

Então, a reduzida atividade catalítica pode estar relacionada à alteração no *loop* de coordenação do cálcio no caso das Asp49-PLA₂s com baixa atividade catalítica assim como a reduzida atividade miotóxica das Lys49-PLA₂s em presença de Mn²⁺ deve ocorrer por alguma alteração na região com o qual este íon interage. Uma peculiaridade do estudo com os íons é que a alteração na conformação da proteína é mais sutil do que a provocada por ligantes de maior massa molecular, assim o estudo cristalográfico desta situação poderia indicar modificações inéditas. Portanto, ressalta-se a importância dos estudos estruturais com os íons cálcio em Asp49-PLA₂s com baixa atividade catalítica e íons manganês em PLA₂s homólogas para a melhor compreensão do mecanismo miotóxico.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Estudar as fosfolipases A_2 homólogas em presença de íons através de cristalografia de raios X para compreender seu mecanismo miotóxico independente de cálcio. Para tal finalidade, a PrTX-I e BthTX-I (Lys49-PLA₂s) foram cristalizadas em presença de íons manganês e zinco e a BthTX-II (Asp49-PLA₂), de cálcio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas esquematizadas e simplificadas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios X de PLA₂s por substituição molecular de venenos de serpentes são mostradas no fluxograma a seguir:

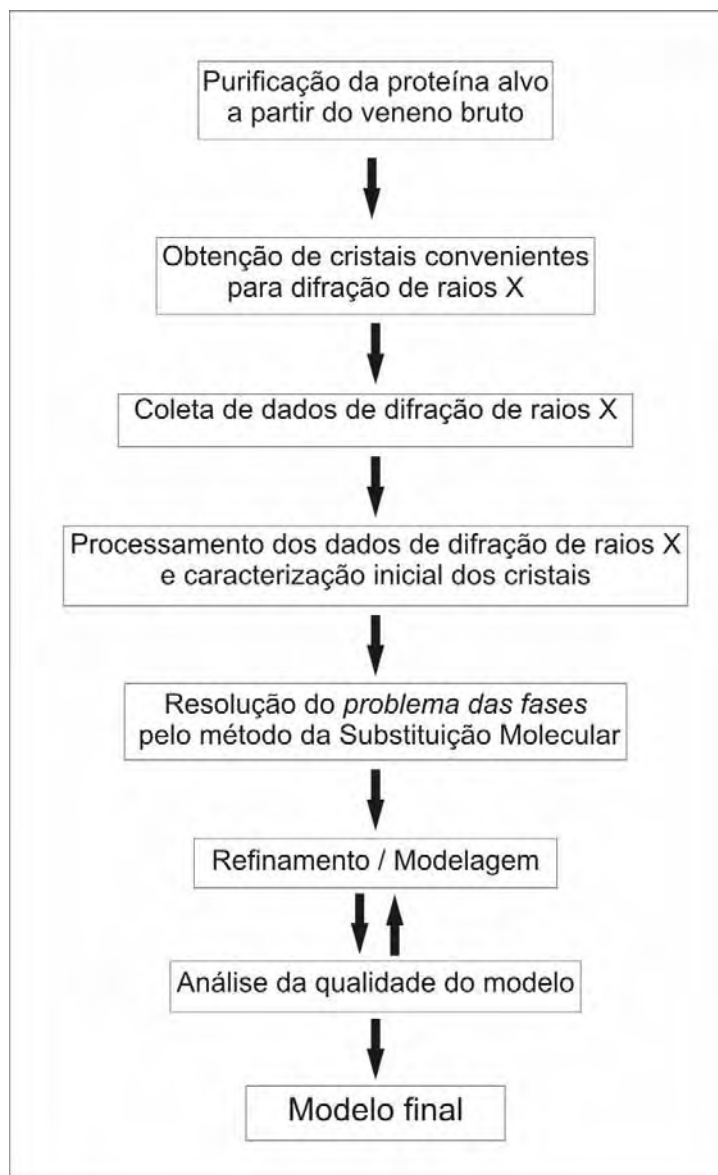


Figura 5 Etapas para resolução de uma estrutura protéica por difração de raios X por substituição molecular a partir do veneno bruto.

3.1 Proteínas utilizadas

As miotoxinas PLA₂s PrTX-I, BthTX-I e BthTX-II foram utilizados, sendo a primeira extraída do veneno de *Bothrops pirajai* (De Azevedo *et al.*, 1998) e as demais de *Bothrops jararacussu* (Mancuso *et al.*, 1995; Toyama *et al.*, 1998). As amostras foram obtidas a partir do veneno bruto. Ambas as proteínas utilizadas nos experimentos de cristalização em presença de íons foram fornecidas por nosso colaborador, o Prof. Dr. Andreimar Martins Soares (que na época era docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP/Ribeirão Preto), na forma liofilizada.

As proteínas liofilizadas foram solubilizadas em água. Para certificar uniformização na quantidade de proteína utilizada nos diferentes experimentos, as toxinas foram quantificadas por espectrofotometria (Thermo Scientific NanoDropTM 1000c). As principais condições de cristalização das toxinas PrTX-I e BthTX-I são: 1) 0,1 M (mol/L) TrisHCl pH 7,5 (PrTX-I) e pH 8,5 (BthTX-I), 30% PEG4000 (m/v) e 0,1 M ou 0,2 M sulfato de lítio (m/v); 2) 0,1 M citrato de sódio pH 5,6, 20% PEG4000 e 20% isopropanol (v/v). No caso dos experimentos feitos com a BthTX-I e PrTX-I e íons, variações da primeira solução precipitante foram utilizadas e a concentração de proteína determinada por espectrofotometria foi entre 10 e 11 mg/mL. Já a BthTX-II teve sua concentração determinada entre 8 e 9 mg/mL.

3.1.1 A proteína PrTX-I

A PrTX-I é uma Lys49-PLA₂ miotóxica não catalítica composta por 121 aminoácidos, com pI 8,3 e massa molecular aproximado de 13kDa (Mancuso *et al.*, 1995; Toyama *et al.*, 1998). Esta enzima foi cristalizada na sua forma nativa e pertence ao grupo espacial P3₁21, apresentando duas moléculas na unidade assimétrica. Os dados foram coletados a 1,87 Å de resolução (Dos Santos *et al.*, 2009b) e essa estrutura se encontra disponível no banco de dados de proteínas (PDB) (código de identificação no banco de dados de proteínas (PDB id): 2Q2J).

3.1.2 A proteína BthTX-I

A BthTX-I é uma Lys49-PLA₂ miotóxica não catalítica composta por 121 aminoácidos, com pI 7,7 e massa molecular de aproximadamente 13,2 kDa (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Cintra *et al.*, 1993). Essa proteína é praticamente idêntica à PrTX-I, sendo diferenciada apenas por 3 aminoácidos, havendo substituição do Asn67, Leu116 e Asp132 por Asp, Lys e Pro, respectivamente (Cintra *et al.*, 1993; Toyama *et al.*, 1998). Os modelos cristalográficos nativos são praticamente idênticos (Dos Santos *et al.*, 2009b; Fernandes *et al.*, 2010).

3.1.3 Proteína BthTX-II

A BthTX-II é uma Asp49-PLA₂ composta por 122 aminoácidos, com pI 6,9 e possui massa molecular de aproximadamente 13,8 kDa (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Gutierrez *et al.*, 1991; Pereira *et al.*, 1998). Além da atividade miotóxica, a toxina apresenta efeitos hemolíticos e indução de edema (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Gutierrez *et al.*, 1991). Esta enzima foi cristalizada na sua forma nativa, seus dados foram coletados a 2,19Å de resolução, apresentam duas moléculas na unidade assimétrica e pertencem ao grupo espacial C2 (PDB id: 2OQD) (Correa *et al.*, 2008).

3.2. Experimentos de cristalização

O princípio da cristalização de uma proteína consiste na elevação da concentração desta até o ponto de supersaturação. Neste ponto, a proteína deixa de ser solúvel e de estar no estado homogêneo, favorecendo agregação de parte das moléculas (estado sólido), podendo assim precipitar ou cristalizar (Asherie, 2004). O processo de cristalização é difícil, uma vez que é necessário haver alteração da solubilidade ao ponto em que forças externas provoquem o empacotamento ou agrupamento da proteína em uma forma menos energética e mais organizada, a cristalina. Para atingir tal forma, deve-se considerar uma série de fatores, como a concentração da proteína, concentração do agente precipitante, pH, força iônica, velocidade de troca gasosa, entre outros.

O processo utilizado nos experimentos de cristalização foi o *salting-out*, que se fundamenta no fato de que, em solução, a alta concentração de um sal diminuir a solubilidade da proteína. Então, a proteína é adicionada a uma solução contendo o agente precipitante e, através do aumento gradativo da concentração do agente precipitante, haverá precipitação ou cristalização da proteína. Caso seja possível estabelecer os parâmetros ideais (temperatura, concentração do agente precipitante, concentração da proteína, tipo de agente precipitante, dentre outros) que propiciem a nucleação da proteína, haverá cristalização da mesma (Mcperson, 2003).

Um método bastante eficiente para o aumento gradativo da concentração do agente precipitante é aquele baseado na difusão de vapor. Este método consiste em um ambiente fechado que proporciona troca gasosa entre duas soluções com diferentes concentrações.

O sistema utilizado nos experimentos de cristalização foi o gota suspensa (*hanging drop*) (Figura 6). Neste sistema, a gota suspensa é a solução que contém a proteína e o agente precipitante, enquanto a outra solução é a do poço ou do recipiente. Cabe ressaltar que o volume do agente precipitante no recipiente, no caso 0,5 mL, é muito maior que o da lamínula, no caso 1 μ L, sendo possível, desta maneira, considerar o volume do recipiente como infinito em relação à gota. A solução do agente precipitante é adicionada no poço e na gota suspensa na mesma concentração, contudo a menor concentração do agente precipitante na gota suspensa deve-se ao fato de haver a adição da proteína, que está a uma concentração de aproximadamente 10 mg/mL e diluída em água ultra-pura ou tampão, aumentando o volume e diluindo a concentração de cada um dos componentes do agente precipitante. Portanto, à medida que o sistema entra em equilíbrio, a gota suspensa perde água para a solução do poço, conseqüentemente aumenta gradativamente a concentração da proteína e do agente precipitante, favorecendo então, a cristalização.

Para que a cristalização de uma proteína ou complexo seja alcançada com sucesso, é necessário definir as melhores condições de crescimento dos cristais, conforme já mencionado. Os cristalógrafos utilizam-se do diagrama de fases e da curva de solubilidade para guiar os experimentos de cristalização bem como otimização dos mesmos (Mikol *et al.*, 1990; Saridakis e Chayen, 2003). Com o diagrama de fases (Figura 7), é possível diferenciar três zonas além da insaturada: a de precipitação, onde as concentrações de proteína e agente

precipitante são elevadíssimas havendo surgimento de solução amorfa ou repleta de agregados e/ou precipitados; a de nucleação, onde há alta concentração de proteína e de agente precipitante havendo surgimento dos pequenos e microscópicos aglomerados organizados de proteínas, mais conhecidos como núcleos de proteína (Kashchiev, 2001), que são o início da formação do cristal; e a última, a região metaestável, a que viabiliza que os cristais, desde que já nucleados, cresçam, ou seja, que as moléculas livres de proteína passem a se agrupar ordenadamente no núcleo. Cabe lembrar que as diferentes zonas são qualitativas, já que se trata de um processo cinético, restando ao cristalógrafo analisar o estado em que a gota se encontra e se basear nisso para realizar alterações nas condições de cristalização (Mikol *et al.*, 1990; Saridakis e Chayen, 2003).

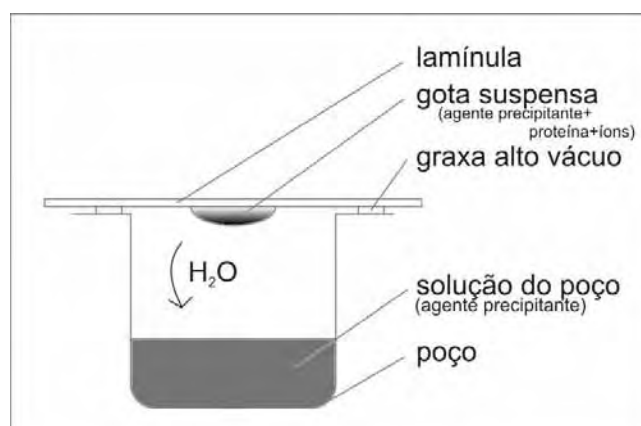


Figura 6 Processo de cristalização através do método de difusão de vapor através da gota suspensa

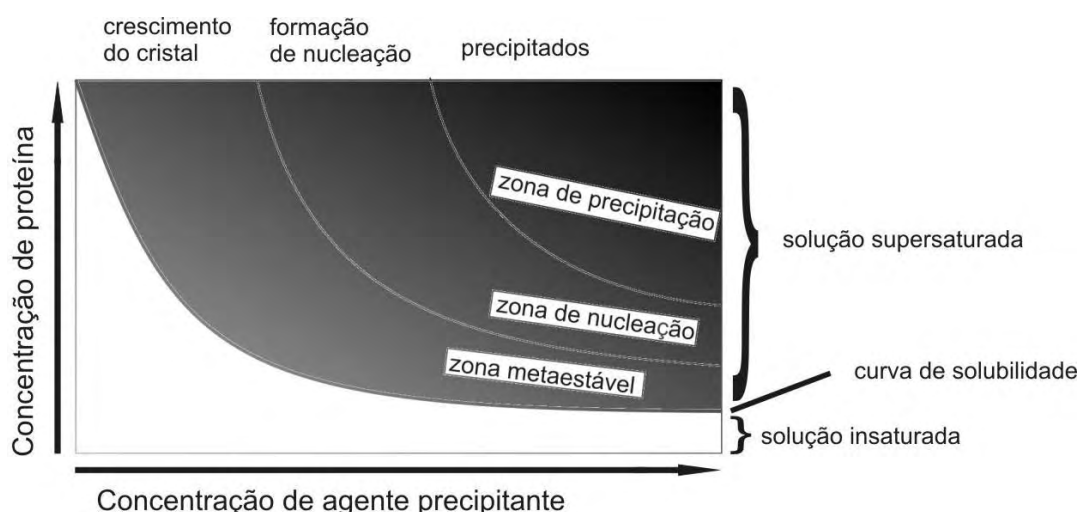


Figura 7. Diagrama de fases do processo de cristalização com variação de concentração de proteína e de agente precipitante.

Para obter cristais com boa qualidade para a próxima etapa, a difração de raios X, é necessário que o processo seja lento, viabilizando o crescimento organizado do cristal. A nucleação ocorre a partir do momento em que as forças presentes na solução supersaturada ultrapassam a barreira energética para formação dos núcleos, ou seja, a energia livre da proteína diminui à medida que há aumento das interações favoráveis, favorecendo a interação entre as moléculas protéicas em solução. A presença de impurezas pode prejudicar o processo de cristalização, porque a nucleação pode ocorrer sobre essas partículas, provocando crescimento desorganizado.

A próxima etapa é, então, o crescimento do cristal. Esse processo ocorre com a incorporação de mais moléculas de proteínas no núcleo ou minúsculo cristal. A morfologia do cristal depende da velocidade do crescimento do mesmo, que é proporcional à supersaturação da solução, sendo que cristais maiores são resultados de crescimento mais lento. A medida que novas moléculas de proteína vão se empacotando no cristal, a concentração protéica do sistema diminui, isso pode provocar uma redução no crescimento do cristal ou até na sua estabilidade, uma vez que o sistema entraria na fase solúvel do diagrama de fases. Outra razão para tal interrupção pode ser o acúmulo de defeitos nas faces do cristal.

Para ocorrer cristalização de forma lenta e organizada, há uma série de fatores e parâmetros que necessitam ser ajustados, pois estes influenciam no diagrama de fases. Tais fatores são estabelecidos através da combinação da concentração da proteína, da temperatura do ambiente e das características do solvente, que são: a concentração, o pH, a força iônica, o tipo de tampão e a presença de aditivos, como polietilenoglicol (PEG) e óleo. Para estabelecer tais parâmetros, pode-se utilizar o método da matriz esparsa (Jancarik e Kim, 1991) ou alguma variação desta metodologia, que consiste em utilizar várias condições de cristalização previamente estabelecidas abrangendo diferentes combinações de sais, precipitantes e pHs em menos de uma centena de soluções. Algumas empresas oferecem kits de cristalização com diversas soluções prontas, sendo estas formuladas com base em pesquisas das condições de experimentos de cristalização bem sucedidos. Após a utilização do método de matriz esparsa, é possível otimizar a condição em que foram obtidos cristais com a variação de alguns parâmetros desta solução. Dessa forma é possível estabelecer os parâmetros corretos para viabilizar o surgimento e crescimento de cristais cuja forma e tamanho sejam adequados à difração de raios X.

3.3 Coleta de dados de difração de raios X

A coleta de dados de difração de raios X é a única forma pela qual podemos obter uma estrutura cristalográfica. Os dados são provenientes da difração provocada pela incidência do feixe de raios X sobre o cristal e podem ser obtidos através da utilização de uma fonte de raios X convencional, com um ânodo rotatório, ou raios X de um síncrotron (como o existente no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas - SP).

Para realizar a coleta dos dados nestes equipamentos, o cristal de proteína imerso na solução da gota suspensa é colocado em um *loop* com diâmetro adequado ao tamanho do cristal. O *loop* contendo o cristal é alinhado ao feixe de raios X de tal maneira que, durante os movimentos oscilatórios que o mesmo sofrerá, o cristal fique exposto à radiação de maneira homogênea. O cristal é, então, exposto ao feixe de raios X e também a um fluxo de nitrogênio gasoso, à temperatura controlada (normalmente 100 K). A temperatura reduzida produzida com o fluxo de nitrogênio é importante para diminuir a degradação do cristal que ocorre com a incidência da radiação do cristal, possibilitando a manutenção da morfologia e qualidade do cristal por longas coletas de dados.

A coleta de dados é realizada por placas de imagens reutilizáveis com leitura a laser ligadas a uma estação gráfica. A placa de imagens é constituída por material semicondutor e a leitura ocorre com a excitação dos elétrons desse material provocado pela incidência dos fótons difratados, sendo assim, armazenando a localização dos fótons. A leitura ocorre quando o material semicondutor é levado a um estado intermediário de energia, produzindo luminescência proporcional ao número de fótons de raios X incidentes na placa; em seguida, estas informações vão para uma fotomultiplicadora, que mede o número de fótons fluorescentes emitidos. Esses dados são transmitidos a uma estação gráfica na qual as imagens de difração de raios X podem ser visualizadas (através da intensidade das difrações). As intensidades com seus respectivos desvios-padrão são os únicos dados disponíveis para a determinação da estrutura tridimensional.

Inicialmente, pode-se determinar a partir deste conjunto de dados informações como grupo espacial, parâmetros de rede do cristal, número de monômeros da proteína na unidade assimétrica e previsão da porcentagem de solvente no cristal. O processamento dos dados

obtidos é feito utilizando-se o programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997), que é largamente utilizado pela comunidade cristalográfica.

3.4 Elucidação de estruturas tridimensionais

Após coleta e processamento do conjunto de dados, é necessário resolver o problema das fases. Para isso, pode-se utilizar o método indireto ou os diretos. Dentre estes, há o MIR (*Multiple isomorphous replacement*) e o MAD (*Multiwavelength anomalous diffraction*), sendo que a diferença entre eles é a de que este último consiste na coleta de dados com diferentes comprimentos de ondas de acordo com o λ (comprimento de onda) em que há maior absorção de energia por um determinado metal pesado, facilitando a localização dos metais. No método indireto, a substituição molecular consiste em utilizar as fases de uma proteína com alta homologia e com estrutura já resolvida, sendo, portanto, um processo mais simples e rápido. A determinação de uma estrutura protéica pelo método de Substituição Molecular pode ser realizada usando um modelo cristalográfico de uma proteína com alta homologia seqüencial com a proteína cuja estrutura se deseja elucidar. O procedimento baseia-se no fato de proteínas com seqüência semelhante de aminoácidos possuírem enovelamentos similares (Mcree, 1993; Drenth, 1994)

Após o processamento dos dados provenientes da coleta de dados de difração de raios X, é gerado um mapa de densidade eletrônica. Quanto maior o número de elétrons de um átomo, mais intenso será o sinal observado no mapa de densidade eletrônica. O modelo gerado pela substituição molecular é, então, refinado até a máxima concordância entre dados experimentais e a estereoquímica da molécula, o que pode ser feito utilizando-se os programas CCP4 (Brunger *et al.*, 1998), PHENIX (Adams *et al.*, 2010) e o CNS (Brunger, 1992). A substituição molecular foi realizada utilizando-se os programas Molrep (Vagin e Teplyakov, 2010) e Phaser (McCoy *et al.*, 2007). No caso do refinamento da ocupação do modelo da BthTX-II com íons cálcio, o programa CNS foi utilizado, e dos demais complexos, o PHENIX. Durante as etapas de refinamento, ajustes manuais do modelo à densidade eletrônica foram também realizados, sendo utilizado o programa gráfico Coot (Emsley e Cowtan, 2004).

3.5 Espalhamento anômalo

Os átomos têm a capacidade de absorver e emitir raios X (Rhodes, 2006). Caso a energia do feixe de raios X seja muito próxima da energia necessária para provocar a transição de um elétron para outro orbital atômico de maior energia, ocorre a emissão de uma energia de luz visível, fluorescência, e o espalhamento ou dispersão anômala (Walsh *et al.*, 1999). Essa energia específica ou comprimento de onda (um tem relação direta com o outro) é conhecida como borda de absorção (Rhodes, 2006). Cada átomo possui uma borda de absorção de acordo com seu número de elétrons; já que quanto maior o for, maior será a energia necessária para provocar a transição eletrônica (Rhodes, 2006). Cabe ressaltar que há a borda de absorção específica para cada orbital atômico. Diferente do espalhamento normal, onde os átomos espalham a mesma energia incidente com mesma fase em todas as direções, no espalhamento anômalo há a alteração da fase e da amplitude dos raios X (Walsh *et al.*, 1999). Assim, em uma coleta de dados utilizando o comprimento de onda referente à borda de absorção, haverá o fenômeno de espalhamento anômalo de um átomo específico e o espalhamento normal dos demais, sendo possível separar o fator vindo do espalhador anômalo e identificar posição deste (Walsh *et al.*, 1999; Rhodes, 2006).

Os experimentos realizados nos laboratórios de luz síncrotron permitem alteração do comprimento de onda dos raios X de maneira que seja possível explorar espalhamento anômalo de diferentes elementos. A linha MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron foi utilizada para coleta de dados de espalhamento anômalo dos cristais. Cabe ressaltar que é importante realizar uma varredura experimental do comprimento de onda para estabelecer ponto de maior espalhamento (borda de absorção), pois o valor experimental e o teórico podem ter ligeira diferença dependendo do microambiente onde o átomo está inserido (Walsh *et al.*, 1999). Foi utilizado um sensor de fluorescência já disponível na linha para calcular o comprimento de onda referente à borda de absorção, ou seja, ponto que haveria o maior espalhamento anômalo. Essas operações foram realizadas através do programa “Blu-Ice” (Mcphillips *et al.*, 2002) com auxílio técnico da equipe do LNLS. O processamento dos dados foi realizado com o programa HKL2000 (Otwinowski e Minor, 1997) com alguns ajustes manuais para separar as reflexões provenientes do espalhamento anômalo.

Após processamento de dados, os mapas anômalo foram gerados para localização dos íons em pesquisa utilizando-se o aplicativo FTT Map, disponível no pacote CCP4 (Brunger *et al.*, 1998). Inicialmente, o mapa foi gerado com o conjunto de reflexões referente à borda de absorção do átomo utilizando o modelo contendo apenas os átomos da proteína sem as cadeias laterais próximas das regiões candidatas previamente estabelecidas. Após o estabelecimento dos picos contendo o sinal anômalo, o modelo foi concluído com os dados do comprimento de onda remoto, já que este possui maior resolução. Então, novo mapa anômalo foi gerado com as reflexões do espalhamento anômalo retirando apenas os íons para validação dos picos anteriores, já que o modelo está mais adequado e com melhores estatísticas.

3.6 Localização e análise do sítio de coordenação dos metais

A localização dos sítios de ligação dos metais pesquisados foram realizados através de inspeção manual e do recurso automático *find ligands* ou *Difference Map Peaks* do programa Coot com sinal mínimo de 3σ ou 7σ , respectivamente, no mapa diferença de densidade eletrônica ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$), mapa este comum para localizar átomos e ligantes que ainda não estão presentes no modelo. Este recurso é utilizado para localização dos íons em estudo pela técnica de difração de raios X já que a intensidade do mapa de densidade eletrônica é relacionada ao número de elétrons do átomo que ocupa aquela região. Como o cálcio, manganês e zinco apresentam maior número de elétrons que os átomos protéicos (hidrogênio, carbono, oxigênio e enxofre) ou de moléculas de água (hidrogênio e oxigênio), espera-se encontrar uma densidade eletrônica maior para os íons do que para os demais (3σ).

Durante o refinamento do modelo, é gerado o *B-factor* ou fator temperatura para cada um dos átomos. Esse fator pode ser compreendido como a oscilação ou vibração do átomo na densidade eletrônica (Drenth, 1994, p. 93-95; Harding *et al.*, 2010, p. 258). O fator temperatura é importante para se avaliar a qualidade do modelo, sendo que altos valores indicam que o átomo em questão está mal posicionado ou então não se corresponde ao elemento presente na densidade eletrônica (Drenth, 1994, p. 93-95). A análise desse valor é sempre comparativa com o fator temperatura dos átomos ao seu redor, já que regiões mais flexíveis da proteína bem como cadeias laterais tendem a possuir valores mais elevados (Drenth, 1994, p. 93-95). Desta forma, nos sítios de coordenação de metais é esperado que os

átomos doadores e o metal tenham fatores temperatura próximos (Harding *et al.*, 2010, p. 258). Caso a inspeção deste mapa e o fator temperatura não sejam suficientes para localização e confirmação dos íons, pode-se gerar o mapa diferença anômalo, onde haverá apenas picos provenientes do átomo que teve seu espalhamento anômalo explorado.

A análise do sítio de coordenação dos metais em estudo foi feita de acordo com as informações disponíveis no *website* da pesquisadora Marjorie Harding (<http://tanna.bch.ed.ac.uk/>). Uma série de estudos alimentam esse *website*, que possui tabelas e indicações do número, caráter e distância das ligações mais comuns e das aceitáveis envolvidas na coordenação de diferentes metais (Marjorie *et al.*, 2010).

A investigação de dois íons metálicos foram realizados nos estudos cristalográficos, manganês e zinco. O manganês é um metal de transição com 25 elétrons e adota a forma iônica com carga 2+ ou 3+. Os átomos e aminoácidos que doam elétrons são, usualmente, oxigênio de Asp e Glu e o nitrogênio da His e, ocasionalmente, oxigênio da cadeia principal, Asn, Gln, Ser e Thr. O número de coordenação usual é 5 a 6 e, raramente, 4 e 7. A distância típica do manganês ao oxigênio é 2,15 – 2,20Å, ao nitrogênio 2,21Å e ao enxofre 2,35Å (Marjorie *et al.*, 2010).

O zinco é um metal de transição com 30 elétrons e adota a forma iônica com carga 2+. Os átomos e aminoácidos que doam elétrons são, usualmente, o nitrogênio imidazólico da His, o enxofre da Cys e o oxigênio das cadeias laterais dos Asp e Glu e, ocasionalmente, o oxigênio da cadeia principal, Asn, Gln, Ser e Thr. O número de coordenação usual é 4 e, raramente, 3, 5 e 6. A distância típica do zinco ao oxigênio é entre 2,00 e 2,10Å, do nitrogênio 2,03Å e do enxofre 2,31Å. Moléculas de água podem estar presentes completando o número de coordenação tanto para o zinco como para o manganês (Marjorie *et al.*, 2010).

No caso do cálcio, metodologia diferente foi utilizada, uma vez que a intenção foi investigar se esse íon estaria coordenado no *loop* de ligação de cálcio. Para certificar que os Ca^{2+} realmente estavam presentes, os seguintes pré-requisitos foram verificados: I) valor de ocupação maior do que 0,7 após refinamento (programa CNS (Brunger, 1992)); II) corte do mapa de densidade eletrônica (relação sinal ruído, i.e., I/σ) maior do que 2,5 no mapa $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$; III) preferência de interação com átomos de nitrogênio, enxofre e especialmente oxigênios (incluindo características de ligantes bidentados) (Goyal e Mande, 2008).

3.7 Análise e comparação das estruturas cristalográficas

A comparação das estruturas cristalográficas obtidas com as presentes no banco de dados de proteínas foi realizada usando o programa Coot (Emsley e Cowtan, 2004). As análises das interfaces de contato e das estruturas quaternárias do modelo cristalográfico foram realizadas usando a ferramenta online PISA (*Protein, Interfaces, Surfaces and Assemblies*) (Krissinel e Henrick, 2007) disponível no site do *European Bioinformatics Institute Server* (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html). Todas as figuras foram geradas no programa Pymol (Delano, 2002).

Algumas proteínas ou complexos apresentam estrutura quaternária, i.e. interação entre duas ou mais cadeias polipeptídicas ou monômeros. Apesar de não se tratar da maioria dos modelos cristalográficos, algumas estruturas quaternárias observadas nestes podem existir apenas no empacotamento do cristal, não tendo relevância biológica (Krissinel e Henrick, 2007). O programa PISA identifica de maneira automatizada a provável estrutura quaternária biológica de uma proteína ou complexo em solução baseando-se nas interações físico-químicas e na termodinâmica envolvidas entre monômeros ou proteína-ligante (Krissinel e Henrick, 2007). Atualmente, não existe nenhum método totalmente eficaz para diferenciar estruturas quaternárias sem relevância biológica e estimar suas unidades biológicas; no entanto, o programa PISA é uma ferramenta que auxilia nesta predição (Krissinel e Henrick, 2007). Os autores avaliaram a eficácia do programa em conjuntos de dados de teste (1,35% de todos os dados de cristalografia de raios X disponíveis na época no PDB) e obtiveram 90% de acerto (Krissinel e Henrick, 2007), sendo este, portanto, um método eficaz para prever estado oligomérico com relevância biológica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos estruturais com a PrTX-I e BthTX-I em presença de íons manganês

Os estudos estruturais da PrTX-I e BthTX-I em presença de íons manganês são importantes para compreender, do ponto de vista estrutural, o efeito inibitório deste íon observado por Soares e co-autores (2002). Diversas estruturas cristalográficas de Lys49-PLA₂s complexadas já foram elucidadas, sendo a presença de inibidores observada no canal hidrofóbico e no sítio de ligação de cálcio da proteína (Lee *et al.*, 2001; Ambrosio *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2007; Dos Santos *et al.*, 2009b; Fernandes *et al.*, 2010). Os estudos com íons teriam relevância por se tratar de um átomo apenas em comparação à alta massa molecular dos ligantes, de maneira que manganês poderia provocar alterações pontuais, indicando novas informações acerca do mecanismo de ação das PLA₂s.

Os estudos estruturais da PrTX-I/Mn²⁺ foram iniciados no doutorado da Dra. Juliana Izabel dos Santos (Dos Santos, 2011) e em minha Iniciação Científica (Borges, 2009), quando esta aluna me co-orientou. Nesta época, a PrTX-I foi cristalizada em duas condições de cristalização diferentes (Borges, 2009). Uma delas idêntica a nativa (0,1M TrisHCl pH 7,5, 30% PEG4000 (m/v) e 0,1M sulfato de lítio (v/v)) (Dos Santos *et al.*, 2009b), sendo os cristais obtidos em gota suspensa contendo 0,8 µL de proteína (12 mg/mL), 0,8 µL de solução precipitante e 0,2 µL de MnCl₂ (1 M). A outra é semelhante à nativa, com exceção do sulfato de lítio, cuja concentração foi aumentada de 0,1 M para 0,2 M, sendo os cristais obtidos em gota suspensa 0,8 µL de proteína (12 mg/mL), 0,8 µL de solução precipitante e 0,4 µL de MnSO₄ (12,5 mM). Comparando a morfologia dos cristais dessas duas condições de cristalização, no primeiro caso observamos os volumosos em um formato hexagonal (semelhantes aos cristais da Figura 8), enquanto no segundo, finos em formato retangular (semelhantes aos cristais da Figura 11). Após coleta de dados, observamos mais uma diferença entre esses dois tipos de cristais: no primeiro caso, o conjunto de dados, após processamento de dados, indicou grupo espacial era o P3₁21; enquanto o segundo, P2₁. Possivelmente o aumento da concentração de íons sulfato na segunda condição de cristalização provocou o diferente empacotamento e morfologia dos cristais (Borges, 2009). O

refinamento de ambos os conjuntos de dados foram concluídos e algumas regiões candidatas aos íons manganês foram levantadas no grupo espacial P3₁21; no entanto, não foi possível concluir que este íon estava realmente presente em cada uma das regiões, pois havia a possibilidade da presença do cloreto e da molécula de água provenientes da condição de cristalização que geravam ocupação e *B factor* coerentes (Borges, 2009). Então, optamos por responder, nessa dissertação, a essa dúvida através da coleta de dados explorando o espalhamento anômalo do manganês (mais informações no **item 3.5**). Esse estudo foi realizado em conjunto com a Dra. Juliana Izabel dos Santos, sendo então parte também de seu projeto de doutorado (Dos Santos, 2011).

4.1.1 Estudos estruturais com a PrTX-I/Mn²⁺ em grupo espacial P3₁21

Experimentos de cristalização semelhantes aos anteriormente citados foram realizados com o intuito de obter mais cristais e submetê-los a coleta de dados em comprimento de onda referente à borda de absorção do manganês. Cristais da PrTX-I foram obtidos na mesma condição de cristalização da proteína nativa (Dos Santos *et al.*, 2009b) em gota suspensa contendo 1,0 µL de proteína (12 mg/mL), 0,6 µL de solução precipitante e 0,4 µL de MnCl₂ (0,1 M) (Figura 8). Os cristais foram levados a linha MX2 do LNLS e, após incidência de raios X no cristal, detectamos a fluorescência no comprimento de onda referente à borda do manganês, confirmando a presença desse íon metálico no cristal. O processamento dos dados foi realizado de modo a separar as reflexões do espalhamento anômalo (Tabela 1).

A substituição molecular foi realizada utilizando-se alguns modelos de PrTX-I em alta resolução disponíveis no banco de dados, 2OK9 (Marchi-Salvador *et al.*, 2009), 2Q2J e 3CYL (Dos Santos *et al.*, 2009b), e os modelos gerados em minha Iniciação Científica (PrTX-I/Mn²⁺ em grupo espacial P3₁21 e resolução 1.9Å) (Borges, 2009). Duas configurações diméricas foram encontradas na unidade assimétrica, “dímero convencional”, estabilizado pelas ligações α-hélice do N-terminal e a β-wing principalmente por meio dos resíduos Glu12, Trp77, Asp79 e Lys80, e o “dímero alternativo”, estabilizado pelas ligações de hidrogênio das Tyr119 e Asn17 e interações hidrofóbicas entre *loop* de ligação de cálcio e C-terminal. Optamos por utilizar o “dímero alternativo” que foi sugerido por Dos Santos *et al.* (2009b) como o relevante biologicamente com base em alguns argumentos, dentre os quais cabe citar

os resultados do programa PISA. Após o refinamento de corpo rígido, os melhores resultados foram utilizando o monômero B do nosso próprio modelo da PrTX-I/Mn²⁺ a 1.9Å, R=39,1% e R_{free}=41,0%. Então realizamos o refinamento do modelo e adição de moléculas de água e omissão de algumas cadeias laterais que não apresentavam densidade eletrônica Lys70, Glu86, Lys115, Lys116, Lys127 e Asp132 do monômero A e Lys57, Lys70, Glu86, Lys127, Lys129, Ala130, Asp119, Asp132 do monômero B. Vale ressaltar que todos estes resíduos estão ou expostos ao solvente ou na interface de contato do monômero. Concluímos o modelo com as estatísticas de R=20,0% e R_{free}=23,2%. Apenas o resíduo Asp132B está fora do gráfico permitido de Ramachandran e esta entre os resíduos que constituem a região do C-terminal. Cabe ressaltar que essa região é altamente flexível nos modelos nativos (sem ligante no canal hidrofóbico) e essa maior vibração é observada nos valores do *B factor* e a omissão de cadeias laterais são esperadas (Da Silva Giotto *et al.*, 1998; Ambrosio *et al.*, 2005; Dos Santos *et al.*, 2009b). Mesmo caso é observado nesta estrutura, a densidade eletrônica não é clara, já que a relação intensidade/ruído (*I/σ*) é baixa, o que impede a modelagem precisa. Além disso, a cadeia lateral de grande parte do C-terminal foi omitida, incluindo Asp132B.

O mapa anômalo foi então gerado (conforme descrito no **item 3.5**) e a busca de densidade eletrônica correspondente aos íons foi realizada utilizando um sinal mínimo de 5σ, sendo observadas apenas duas regiões candidatas (Figura 9). Cabe ressaltar que outras densidades eletrônicas correspondentes a átomos de enxofre de cisteínas e metioninas foram encontradas neste mapa em intensidade semelhante.

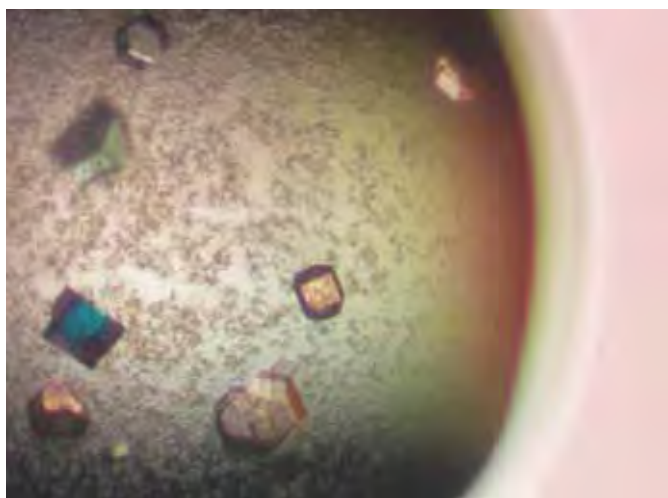


Figura 8. Cristais de PrTX-I em presença cloreto de manganês

Tabela 1. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios X da PrTX-I/MnCl₂ em grupo espacial P3₁21 em dois comprimentos de ondas diferentes

	borda de absorção	remoto
Comprimento de onda (Å)	1,89226	1,37757
Energia da linha (eV)*	6.552,20	9.000,20
Grupo Espacial	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21
Cela unitária (Å)	a = b = 57,08 c =131,62	a = b = 57,10 c =131,64
Resolução (Å)	40,0-2,15 (2,24-2,15) ^a	40,0-1,85 (1,92-1,85) ^a
Reflexões únicas	24910 (2817) ^{ae}	21134 (2239) ^a
Redundância	1,9 (1,8) ^{ae}	3,3 (3,2)
R _{merge} ^b (%)	4,6 (17,9) ^{ae}	6,8 (38,9) ^a
Completeza (%)	95,2 (96,4) ^{ae}	96,1 (94,6) ^a
I/σ (I)	17,6 (6,3) ^{ae}	15,0 (6,1) ^a
Quantidade solvente (%)		46,2
Coefficiente de Matthews (Å ³ /Da)	-	2,3
Desvio RMSD dos valores ideais		
Comprimento das ligações (Å)	-	0,015
Ângulos das ligações (°)		1,572
Gráfico de Ramachandran (%)		
Região mais favorável		93,8
Região aceitável	-	5,8
Região desfavorável		0,6
B factor Médio (Ocupação)		
Proteína		36,64 (1,0)
SO ₄		54,26 (0,9)
Cl ⁻	-	31,5 (0,67)
TRIS		52,84 (0,9)
H ₂ O		42,27 (1,0)
R _{crist} ^c (%)		20,0
R _{free} ^d (%)	-	23,2

^a Números em parênteses são para a faixa de mais alta resolução. ^b $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} (\sum_i (|I_{\text{hkl},i} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle|)) / \sum_{\text{hkl},i} \langle I_{\text{hkl}} \rangle$, onde $I_{\text{hkl},i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$. ^c $R_{\text{crist}} = R_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|) / |F_{\text{obs}}|$, onde $|F_{\text{obs}}|$ e $|F_{\text{calc}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados. ^d R_{free} é equivalente ao R_{crist} , porém calculado com 5% das reflexões omitidas no processo de refinamento. ^e Estatísticas do espalhamento anômalo. RMSD *root-mean-square deviation*.

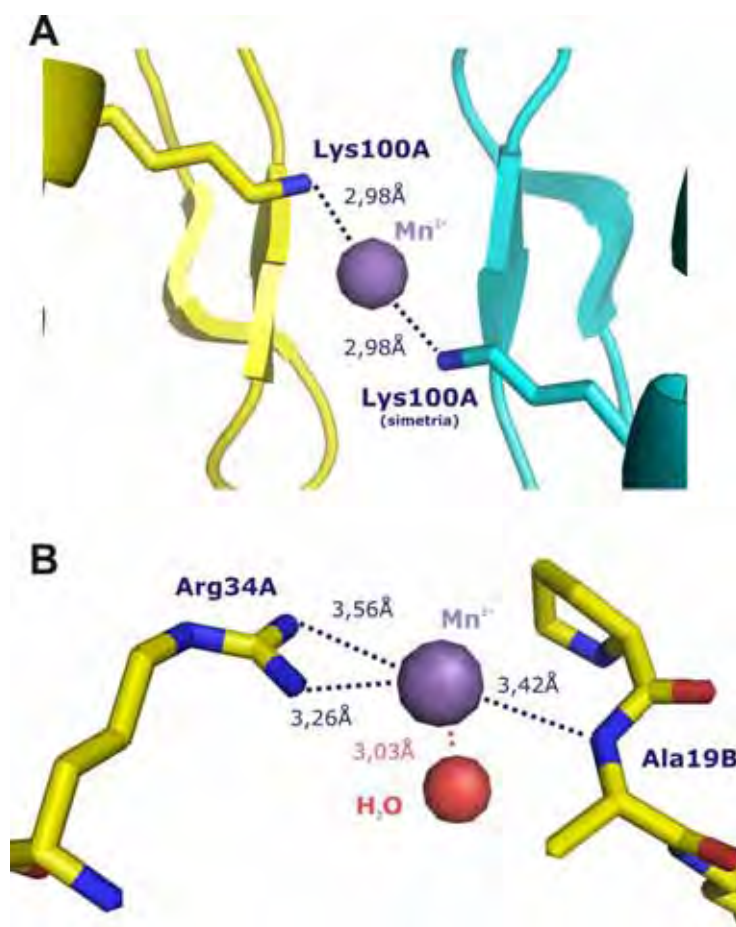


Figura 9. Regiões candidatas de ligação dos íons manganês na estrutura PrTX-I/MnCl₂. As esferas em roxo e em vermelho correspondem a átomos de manganês e moléculas de água, respectivamente. (A) A posição do átomo de manganês está em simetria cristalográfica, portanto interage com Nζ da Lys100A e seu simétrico. (B) Manganês sendo coordenado pelos Nη1 e Nη2 Arg34A, pelo oxigênio da cadeia principal Ala19B e por uma molécula de água. Somente as distâncias abaixo de 3,6Å foram consideradas.

4.1.2 Análise das regiões candidatas da PrTX-I de interação dos íons manganês

Conforme as restrições de coordenação do manganês descritas no **item 3.6**, observa-se que a distância máxima de ligação aceitável é de 2,35Å, o número de coordenação de 4 a 7 e a preferência por interação com resíduos ácidos não foram satisfeitas pelas regiões candidatas (Figura 9). Tais observações indicam que ou a densidade eletrônica não corresponde a de um sítio comum de ligação de manganês ou se trata do sítio de ligação de outro átomo. Optamos por analisar no PDB se a Arg e a Lys seriam encontradas interagindo com manganês em outros modelos cristalográficos. Para tanto utilizamos a ferramenta MESPEUS_10 (Hsin, 2008) (disponível em http://mespeus.bch.ed.ac.uk/MESPEUS_10/index.html) (Banco de Dados atualizado com

PDB em janeiro de 2010) selecionando o metal manganês com coordenação de 4 interações com a Arg (Figura 9A) e 2 da Lys (Figura 9B). Nestas análises, nenhum caso foi encontrado, ressaltando a inviabilidade de coordenação.

As exigências de coordenação do íon manganês não foram cumpridas nas regiões candidatas a esses íons. Dessa forma, a densidade eletrônica observada no mapa anômalo provavelmente se refere ao espalhamento anômalo de outro átomo. Esse fenômeno é possível, já que ao realizarmos a difração de raios X com energia referente à borda de absorção do manganês, aproximadamente 6500 eV, todos os átomos mais leves que o Mn também produzem espalhamento anômalo, contudo em menor intensidade. O sinal anômalo observado poderia ser proveniente de um dos compostos da condição de cristalização, isto é, dos íons manganês, cloro, sulfato (enxofre), lítio ou molécula de água (oxigênio e hidrogênio). O hidrogênio, o lítio e oxigênio podem ser descartados, já que apresentam reduzido número de elétrons e a intensidade do espalhamento anômalo gerado não seria suficiente para ser mensurado (Walsh *et al.*, 1999). Dessa maneira, o cloro, o manganês e o enxofre são potenciais ligantes dessa região.

Os gráficos do espalhamento anômalo teórico do manganês, do cloro e do enxofre em função do comprimento de onda indicam que no comprimento referente à borda de absorção do manganês há intensidade suficiente para estes três elementos serem observados no mapa anômalo (Figura 10). Essa observação é confirmada pelos nossos dados experimentais, já que, no mapa anômalo gerado, foi possível observar densidade para os enxofres das cisteínas (pontes dissulfeto) e metioninas. Apesar de as características levantadas no **item 3.6** inviabilizarem a possibilidade do manganês ser coordenado naquela região, existe a hipótese deste metal de transição estar realizando leve interação com ocupação parcial nos cristais em sítio de coordenação não usual, apesar de pouco provável. Para comprovar tal hipótese, é necessário realizar nova coleta de dados em comprimento inferior a borda de absorção do manganês, pois dessa maneira o espalhamento anômalo de átomos mais leves seria aumentado e o do manganês seria reduzido como ilustra a Figura 10. A comparação da intensidade dos picos desses diferentes mapas anômalos serviria para concluir então, qual átomo está provocando o espalhamento observado nas regiões apontadas na Figura 9.

Diante da possibilidade dos picos observados serem referentes a átomos de cloro

ou de enxofre, optamos por realizar ciclo de refinamento utilizando mesmos parâmetros com uma variável em cada uma das situações, refinar ou não ocupação dos possíveis ligantes (Tabela 2). Cabe ressaltar que o enxofre poderia ocupar a região candidata na sua forma iônica, sendo, portanto, o SO_4^- utilizado no refinamento. Contudo, o íon sulfato pode ser descartado das possibilidades pela presença dos quatro oxigênios que torna a densidade eletrônica mais triangular e volumosa, já que observamos uma densidade esférica.

Tabela 2. Ocupação e *B-factor* de possíveis ligantes nas regiões candidatas para interação com íons manganês com respectivas estatísticas de refinamento (R e R_{free}).

	Região 1		Região 2		R (R_{free})
	ocupação	<i>B-factor</i>	ocupação	<i>B-factor</i>	
Mn^{2+}	1	71,52	1	49,28	20,6% (25,0%)
	0,44	44,93	0,6	37,35	20,3% (24,8%)
Cl^-	1	68,01	1	36,82	20,2% (24,7%)
	0,59	40,51	0,75	30,78	20,2% (24,7%)
$\text{S(O}_4\text{)}^-$	1	41,9 (55,57)	1	148,44 (147,62)	20,7% (25,4%)
	0,49	23,78 (38,1)	0,32	32,42 (39,34)	20,3% (24,9%)

Como o íon de cloreto apresentou valores bem próximos do manganês e em acordo com os valores comparativo da proteína, optamos por analisar coordenação do íon cloreto com mesmo cuidado que o utilizado no caso do manganês. Infelizmente, não existe um servidor ou ferramenta *online* de ânions que possibilite organização das distâncias, geometria e número de coordenação assim como é possível com *MESPEUS* (Hsin, 2008) ou *MetalloScripps Database* (MDB) (Castagnetto *et al.*, 2002) (disponível em <http://metallo.scripps.edu/>). Contudo, com *Metal Interactions in Protein Structures* (MIPS) (Hemavathi, 2010) (disponível em <http://dicsoft2.physics.iisc.ernet.in/cgi-bin/mips/mindex.pl>) é possível realizar buscas por qualquer elemento e obter listas de PDBs com restrições de resolução, ligante, tipo e número de interação. Realizamos busca restrita a estruturas, em resolução entre 1 e 2 Å e R_{factor} 1 e 25%, com cloreto interagindo em distância entre 1 e 4 Å com apenas resíduos Arg da proteína ou com apenas Lys, já que são esses os dois resíduos de interação nas regiões candidatas (Figura 9). 1437 modelos foram encontrados na busca pela Arg e 625 na pela Lys, em um total de 3067 modelos contendo Cl^- respeitando as restrições da resolução e R_{factor} apontadas acima. Na literatura, não encontramos nenhum artigo que sintetize as informações do íon cloreto ou outros ânions, apenas em relação aos íons sulfato e

fosfato (Chakrabarti, 1993). Contudo, Vaney *et al.* (2001) tentaram estipular requisitos para coordenação e diferenciação de ânions em cristais polimorfos de lisozima. Infelizmente, não obtiveram sucesso, já que observaram uma somatória de fatores influenciando os diferentes sítios de coordenação dos ânions em estudo (Vaney *et al.*, 2001, p. 935). Porém, um padrão observado é a preferência por resíduos básicos Asn, Arg e Lys (Vaney *et al.*, 2001). Além dessa preferência, a distância entre interações também é importante, então optamos por analisá-la com os modelos cristalográficos do artigo de revisão Mueller-Dieckmann *et al.* (2007). Realizamos essa opção porque os autores nesse trabalho exploraram o espalhamento anômalo para diferenciar íons, portanto um embasamento experimental para confirmação dos sítios de coordenação do cloreto, característica não realizada no estudo de Vaney *et al.* (2001). Para auxiliar nossa análise, realizamos uma triagem com a ferramenta *Ligand-Protein Contacts* (LPC) (Sobolev *et al.*, 1999) (disponível em <http://bip.weizmann.ac.il/oca-bin/lpcsu>) para identificar em quais dos modelos do trabalho de Mueller-Dieckmann *et al.* (2007) o cloreto interagia com nitrogênios da cadeia lateral da Lys (Nζ) ou Arg (Nη) em distância máxima de 4Å. Então, contabilizamos todas as interações atômicas num raio de 4Å através de inspeção manual no programa Coot (Tabela 3). Analisando os dados, confirmamos a falta de padrão nas interações do cloreto dito por Vaney *et al.* (2001), já que o número e o tipo de interação, com oxigênios e nitrogênios de diferentes aminoácidos, foram observados (Tabela 3). Além disso, a distância dessas interações é acima de 2,8Å, valor superior do observado na coordenação do manganês. Encontramos confirmação das distâncias e preferências por coordenação do íon cloreto levantadas na Tabela 3 no trabalho de Irimia *et al.* (2003). Estes autores geraram um modelo cristalográfico de uma proteína contendo cloreto, sendo este íon importante para manutenção da oligomerização ao participar da interface de contato dos monômeros (Irimia *et al.*, 2003). Diferentes regiões de coordenação do cloreto são encontradas nesse modelo, sendo todas envolvendo resíduos ácidos e básicos, além da His e de oxigênios das moléculas de água, em distância entre 2,49Å e 3,85Å. Portanto, corroboramos a identificação do cloreto através do espalhamento anômalo nos estudos de Dieckmann *et al.* (2007) com as observações da interação cloreto-proteína de Irimia *et al.* (2003) em uma proteína cuja estabilidade depende de cloreto.

No sítio de coordenação candidato manganês 1 (Figura 9A), observamos duas interações com Nζ da Lys com distância de 2,98 Å considerando a simetria cristalográfica. Situações semelhantes à essa são observadas nos casos íons cloreto #5 e #6 (Tabela 3), isto é,

duas interações de 2,97 Å ao Nζ Lys e ao N Lys no primeiro caso e uma interação de 3,50 Å ao Nζ Lys no segundo. No sítio de coordenação candidato manganês 2 (Figura 9B), observamos quatro interações, 3,03 Å com oxigênio de uma moléculas de água, 3,26 e 3,56 Å com interações com Nη da Arg e 3,42 Å com N da cadeia principal da Ala. As interações com situações semelhantes são encontradas nos íons cloreto #3, #7, #9, #10 e #11. No primeiro caso, é encontrado interação da Nη da Arg com N da cadeia principal; no #11, #7 e #10 duas, três e quatro interações envolvendo Arg e H₂O, respectivamente; e no #9 duas interações com Arg. As distâncias do sítio de coordenação candidato manganês 2 estão dentro do observado nesses modelos, isto é, a distância ao oxigênio da molécula de água (2,97 Å) em acordo com #11 e #12; a distância à Arg (3,26 e 3,56 Å), #3, #7 e #10; e a distância ao nitrogênio da cadeia principal, #1, #6 e #13. Dessa maneira, comprovamos que tanto as distâncias quanto os números de interações são observadas em outras situações, confirmando a possibilidade da presença do íon cloreto nas regiões candidatas (Figura 25). As interações desse íon com a lisina e com a arginina são comuns conforme observação de Vaney *et al.* (2001) e nossas análises através do *Metal Interactions in Protein Structures* (MIPS).

Tabela 3. Diferentes sítios de ligação e suas respectivas distâncias a átomos de proteínas e/ou moléculas de água.

PDB	# Cl-	Dist	Át/Res	Dist	Át/Res	Dist	Át/Res	Dist	Át/Res	Dist	Át/Res
2G4I	1	3,65	N Lys								
2G4J	2	2,83	Nη2 Arg	3,32	Nε Arg	3,1	Nε 2 Gln	3,75	O Ala	3,1	N Phe
2G4K	3	3,42	Nη1 Arg	3,71	N Ser						
2G4Q	4	3,23	N Ile	3,52	Nη2 Arg	3,57	Oδ1 Asp	3,72	Nε2 His		
	5	3,5	Nζ Lys								
2G4L	6	2,97	Nζ Lys	2,97	N Lys						
2G4O [#]	7	2,8	H ₂ O	3,07	Nη1 Arg	3,2	Nη2 Arg				
	8	3,52	H ₂ O	3,68	Nη2 Arg	3,81	Oδ1 Asp				
	9	3,76	Nη1 Arg	3,98	Nη1 Arg						
	10	2,83	H ₂ O	3,52	Nη1 Arg	3,63	H ₂ O	3,76	Nη1 Arg		
	11	2,99	H ₂ O	3,18	Nη1 Arg						
2G4V	12	2,68	H ₂ O	2,98	H ₂ O	3,04	Oη Tyr	3,07	Nη1 Arg	3,62	Nη1 Arg
2G4Z	13	3,09	N Asp	3,23	NZ Lys	3,46	N Leu	3,55	H ₂ O	3,55	Oδ2 Asp
	13 cont	3,55	O Asp	3,72	N Gly	3,72	N Gly	3,92	N Val		
	14	3,32	Nε Arg	3,48	Nη2 Arg						
	15	3,65	Nη1 Arg	3,99	Nε2 Gln						

[#] Modelo tetramérica, por isso maior número de íons cloreto em interações semelhantes. Os demais modelos são monoméricos. Dist é a distância entre o átomo (At) do resíduo (Res) ou oxigênio da molécula de H₂O. Distâncias e resíduos em negrito se tratam das interações observadas nas regiões candidatas, i.e. Nη1 e 2 da Arg, Nζ da Lys, oxigênio da H₂O e N da cadeia principal do resíduo.

4.1.3 Estudos estruturais da BthTX-I em grupo espacial P2₁

O estudo do espalhamento anômalo dos conjuntos de dados em grupo espacial P3₁21 auxiliaram bastante a localização de íons, portanto optamos por utilizar mesma metodologia em cristais da segunda condição de cristalização, isto é, com 0,2 M de sulfato de lítio. Em vista da escassez do veneno da serpente *Bothrops pirajai* que está em extinção, utilizamos a BthTX-I em substituição PrTX-I. Essa substituição pode ser realizada sem problemas, já que apenas três resíduos são diferentes num total de 121 e as estruturas cristalográficas nativas em mesma condição de cristalização são praticamente idênticas (Dos Santos *et al.*, 2009b; Fernandes *et al.*, 2010). Cristais foram obtidos em gota suspensa contendo 0,8 µL de proteína (10,45 mg/mL), 0,6 µL de solução precipitante e 0,2 µL de MnSO₄ (125 mM) (Figura 11). Confirmamos a morfologia retangular (Figura 11), diferente do formato hexagonal dos anteriores (Figura 8). Esses cristais foram submetidos a experimentos de difração de raios X na linha MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e, após incidência de raios X no cristal, detectamos a fluorescência no comprimento de onda referente à borda do manganês, confirmando a presença desse íon metálico no cristal. O processamento dos dados foi realizado com o cuidado de separar as reflexões do espalhamento anômalo (Tabela 4). O processamento dos dados foi no grupo espacial P2₁ a uma resolução de 1,55 Å no comprimento de onda remoto.

A substituição molecular foi realizada com o modelo da PrTX-I complexada com vitamina E (PDB id: 3CYL) (Dos Santos *et al.*, 2009b) que apresenta mesmo grupo espacial que esse conjunto de dados. Após alguns ciclos de refinamento, realizamos inspeção por ligantes conforme indicado no **item 3.6**, encontramos densidades eletrônicas com alta intensidade em dois formatos diferentes, piramidal e segmentar. Nestes, optamos por adicionar PEG4000 (polietilenoglicol de alto massa molecular) e naquelas SO₄⁻, ambos presentes na condição de cristalização. Diferentemente do modelo anterior, em grupo espacial P3₁21, neste há presença de moléculas de PEG no canal hidrofóbico da proteína e íons sulfato. Uma das possíveis razões para haver esse empacotamento diferente e a presença desses ligantes é o aumento da concentração de íons sulfato. As cadeias laterais dos resíduos lisinas 69 e 70 e Asp79 de ambos os monômeros A foram omitidas, pois não possuíam densidade eletrônica bem definida. A estrutura apresenta as estatísticas R=19,1% e R_{free}=22,6 e boa qualidade estequiométrica conforme indicado na Tabela 4. Comparando com os dados em grupo

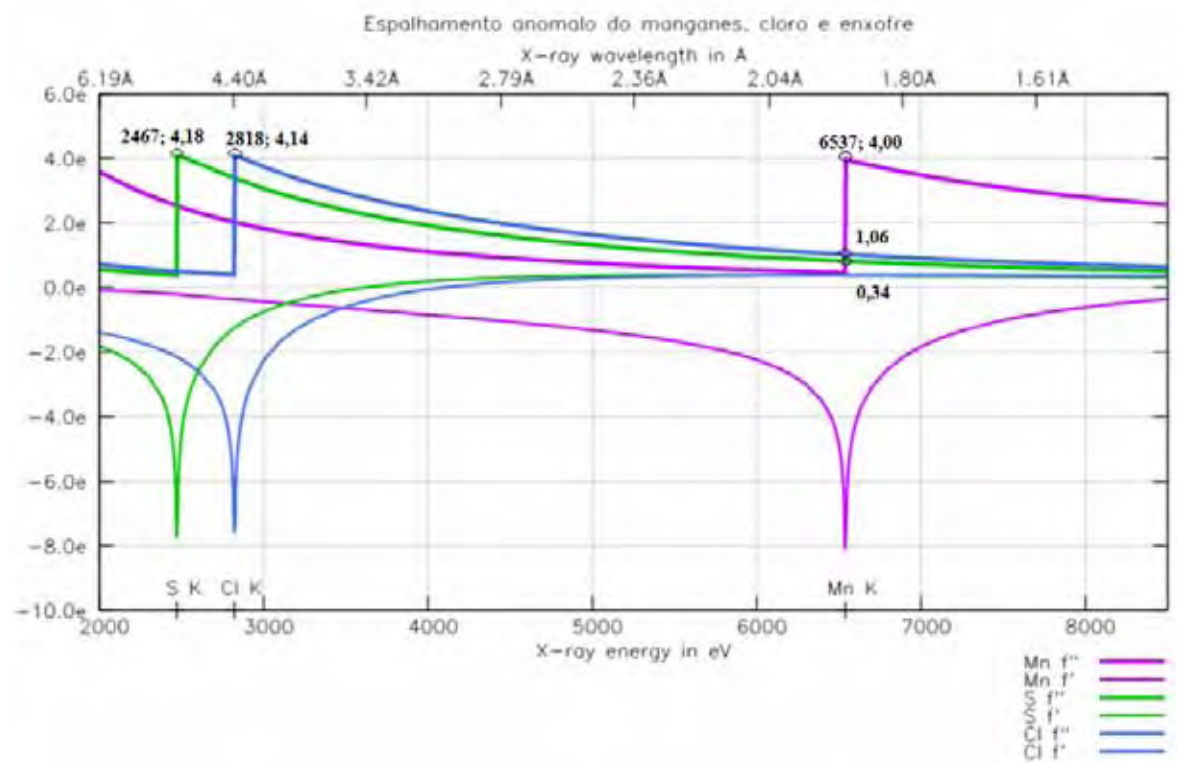


Figura 10: Valores teóricos do f'' e f' do manganês (Mn), em magenta, enxofre (S), em verde, e cloro (Cl), em azul. Gráfico gerado pelo site: http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/AS_form.html que utiliza a biblioteca de Brennan and Cowan (Brennan e Cowan, 1992)

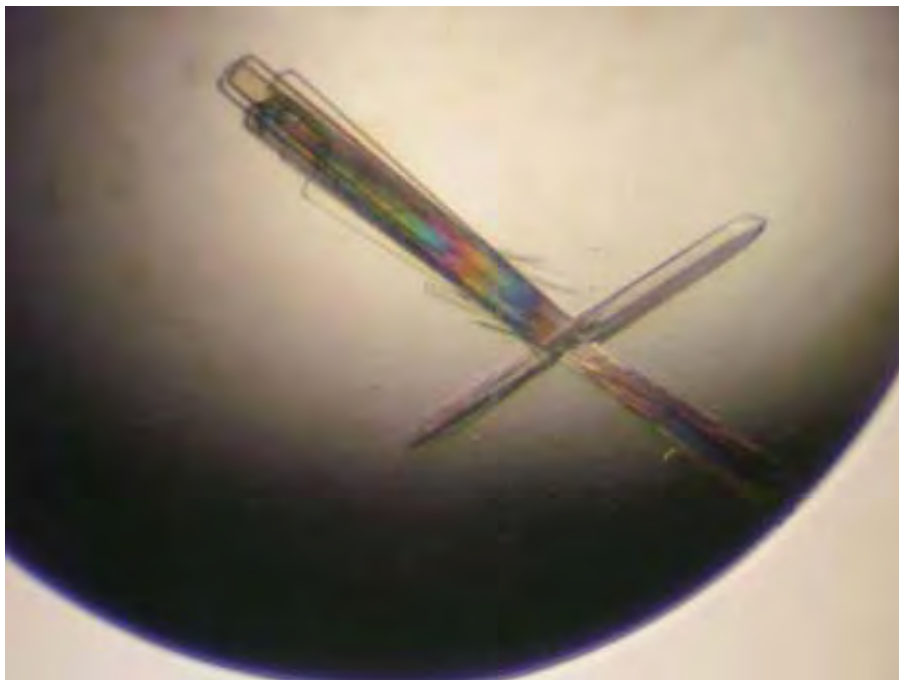


Figura 11. Cristais de PrTX-I em presença de sulfato de manganês.

Tabela 4. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios-X da BthTX-I/MnSO₄ em grupo espacial P2₁ em em dois comprimentos de ondas diferentes

	borda de absorção	remoto
Comprimento de onda (Å)	1,8922	1,4590
Energia da linha (eV)*	6.553,1	8.497,8
Grupo Espacial	P2 ₁	P2 ₁
Cela unitária (Å)	a = 39,41 b = 72,22 c =44,78	a = 39,45 b = 72,38 c =44,87
Resolução (Å)	40 - 2,05 (2,12 - 2,05) ^{ae}	40,0 - 1,58 (1,66 - 1,58) ^a
Reflexões únicas	26881 (2557) ^{ae}	32516 (4526) ^a
Redundância média	1,7 (1,6) ^{ae}	3,5 (3,4) ^a
R _{merge} ^b (%)	4,8 (7,9) ^{ae}	6,2 (31,8) ^a
Completeza (%)	88,7 (84,6) ^{ae}	96,1 (94,1) ^a
I/σ (I)	32,7 (18,6) ^{ae}	17,5 (4,2) ^a
Quantidade solvente (%)		47,0
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Da)		2,3
Desvio RMSD dos valores ideais		
Comprimento das ligações (Å)		0,018
Ângulos das ligações (°)		1,8
Gráfico de Ramachandran (%)		
Região mais favorável		97,1
Região aceitável		2,9
B factor Médio (Ocupação)		
Proteína		26,5 (1,0)
SO ₄		46,3 (0,93)
PEG4000		38,2 (1,0)
H ₂ O		38,3 (1,0)
R _{crist} ^c		19,1
R _{free} ^d		23,2

^a Números em parênteses são para a faixa de mais alta resolução. ^b $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} (\sum_i (|I_{\text{hkl},i} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle|)) / \sum_{\text{hkl},i} \langle I_{\text{hkl}} \rangle$, onde $I_{\text{hkl},i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$. ^c $R_{\text{crist}} = R_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|) / |F_{\text{obs}}|$, onde $|F_{\text{obs}}|$ e $|F_{\text{calc}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados. ^d R_{free} é equivalente ao R_{crist} , porém calculado com 5% das reflexões omitidas no processo de refinamento. ^e Estatísticas do espalhamento anômalo. RMSD *root-mean-square deviation*.

espacial P3₁21 anteriores, é possível destacar que essa estrutura se apresenta bem mais estável, conforme observado pela menor necessidade de omitir cadeias laterais e pelos fatores R inferiores.

Realizamos a inspeção de íons manganês e geramos o mapa anômalo, porém não encontramos regiões candidatas como foram encontrados no conjunto de dados anterior. Nesse mapa anômalo, o ruído era demasiadamente intenso e não foi tão fácil diferenciar picos. Esses resultados indicam que não foi perceptível densidade eletrônica para o manganês, contudo problemas na coleta de dados poderiam também ser os responsáveis pela dificuldade de encontrarmos o pico do manganês.

4.2 Estudos estruturais com a BthTX-I em presença de Mn²⁺ e Zn²⁺

Assim como os dados estudos estruturais da BthTX-I em presença de íons manganês são importante, o estudo com zinco também o é. Apesar de não ter sido discutido por Soares e colaboradores (2002), os seus experimentos com ratos avaliando o efeito edematogênico provocado pela administração da toxina BthTX-I, de íons divalentes e de ambos indicam que o zinco reduz a atividade da toxina. O edema observado pela toxina (25µg) é menor (75%) do que o provocado por solução com concentração 1 mM de zinco (aproximadamente 86%). Curiosamente, quando a mesma massa da toxina é administrada em presença de íons zinco, há uma redução no edema à medida que a concentração do zinco é reduzida, sendo 70% para 1,0 mM e, aproximadamente, 52% para 0,25 mM. Seria interessante realizar esse mesmo experimento reduzindo ainda mais a concentração do zinco para avaliar até qual concentração a redução do edema seria observada. Além dessas observações, o íon zinco e a toxina sozinhos provocam um edema maior do que quando os dois são administrados juntos, o que indica uma possível inibição recíproca, ou seja, o efeito edematogênico provocado pela toxina é inibido pela complexação toxina/Zn²⁺ e vice-versa. A literatura ainda carece de estudos funcionais de Lys49-PLA₂s e esses íons, novos experimentos analisando outras atividades farmacológicas com concentrações reduzidas desse íon e/ou outros poderia oferecer mais subsídios para compreensão da inibição e do próprio mecanismo de ação.

Experimentos de cristalização foram realizados com a BthTX-I e íons manganês e zinco utilizando a condição de cristalização nativa (Dos Santos *et al.*, 2009b). A gota suspensa

foi preparada utilizando diferentes proporções de proteína, íons e solução precipitante com objetivo de obter melhores cristais. Monocristais com formato hexagonal foram obtidos em gota montada a partir de 0,8 μL de proteína (10,4 mg/mL), 0,32 μL de MnSO_4 (12,5 mM), 0,09 μL de ZnCl_2 (1 M) e 0,48 μL de solução precipitante (Figura 12) e foram submetidos à difração de raios X na linha MX1 LNLS (Tabela 5).

A substituição molecular foi realizada com modelo PrTX-I/ MnCl_2 com resolução de 1,85 Å (**item 4.1.1**). Após ciclo de refinamentos, realizamos uma busca com a ferramenta *Difference Map Peaks* e encontramos um pico de 14,0 σ próximo da His120A, outro de 8,0 σ próximo da His48A, outro de 7,7 σ próximo da His120B. Diferentemente dos outros picos, encontramos densidade eletrônica a 8,2 σ em formato triangular e mais volumoso, cuja localização é distante de átomos protéicos e próxima do pico da His120B. Então, realizamos adição de sulfato nesta densidade eletrônica triangular e íons zinco nos outros três picos e de moléculas águas. Optamos por refinar a ocupação dos ligantes, já que a densidade não era tão intensa. Após inspeção da proteína, curiosamente a Arg34A possuía dupla ocupação com conformação idêntica à esse mesmo resíduo da estrutura PrTX-I/ MnCl_2 anteriormente elucidada. Então, notamos a interação com os nitrogênios da cadeia lateral desse resíduo com um pico que optamos por adicionar o íon cloreto também. Devido a baixa relação sinal ruído (I/σ), optamos por omitir as cadeias laterais de Lys20, Leu32, Lys116, Lys127 do monômero



Figura 12. Cristais de BthTX-I em presença de sulfato de manganês e de cloreto de zinco obtidos

Tabela 5. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios X da BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺ em grupo espacial P3₁21

Linha coletada (LNLS)	MX1
Grupo Espacial	P3 ₁ 21
Cela unitária (Å)	a = b = 56,39 c = 129,14
Resolução (Å)	40,0-2,00 (2,07-2,00) ^a
Reflexões únicas	16340 (1614) ^a
Redundância média	3,8 (3,9)
R _{merge} ^b (%)	7,9 (56,4) ^a
Completeza (%)	97,2 (98,2) ^a
I/σ (I)	13,7 (2,6) ^a
Quantidade solvente (%)	44,0
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Da)	2,2
Desvio RMSD dos valores ideais	
Comprimento das ligações (Å)	0,008
Ângulos das ligações (°)	1,16
Gráfico de Ramachandran (%)	
Região mais favorável	96,7
Região aceitável	2,9
Região desfavorável	0,4%
B factor Médio (Ocupação)	
Proteína	33,7 (1,0)
SO ₄	47,5 (0,7)
Cl ⁻	42,3 (0,8)
Zn ²⁺	40,6 (0,6)
H ₂ O	37,0 (1,0)
R _{crist} ^c (%)	21,1
R _{free} ^d (%)	24,9

^a Números em parênteses são para a faixa de mais alta resolução. ^b $R_{merge} = \sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|)) / \sum_{hkl,i} \langle I_{hkl} \rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$. ^c $R_{crist} = R_{hkl} (| |F_{obs_{hkl}}| - |F_{calc_{hkl}}| |) / |F_{obs_{hkl}}|$, onde $|F_{obs_{hkl}}|$ e $|F_{calc_{hkl}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados. ^d R_{free} é equivalente ao R_{crist} , porém calculado com 5% das reflexões omitidas no processo de refinamento. RMSD *root-mean-square deviation*.

A e Lys57, Lys69, Lys70, Lys78 e Lys122 do monômero B. Então, obtivemos as estatísticas de $R=20,5\%$ e $R_{\text{free}}=24,5\%$ e boa qualidade estequiométrica conforme indica Tabela 5. Apenas o resíduo Leu32A se apresentou na região não permitida do Gráfico de Ramachandran, que teve sua cadeia lateral omitida devido à densidade eletrônica não clara e provavelmente essa distorção foi provocada pela mudança conformacional da Arg34A que interage com íon cloreto. As regiões de interação com zinco estão ilustradas na Figura 13.

4.2.1 Análise das regiões candidatas da BthTX-I de interação os íons zinco e manganês

A região candidata 2 da estrutura PrTX-I/ Mn^{2+} (Figura 9 B) e a região candidata 4 da estrutura BthTX-I/ Mn^{2+} e Zn^{2+} (Figura 13 D) são equivalentes, i.e. região da Arg34A e Ala19B, portanto a mesma discussão dos dados do espalhamento anômalo BthTX-I/ Mn^{2+} disponível no **item 4.1.2** é cabível para esse conjunto de dados. Esse sítio deve provavelmente se tratar do íon cloreto também.

Dentre as restrições do íon zinco levantadas no **item 3.6**, cabe ressaltar que a distância esperada do zinco ao oxigênio (no caso, da água) é de $2,10\text{\AA}$ ao oxigênio e ao nitrogênio, $2,03\text{\AA}$; a coordenação usual de 4 interações e rara de 3, sendo aceitável complementar número de coordenação por moléculas águas; e que a interação preferencial por nitrogênio da His. A interação do íon zinco encontrada é semelhante nos três casos, uma interação com nitrogênio imidazólico e duas com oxigênio de duas moléculas de água (Figura 13 A, B e C). As regiões de interação da His120 com o zinco foram encontradas em ambos os monômeros (Figura 13 B e C). As distâncias estão dentro do aceitável, já que uma pequena variação entre o valor esperado (valor teórico) e o experimental é aceitável. Dessa maneira, três íons zinco foram mantidos nas regiões da His48 e His120 apontadas e na Arg34, optamos por refinar íon cloreto. Para confirmar se o manganês é o átomo que está interagindo com a Arg34 é necessário realizar novas coleta de dados em diferentes comprimentos de onda correspondentes à borda do manganês e do cloro conforme sugerido no **item 4.1.2**.

4.3 Estudos estruturais com a BthTX-I em presença de Zn^{2+}

Experimentos de cristalização foram realizados com a BthTX-I e íons zinco. A gota suspensa foi preparada com 0,6 μL de proteína (10,4 mg/mL), 0,2 μL de ZnCl_2 (1 M) e 0,4 μL de solução precipitante, mesma da nativa (Dos Santos *et al.*, 2009b). Cristais dessa gota (Figura 14) apresentaram morfologia semelhante aos retangulares obtidos com MnSO_4 e foram submetidos à difração de raios X na linha MX2 no LNLS (Tabela 6). Semelhantemente à estrutura PrTX-I/ MnSO_4 , esse conjunto também apresentou grupo espacial P2_1 .

A substituição molecular foi realizada com modelo PrTX-I/ MnSO_4 com resolução de 1,58 Å (**item 4.1.3**). Então, realizamos uma busca por ligantes e encontramos quatro picos intensos com formato piramidal e outros três em segmentos. Nos picos piramidais adicionamos íons sulfato e nos segmentos moléculas de PEG4000, ambos presentes na condição de cristalização. Nenhum outro pico foi encontrado próximo à distância comum de coordenação do zinco ou à região com interface eletrostática negativa ou composta por resíduos ácidos, indicando que o zinco não foi capaz de complexar com essa forma da toxina. Então, realizamos adição de moléculas de água, refinamento de ocupação dos sulfatos e PEG4000 e adição de mais 3 sulfatos cujas densidades se tornaram mais claras a medida que melhoramos o modelo posteriormente. Os mesmos resíduos da estrutura BthTX-I/ MnSO_4 tiveram suas cadeias laterais omitidas, i. e., lisinas 69 e 70 e Asp79. O modelo foi concluído com as estatísticas de $R=18,6\%$ e $R_{\text{free}}=23,2$ e boa qualidade estequiométrica conforme indica valores da Tabela 6.

Tabela 6. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios X da BthTX-I/Zn²⁺ em grupo espacial P2₁

Linha coletada (LNLS)	MX2
Grupo Espacial	P2 ₁
Cela unitária (Å)	a = 39,45 b = 72,17 c = 44,83
Resolução (Å)	40,0-2,00 (2,07-2,00) ^a
Reflexões únicas	15967 (1540) ^a
Redundância média	3,3 (3,1)
R _{merge} ^b (%)	8,7 (37,1) ^a
Completeza (%)	95,8 (92,9) ^a
I/σ (I)	12,1 (3,3) ^a
Quantidade solvente (%)	46,8
Coeficiente de Matthews (Å ³ /Da)	2,3
Desvio em RMSD dos valores ideais	
Comprimento das ligações (Å)	0,009
Ângulos das ligações (°)	1,182
Gráfico de Ramachandran (%)	
Região mais favorável	96,3
Região aceitável	3,7
B factor Médio (Ocupação)	
Proteína	31,7 (1,0)
SO ₄	50,5 (0,9)
PEG4000	40,8 (1,0)
H ₂ O	38,1 (1,0)
R _{crist} ^c (%)	18,6
R _{free} ^d (%)	23,2

^a Números em parênteses são para a faixa de mais alta resolução. ^b $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} (\sum_i (|I_{\text{hkl},i} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle|)) / \sum_{\text{hkl},i} \langle I_{\text{hkl}} \rangle$, onde $I_{\text{hkl},i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$. ^c $R_{\text{crist}} = \sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|) / \sum_{\text{hkl}} F_{\text{obs}}$, onde F_{obs} e F_{calc} são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados. ^d R_{free} é equivalente ao R_{crist} , porém calculado com 5% das reflexões omitidas no processo de refinamento. RMSD *root-mean-square deviation*.

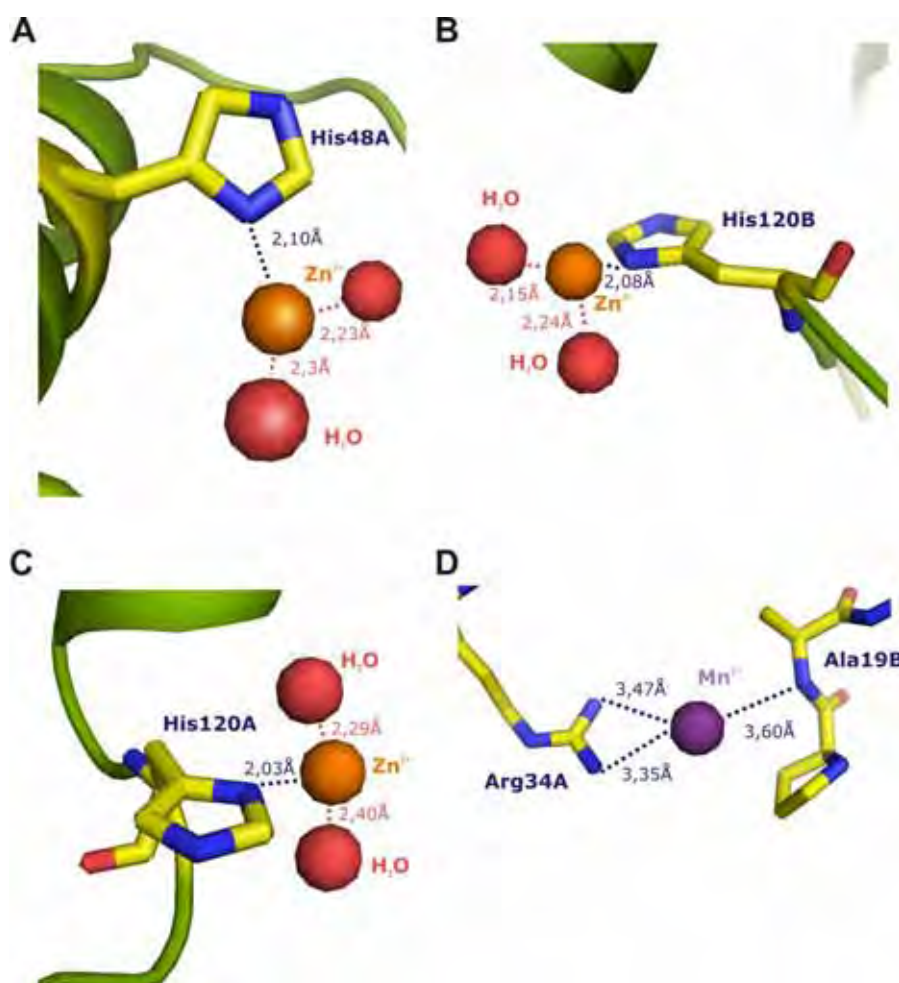


Figura 13. Regiões candidata de ligação dos íons zinco e manganês na estrutura PrTX-I/MnCl₂ e BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺. As esferas em laranja, em roxo, e em vermelho correspondem a átomos de zinco, de manganês e a moléculas de água, respectivamente. (A) Zinco interagindo com Nδ da His48A e uma molécula de água. (B) Zinco interagindo com Nδ da His120B e duas moléculas de água, a 3ª água apresenta distância muito superior (C) Zinco interagindo com Nδ da His120A e duas moléculas de água. (D) Manganês sendo coordenado pelos Nη1 e Nη2 Arg34A, pelo oxigênio da cadeia principal Ala19B. As distâncias abaixo de 3,6Å foram consideradas.



Figura 14. Cristais de BthTX-I em presença de cloreto de zinco.

4.4 Estudos comparativos da PrTX-I e BthTX-I em presença de íons

Os estudos estruturais da PrTX-I e BthTX-I com íons divalentes foram estimulados pelos resultados de Soares *et al.* (2002), dentre os quais o zinco e o manganês mostraram-se potenciais inibidores da toxina. O estudo desses complexos no presente estudo abrangeram quatro estruturas cristalográficas, PrTX-I/MnCl₂ e BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺ em grupo espacial P3₁21 e BthTX-I/MnSO₄ e BthTX-I/Zn²⁺ em P2₁, contudo apenas na estrutura BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺ encontramos íons zinco, enquanto nas demais nenhum cátion. Os outros modelos cristalográficos gerados nessa dissertação também podem fornecer alguma informação adicional às estruturas atualmente disponíveis no banco de dados (PDB), já que alguma mudança conformacional pode ter sido provocada pela adição do MnCl₂, MnSO₄ ou ZnCl₂ como aditivo na cristalização.

Uma observação curiosa é que em condições de cristalização semelhantes, obtivemos estruturas em grupos espaciais diferentes, P3₁ e P2₁. É interessante mencionar que em nossos experimentos de cristalização, os cristais hexagonais foram facilmente obtidos se comparados com os retangulares, já que o crescimento destes últimos em cristais únicos e separáveis foi custoso. Em ordem de tentar entender o motivo desse diferente empacotamento cristalino, calculamos a proporção de moléculas de composto por molécula de proteína de cada um dos constituintes presentes na gota que originaram os quatro conjuntos de dados (Tabela 7). Se compararmos as proporções dos conjuntos de dados contendo apenas Mn²⁺ como aditivo, podemos concluir que o aumento sutil da concentração de PEG4000 (de 7 para 9) e o significativo do sulfato (de 78 para 238) provocam o empacotamento cristalino em P2₁. Contudo, não encontramos nenhum padrão extrapolando a análise para dados contendo zinco, aparentemente este íon muda a dinâmica da cristalização. Curiosamente notamos em nossos experimentos de cristalização que quando o aditivo cloreto de zinco não é adicionado na gota que originou os cristais da estrutura BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺ (0,8 µL de proteína (10,4 mg/mL), 0,32 µL de MnSO₄ (12,5 mM), 0,09 µL de ZnCl₂ (1 M) e 0,48 µL de solução precipitante), obtivemos cristais em formato hexagonais (P3₁21), portanto podemos concluir que ou o zinco ou o cloreto provocaram a mudança neste caso. Outro dado interessante é observar que íons zinco foram encontrados interagindo na estrutura P3₁21, contudo não na P2₁, mesmo esta tendo três vezes mais zinco por molécula de proteína.

Tabela 7. Proporção em número inteiros de ligantes por molécula de proteína em cada um dos conjuntos de dados da PrTX-I e BthTX e íons Mn^{2+} e Zn^{2+} .

	Grupo Espacial	Proporção ligante por molécula de proteína						
		Mn^{2+}	Zn^{2+}	SO_4^{2-}	Cl^-	TRIS	Li^{2+}	PEG4000
PrTX-I/ $MnCl_2$	P3 ₁ 21	52	-	78	183	78	78	7
BthTX-I/ $Mn^{2+}Zn^{2+}$		7	148	105	396	99	99	9
BthTX-I/ $MnSO_4$	P2 ₁	41	-	238	98	98	197	9
BthTX-I/ Zn^{2+}		-	440	88	967	88	88	8

Uma estratégia eficiente para estudar o mecanismo de ação das proteínas através da comparação de estruturas cristalográficas é a classificação em diferentes estados ou estágios de ação. Essa estratégia foi empregada por Bahnson (2005), quando este classificou diferentes estruturas Asp49-PLA₂s em estados ativos, intermediários e inativos auxiliando a melhor compreensão do mecanismo catalítico. Nesse sentido, Dos Santos e colaboradores (2009b) dividiram os modelos das PLA₂s homólogas de veneno botrópico em duas categorias com base em ângulos de abertura (θ_A) e de torção (θ_T), o estado inativo e o ativo, sendo o primeiro característico do grupo espacial P2₁ e o segundo, P3₁. Seguindo tal classificação, obtivemos dois modelos em estado ativo (PrTX-I/ $MnCl_2$ e BthTX-I/ $Mn^{2+}Zn^{2+}$) e dois em inativo (PrTX-I/ $MnSO_4$ e BthTX-I/ Zn^{2+}). Caso seja comprovada atividade inibitória dos íons de zinco na proteína, o modelo BthTX-I/ $Mn^{2+}Zn^{2+}$ apesar de estar em estado ativo, teria alterações que neutralizariam regiões importantes para desempenhar seu mecanismo de ação.

Comparamos a semelhança entre as estruturas cristalográficas através da sobreposição dos α em valores RMSD (RMSD (*root-mean-square deviation* ou valor de desvio calculado através da raiz quadrada da média dos quadrados das distâncias entre átomos equivalentes)) de cada um dos monômeros (Tabela 8). Como era de se esperar pela presença de ligantes PEG4000 nos canais hidrofóbicos dos modelos em P2₁ e ausência nos em P3₁, estruturas em mesmo grupo espacial apresentam menores valores de desvio (RMSD). A sobreposição dos α dos monômeros das estruturas cristalográficas em grupo espacial P3₁21 (PrTX-I/ $MnCl_2$ e BthTX-I/ $Mn^{2+}Zn^{2+}$) resulta em desvio (RMSD) de 0,45 e 0,63 Å entre monômeros A e B, respectivamente. A maior diferença entre os monômeros A é dos resíduos 85 a 88 (Figura 15). A região compreendida por estes resíduos se encontra entre folhas β antiparalelas e α -hélice 3 e é altamente flexível entre PLA₂s homólogas. Nos monômeros B,

outras diferenças são observadas além da região dos resíduos 85 a 88 observada no monômero A, a Gly60 e a região do C-terminal (Figura 15), sendo esta última já mencionada como tendo alta flexibilidade e altos valores de *B factor*. Cabe ressaltar que apenas um íon está relacionado às mudanças conformacionais acima citadas, que é o zinco que interage com a His120B do Cterminal (Figura 15), interação esta que poderia provocar a diferença estrutural observada na comparação dos dois modelos (em ciano na Figura 18 A e B). A Figura 15 provoca a ilusão de que a Gly60 circulada está próxima a um sulfato, contudo é o ângulo da imagem que provoca tal observação, quando, na realidade, estes estão distantes.

A sobreposição dos monômeros A e B das P2₁ têm desvio (RMSD) de 0,29 e 0,13Å, respectivamente. Esses valores demonstram BthTX-I/MnSO₄ e BthTX-I/Zn²⁺ como estruturas praticamente idênticas (Figura 16), com exceção das Val32A que estão voltadas para lados opostos (Figura 17). Observamos que a posição do PEG4000 interfere na direção que a Val32A adota. Apesar desta ligeira diferença, é possível afirmar que a análise de uma estrutura pode ser extrapolada para a outra e a alteração dos cátions em estudo é indiferente para estrutura cristalográfica. Essa semelhança pode se relacionar com a maior estabilidade estrutural, já que cada um dos dois casos trata-se de cristais provenientes de condições de cristalização distintas, seja pela diferença entre o aditivo íon metálico utilizado, manganês ou zinco, ou pela diferentes proporções e quantidades de agentes precipitantes (Tabela 7). Essa estabilidade estrutural é chamada de estrutura canônica e é observada através de valores inferiores de R, de menos resíduos sem cadeia lateral definida e menor flexibilidade dos C-terminal em comparação ao estado nativo (Magro *et al.*, 2003; Ambrosio *et al.*, 2005; Dos Santos *et al.*, 2009b). A estrutura canônica estaria relacionado à interação da Lys122 ao *loop* de ligação de cálcio (Ambrosio *et al.*, 2005) ou com o ligante no canal hidrofóbico (Fernandes *et al.*, 2010) e à exposição da Tyr119 à região externa (Figura 18, em **A** e **B**, Tyr119 (*sticks* em vermelho) do monômero B (verde). Em **C**₃ e **D**₃, ambas Tyr119) (Dos Santos *et al.*, 2009b) e à formação do *hydrophobic knuckle* (resíduos em amarelo na Figura 18 **C**₁ e **2** e **D**₁ e **2**) (Ambrosio *et al.*, 2005). No estado nativo, P3₁21 sem o PEG4000, apenas um dos monômeros apresenta a estrutura canônica, sendo, no nosso caso, o monômero A, cuja estabilidade é observada através da maior semelhança com ambos os monômeros das estruturas complexadas (Tabela 8 – desvios (RMSD) dos monômeros A da P3₁ em comparação ao A e B da P2₁ são menores que 1, enquanto os valores dos monômeros B, maior que 1). Na estrutura não canônica, monômero B, mais cadeias laterais não possuem densidade definida (pontilhado

onde supostamente a cadeia de lisinas (em laranja) ocupariam na Figura 18 **A** e **B**) e mais desvios são observados (Figura 15). Quanto a Lys122 do monômero não canônico, na estrutura BthTX-I/MnCl₂ sua cadeia lateral está voltada para lado oposto do encontrado na estrutura canônica e na BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺ não apresenta densidade eletrônica clara, indício de sua alta vibração.

Tabela 8. Desvio RMSD da sobreposição dos Ca dos monômeros das estruturas cristalográficas PrTX-I/MnCl₂, BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺, PrTX-I/MnSO₄ e BthTX-I/Zn²⁺.

		P3 ₁ 21		P2 ₁			
		BthTX-I/Mn ²⁺ Zn ²⁺		PrTX-I/MnSO ₄		BthTX-I/Zn ²⁺	
		A	B	A	B	A	B
P3 ₁ 21	PrTX-I/MnCl ₂	A	0,45	1,15	0,61	0,74	0,69
		B	1,11	0,63	1,29	1,17	1,06
	BthTX-I/Mn ²⁺ Zn ²⁺	A	-	-	0,61	0,74	0,59
		B	-	-	1,29	1,17	1,18
P2 ₁	PrTX-I/MnSO ₄	A	0,61	1,29	-	-	0,29
		B	0,74	1,17	-	-	0,84

Em **negrito**, valores com menor desvio.

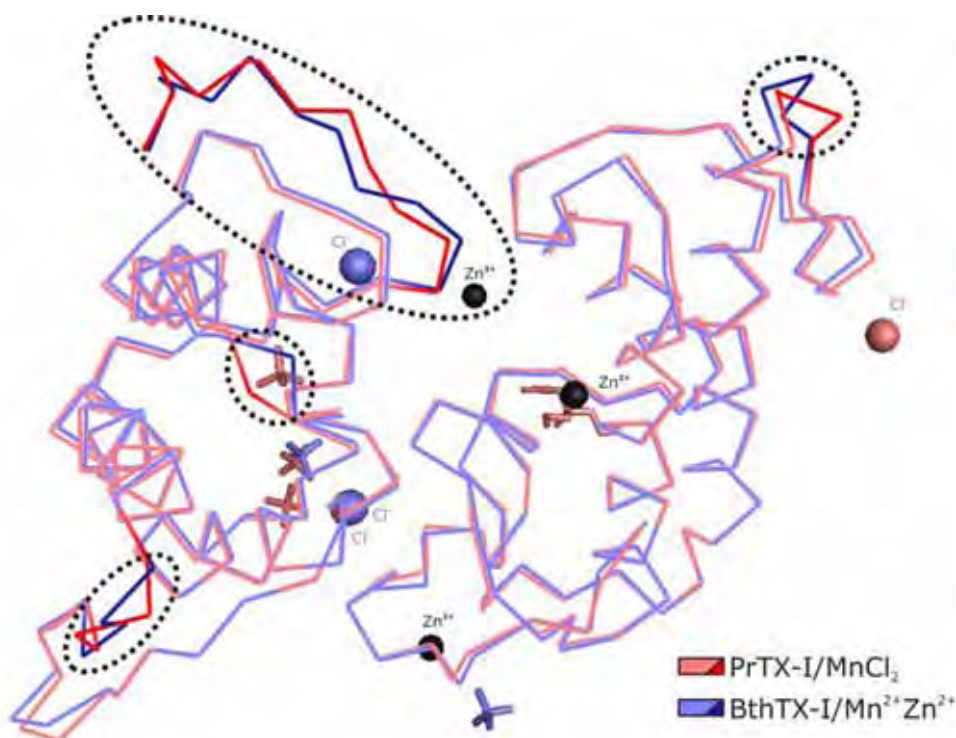


Figura 15. Sobreposição da estrutura PrTX-I/MnCl₂ (vermelho) e da BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺ (azul) em *ribbons*. Regiões mais variáveis em coloração escura com destaque pontilho e maior variação. Íons de sulfato são ilustrados em *sticks* e cloreto na coloração da toxina e os íons zinco do complexo BthTX-II/Mn²⁺Zn²⁺ em preto.

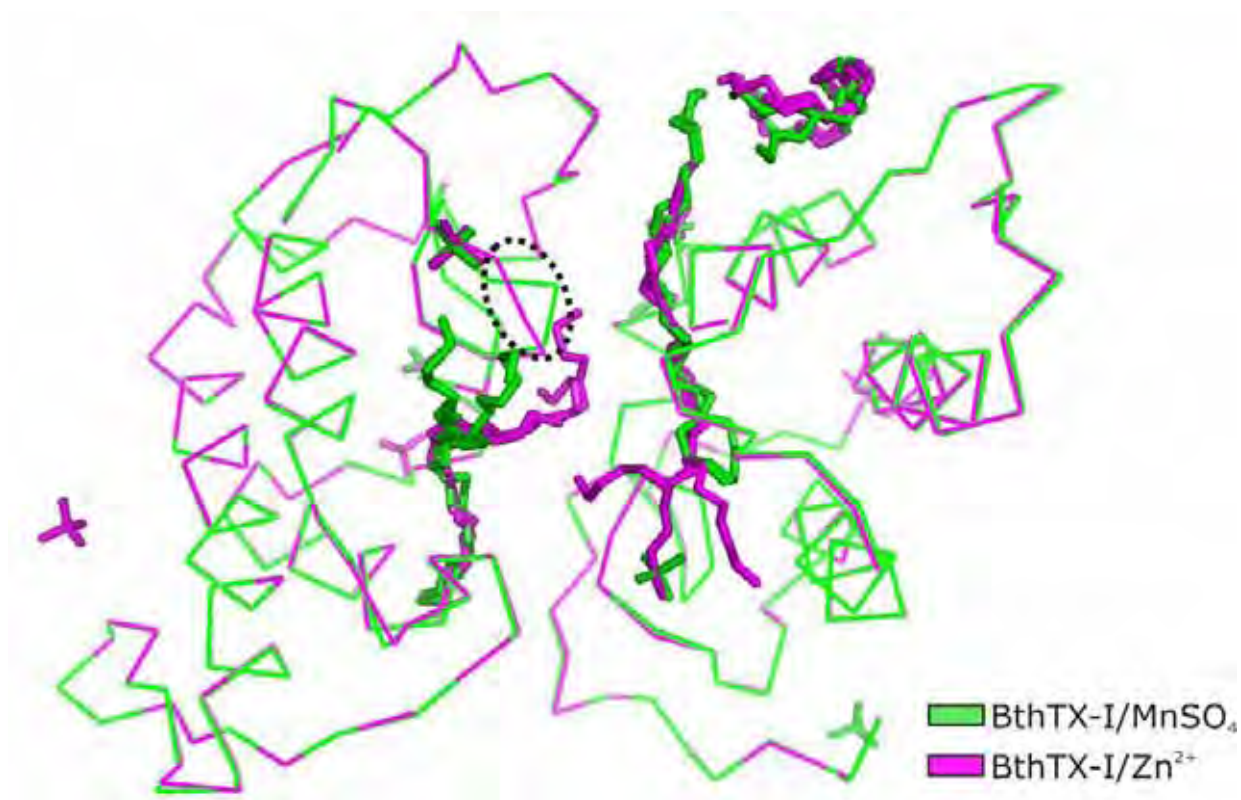


Figura 16. Sobreposição da estrutura BthTX-I/MnSO₄ (verde) e da BthTX-I/Zn²⁺ (magenta) em *ribbons*. Em *sticks* moléculas PEG4000 com ocupação parcial e íons SO₄⁻.

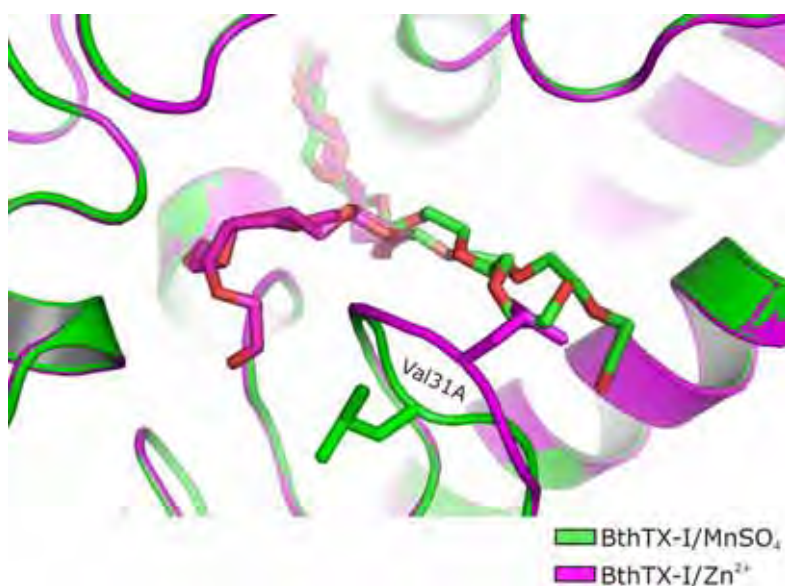


Figura 17. Desvio no *loop* de ligação de cálcio do monômero A em BthTX-I/MnSO₄ (verde) e em BthTX-I/Zn²⁺ (magenta) em *cartoon* com a Val32 direcionada para região oposta à molécula de PEG4000, em *sticks*.

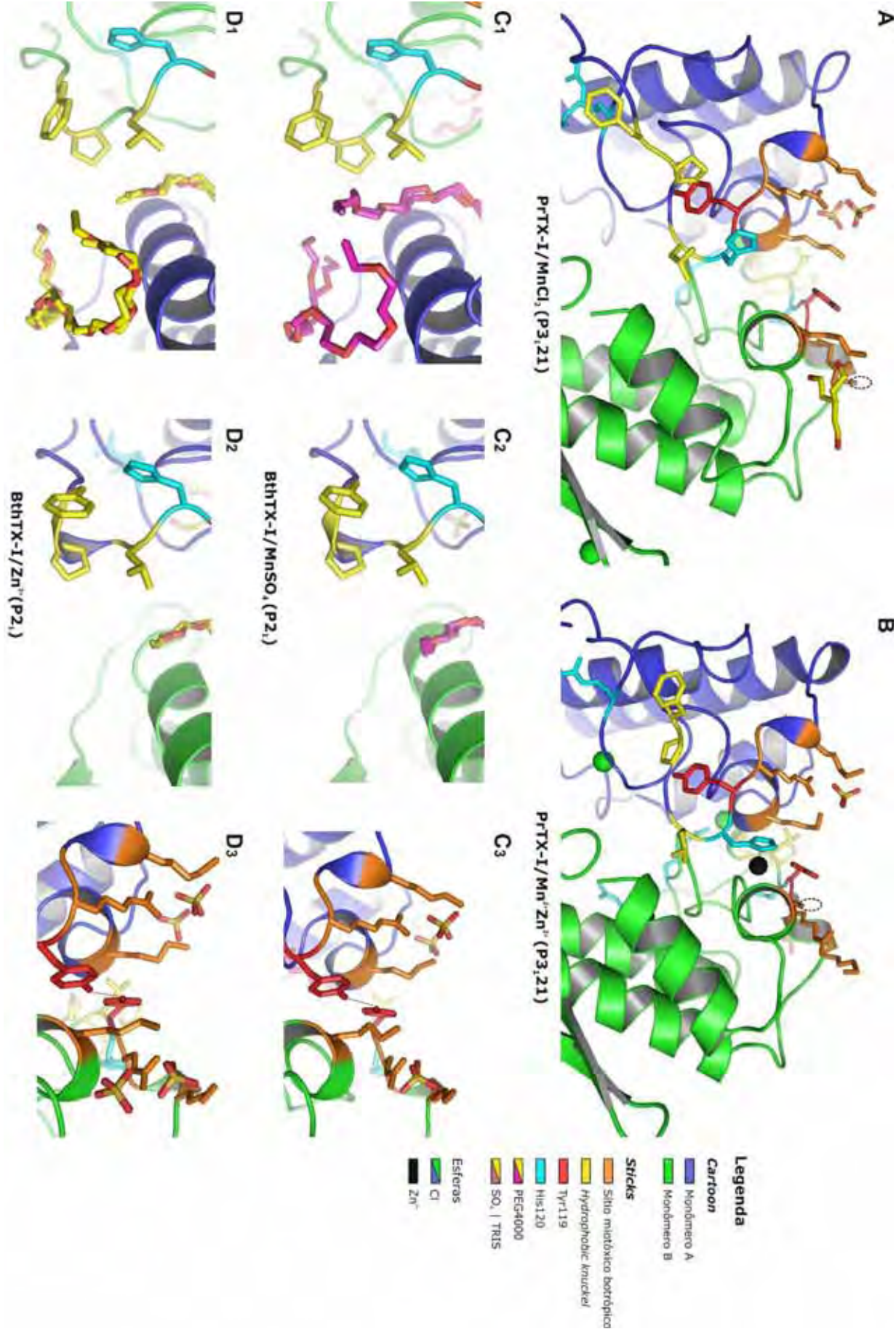


Figura 18. Região do C-terminal das estruturas cristalográficas botrópicas em presença de íons. Em **A** e **B**, estruturas nativas em grupo espacial $P3_1$, PrTX-I/MnCl₂ e BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺, respectivamente. Em **C** e **D** estruturas complexadas com polietilenoglicóis em grupo espacial $P2_1$, BthTX-I/MnSO₄ e BthTX-I/Zn²⁺, respectivamente. Em *cartoon*, monômero A em azul e o B em verde. Sítio miotóxico proposto por Dos Santos *et al.* (2009b) (Lys20, Lys115 e Arg118) em *sticks* laranjas com íons sulfato ilustram sua semelhança apenas em estruturas de mesmos grupos espaciais, sendo nas $P2_1$, maior proximidade observada entre o sítio miotóxico de cada um dos monômeros. *Sticks* em vermelho Tyr119 fundamentais para manutenção da configuração dimérica $P2_1$ (em vermelho **C**₃ e **D**₃), porém não na $P3_121$ (em vermelho **A** e **B**) (Dos Santos *et al.*, 2009b). *Sticks* em amarelo ilustram o *hydrophobic knuckle* (Leu121, Pro123 e Phe125) proposto por Ambrosio *et al.* (2005) nas estruturas cristalográficas $P2_1$ (em amarelo em **C**_{1 e 2} e **D**_{1 e 2}), porém não nas $P3_121$ (em amarelo **A** e **B**), quando os resíduos estão espaçados. Em ciano, His120 nas $P2_1$ está voltada a região interna da toxina (**C**_{1 e 2} e **D**_{1 e 2}) e em $P3_121$ (**A** e **B**), à externa. As esferas em azul e verde são íons cloreto referentes ao monômero A e B, respectivamente. Esferas em preto são íons de zinco, sendo um destes responsável pela mudança conformacional da His120B (ciano entre **A** e **B**). Ligantes em *sticks* magenta (**C**₁ e **2**) e em amarelo (**D**₁ e **2**) representam moléculas de PEG4000 que indicam nenhuma diferença conformacional na proteína apesar de variação destes, contudo no monômero B (**C**₁ e **D**₁) dois polietileno glicóis são encontrados em comparação a um do monômero A (**C**₂ e **D**₂).

A comparação dos modelos da PrTX-I e BthTX-I cristalizadas em presença de íons divalentes com PLA₂s indica que conservam a estrutura da α -hélice do N-terminal (hélice 1), o *loop* de ligação de cálcio, duas longas α -hélices anti paralelas (hélices 2 e 3), as duas folhas β -pregueadas (β 1 e β 2) e C terminal (Figura 2) e resíduos da rede catalítica, His48, Tyr52, Tyr73 e Asp99 (Murakami e Arni, 2003). Além disso, os modelos contêm todos os aminoácidos previstos pela sequência de aminoácidos (Cintra *et al.*, 1993; Toyama *et al.*, 1998), com exceção de algumas cadeias laterais que não possuíam densidade eletrônica bem delimitada.

Diversas PLA₂s homólogas de veneno botrópico foram elucidadas em estados nativos e complexados nos últimos anos. Estas toxinas podem ser classificadas em nativas em grupo espacial $P3_121$, em complexadas ($P2_1$) (Dos Santos *et al.*, 2009b). A estrutura da toxina complexada com ácido graxo indica a presença de um ligante por monômero em regiões equivalentes, isto é, no canal hidrofóbico com oxigênios da extremidade desse ácido próximos da His48. Já nas com PEG4000, além de ocupar região semelhante aos ácidos graxos (PrTX-II/ácido graxo PDB id: 1QLL), uma outra molécula do polietilenoglicol é encontrada em região externa da toxina e próxima da entrada do canal hidrofóbico. Não encontramos diferenças conformacionais em comparação da BthTX-I/MnSO₄ e a BthTX-I/Zn²⁺ com demais PLA₂s homólogas em estado complexado. Os ligantes de cadeia longa, polietilenoglicóis e ácidos graxos, que ocupam o canal hidrofóbico da toxina, estão em mesmas regiões, contudo flexibilidade é observada nas extremidades destes, incluindo a

BthTX-I/PEG4k (PDB id: 3IQ3) que é praticamente idêntica aos nossos modelos complexados (Lee *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2010).

Alguns peptídeos sintetizados a partir da estrutura do C-terminal de PLA₂s homólogas são capazes de mimetizar ação da toxina inteira (Nunez *et al.*, 2001), de forma que optamos por tentar entender seu mecanismo de ação a partir dessa região. Na região do C-terminal na estrutura PrTX-I/MnCl₂, observamos dois íons sulfato em um dos sítios miotóxicos (proposto por Dos Santos *et al.* (2009b)) e uma molécula de TRIS no outro (Figura 18 A), esses ligantes poderiam mimetizar a membrana biológica e fosfolipídeos aniônicos de lipossomos pelo grupo fosfato dos fosfolipídeos. Essa estratégia foi utilizada por Bahnson (2005) ao analisar PLA₂s e posteriormente por Dos Santos *et al.* (2009b) ao analisar PLA₂s homólogas. Diversos estudos funcionais apontam caráter básico do C-terminal fundamental para interação com membrana (Falconi *et al.*, 2000; Lomonte *et al.*, 2003a), tanto que a capacidade de romper lipossomos ou toxicidade celular é aumentada com o enriquecimento de fosfolipídeos aniônicos nestas membranas (Diaz *et al.*, 1991; Diaz *et al.*, 2001). Portanto, analisamos a superfície do C-terminal das toxinas PLA₂s homólogas botrópicas em três estados: 1) nativo; 2) complexado com ácido graxo e; 3) complexado com PEG4000. Na ausência do modelo cristalográfico da BthTX-I ou PrTX-I com ácido graxo, utilizamos a PrTX-II para analisar estado 2 (Lee *et al.*, 2001). Essas três toxinas são praticamente idênticas, a PrTX-II e a BthTX-I possuem apenas um e três resíduos diferente em relação a PrTX-I, respectivamente (Alinhamento disponível em Figura 22).

Para análise dos diferentes modelos cristalográficos, utilizamos a classificação das PLA₂s homólogas sugerida por Dos Santos *et al.* (2009b) com base em dois ângulos entre os monômeros, o de abertura (θ_A) e o de torção (θ_T). Essa análise é recomendada já que diversos estudos cristalográficos apontaram diferentes estados dessas toxinas com base na alteração da interface dimérica (Da Silva Giotto *et al.*, 1998; Magro *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2007). Além destes, resultados de eletroforese, análises espectroscópicas e de SAXS indicam que essas toxinas adotam conformação dimérica em solução (Murakami *et al.*, 2007). Seguindo tal proposta, selecionamos os “dímeros alternativos”: 1) PrTX-I/MnCl₂ nativa, 2) PrTX-II/ácido graxo (PDB id: 1QLL) (Lee *et al.*, 2001), um estado complexado com molécula de relevância biológica em grupo espacial P₂₁2₁2₁; 3) BthTX-I/PEG4000 em grupo espacial P₂₁, já que possui uma molécula a mais interagindo em um dos monômeros.

Cabe ressaltar que a estrutura da molécula do PEG4000 é semelhante à do ácido graxo e, conforme Ambrosio *et al.* (2005) testou no modelo cristalográfico da ACL miotoxina com ácido graxo, o refinamento dessas duas moléculas não é diferenciado pelas estatísticas geradas, sendo então um representativo da outro.

Dessa maneira, comparamos a superfície dos C-terminais desses três diferentes estados divididos em dois planos opostos separados por uma rotação de 180°: o *hydrophobic knuckle* do monômero A (Figura 19 A₁, B₁, C₁); e o do monômero B (Figura 19 A₂, B₂, C₂). Conforme indicado por experimentos funcionais e estruturais, agrupamos as duas propostas do mecanismo miotóxico ser decorrente de resíduos do C-terminais, o *hydrophobic knuckle* (Leu121, Pro123 e Phe125) (Ambrosio *et al.*, 2005) e do sítio miotóxico (Lys18, Lys105 e Arg108) (Dos Santos *et al.*, 2009b), além da Lys16 adicionada por interagir com sulfatos do monômero A e TRIS do B. No “dímero alternativo”, o *hydrophobic knuckle* de um monômero possui relação com sítio de coordenação de cálcio do outro. Na estrutura nativa, o *hydrophobic knuckle* do monômero A juntamente com a interface de contato com monômero B não canônico impedem o acesso ao canal hidrofóbico até His48B (Figura 19 A₁). Tal fechamento é explicado pela orientação entre os monômeros $\theta_A=7^\circ$ e o $\theta_T=60^\circ$ e presença do monômero B não canônico (Figura 19 A₁). Já no monômero B, esses resíduos hidrofóbicos não estão organizados, o que possibilita a existência de abertura para entrada do ácido graxo (Figura 19 A₂). Cabe ressaltar que este ligante foi inserido através da sobreposição dos monômeros canônicos A da PrTX-I/MnCl₂ e PrTX-II/ácido graxo, artifício que é reforçado pela presença de polietilenoglicol de menor massa molecular em estrutura de grupo espacial P3₁21 nesta mesma região (Figura 19 D), a BthTX-I/PEG400 (PDB id: 2H8I) (Murakami *et al.*, 2007). Então, em A₂, observamos a interação do um ácido graxo com His120B e Leu121B, *loop* de ligação de cálcio e His48 do monômero A, interação esta que provocaria alteração da estrutura desordenada do monômero B em canônica. Nesta mudança no monômero não canônico, os resíduos His120 e Lys122 seriam direcionados para região interna da toxina em conjunto com a exposição da Tyr119 e formação do *hydrophobic knuckle*. Portanto, ocorreriam as seguintes alterações no monômero não canônico: 1) alteração da Lys122 voltada do solvente para o *loop* de ligação de cálcio ou para o ligante amplamente discutida por Ambrosio *et al.* (2005) e Fernandes *et al.* (2009); 2) a His120 na entrada do canal hidrofóbico seria direcionada para região interna do monômero; 3) Tyr119 seria direcionada a região externa e interagiria através de ligação de hidrogênio com a outra Tyr119

do monômero canônico; 4) aproximação da Leu121, da Pro123 e da Phe125 e formação do *hydrophobic knuckle*. Essas mudanças provocariam uma redução na abertura presente no *hydrophobic knuckle* do monômero B (Figura 19 B₂) e origem dessa mesma abertura no A (Figura 19 B₁), que estava anteriormente fechado (Figura 19 A₁). Essa abertura é originada também pelo aumento do θ_A para 23° e o do θ_T para 82° e permite a entrada de outro ácido graxo conforme indica ligante da Figura 19 B₁. Após essa interação, aparentemente a toxina recebe outro ácido graxo (no caso PEG4000) reduzindo θ_T para 40° adotando conformação indicada pelo Figura 19 C. Em nossa hipótese partimos da premissa que o C-terminal das PLA₂s homólogas seria capaz de desestabilizar a membrana do músculo ou do lipossomo de modo a atrair a porção correspondente ao ácido graxo dos fosfolipídeos primeiramente em um canal hidrofóbico e posteriormente no outro. Essa premissa explicaria os efeitos de desestabilização de membrana da toxina *in vitro*. *In vivo* no envenenamento ofídico, um efeito sinérgico ocorreria entre PLA₂s e PLA₂s homólogas, ou seja, a catálise em fosfolipídeos promovida pelas PLA₂s deixaria ácidos graxos livres às homólogas para se organizarem do dímero nativo para o complexado.

Se considerarmos que o zinco realmente possui atividade inibitória da BthTX-I conforme nossa interpretação dos resultados de Soares *et al.* (2002), a BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺ indica um estado ativo sem ligantes no canal hidrofóbico (P3₁₂₁), porém inibido pelas interações iônicas do zinco. Essas interações ocorrem com as His120 dos C-terminais e com apenas a His48 da rede catalítica do monômero canônico (Figura 13 A, B e C). Para complementar nossa análise, o agente alquilante BPB (*p*-bromophenacyl bromide) é capaz de modificar histidinas, sendo nas modificações químicas de PLA₂s e PLA₂s homólogas, apenas His48 alterada (Soares e Giglio, 2003). Os experimentos funcionais com a BthTX-I e a PrTX-I com essa modificação indicam redução em 50% da atividade miotóxica e quase total da citotóxica, enquanto capacidade de clivar lipossomos e atividades edematogênicas e bactericidas não são tão reduzidas (Soares e Giglio, 2003). Os estudos cristalográficos dessa modificação química indicam que as interações da molécula de BPB distorcem *loop* de ligação de cálcio e induzem formação do mesmo “dímero alternativo” complexado ($\theta_A=23^\circ$ e o $\theta_T=53^\circ$), apesar de que nesse caso o canal está desocupado (Marchi-Salvador *et al.*, 2009). Estes autores explicam a inibição de 50% da toxina propondo a hipótese de que a toxina teria duas regiões de interação com a membrana muscular, o sítio miotóxico proposto por Dos Santos *et al.* (2009b) e o sítio ativo/canal hidrofóbico. Diferentemente do BPB, os íons zinco

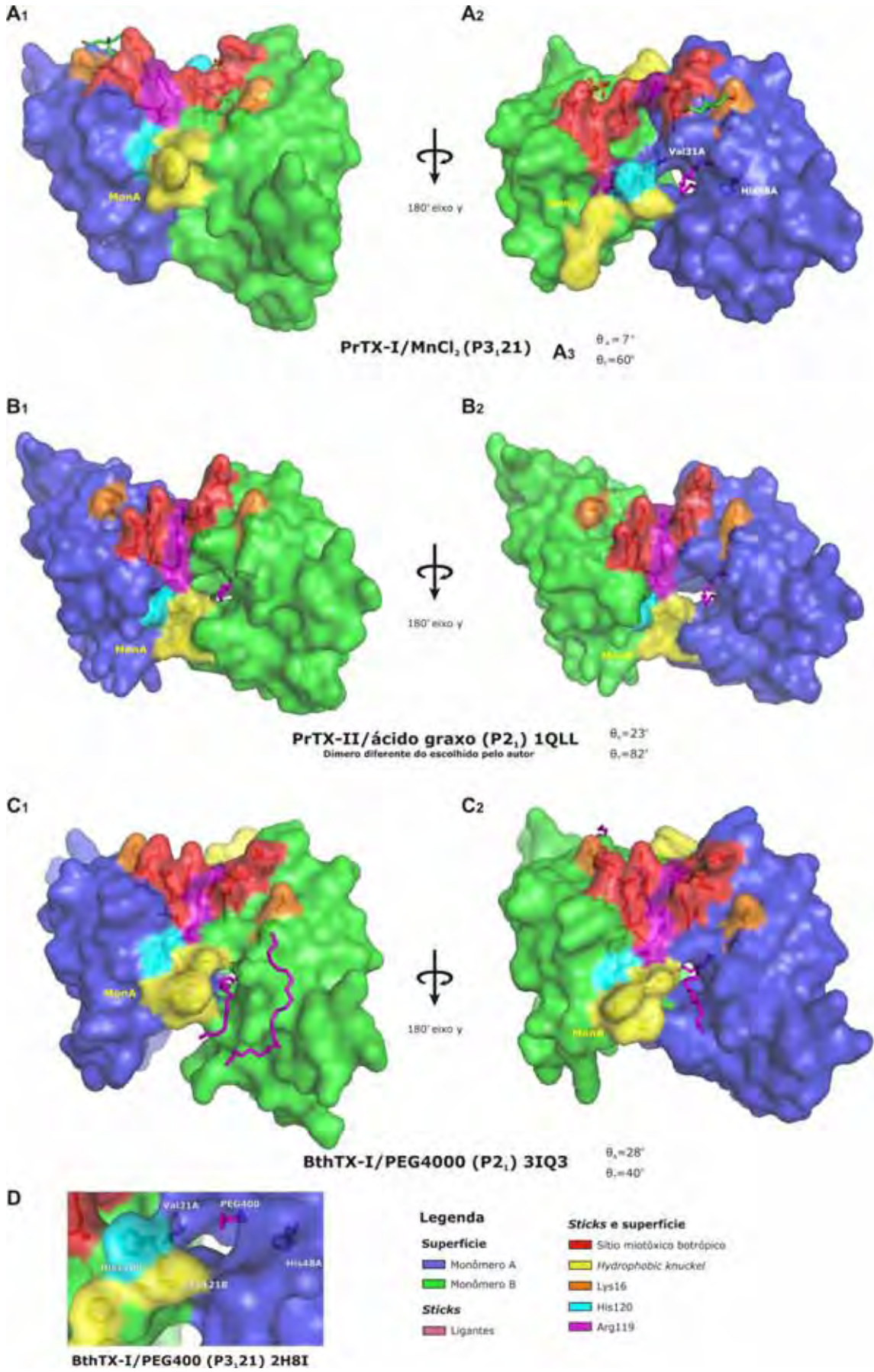


Figura 19. Superfícies dos C-terminais de Lys49-PLA₂s botrópicas em diferentes estados classificados pelos ângulo de abertura (θ_A) e ângulo de torção (θ_T) sugeridos por Dos Santos *et al.* (2009b). Toxinas estão separadas em: 1) reduzido θ_A e elevado θ_T , estado nativo sem ligantes no canal hidrofóbico em grupo espacial P3₁21, representado pela PrTX-I/MnCl₂ (**A**); 2) moderado θ_A e elevadíssimo θ_T , estado complexado com duas moléculas de ácido graxo em grupo espacial P2₁2₁2₁ representado pela PrTX-II/ácido graxo (PDB id: 1QLL) (**B**); e 3) moderado θ_A e reduzido θ_T , estado complexado com três moléculas de PEG4000 (molécula homóloga ao ácido graxo) pela BthTX-I/PEG4000 (PDB id: 3IQ3) (**C**). Conforme indicações das colorações na imagem, estruturas bem definidas na literatura por Ambrosio *et al.* (2005) e Dos Santos *et al.* (2009b) são apontadas através de *sticks* e superfície. Além disso, Lys16 em laranja é indicada como auxiliar do sítio miotóxico em vermelho ao interagir com íons sulfato do monômero A e molécula de TRIS no monômero B (**A**₁ e **2**). Em **1** é mostrado o *hydrophobic knuckle* do monômero A das toxinas e em **2**, *hydrophobic knuckle* do monômero B, sendo ambas imagens diferentes por um giro de 180° em eixo Y. Em *sticks* magenta, ligantes no canal hidrofóbico, isto é, ácido graxo em **B**₁ e **2**; PEG4000 em **C**₁ e **2**; e PEG400 em **D**. A superfície em **A**₁ indica que o acesso ao canal hidrofóbico está totalmente ocluído pelos resíduos do *hydrophobic knuckle* (presente no monômero A pela estrutura canônica deste) e pelos resíduos do monômero B. Em **A**₂, a inexistência do *hydrophobic knuckle* no monômero B junto a sua proximidade com resíduos do monômero A oferece espaço para que um ácido graxo tenha acesso ao canal hidrofóbico e His48A através da His120B em ciano e Leu121B. Este ligante (magenta **A**₂) não está presente no modelo P3₁21, foi inserido após sobreposição dos monômeros canônicos A de BthTX-I/MnCl₂ e de PrTX-II/ácido graxo (PDB id: 1QLL), o que indica que este ligante ocupa exatamente a mesma região de acesso ao canal hidrofóbico próximo da His120B e Leu121B. Tal análise é corroborada pela estrutura BthTX-I/PEG400 em grupo espacial P3₁21 que indica presença de pequeno ligante nessa mesma região (**D**). Após interação com ácido graxo na His48 canônica e resíduos do *hydrophobic knuckle* do monômero não canônico, há aumento de ambos θ_A e θ_T . Essa mudança de angulação possibilita que outro canal hidrofóbico esteja acessível a moléculas de ácido graxo (**B**₁ e **2**), quando uma molécula é observada em cada monômero. Comparando o acesso ao canal hidrofóbico em **A**₂ e **B**₁ e **2**, a abertura é bem maior em **A**₂, sendo então reduzida pela interação das Tyr119 em roxo e pela His120B que se volta ao interior da toxina. Com a redução do θ_A , outro ligante similar ao ácido graxo (PEG4000) é encontrado próximo ao ligante presente no *hydrophobic knuckle* do monômero A. Cabe ressaltar que a estrutura quaternária analisada é referente ao “dímero alternativo”, sendo o dímero PrTX-II/ácido graxo submetido ao programa PISA para obtermos tal conformação, já que o autor optou por refiná-lo no “dímero convencional”.

não promoveram a dimerização em grupo espacial P2₁, portanto é improvável que seu suposto mecanismo inibitório seja semelhante a este no sítio ativo/canal hidrofóbico.

O íon zinco na BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺ foi identificada apenas na His48 do monômero canônico, observação curiosa, já que os íons poderiam ter acesso aos canais hidrofóbicos no lado oposto ao C-terminal da toxina. Contudo, encontramos aparente explicação através da hipótese levantada anteriormente. Nesta, o “dímero alternativo” P3₁21 interagiria primeiramente com um ácido graxo por meio da entrada deste ligante pela His120 e Leu121 não canônicas em direção à His48 canônica, o que provocaria estabilização do monômero flexível em canônico, alteração de θ_A , θ_T e da oligomerização em dímero P2₁2₁2₁. Dessa maneira o íon zinco estaria interagindo a His48 por ser constituinte da estrutura canônica, já que a comparação dessa região entre monômero não canônico e canônico não indica diferenças estruturais próximas ao íon. Dessa maneira, a interação com His48 canônica e His120 não canônica prejudicaria a docagem do ácido graxo, dificultando a entrada deste. A importância levantada nesse estudo para His120 é coerente com peptídeos sintéticos que

ressaltam a região do 115 ao 129 como fundamentais para mecanismo miotóxico. Além disso, a localização da His120 é próxima de resíduos importantíssimos, como a Lys122 (Fernandes *et al.*, 2010), a Tyr119 e os constituintes do sítio miotóxico (Dos Santos *et al.*, 2009b) e do *hydrophobic knuckle* (Ambrosio *et al.*, 2005). Então, ressaltamos importância de toda essa região. A mutação sítio-dirigida da His120 para Ala não indicou alterações substanciais na atividade miotóxica (Chioato *et al.*, 2007), contudo a mutação pontual para Ala mantém caráter hidrofóbico e teria mesma função da His120 de, no primeiro momento, delimitar região de entrada do ácido graxo e num segundo de ser direcionada para região interna do monômero com a formação do *hydrophobic knuckle*.

Dessa maneira, encontramos explicações acerca dos sítios de interação dos íons zinco e apontamos uma relevância biológica nos diferentes estados das toxinas botrópicas em presença e ausência de ligantes no canal hidrofóbico. Apesar desses íons não terem provocado alteração conformacional quando a BthTX-I/ $Mn^{2+}Zn^{2+}$ é sobreposta com PrTX-I/ $MnCl_2$, outras regiões em $C\alpha$ estão diferentes (Figura 15) principalmente entre monômeros não canônico, B. Selecionamos modelos cristalográficos com toxinas botrópicas em estado nativo P3₁21 para realizar análise comparativa, BnSP-6 e BnSP-7 de Bothrops (PDB id: 1PA0 e 1PC9) (Magro *et al.*, 2003), PrTX-I (PDB id: 2Q2J) (Dos Santos *et al.*, 2009b) e BthTX-I (PDB id: 3HZD) (Fernandes *et al.*, 2010). Todos os desvios ressaltados em Figura 15 foram encontrados também em outras toxinas, com exceção da Gly60 que aparentemente não possui nenhuma relação com outros resíduos importantes para atividade miotóxica.

No monômero canônico em nossos modelos P3₁21, encontramos uma mudança na cadeia principal do *loop* de ligação de cálcio e direção oposta adotada pela cadeia lateral da Arg34 (Figura 20 em azul e verde). Essa região se trata justamente de uma das candidatas ao íon manganês encontradas após análise de mapa anômalo (Figura 9B). Possivelmente esse íon foi o responsável pela mudança conformacional, sendo o íon cloreto o mais provável conforme discutido no **item 4.1.2**. Observamos nas proteínas disponíveis no banco de dados que a posição da Arg34 é altamente conservada em ambos os monômeros de estruturas nativas e complexadas (P3₁21 e P2₁), tendo sua cadeia lateral direcionada para o resíduo 132 do C-terminal (Figura 20 em vermelho, laranja e magenta). Diferentemente dos outros modelos, na PrTX-I/ $MnCl_2$, a Arg34A se encontra em região oposta (Figura 20 em azul) estabelecendo proximidade com a região N-terminal do monômero não canônico (B) e Leu32,

Lys122 e resíduos do *hydrophobic knuckle* do monômero canônico, regiões fundamentais para docagem do segundo ácido graxo na hipótese proposta anteriormente. Na BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺, o *loop* de ligação de cálcio adota ambas conformações em ocupações parciais (Figura 20 em verde). Tentamos encontrar uma evidência para tal diferença nas condições de cristalização e proporções moléculas de ligantes proteína entre cristais com MnCl₂ como aditivo e no outro com MnSO₄ e ZnCl₂, contudo não encontramos uma evidência. A ocupação parcial em um modelo cristalográfico se refere à presença de ambas as conformações nas moléculas que constituem o cristal. Dessa maneira, o microambiente da gota de cristalização em conjunto com o íon cloreto foram capazes de atrair a região do *loop* de ligação de cálcio e Arg34 na direção oposta observada no modelo PrTX-I/MnCl₂. Já no modelo BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺ parte das moléculas adotam conformação dessa região semelhante aos demais modelos das PLA₂s homólogas botrópicas, parte diferente. Aparentemente o íon cloro não possui relevância biológica na atividade da PLA₂s homólogas, o que dificulta a inferência da importância dessa alteração conformacional. Essa região do *loop* de ligação de cálcio, logo anterior à Arg34, é altamente flexível, de maneira que a força iônica na cristalização pode ter promovido essa diferente conformação.

A Arg34 não é um resíduo apontado como importante para atividade da PLA₂s homóloga tantos em estudos funcionais como em cristalográficos. Contudo, esse resíduo é descrita em três estudos, nos modelos cristalográficos da ACL miotoxina de Ambrosio *et al.* (2005) e da Mt-II complexada com suramina de Murakami *et al.* (2005) e, posteriormente, na dinâmica molecular com BthTX-I e suramina (Murakami *et al.*, 2007). Ambrosio *et al.* (2005) encontrou um sítio de coordenação de sulfato com participação da Arg34 nos modelos cristalográficos da ACL miotoxina de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, um complexada com ácido graxo (PDB id: 1S8G) e outro nativa (PDB id: 1S8H e 1S8I). Comparamos essas duas estruturas e notamos que os íons sulfato estão em posições ligeiramente diferentes, contudo mudanças conformacionais são observadas nessa região. A sobreposição destes dois modelos com o modelo da Mt-II com a suramina nos indica que a posição dos dois grupos fosfatos (PO₄⁻) deste ligante ocupa a mesma região dos dois sulfatos (SO₄²⁻) da ACL miotoxina. Contudo não encontramos nenhuma evidência dessas diferentes análises, além da flexibilidade adotada pelo *loop* de ligação de cálcio. Dessa maneira, não encontramos importância para diferente posição deste resíduo, contudo realizaremos análises mais detalhadas com objetivo de inferir sua relevância biológica.

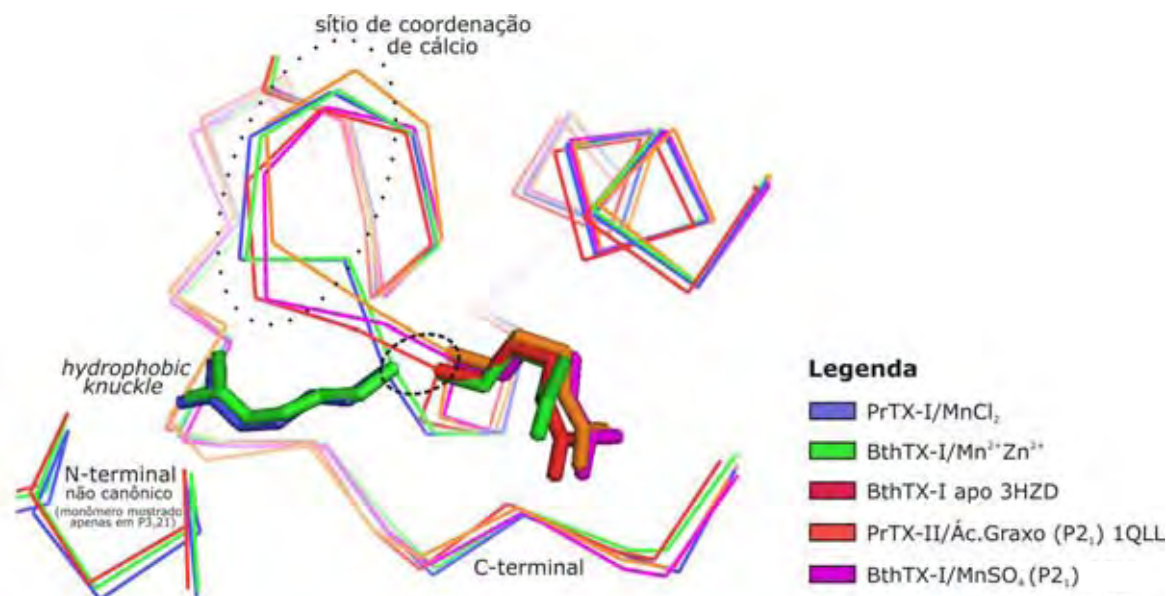


Figura 20. Comparação da cadeia lateral da arginina 34 em monômeros canônicos de diferentes PLA₂s homólogas em estado nativo em *ribbons*. Em BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺ e PrTX-I/MnCl₂, os nitrogênios da cadeia lateral desse resíduo estão próximos de regiões vistas como importantes para mecanismo de desestabilização da membrana, i.e. sítio de coordenação do cálcio, *hydrophobic knuckle* e N-terminal do monômero não canônico. Em demais Lys49-PLA₂s, essa proximidade é com resíduo 132 da extremidade do C-terminal. Em verde é possível observar dupla ocupação da Arg34 de BthTX-I/Mn²⁺Zn²⁺.

4.5 Estudos da BthTX-II em presença de íons cálcio

Os estudos estruturais das toxinas Asp49-PLA₂s descritas como detentoras de baixa ou moderada atividade catalítica PrTX-III e BthTX-II, demonstraram que seus sítios de coordenação de cálcio encontram-se distorcidos (Andriao-Escarso *et al.*, 2000; Rigden *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2008). Rigden *et al.* (2003) explicam que o modelo cristalográfico da PrTX-III estaria em uma forma inativa, sendo o *loop* de ligação de cálcio reordenado quando em contato com fosfolípido. Já Correa *et al.* (2008) fundamentam que essa região da BthTX-II permaneceria distorcida e o mecanismo de ação seria diferente das demais Asp49-PLA₂s e independente de cálcio. Portanto, avaliamos se haveria um ordenamento ou mudança conformacional do *loop* de ligação de cálcio da BthTX-II na presença deste íon através da técnica de cristalografia de raios X.

Com o intuito de corroborar as hipóteses levantadas pela estrutura cristalográfica BthTX-II/Ca²⁺, buscamos complementá-los com estudos experimentais e teóricos. Para tanto,

estabelecemos colaboração com a Dra. Mariana Cintra-Francischinelli (na época realizava o doutorado no Laboratorio di Patogenesi Microbica, Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali, Università di Padova, Itália) que avaliou a toxicidade da BthTX-II em células musculares em duas situações, em ausência e em presença de cálcio extracelular. Os dados cristalográficos ainda foram complementados por estudos filogenéticos de PLA₂s e PLA₂s homólogas de veneno de serpente, desenvolvidos pelos alunos de nosso próprio laboratório (Dra. Juliana Izabel dos Santos e Me. Carlos Henrique Alexandre Fernandes, alunos do orientador dessa dissertação, Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes), e pelo Prof. Dr. Antônio Sérgio Kimuz Braz, atualmente professor da Universidade Federal do ABC. Por motivos didáticos, os estudos funcionais e filogenéticos estão organizados antes dos cristalográficos. Todos esses dados foram organizados e publicados no periódico *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, com o título “*Structural, functional and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class*” (disponível no Apêndice).

4.5.1 Estudos funcionais da BthTX-II

A toxina BthTX-II adquire a forma dimérica em solução conforme observado em experimentos de SDS-PAGE e espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Dos Santos *et al.*, 2011). A importância da formação do dímero de PLA₂s em solução é ressaltada por alguns estudos (Bahnson, 2005). Teste de clivagem de fosfolipídeos por miotoxinas botrópicas (Tabela 9), indicam que o valor observado da BthTX-II é muito inferior do que o de uma Asp49-PLA₂ catalíticas (Mt-I de *Bothrops asper*) e é próximo dos valores das Lys49-PLA₂s, indicando ausência da atividade catalítica da BthTX-II e PLA₂s homólogas (Dos Santos *et al.*, 2011). Esse teste é realizado com um kit comercial para avaliar atividade catalítica de PLA₂ secretadas (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI), usando o análogo de 1,2-dithio of diheptanoyl phosphatidylcholine como substrato. Se houver hidrólise da ligação tiol-éster na posição *sn*-2 do fosfolipídeo, tióis livres são detectados por DTNB (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)).

Ensaio de viabilidade celular em tempo real de miotubos C2C12 com e sem cálcio extracelular administrando-se 50µg da BthTX-II na cultura celular resultam em progressiva

degeneração das células observada por perda de morfologia, acúmulo de agregados no citosol, fragmentação e eventual perda de sarcolema (Dos Santos *et al.*, 2011). A morte celular de miotubos provocada pela toxina com ausência e presença de cálcio também foi analisada e mostrou ser dose e tempo-dependente em ambas as situações (Dos Santos *et al.*, 2011).

Tabela 9 Capacidade de toxinas botrópicas de clivar fosfolípidos.

BthTX-II	Asp49-PLA ₂ s de <i>Bothrops jararacussu</i>	0,097 ± 0,017 µmol/min/mg ^a
BthTX-I	Lys49-PLA ₂ s de <i>Bothrops jararacussu</i>	0,62 ± 0,42 µmol/min/mg ^b
Mt-I (catalítica)	Asp49-PLA ₂ s de <i>Bothrops asper</i>	282,0 ± 24,6 µmol/min/mg ^b
BaspTX-II ou Mt-II	Lys49-PLA ₂ s de <i>Bothrops asper</i>	0,028 ± 0,003 µmol/min/mg ^b

^a Valores extraídos de (Dos Santos *et al.*, 2011). ^b Valores extraídos de (Cintra-Francischinelli *et al.*, 2009b).

Conforme observado nos resultados funcionais acima citados é possível questionar a capacidade catalítica da BthTX-II, já que alguns resultados indicam ausência de atividade catalítica e outros experimentos, baixa ou moderada (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Pereira *et al.*, 1998; Andriao-Escarso *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2011). Além disso, essa toxina é miotóxica em mecanismo independente de cálcio, tendo uma semelhança funcional com PLA₂s homólogas, conforme ilustra a Tabela 9. A polêmica da reduzida ou inexistente atividade catalítica das Lys49-PLA₂s nos anos 80 aparenta, nesse momento, ressurgir para a BthTX-II, uma Asp49-PLA₂. O mesmo questionamento levantado naquela época por van den Bergh *et al.* (1988) pode ser analisado novamente, i.e., seria a baixa atividade catalítica observada na BthTX-II decorrente da contaminação de outras PLA₂s catalíticas proveniente da purificação do veneno bruto de *Bothrops jararacussu*? Analisando o método de purificação deste veneno de Homs-Brandeburgo *et al.* (1988) na etapa de separação das fosfolipases A₂ (2ª etapa em cromatografia em coluna de troca iônica em gradiente de concentração), a BthTX-I é o 5º e último pico, enquanto a BthTX-II, o 4º. Os picos anteriores, 1º, 2º e 3º, dessa etapa de separação continham PLA₂s ácidas com alta atividade catalítica (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988). Conforme questionado anteriormente sobre a real eficiência do

processo de separação, é possível que haja contaminação de PLA₂s ácidas e catalíticas no 4º pico referente a BthTX-II. Experimentos com BthTX-II recombinante seriam cruciais para avaliar a real inatividade catalítica e comprovar ou descartar a hipótese de contaminação, assim como Ward *et al.* (2002) comprovaram ausência de atividade catalítica de Lys49-PLA₂ recombinante.

4.5.2 Estudos filogenéticos e comparações de sequências entre PLA₂s de veneno de serpentes

Em colaboração com alguns alunos de nosso laboratório, estudos filogenéticos foram realizados com maioria das fosfolipases A₂ e PLA₂s homólogas de veneno de serpente da subfamília Crotalinae (família Viperidae) com sequência de aminoácidos disponíveis no banco de dados do NCBI (The National Center for Biotechnology Information disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Dos Santos *et al.*, 2011). A árvore filogenética foi gerada através de análise Bayesiana com PLA₂s com variações de Asp, Lys, Arg, Gln e Asn na posição 49 (Figura 21, para mais detalhes das sequências não especificadas na imagem, vide Tabela V do nosso artigo (Dos Santos *et al.*, 2011) no apêndice). A árvore obtida pode ser dividida em dois grupos com um ancestral comum, um de ramo catalítico e outro com atividade independente de cálcio. O segundo ramo é formado pelas toxinas básicas Asp49-PLA₂s (BthTX-II, PrTX-III e Mt-III), Arg49 e Lys49-PLA₂s, enquanto o primeiro, pelas toxinas básicas Asn49 e Gln49-PLA₂s e Asp49-PLA₂s tanto básicas como ácidas. Cabe ressaltar que todas as Arg49 e Lys49-PLA₂s são PLA₂s homólogas, isto é, desprovidas de atividade catalítica, e foram agrupadas em ramo B em conjunto com as “catalíticas” Asp49-PLA₂s básicas (BthTX-II, PrTX-III e Mt-III).

Portanto, os resultados desse estudo filogenético corroboram os dados funcionais (Dos Santos *et al.*, 2011) e cristalográficos da estrutura nativa da BthTX-II e da PrTX-III (Rigden *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2008), situando a BthTX-II em conjunto com a PrTX-III e Mt-III, numa relação filogenética mais próxima de Lys49-PLA₂s do que Asp49 ácidas. Outros estudos filogenéticos foram realizados com objetivo semelhante de se conhecer a evolução das toxinas, contudo menos sequências protéicas foram utilizadas e não foi encontrado uma explicação semelhante da que encontramos (Ohno *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2006).

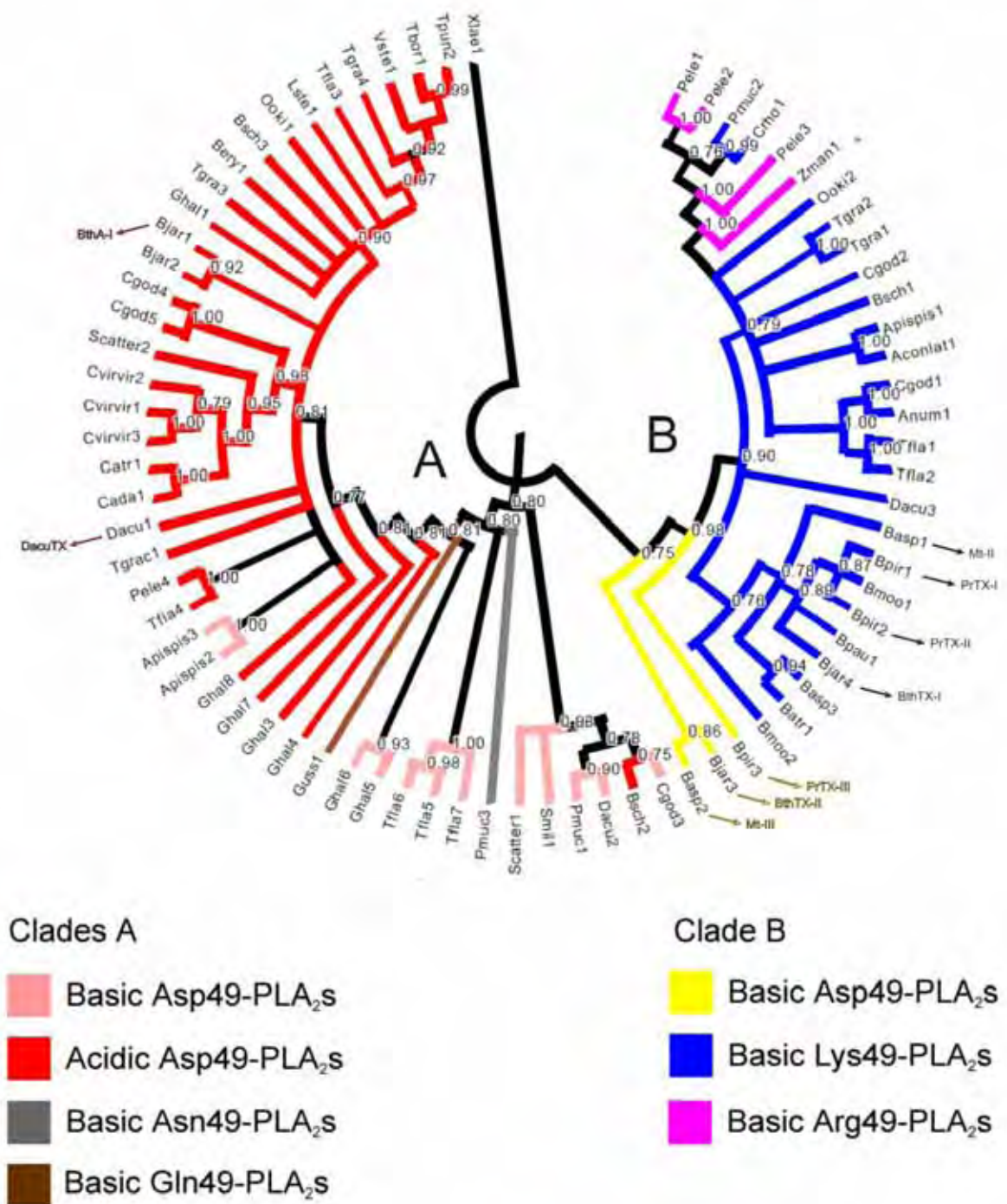


Figura 21. Árvore filogenética de PLA₂s e PLA₂s homólogas de veneno de serpente. A árvore filogenética pode ser separada em ramo A, composto por toxinas catalíticas, e ramo B, por toxinas detentoras de mecanismo independente de cálcio.

Para estudar em mais detalhes as Asp49-PLA₂s básicas que foram agrupadas em ramo composto por toxinas desprovidas de atividade catalítica e detentoras de mecanismo

independente de cálcio, optamos por realizar análise de sequência dessas toxinas. Para tanto, selecionamos três candidatos da classe Asp49 e quatro Lys49-PLA₂s, além da BthTX-II, PrTX-III e Mt-III. A DacuTX de *Deinagkistrodon acutus* e a AhalTX de *Agkistrodon halys pallas* foram selecionadas entre Asp49-PLA₂s, já que apresentam os mesmos resíduos da região do *loop* de ligação de cálcio (resíduos 26 a 33) da BthTX-II e possuem seus modelos cristalográficos elucidados. Já as demais toxinas foram selecionadas por serem provenientes de serpentes do mesmo gênero da serpente cujo veneno contém a BthTX-II, *Bothrops jararacussu*. A BthTX-I, analisada no **item 4.1** e BthA-I (Asp49-PLA₂) são purificadas dessa mesma serpente, *Bothrops jararacussu*, a PrTX-I, PrTX-II (Lys49-PLA₂) e a PrTX-III (Asp49-PLA₂) de *Bothrops pirajai* e a Mt-II (Lys49-PLA₂) e Mt-III (Asp49-PLA₂) de *Bothrops asper*. Realizamos uma busca no banco de dados pelas sequências dessas toxinas proveniente tanto do sequenciamento como dos modelos cristalográficos, algumas diferenças em alguns poucos resíduos foram encontradas conforme indica a Tabela 10. Diante do detalhamento possibilitado pela técnica de cristalografia de raios X em alta resolução e do pequeno erro do sequenciamento, optamos por dar preferência às sequências dos modelos cristalográficos. No entanto, a sequência da PrTX-III e da DacuTX provenientes do sequenciamento e dos modelos cristalográficos apresentam diversos aminoácidos diferentes, sendo então ambos selecionados para o alinhamento.

Realizamos o alinhamento (Figura 22) utilizando o programa Clustal X 2.1 (Larkin *et al.*, 2007). Optamos por realizar o alinhamento completo das sequências com configurações padrões, que inclui análise filogenética para organizar proteínas mais semelhantes próximas entre si. Resultado semelhante à árvore filogenética foi obtido, as Asp49-PLA₂s BthTX-II, PrTX-III (PDB id: 1GMZ) e Mt-III foram organizadas mais próximas das Lys49 e mais distantes das demais Asp49. Considerando essa proximidade e que a região do C-terminal foi apontada por estudos com peptídeos sintéticos (Lomonte *et al.*, 2003b) e mutação sítio-dirigida (Chioato *et al.*, 2007) como importante para as atividades farmacológicas de Lys49-PLA₂s, optamos por analisar minuciosamente o C-terminal (resíduos 111 a 133). O critério utilizado foi o caráter dos resíduos, já que estudos demonstraram que os resíduos básicos e hidrofóbicos seriam os responsáveis pela interação com os fosfolípidos da membrana biológica encontrada em células musculares e dos lipossomos (Diaz *et al.*, 1991; Falconi *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2001; Ambrosio *et al.*, 2005; Dos Santos *et al.*, 2009b).

Tabela 10 Diferença entre sequenciamento experimental e modelo cristalográfico da PrTX-I e II e BthTX-I

	Código	Resíduo diferente
PrTX-I	NCBI: 209572966	116: L
	PDB: 2Q2J	116: K
PrTX-II	NCBI: 17368328	132: D
	PDB: 1QLL	132: K
BthTX-I	NCBI: 209572966	67: D
	PDB: 2H8I e 3IQ3	67: N

	10	20	30	40	49	60	70
BthTX-II	DLWQFGQMILKETGKLPFPYYTTYGCYCGWGGQGQPKDATDRCCFVHDCCYGKLTNCKPKTD						
Mt-III	SLIEFAKMILEETKRLPFPYYTTYGCYCGWGGQGQPKDATDRCCFVHDCCYGKLSNCKPKTD						
PrTX-III pdb	DLWQFGKMILKETGKLPFPYYVTYGCYCGVGGRGQPKDATDRCCFVHDCCYGKLTSCPKPKTD						
PrTX-I	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCPKPKD						
PrTX-II	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCPKPKD						
BthTX-I	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCPKPKD						
Mt-II	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCPKPKD						
PrTX-III seq	DLWQFGQMILKETGKLPFPYYTYGGCYCGVGGRRGLGTKDDRCCYVHDCCYKKLTGCPKTD						
DacuTX	SLIQFETLIMKVVKKSGMFWYSAYGCYCGWGGHGRPQDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPKMD						
DacuTX seq	SLIQFETLIMKVVKKSGMFWYSAYGCYCGWGGHGRPQDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPKMD						
AhalTX	SLIQFETLIMKVAKKSGMFWYSNYGCYCGWGGQGRPQDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPKMD						
BthA-I	SLWQFGKMINYVMGESGVLQYLSYGCYCGLGGQGQPTDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPKID						
	*	*	*	**	*	*****	*

	80	90	100	111	115	122	132
BthTX-II	RYSYSRENGVVIICGEGTPCEKQICECDKAAAVCFRENLR			TY-KKRYMAYPDVLCCKKPAE-KC			
Mt-III	RYSYSRKSQVVIICGEGTPCEKQICECDKAAAVCFRENLR			TY-KKRYMAYPDLLCKKPAE-KC			
PrTX-III pdb	RYSYSRKDGTIVCGENDPCRKEICECDKAAAVCFRENLR			TY-NKKYMSYVLSLCKKXAD-DC			
PrTX-I	RYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLT			GY-NKKYRYHLKPFCKKAD--DC			
PrTX-II	RYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLT			GY-NKKYRYHLKPFCKKAD--KC			
BthTX-I	RYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLT			GY-NKKYRYHLKPFCKKAD--PC			
Mt-II	RYSYSWKDKTIVCGENNSCLKELCECDKAVAICLRENLT			GY-NKKYRYHLKPLCKKAD--AC			
PrTX-III seq	RYSYSWLDLTIVCGEDDPC-KELCECDKAAVCFRENLT			GY-NKKYRYHLKPFCKKADK-PC			
DacuTX pdb	SYTYSEENGDIVCGDDPCKREICECDRVAADCFRDNL			DTYNSDTYWRYPQDC-EESPEPC			
DacuTX seq	SYTYSEENGDIVCGDDPCKREICECDRVAAVCFRDNL			DTYNSDTYWRYPPTKNC-QEEDPDC			
AhalTX	VYSFSEENGDIVCGDDPCKREICECDRAAAICFRDNL			TLTYNDKKYWAFAKNC-QEESPEPC			
BthA-I	SYTYSKKNQDVVCGDDPCKKQICECDRVATTCFRDNK			DTY-DIKYWFYGAFCNC-QEESPEPC			
	*	*	*	*****	*	*	*

Figura 22 Alinhamento de Lys49 e Asp49-PLA₂s. O símbolo * representa resíduos conservados. Os resíduos do sítio de ligação de cálcio estão grifados em tons de cinza, sendo o tom claro característico de Asp49-PLA₂s como resíduos essenciais para coordenação. Numeração grifada em amarelo (resíduos 111 a 133) representa a região do C-terminal apontada por estudos como região responsável pelo mecanismo miotóxico independente de cálcio de Lys49-PLA₂s (Lomonte *et al.*, 2003b; Chioato *et al.*, 2007). Nesta região, os resíduos hidrofóbicos estão grifados em magenta (glicina (G), alanina (A), valina (V), leucina (L), metilalanina (M), isoleucina (I), prolina (P)); os resíduos com anel aromático estão grifados em vermelho (fenilalanina (F), tirosina (Y) e triptofano (W)); resíduos polares com caráter básico estão grifados em verde água (lisina (K), arginina (R) e histidina (H)); com caráter negativo em azul (ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E)); e neutros não grifados (asparagina (N), cisteína (C), serina (S), glutamina (Q) e treonina (T)). X é um aminoácido não identificado.

Nas análises realizadas, observamos que o C-terminal das PLA₂s e PLA₂s homólogas

alinhas pode ser separado entre ácido e básico de acordo com o número de resíduos positivos e negativos (Tabela 11). Apesar de a estrutura primária da PrTX-III proveniente do sequenciamento (NCBI id: 17865540) apresentar muitas diferenças em comparação ao modelo cristalográfico (PDB id: 1GMZ), ambos C-terminais são básicos. Contudo essa diferença ressalta a necessidade de repetir o processo de sequenciamento por espectrômetro de massa e definir real sequência da PrTX-III. Os C-terminais básicos são característica essencial de todas as Lys49-PLA₂s analisadas e da BthTX-II, PrTX-III (PDB id: 1GMZ) e Mt-III. Analisando-os, observamos a manutenção das lisinas 115, 128 e 129. A Lys122 que foi ressaltada em diversos estudos com Lys49-PLA₂s como resíduo crucial ao mecanismo miotóxico (Ambrosio *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2010) não está presente na BthTX-II e Mt-III, curiosamente a região do C-terminal dessas duas últimas toxinas são idênticas. Enquanto as toxinas com C-terminal básico possuem entre 5 e 8 resíduos básicos e 1 e 3 ácidos, as com ácido, entre 2 e 3 básicos e 4 e 6 ácidos. A presença de 3 a 5 resíduos com anéis aromáticos em todas as sequências analisadas indica que possivelmente essa região é importante para interação com a membrana bilipídica conforme indica outros estudos (Falconi *et al.*, 2000; Ambrosio *et al.*, 2005). Apesar de haver diferenças entre sequenciamento da DacuTX (NCBI id: 97180271) e da PrTX-III (NCBI id: 17865540) e o modelo cristalográfico (DacuTX PDB id: 1IJL e PrTX-III PDB id: 1GMZ), não foram observados diferenças quanto ao caráter total do C-terminal. Ressaltamos a necessidade de repetir processo de sequenciamento por espectrômetro de massa e definir real sequência dessas duas toxinas.

Segundo resultados da árvore filogenética (Figura 21), a BthTX-II agrupa-se próxima de outras duas Asp49-PLA₂s, a Mt-III e a PrTX-III. Conforme os experimentos funcionais indicam, a BthTX-II, apesar de possuir todos os resíduos essenciais à catálise, não apresenta tal atividade e possui mecanismo independente de cálcio (**item 4.5.1**). E quanto a essas outras duas toxinas? Comparando o cromatograma da purificação do veneno de *Bothrops jararacussu* (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988) e da *Bothrops pirajai* (Mancuso *et al.*, 1995) é possível perceber que estes são praticamente idênticos. Contudo, na separação das PLA₂s (2ª etapa de purificação por troca iônica), a atividade catalítica observada pelos picos anteriores ao da BthTX-II apresentam maiores valores (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988), enquanto os anteriores da PrTX-III, menores (Mancuso *et al.*, 1995). O pico seguinte da BthTX-II é referente a BthTX-I que é reportada como sem capacidade catalítica e os picos seguintes da PrTX-III são Lys49-PLA₂s com atividade catalítica residual, PrTX-II e PrTX-I (Homs-

Brandeburgo *et al.*, 1988; Mancuso *et al.*, 1995). Segundo os estudos de Andrião-Escarso *et al.* (2000), a atividade catalítica da BthTX-II e da PrTX-III são moderadas e com valores semelhantes. No caso da 2ª etapa de purificação do veneno da *Bothrops jararacussu*, a presença de fosfolipases A₂ ácidas com alta atividade catalítica nos picos anteriores ao da BthTX-II levanta a hipótese da moderada atividade catalítica desta ser decorrente à atividade das ácidas, que seriam um vestígio em uma purificação não totalmente eficiente. A mesma hipótese não procede no caso da PrTX-III, já que esse pico apresenta atividade catalítica maior do que os demais, ao menos pelos experimentos apontados por Mancuso e colaboradores (1995). Em nossos resultados funcionais, observamos ausência da atividade catalítica da BthTX-II, contudo os acima abordados denominam-na como moderada (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Andrião-Escarso *et al.*, 2000). A diferença de metodologia poderia explicar tal incongruência de resultados, já que em experimentos aqui apontados foi utilizado o análogo de 1,2-dithio of diheptanoyl phosphatidylcholine como substrato (Dos Santos *et al.*, 2011) e nos demais (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Andrião-Escarso *et al.*, 2000) (Mancuso *et al.*, 1995), gema de ovo. Cabe ressaltar que os protocolos de purificação foram os mesmos. Dessa forma, questionamos se o teste catalítico com gema de ovo como substrato seria realmente eficaz para observar a atividade catalítica da BthTX-II e se a atividade catalítica da PrTX-III seria observada na metodologia aqui empregada.

A Mt-III aparenta ser um caso diferente das anteriores, já que a atividade catalítica foi observado em diversos experimentos (Kaiser *et al.*, 1990; Bultron *et al.*, 1993a; Bultron *et al.*, 1993b; Chaves *et al.*, 1998). Curiosamente, esta toxina apresenta também um mecanismo de desestabilização de membrana independente de cálcio (Bultron *et al.*, 1993a; Bultron *et al.*, 1993b; Chaves *et al.*, 1998), fato incomum entre demais PLA₂s de veneno de serpentes, contudo também observado na PrTX-III (Soares *et al.*, 2001). O mecanismo independente de cálcio da Mt-III também foi encontrado por Falconi e colaboradores (2000) em lipossomos, contudo estes autores foram além ao analisar a interface eletrostática da região externa tanto de Asp49 como de Lys49-PLA₂s. Semelhante as duas divisões aqui levantadas quanto ao caráter do C-terminal, Falconi e co-autores dividiram as toxinas entre duas classes, uma com uma região básica e outra com duas regiões. A primeira classe seria exclusiva de PLA₂s catalíticas, enquanto a segunda seria composta por PLA₂s homólogas e pela Mt-III (Falconi *et al.*, 2000). Outro experimento interessante é a síntese do peptídeo referente à região do C-terminal (115 a 129) da Mt-III e da BthTX-II (Nunez *et al.*, 2001) que interessantemente têm

essa região idêntica (Figura 22). Este peptídeo não foi capaz de exercer atividade miotóxica nem a de induzir edema, contudo se complexa com o inibidor heparina. Segundo os autores, aparentemente o C-terminal é uma região importante para interação com fosfolipídeos de membrana, porém não com a desestabilização desta (Nunez *et al.*, 2001). Cabe ressaltar que entre os peptídeos sintéticos baseados no C-terminal de Lys49-PLA₂s, alguns se mostraram inócuos (Lomonte *et al.*, 2003b), de forma que os observados de Nunez *et al.* (2001) não excluem a possibilidade da região C-terminal estar relacionada com mecanismo independente de cálcio da Mt-III ou da BthTX-II.

Diante da discussão acima levantada, as toxinas BthTX-II, PrTX-III e Mt-III aparentam ter grandes semelhanças. Questionamos, porém, se a atividade catalítica da PrTX-III seria também observada em outras metodologias. Consequentemente, o mecanismo miotóxico independente de cálcio apresentado pela BthTX-II, PrTX-III e Mt-III são semelhantes e tem relação com o C-terminal, porém de maneira diferente da apontado em Lys49-PLA₂s.

Tabela 11 Distribuição de resíduos separados por polaridade, cargas e presença de anel aromático entre Lys49 e Asp49-PLA₂s com denominação do C-terminal entre básico e ácido

		básicos	aromáticos	hidrofóbicos	neutros	ácidos
Asp49-PLA ₂ s	BthTX-II	7 (32%)	3 (14%)	7 (32%)	3 (14%)	2 (9%)
C-terminal	Mt-III	7 (32%)	3 (14%)	7 (32%)	3 (14%)	2 (9%)
básico	PrTX-III pdb	5 (23%)	3 (14%)	3 (14%)	8 (36%)	3 (14%)
Lys49-PLA ₂ s	PrTX-I	6 (29%)	4 (19%)	5 (24%)	4 (19%)	2 (10%)
C-terminal	PrTX-II	7 (33%)	4 (19%)	4 (19%)	4 (19%)	2 (10%)
básico	BthTX-I	7 (33%)	4 (19%)	5 (24%)	4 (19%)	1 (5%)
	Mt-II	6 (29%)	3 (14%)	6 (29%)	5 (24%)	1 (5%)
	ACL-myo	7 (33%)	5 (24%)	2 (10%)	5 (24%)	2 (10%)
Asp49-PLA ₂ s	PrTX-III seq	8 (38%)	3 (14%)	5 (24%)	4 (19%)	1 (5%)
Asp49-PLA ₂ s	DacuTX pdb	2 (9%)	4 (17%)	3 (13%)	8 (35%)	6 (26%)
C-terminal	DacuTX seq	2 (9%)	4 (17%)	3 (13%)	9 (39%)	5 (22%)
ácido	AhalTX	3 (13%)	4 (17%)	6 (25%)	7 (29%)	4 (17%)
	BthA-I	3 (14%)	5 (23%)	4 (18%)	6 (27%)	4 (18%)

4.5.3 Estudos estruturais da BthTX-II em presença de íons cálcio

A BthTX-II, conforme anteriormente descrito, é uma Asp49-PLA₂ com atividade catalítica questionável. A estrutura apo desta toxina apresenta distorção no *loop* de cálcio (Correa *et al.*, 2008). Essa distorção poderia ser decorrente da ausência de cálcio na condição de cristalização, portanto, optamos por cristalizar a toxina em presença abundante de cálcio para observar se essa região não teria sua conformação alterada.

Na minha Iniciação Científica, iniciei os estudos estruturais da BthTX-II em presença de íons cálcio (Borges, 2009). Nesta época tivemos grande dificuldade na cristalização, uma vez que obtínhamos cristais que não apresentavam padrão de difração satisfatório para coleta de dados. A alta mosaicidade observada nas imagens inviabilizava ou o processamento de dados ou o refinamento da estrutura. No entanto, após sucessivas tentativas de cristalização deste complexo, coleta e processamento de dados, conseguimos realizar o processamento (Tabela 12).

O modelo nativo (PDB ID: 2OQD) foi utilizado para substituição molecular. Um dímero foi encontrado na unidade assimétrica assim como indicou o coeficiente de Matthews, o que é corroborado pelos experimentos de DLS e eletroforese (Dos Santos *et al.*, 2011). Duas possíveis configurações diméricas na cela unitária foram observadas para elucidação da estrutura, como já descrito por Córrea e colaboradores (2008), sendo a sugerida por estes, escolhida. Realizamos ciclos de refinamento e observamos ausência ou baixa relação sinal ruído (I/σ) da densidade eletrônica em algumas cadeias laterais, observação possivelmente provocada pela alta vibração ou mais de uma ocupação desses átomos. Em vista disso, as cadeias laterais dos seguintes resíduos foram excluídas: Arg43, Lys54, Lys69, Glu78, Ile82, Glu86, Lys114, Lys115, Asp122, Lys128 e Lys132 do monômero A, e Arg111 e Lys115 do monômero B, demonstrando uma maior estabilidade deste último monômero, já que as densidades eletrônicas estavam mais definidas. Cabe ressaltar que a maioria dos resíduos estão na região do C-terminal, região que, nas PLA₂s homólogas, apresenta maior fator temperatura quando comparada a média geral da proteína (Magro *et al.*, 2003; Ambrosio *et al.*, 2005; Dos Santos *et al.*, 2009b).

Tabela 12. Estatísticas de coleta de dados de difração de raios X da BthTX-II com a uma resolução de 2,10Å.

Linha coletada (LNLS)	MX2
Grupo Espacial	C2
Cela unitária (Å)	a=59,24; b=100,88; c=47,17
Resolução (Å)	50,44-2,10 (2,20-2,10) ^a
Reflexões únicas	12718 (1625) ^a
Redundância média	3,7 (3,5) ^a
R _{merge} ^b (%)	10,4 (51,0) ^a
Completeza (%)	97,4 (99,4) ^a
I/σ (I)	10,79 (2,55) ^a
Desvio RMSD dos valores ideais	
Comprimento das ligações (Å)	0,019
Ângulos das ligações (°)	1,68
Gráfico de Ramachandran (%)	
Região mais favorável	89,2
Região aceitável	10,8
R _{crist} ^c (%)	21,9
R _{free} ^d (%)	24,9

^a Números em parênteses são para a faixa de mais alta resolução. ^b $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} (\sum_i (|I_{\text{hkl},i} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle|)) / \sum_{\text{hkl},i} \langle I_{\text{hkl}} \rangle$, onde $I_{\text{hkl},i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h, k e l, e $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$. ^c $R = R_{\text{hkl}} (| |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| |) / |F_{\text{obs}}|$, onde $|F_{\text{obs}}|$ e $|F_{\text{calc}}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados. ^d R_{free} é equivalente ao R_{crist} , porém calculado com 5% das reflexões omitidas no processo de refinamento.

A busca por regiões candidatas aos íons cálcio foi realizada conforme especificado no **item 3.6**, encontramos algumas regiões candidatas aos íons cálcio, no entanto, apenas duas em cada um dos monômeros satisfizeram as condições pré-estabelecidas. Moléculas de água foram adicionadas no modelo e o refinamento foi concluído com as estatísticas finais de $R=21,9\%$ e $R_{\text{free}}=24,9\%$. O modelo foi submetido ao PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) e não apresentou nenhum resíduo na região generosamente permitida ou na não permitida do gráfico de Ramachandran. Além disso, o modelo apresentou melhor qualidade estequiométrica do que o esperado pelas estruturas com essa mesma resolução (*Overall G-*

factor) (Laskowski *et al.*, 1993). A estrutura foi depositada no banco de dados de proteínas (PDB id: 3JR8). Cabe ressaltar que o estudo do local de interação dos íons cálcio bem como a análise dessa estrutura cristalográfica com demais modelos presentes no banco de dados foi realizado em conjunto com Dra. Juliana Izabel dos Santos, sendo parte de seu doutorado (Dos Santos, 2011).

4.5.3 Comparação da BthTX-II/Ca²⁺ e outras PLA₂s

A primeira comparação da estrutura BthTX-II/Ca²⁺ realizada foi com seu modelo nativo (PDB id: 2OQD) (Correa *et al.*, 2008). A sobreposição dos C^α desses dois modelos cristalográficos, ambos diméricos, resultou em um desvio (RMSD (*root-mean-square deviation* ou valor de desvio calculado através da raiz quadrada da média dos quadrados das distâncias entre átomos equivalentes)) de 0,38 e 0,83 Å para os monômeros A com A e B com B, respectivamente, sendo o principal desvio observado na região correspondente aos resíduos 77 a 81 do monômero B (região pontilhada na Figura 23). Para compreender razão para tal diferença, realizamos análise minuciosa dessa região (Figura 24). Com base na distância observada entre o íon cálcio e os oxigênios das cadeias principais do ácido glutâmico 78 do monômero B de ambas as estruturas, é improvável que a diferença estrutural ressaltada tenha sido ocasionada pela presença deste íon em região adjacente (Figura 23). O Glu78B da BthTX-II/Ca²⁺ apresenta cadeia lateral e um de seus oxigênios estabelece uma ligação de hidrogênio com uma molécula de água, já no modelo nativo, este resíduo não apresenta cadeia lateral delimitada e esta região está sendo ocupada por diversas moléculas de água (Figura 24). Ainda no modelo nativo, uma dessas águas estabelece ligação de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia lateral da Lys115A, sendo essa cadeia lateral não delimitada no modelo com cálcio (Figura 24). Diante dessas observações, é possível inferir que a presença da cadeia lateral estável do Glu78B provoca vibração da Lys115A no modelo com cálcio e no nativo o oposto ocorre, sendo então responsável pela distorção observada. Além disso, cabe ressaltar que essa região dos resíduos 77 a 81 é altamente variável nos diversos modelos cristalográficos presentes em PLA₂s homólogas (Murakami e Arni, 2003, p. 906). O sítio de coordenação do cálcio da estrutura BthTX-II/Ca²⁺ permaneceu semelhante ao da nativa mesmo com fonte abundante de cálcio na cristalização.

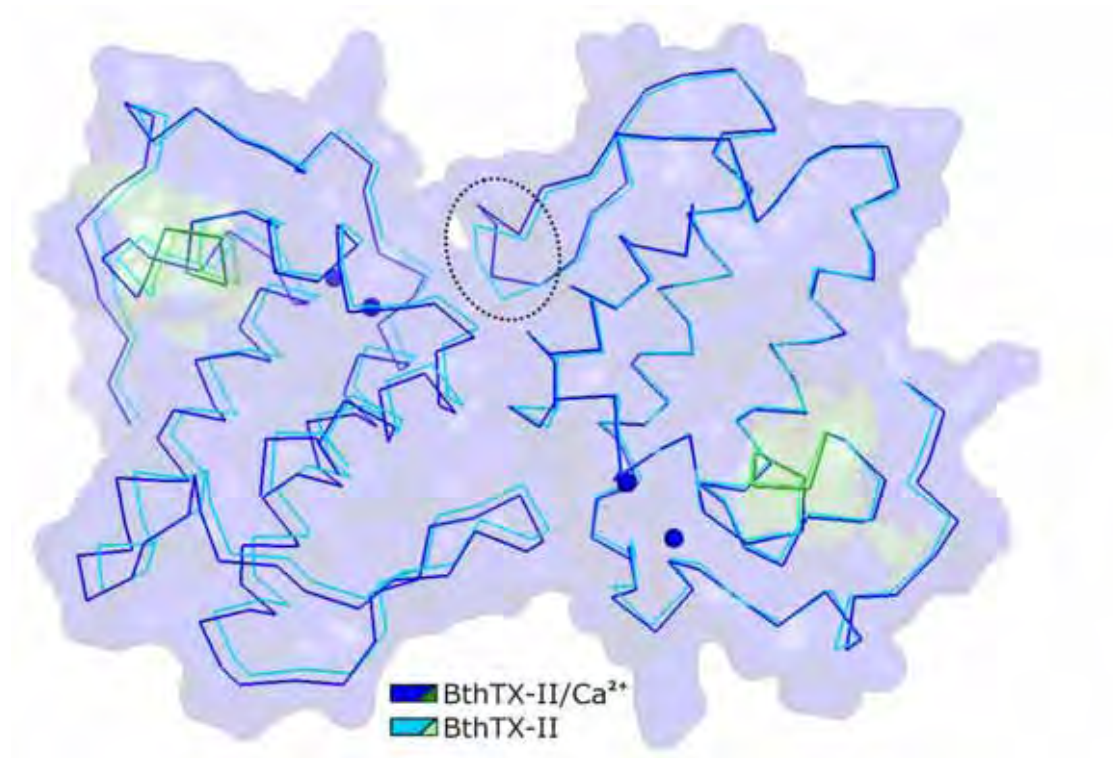


Figura 23. Sobreposição de C^α da BthTX-II nativa e com cálcio. Em azul escuro e em azul claro, BthTX-II/ Ca^{2+} e BthTX-II (2OQD), respectivamente. Em verde é a região do *loop* de ligação de cálcio. Em destaque em preto, região com maior RMSD.

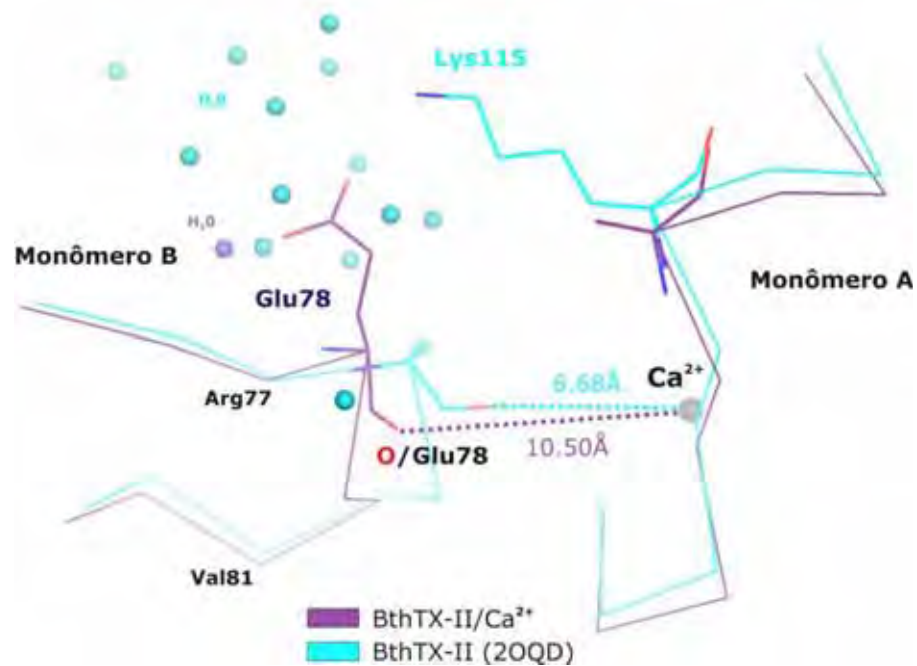


Figura 24. Presença e/ou ausência de cadeia lateral dos resíduos Glu78/B e Lys115/A nas formas complexada (em roxo) e apo (2OQD) (em ciano) da proteína BthTX-II. As esferas (em ciano e em roxo) representam

moléculas de água presentes em ambas as formas. Em linhas pontilhadas são apresentadas as distâncias entre o íon cálcio presente na BthTX-II/Ca²⁺ e o átomo O/Glu78/B de ambas as formas.

A análise da estrutura primária e secundária da BthTX-II/Ca²⁺ aponta que esta apresenta as características comuns de PLA₂s, i.e. 7 pontes dissulfeto (Schaloske e Dennis, 2006), conservação dos aminoácidos do sítio catalítico His48, Tyr52, Tyr73 e Asp99 e os envolvidos na coordenação do cálcio Tyr28, Gly30, Gly32 e Asp49 (Scott *et al.*, 1990a; Murakami e Arni, 2003; Bahnson, 2005). Apesar de haver conservação dos supostos pré-requisitos para coordenação do cálcio e catálise, os íons de cálcio não foram observados nessa região.

A comparação das sequências de PLA₂s e PLA₂s homólogas, no **item 4.5.2**, indicou que, possivelmente, o caráter básico do C-terminal de algumas PLA₂s está relacionado com sua capacidade de provocar efeito miotóxico independente de cálcio. Então, analisamos suas estruturas terciárias com objetivo de obter maiores detalhes desse mecanismo em comparação a BthTX-II/Ca²⁺. Essa análise foi realizada também por Correa e colaboradores (2008) que observaram o *loop* de ligação de cálcio da BthTX-II e da PrTX-III distorcido em comparação ao de Lys49-PLA₂s (BthTX-I e PrTX-II) e de outras Asp49-PLA₂s (BthA-I e duas toxinas de *Agkistrodon halys pallas*). Entre as explicações estruturais para distorção, esses autores apontaram o Trp31 da BthTX-II voltado à direção oposta da Leu31 da BthA-I e uma ligação de hidrogênio formada entre os oxigênios da cadeia lateral da Tyr28 e da Asp49. Em nossa análise, optamos por sobrepor essa região da BthTX-II/Ca²⁺ com a de outras toxinas, a DacuTX de *Deinagkistrodon acutus* (PDB id: 1IJL) (Gu *et al.*, 2002) e a AhalTX de *Agkistrodon halys pallas* (PDB id: 1PSJ). Essa escolha foi motivada por ambas serem Asp49-PLA₂s e possuírem, nessa região, mesmos resíduos, incluindo o Trp31 (Figura 25). Confirmamos as observações de Correa e colaboradores (2008) apontadas anteriormente (Figura 25A e B) e encontramos uma diferença na distância entre o oxigênio da cadeia lateral da Tyr28 e o nitrogênio do grupo amina da Gly35 (Figura 25C) de Asp49-PLA₂s catalíticas e não catalíticas. Essa distância pode ser padronizada entre as Asp49-PLA₂s miotóxicas não catalíticas, com 7,64Å e 7,87Å na BthTX-II e PrTX-III respectivamente, e as PLA₂s clássicas com distância entre 3Å e 4,5Å. Esse aspecto foi observado entre as Lys49-PLA₂s com distância de 5Å a 6,5Å (Fernandes *et al.*, 2010).

Em vista da diferente posição da cadeia lateral do Trp31 entre a BthTX-II, PrTX-III, DacuTX e AhalTX (Figura 25A), este resíduo foi analisado minuciosamente e mostrou-se voltado para região externa das proteínas. Com o objetivo de obtermos mais detalhes dessa região nas diferentes toxinas acima comparadas, optamos por analisar suas estruturas quaternárias. Ao analisar o dímero da BthTX-II notamos que se trata da mesma configuração do chamado “dímero convencional” adotado pelas Lys49-PLA₂s (Figura 26) (Arni e Ward, 1996; Correa *et al.*, 2008; Dos Santos *et al.*, 2009a), sendo mais uma evidência da semelhança entre essa proteína e essa classe conforme análises filogenéticas e de cargas do C-terminal apontaram (**item 4.5.2**). Cabe ressaltar que o estudo da oligomerização é importante tanto que a resolução de uma estrutura cristalográfica PLA₂ dimérica ofereceu subsídios para compreensão da interação entre toxina e a interface da superfície (Bahnson, 2005). Para análise se o dímero cristalográfico possui relevância biológica, submetemos os modelos analisados na Figura 25 ao programa PISA (Tabela 13) (Mais informações no **item 3.7**), com exceção da AhalTX que é monomérica. Os resultados do PISA indicaram diferença entre o provável dímero biológico da BthTX-II e PrTX-III e o cristalográfico, dado não observado na DacuTX. Realizamos a análise da interface de contato entre monômeros com superfície eletrostática da DacuTX e dos prováveis dímeros biológicos da BthTX-II e PrTX-III (Figura 27). Na estrutura da primeira toxina (Figura 27C), o sítio de ligação do cálcio está voltado para a região externa sendo que os Trp31 não interagem entre si. No caso das duas últimas toxinas, o sítio de coordenação do cálcio está voltado para o centro da interface do dímero com os resíduos 31 próximos entre si e voltados à região do C-terminal. Assim como foi encontrado resíduos hidrofóbicos na estrutura primária do C-terminal, encontramos o Trp31, que é o resíduo com maior desvio no sítio de ligação de cálcio, próximo a essa região, que é apontada como possível responsável pela atividade miotóxica das Lys49-PLA₂s na literatura (Chioato *et al.*, 2002; Chioato *et al.*, 2007; Cintra-Francischinelli *et al.*, 2009a).

Portanto, com o modelo cristalográfico da BthTX-II na presença de íons cálcio comprovamos que o *loop* de ligação de cálcio está distorcido de maneira que o co-fator do mecanismo catalítico não será coordenado. Encontramos explicações para distorção dessa região e relação com a atividade miotóxica independente de cálcio demonstrada nos experimentos funcionais. Possivelmente, o caráter básico da região do C-terminal possui relação com esse mecanismo e semelhanças com PLA₂s homólogas.

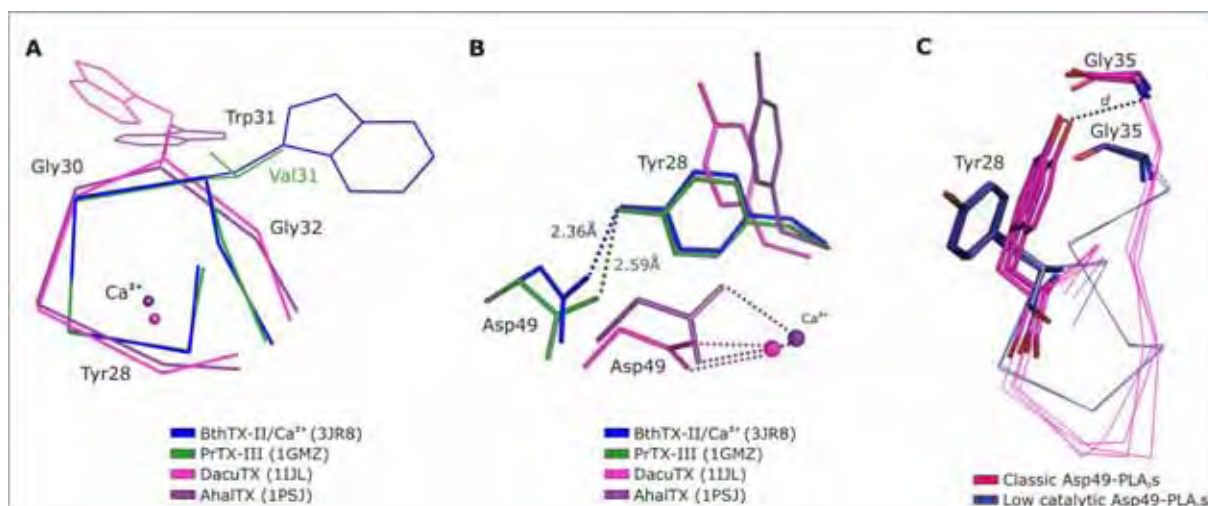


Figura 25 Análise do sítio de coordenação do cálcio de Asp49-PLA₂s. **A.** Sobreposição do sítio de coordenação do cálcio, em ausência de cálcio na BthTX-II (em azul) e PrTX-III (em verde) e em presença na DacuTX (em rosa) e AhalTX (em roxo). **B.** Sobreposição dos resíduos Tyr28 e Asp49 de Asp49-PLA₂. A orientação da Tyr28 das toxinas miotóxicas favorece a formação de uma ligação de hidrogênio entre Oδ Asp49 e Oη da Tyr28, enquanto nas catalíticas a interação é inexistente. **C.** Distâncias entre Oη da Tyr28 grupo amino da Gly35 de Asp49-PLA₂s clássicas (magenta) e miotóxicas (azul). As Asp49-PLA₂s clássicas estão sendo representadas por AhalTX, DacuTX e uma PLA₂ do veneno de *Daboia russelli pulchella*.

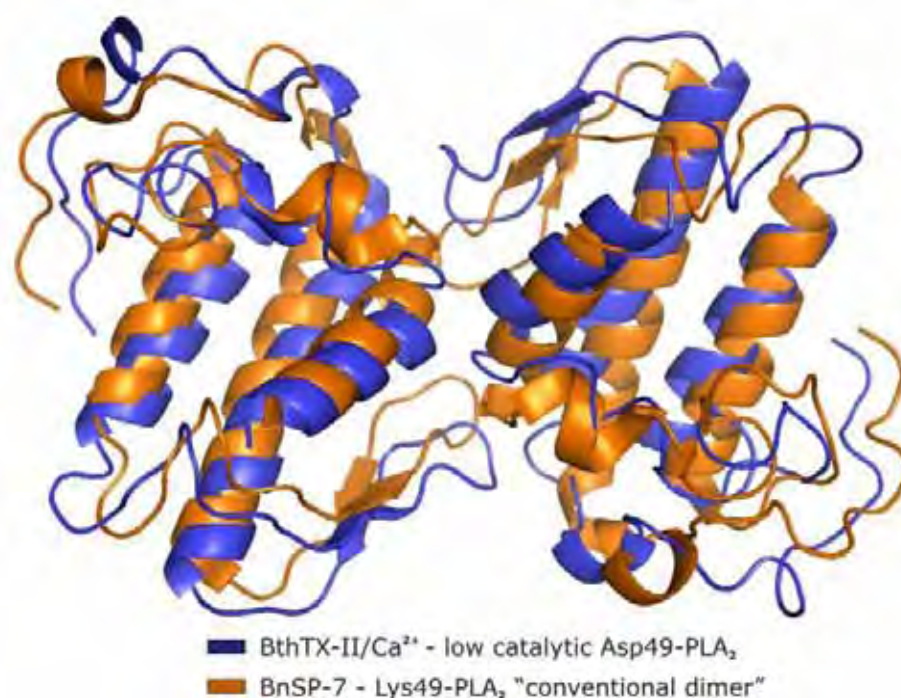


Figura 26 Semelhança em *cartoon* da estrutura quaternária da BthTX-II (Asp49-PLA₂ com baixa atividade catalítica) e o "dímero convencional" de uma Lys49-PLA₂, BnSP-7.

Tabela 13. Análise de área de interface e energia livre de solvatação das Asp49-PLA₂ e BthTX-II/Ca²⁺. Valores dados pelo programa *online* PISA (Krissinel e Henrick, 2007).

Proteínas / Dímero	Área de interface (Å ²)	Δ ⁱ G (kcal/mol) ^a
BthTX-II (2OQD)		
Dímero cristalográfico	456,5	-2,7
Dímero biológico	669,5	-13,5
BthTX-II/Ca²⁺ (3JR8)		
Dímero cristalográfico	422,5	-1,5
Dímero biológico	631,9	-14,6
PrTX-III (1GMZ)		
Dímero cristalográfico	522,3	0,3
Dímero biológico	639,9	-10,4
DacuTX (1IJL)		
Dímero biológico e cristalográfico	992,7	-15,6

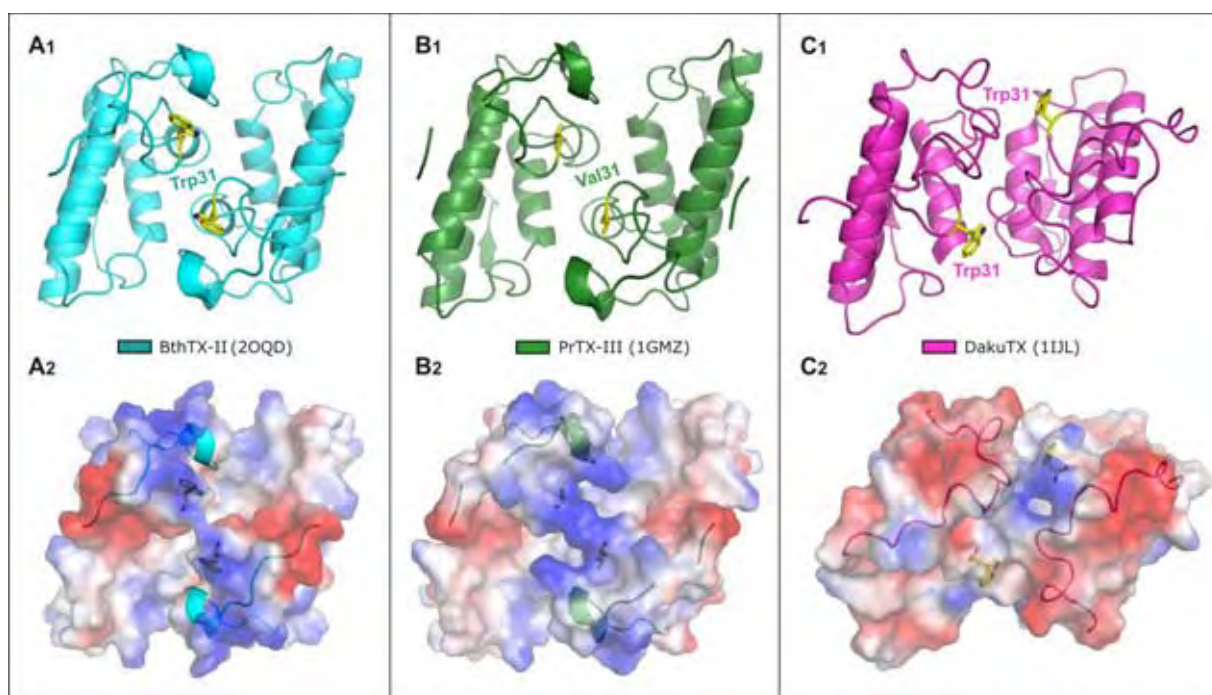


Figura 27. Conformações oligoméricas dos dímeros biológicos de BthTX-II (A), PrTX-III (B) e DakuTX (C). A₁ e A₂ também representam conformação oligomérica da estrutura BthTX-II/Ca²⁺ conforme indicado por análises do programa PISA (Krissinel e Henrick, 2007). A₂, B₂ e C₂ representam a distribuição das cargas da superfície eletrostática com C terminal (resíduos 111 a 133) em *cartoon*. Em A₂ e B₂, os resíduo 31 estão próximos entre si e do C terminal, estabelecendo interação direta entre sítio de coordenação do cálcio e o C-terminal. Em C₂, não existe relação entre Trp31 entre monômeros. Distribuição de cargas básicas na superfície do C-terminal básico em A₂ e B₂, e ácido em C₂.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os estudos cristalográficos com PLA₂s e PLA₂s homólogas contribuíram para melhor elucidação do mecanismo de ação independente de cálcio. Com o estudo da PrTX-I e BthTX-I em presença de manganês e zinco obtivemos dois estados da toxina, nativo e complexado com PEG4000. Contudo, em apenas um modelo nativo foi encontrado íons de zinco, cuja interação é com His48 do monômero canônico e em His120 de ambos monômeros. Para explicar essa suposta inibição nestes resíduos, hipotetizamos como a toxina desestabilizaria a membrana para, então, promover seu efeito tóxico. A região apontada como responsável pelo contato das PLA₂s homólogas com a membrana é a do C-terminal (Lomonte *et al.*, 2003a; Chioato *et al.*, 2007), mais especificamente o sítio miotóxico proposto por Dos Santos *et al.* (2009b) em conjunto com outros resíduos básicos nesse plano. Ainda, há relação com os resíduos do *hydrophobic knuckle* proposto por Ambrosio *et al.* (2005) em conjunto com a His120 do monômero não canônico apontada nesse estudo. Sua interação desempenharia papel na entrada de um ácido graxo em conjunto com Leu121 (porção referente ao ácido graxo no fosfolípídeo) até His48 canônica. Com a ocupação desse canal hidrofóbico, o monômero instável seria organizado em canônico, o que possibilitaria entrada de outra molécula de ácido graxo até outra His48. O zinco então impediria organização do monômero instável em canônico através de interação simultânea de His48 e His120. Dessa maneira, a relevância da His120 e a relação entre sítio miotóxico e *hydrophobic knuckle* e monômeros canônicos e não canônicos são identificadas pela primeira vez.

Os estudos cristalográficos com a BthTX-II indicaram que mesmo em presença do co-fator cálcio na condição de cristalização, o *loop* de ligação de cálcio encontra-se distorcido. Observação semelhante é indicada nos estudos estruturais nativos da BthTX-II (Correa *et al.*, 2008) e da PrTX-III (Rigden *et al.*, 2003). Encontramos as interações que provocam essa distorção (Correa *et al.*, 2008) e possível relevância em seu mecanismo de ação independente de cálcio. A partir das análises do programa PISA, propomos que o dímero com relevância biológica da BthTX-II é mantido pelas interações entre os *loops* de ligação de cálcio. Nessa diferente oligomerização, o Trp31 participaria da interface de contato do monômero e teria relação com a região do C-terminal, interação esta não observada no dímero da DacuTX (PLA₂s ácidas). Estudos filogenéticos de PLA₂s e PLA₂s homólogas indica

relação filogenética da BthTX-II, PrTX-III e Mt-III (todas Asp49-PLA₂s básicas descritas como catalíticas) mais próxima de PLA₂s homólogas do que demais Asp49-PLA₂s, sugerindo possível relação entre mecanismo de ação independente de cálcio (Dos Santos *et al.*, 2011). Diante das semelhanças observadas no estudo filogenético, ressaltamos o caráter hidrofóbico e positivo da região do C-terminal dessas Asp49-PLA₂s básicas como fundamental para exercer a atividade miotóxica independente de cálcio em interação eletrostática com membrana biológica, assim como o é em Lys49-PLA₂s.

Dessa maneira, maiores detalhes foram observados acerca do mecanismo de ação independente de cálcio de PLA₂s, caso BthTX-II realmente seja catalítica, e PLA₂s homólogas. Hipótese do mecanismo de desestabilização de membrana da BthTX-I e PrTX-I foi levantada com indicação da relevância inédita do resíduo His120 e relação entre sítio miotóxico e *hydrophobic knuckle*. Apesar de não termos encontrado o manganês nos modelos cristalográficos, a observação da diferente conformação da Arg34 sugere que a importância desse resíduo deve ser revisada. Além disso, nova coleta de dados em comprimento de onda da borda de absorção dos potenciais ligantes poderiam concluir qual é o átomo responsável pela distorção da Arg34 e do *loop* de ligação de cálcio na estrutura PrTX-I/MnCl₂. Ressaltamos também a importância do estudo estrutural da Mt-III com objetivo de observar se seu *loop* de ligação de cálcio seria semelhante ao da BthTX-II e PrTX-III. Ainda o estudo estrutural destas Asp49-PLA₂s básicas complexadas com inibidores trariam maiores detalhes para compreensão de seu mecanismo de ação. Apesar de não termos encontrado respostas para alguns dos questionamentos feitos, grandes avanços já foram alcançados e as novas perspectivas descritas bem como novos experimentos podem auxiliar ainda mais para elucidação do mecanismo de ação de independente de cálcio de fosfolipases A₂ e PLA₂s homólogas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. D.; AFONINE, P. V.; BUNKOCZI, G.; CHEN, V. B.; DAVIS, I. W.; ECHOLS, N.; HEADD, J. J.; HUNG, L. W.; KAPRAL, G. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; MCCOY, A. J.; MORIARTY, N. W.; OEFFNER, R.; READ, R. J.; RICHARDSON, D. C.; RICHARDSON, J. S.; TERWILLIGER, T. C.; ZWART, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 2, p. 213-21, 2010.
- AMBROSIO, A. L. B.; NONATO, M. C.; DE ARAUJO, H. S. S.; ARNI, R.; WARD, R. J.; OWNBY, C. L.; DE SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C. A molecular mechanism for Lys(49)-phospholipase A(2) activity based on ligand-induced conformational change. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 8, p. 7326-7335, 2005.
- ANDRIO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from Bothrops jararacussu. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755-63, 2000.
- ANTONIOU, S. A.; ANTONIOU, G. A.; LEARNEY, R.; GRANDERATH, F. A.; ANTONIOU, A. I. The rod and the serpent: history's ultimate healing symbol. **World J Surg**, v. 35, n. 1, p. 217-21, 2011.
- ARNI, R. K.; FONTES, M. R. M.; BARBERATO, C.; GUTIERREZ, J. M.; DIAZ, C.; WARD, R. J. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-Phospholipase A(2) homologue isolated from the venom of Cerrophidion (Bothrops) godmani. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 366, n. 2, p. 177-182, 1999.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A(2) - A structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J.; GUTIERREZ, J. M.; TULINSKY, A. Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from Bothrops asper venom. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 51, n. Pt 3, p. 311-7, 1995.
- ASHERIE, N. Protein crystallization and phase diagrams. **Methods**, v. 34, n. 3, p. 266-72, 2004.
- BAHNSON, B. J. Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A2: insight from the anion-assisted dimer. **Arch Biochem Biophys**, v. 433, n. 1, p. 96-106, 2005.
- BORGES, R. J. **Estudos estruturais por difração de raios X de fosfolipases A2 em presença de íons com importância funcional**: 2009. 69 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas - Modalidade Médica). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**: Guia de Bolso. 7. ed. Brasília, DF, 2008. p. 28-31.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**: Guia de Bolso. 8. ed. Brasília, DF, 2010. p. 431-437.
- BRENNAN, S.; COWAN, P. L. A Suite of Programs for Calculating X-Ray Absorption, Reflection, and Diffraction Performance for a Variety of Materials at Arbitrary Wavelengths. **Review of Scientific Instruments**, v. 63, n. 1, p. 850-853, 1992.
- BRUNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v. 355, n. 6359, p. 472-5, 1992.
- BRUNGER, A. T.; ADAMS, P. D.; CLORE, G. M.; DELANO, W. L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; JIANG, J. S.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, M.; PANNU, N. S.; READ, R. J.; RICE, L. M.; SIMONSON, T.; WARREN, G. L. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 54, p. 905-921, 1998.
- BULTRON, E.; GHELESTAM, M.; GUTIERREZ, J. M. Effects on cultured mammalian cells of myotoxin III, a phospholipase A2 isolated from Bothrops asper (terciopelo) venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1179, n. 3, p. 253-9, 1993a.
- BULTRON, E.; GUTIERREZ, J. M.; THELESTAM, M. Effects of Bothrops asper (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A2, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. **Toxicon**, v. 31, n. 2, p. 217-22, 1993b.
- BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S237-42, 2009.
- CAMARGO, A. C.; IANZER, D.; GUERREIRO, J. R.; SERRANO, S. M. Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril. **Toxicon**, 2011.
- CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier, 2003. ISBN 85-7378-133-5.
- CASTAGNETTO, J. M.; HENNESSY, S. W.; ROBERTS, V. A.; GETZOFF, E. D.; TAINER, J. A.; PIQUE, M. E. MDB: the Metalloprotein Database and Browser at The Scripps Research Institute. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 1, p. 379-82, 2002.

- CHAKRABARTI, P. Anion binding sites in protein structures. **J Mol Biol**, v. 234, n. 2, p. 463-82, 1993.
- CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIERREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1861-9, 1998.
- CHIOATO, L.; ARAGAO, E. A.; FERREIRA, T. L.; DE MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H.; WARD, R. J. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A(2) by scanning alanine mutagenesis. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1768, n. 5, p. 1247-1257, 2007.
- CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SA, J. M.; WARD, R. J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys(49)-phospholipase A(2). **Biochemical Journal**, v. 366, p. 971-976, 2002.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; PIZZO, P.; ANGULO, Y.; GUTIERREZ, J. M.; MONTECUCCO, C.; LOMONTE, B. The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca(2+) influx in C2C12 myotubes. **Toxicon**, 2009a.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; PIZZO, P.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PONCE-SOTO, L. A.; ROSSETTO, O.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; POZZAN, T.; MONTECUCCO, C. Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 10, p. 1718-28, 2009b.
- CINTRA, A. C.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J Protein Chem**, v. 12, n. 1, p. 57-64, 1993.
- CORREA, L. C.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CINTRA, A. C.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity: Insights into Ca2+-independent catalytic mechanism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1784, n. 4, p. 591-9, 2008.
- CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S.; SABO, E. F.; ONDETTI, M. A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**, v. 16, n. 25, p. 5484-91, 1977.
- DA SILVA GIOTTO, M. T.; GARRATT, R. C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y. P.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; DE AZEVEDO, W. F.; ARNI, R. K.; WARD, R. J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49 phospholipase A2 homologue. **Proteins-Structure Function and Bioinformatics**, v. 30, n. 4, p. 442-454, 1998.
- DE AZEVEDO, W. F., JR.; WARD, R. J.; CANDURI, F.; SOARES, A.; GIGLIO, J. R.; ARNI, R. K. Crystal structure of piratoxin-I: a calcium-independent, myotoxic phospholipase A2-homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1395-406, 1998.
- DE AZEVEDO, W. F.; WARD, R. J.; GUTIERREZ, J. M.; ARNI, R. K. Structure of a Lys49 phospholipase A(2) homologue isolated from the venom of *Bothrops nummifer* (jumping viper). **Toxicon**, v. 37, n. 2, p. 371-384, 1999.
- DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. San Carlos, CA: DeLano Scientific LLC, 2002.
- DELATORRE, P.; ROCHA, B. A.; SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A.; TOYAMA, M. H.; CAVADA, B. S. Crystal structure of Bn IV in complex with myristic acid: a Lys49 myotoxic phospholipase A from *Bothrops neuwiedi* venom. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 513-8, 2011.
- DIAZ, C.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; GENE, J. A. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A2, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochim Biophys Acta**, v. 1070, n. 2, p. 455-60, 1991.
- DIAZ, C.; LEON, G.; RUCAVADO, A.; ROJAS, N.; SCHROIT, A. J.; GUTIERREZ, J. M. Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A(2): role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. **Arch Biochem Biophys**, v. 391, n. 1, p. 56-64, 2001.
- DOS SANTOS, J. I. **Estudos estruturais com miotoxinas do tipo fosfolipases A2 homólogas do veneno de serpentes do gênero Bothrops: Avanços no entendimento da relação estrutura-função**. 2011. 208 f. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- DOS SANTOS, J. I.; CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; BORGES, R. J.; FERNANDES, C. A.; PIZZO, P.; CINTRA, A. C.; BRAZ, A. S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A class. **Proteins**, v. 79, n. 1, p. 61-78, 2011.
- DOS SANTOS, J. I.; FERNANDES, C. A.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. The intriguing phospholipases A2 homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity. **Protein Pept Lett**, v. 16, n. 8, p. 887-93, 2009a.
- DOS SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A(2) from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J Struct Biol**, v. 167, n. 2, p. 106-16, 2009b.
- DRENTH, J. **Principles of Protein X-ray crystallography**. New York: Springer-Verlag, 1994. ISBN 0-387-94091-X.

- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, 2004.
- FALCONI, M.; DESIDERI, A.; RUFINI, S. Membrane-perturbing activity of Viperidae myotoxins: an electrostatic surface potential approach to a puzzling problem. **J Mol Recognit**, v. 13, n. 1, p. 14-9, 2000.
- FERNANDES, C. A.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SALVADOR, G. M.; SILVA, M. C.; COSTA, T. R.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca(2+)-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA(2)s. **J Struct Biol**, 2010.
- FERREIRA, S. H.; ROCHA, E. S. M. Potentiation of bradykinin by dimercaptopropanol (bal) and other inhibitors of its destroying enzyme in plasma. **Biochem Pharmacol**, v. 11, p. 1123-8, 1962.
- GALLACCI, M.; CAVALCANTE, W. L. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A2 homologues. **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 1-11, 2010.
- GOYAL, K.; MANDE, S. C. Exploiting 3D structural templates for detection of metal-binding sites in protein structures. **Proteins**, v. 70, n. 4, p. 1206-18, 2008.
- GU, L.; ZHANG, H.; SONG, S.; ZHOU, Y.; LIN, Z. Structure of an acidic phospholipase A2 from the venom of *Deinagkistrodon acutus*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 58, n. Pt 1, p. 104-10, 2002.
- GUTIERREZ, J. M.; NUNEZ, J.; DIAZ, C.; CINTRA, A. C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp Mol Pathol**, v. 55, n. 3, p. 217-29, 1991.
- GUTIERREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med**, v. 3, n. 6, p. e150, 2006.
- HEMAVATHI, K. K.; M.; UDAYAKUMAR, A.; SOWMIYA, G.; JEYAKANTHAN, J.; SEKAR, K. MIPS: metal interactions in protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v. 43, n. 1, p. 196-199, 2010.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-27, 1988.
- HSIN, K. S.; Y.; HARDING, M. M.; TAYLOR, P.; WALKINSHAW, M. D. MESPEUS: a database of the geometry of metal sites in proteins. **J. Appl. Cryst.**, v. 41, n. 5, p. 963-968, 2008.
- IRIMIA, A.; EBEL, C.; MADERN, D.; RICHARD, S. B.; COSENZA, L. W.; ZACCAI, G.; VELLIEUX, F. M. The Oligomeric states of Haloarcula marismortui malate dehydrogenase are modulated by solvent components as shown by crystallographic and biochemical studies. **J Mol Biol**, v. 326, n. 3, p. 859-73, 2003.
- JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse-Matrix Sampling - a Screening Method for Crystallization of Proteins. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, p. 409-411, 1991.
- KAISER, II; GUTIERREZ, J. M.; PLUMMER, D.; AIRD, S. D.; ODELL, G. V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch Biochem Biophys**, v. 278, n. 2, p. 319-25, 1990.
- KASHCHIEV, D. Nucleation Theory: Basic Theory and Applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 83, n. 1, p. 66, 2001.
- KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med**, v. 5, n. 11, p. e218, 2008.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A(2) enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.
- KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 3, p. 774-797, 2007.
- LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. **Trends Pharmacol Sci**, v. 20, n. 4, p. 162-70, 1999.
- LAMBEAU, G.; SCHMID-ALLIANA, A.; LAZDUNSKI, M.; BARHANIN, J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. **J Biol Chem**, v. 265, n. 16, p. 9526-32, 1990.

- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-8, 2007.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283-291, 1993.
- LEE, W. H.; DA SILVA GIOTTO, M. T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R. C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A2--a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 28-36, 2001.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003a.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARIA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 307-12, 2003b.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SASA, M.; GUTIERREZ, J. M. The phospholipase A2 homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. **Protein Pept Lett**, v. 16, n. 8, p. 860-76, 2009.
- LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A2 from Bothrops asper snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J Biol Chem**, v. 269, n. 47, p. 29867-73, 1994.
- MAGRO, A. J.; FERNANDES, C. A.; DOS SANTOS, J. I.; FONTES, M. R. Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A2s from snake venoms. **Protein Pept Lett**, v. 16, n. 8, p. 852-9, 2009.
- MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A(2): quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, n. 3, p. 713-720, 2003.
- MAGRO, A. J.; TAKEDA, A. A. S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Structure of BthA-I complexed with p-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 61, p. 1670-1677, 2005.
- MANCUSO, L. C.; CORREA, M. M.; VIEIRA, C. A.; CUNHA, O. A.; LCHAT, J. J.; DE ARAUJO, H. S.; OWNBY, C. L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of Bothrops pirajai snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v. 33, n. 5, p. 615-26, 1995.
- MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KEZDY, F. J.; HEINRIKSON, R. L. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **J Biol Chem**, v. 259, n. 22, p. 13839-43, 1984.
- MARCHI-SALVADOR, D. P.; FERNANDES, C. A.; SILVEIRA, L. B.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Crystal structure of a phospholipase A(2) homologue complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. **Biochim Biophys Acta**, 2009.
- MARJORIE, M. H.; MATTHEW, W. N.; MALCOLM, D. W. Metals in protein structures: a review of their principal features. **GCRY**, v. 16, n. 4, p. 247-302, 2010.
- MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **J Appl Crystallogr**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, 2007.
- MCPHERSON, A. **Introduction to Macromolecular Crystallography**. Hoboken: Wiley-Liss, 2003.
- MCPHILLIPS, T. M.; MCPHILLIPS, S. E.; CHIU, H. J.; COHEN, A. E.; DEACON, A. M.; ELLIS, P. J.; GARMAN, E.; GONZALEZ, A.; SAUTER, N. K.; PHIZACKERLEY, R. P.; SOLTIS, S. M.; KUHN, P. Blu-Ice and the Distributed Control System: software for data acquisition and instrument control at macromolecular crystallography beamlines. **J Synchrotron Radiat**, v. 9, n. Pt 6, p. 401-6, 2002.
- MCCREE, D. E. **Practical Protein Crystallography**. San Diego: Academic Press, 1993. 386p
- MELO, P. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SUAREZ-KURTZ, G. Antagonism of the myotoxic effects of Bothrops jararacussu venom and bothropstoxin by polyanions. **Toxicon**, v. 31, n. 3, p. 285-91, 1993.
- MELO, P. A.; SUAREZ-KURTZ, G. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by Bothrops jararacussu venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. **Toxicon**, v. 26, n. 1, p. 87-95, 1988.
- MIKOL, V.; HIRSCH, E.; GIEGE, R. Diagnostic of precipitant for biomacromolecule crystallization by quasi-elastic light-scattering. **J Mol Biol**, v. 213, n. 1, p. 187-95, 1990.

- MUELLER-DIECKMANN, C.; PANJIKAR, S.; SCHMIDT, A.; MUELLER, S.; KUPER, J.; GEERLOF, A.; WILMANN, M.; SINGH, R. K.; TUCKER, P. A.; WEISS, M. S. On the routine use of soft X-rays in macromolecular crystallography. Part IV. Efficient determination of anomalous substructures in biomacromolecules using longer X-ray wavelengths. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 63, n. Pt 3, p. 366-80, 2007.
- MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A(2). **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 903-913, 2003.
- MURAKAMI, M. T.; ARRUDA, E. Z.; MELO, P. A.; MARTINEZ, A. B.; CALIL-ELIAS, S.; TOMAZ, M. A.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; ARNI, R. K. Inhibition of myotoxic activity of Bothrops asper myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **Journal of Molecular Biology**, v. 350, n. 3, p. 416-426, 2005.
- MURAKAMI, M. T.; VICOTI, M. M.; ABREGO, J. R. B.; LOURENZONI, M. R.; CINTRA, A. C. O.; ARRUDA, E. Z.; TOMAZ, M. A.; MELO, P. A.; ARNI, R. K. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA(2)-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA(2) homologues. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 378-387, 2007.
- NUNEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A(2) from Agkistrodon piscivorus piscivorus snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1587-94, 2001.
- OHNO, M.; CHIIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 841-54, 2003.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Macromolecular Crystallography, Pt A**, v. 276, p. 307-326, 1997.
- PEREIRA, M. F.; NOVELLO, J. C.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; LANDUCCI, E. T.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from Bothrops jararacussu (Jararacucu) venom with low phospholipase A2 activity. **J Protein Chem**, v. 17, n. 4, p. 381-6, 1998.
- RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B. W.; DRENT, J.; SIGLER, P. B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and Crotalus atrox venom. **J Biol Chem**, v. 260, n. 21, p. 11627-34, 1985.
- RETIEF, F. P.; CILLIERS, L. Snake and staff symbolism, and healing. **S Afr Med J**, v. 92, n. 7, p. 553-6, 2002.
- RHODES, G. Crystallography Made Crystal. In: (Ed.). **A guide for user of macromolecular models**. 3rd edition: Academic Press: Elsevier, 2006. p.73-74; 88; 128-136. ISBN 0-12-587073-6.
- RIGDEN, D. J.; HWA, L. W.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I. The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from Bothrops pirajai reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 59, n. Pt 2, p. 255-62, 2003.
- ROCHA, E. S. M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am J Physiol**, v. 156, n. 2, p. 261-73, 1949.
- ROGERS, J.; YU, B. Z.; SERVES, S. V.; TSIVGOULIS, G. M.; SOTIROPOULOS, D. N.; IOANNOU, P. V.; JAIN, M. K. Kinetic basis for the substrate specificity during hydrolysis of phospholipids by secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, v. 35, n. 29, p. 9375-84, 1996.
- ROSENBERG, P. **Handbook of toxinology**. SHYER, W. T. e MEBS, D. New York: Dekker 1990.
- RUFINI, S.; CESARONI, P.; DESIDERI, A.; FARIAS, R.; GUBENSEK, F.; GUTIERREZ, J. M.; LULY, P.; MASSOUD, R.; MORERO, R.; PEDERSEN, J. Z. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**, v. 31, n. 49, p. 12424-30, 1992.
- SARIDAKIS, E.; CHAYEN, N. E. Systematic improvement of protein crystals by determining the supersolubility curves of phase diagrams. **Biophys J**, v. 84, n. 2 Pt 1, p. 1218-22, 2003.
- SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-59, 2006.
- SCOTT, D. L.; ACHARI, A.; VIDAL, J. C.; SIGLER, P. B. Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A2 from the venom of Agkistrodon piscivorus piscivorus. **J Biol Chem**, v. 267, n. 31, p. 22645-57, 1992.
- SCOTT, D. L.; OTWINOWSKI, Z.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1563-6, 1990a.
- SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1541-6, 1990b.

- SOARES, A. M.; ANDRIO-ESCARSO, S. H.; BORTOLETO, R. K.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; ARNI, R. K.; WARD, R. J.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 387, n. 2, p. 188-96, 2001.
- SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-68, 2003.
- SOARES, A. M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; VIEIRA, C. A.; LEITE, G. B.; FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S.; CINTRA, A. C. O.; GIGLIO, J. R.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Mn²⁺ ions reduce the enzymatic and pharmacological activities of bothropstoxin-I, a myotoxic Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops jararacussu* snake venom. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 6, p. 668-677, 2002.
- SOBOLEV, V.; SOROKINE, A.; PRILUSKY, J.; ABOLA, E. E.; EDELMAN, M. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. **Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 327-32, 1999.
- TOYAMA, M. H.; SOARES, A. M.; VIEIRA, C. A.; NOVELLO, J. C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. **J Protein Chem**, v. 17, n. 7, p. 713-8, 1998.
- VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. Molecular replacement with MOLREP. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 22-5, 2010.
- VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)? **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 815-31, 2000.
- VAN DEN BERGH, C. J.; SLOTBOOM, A. J.; VERHEIJ, H. M.; DE HAAS, G. H. The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A2. A site-specific mutagenesis study of porcine pancreatic phospholipase A2 and the rationale of the enzymatic activity of [lysine49]phospholipase A2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. **Eur J Biochem**, v. 176, n. 2, p. 353-7, 1988.
- VANEY, M. C.; BROUTIN, I.; RETAILLEAU, P.; DOUANGAMATH, A.; LAFONT, S.; HAMIAUX, C.; PRANGE, T.; DUCRUIX, A.; RIES-KAUTT, M. Structural effects of monovalent anions on polymorphic lysozyme crystals. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 57, n. Pt 7, p. 929-40, 2001.
- VERHEIJ, H. M.; VOLWERK, J. J.; JANSEN, E. H.; PUYK, W. C.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; DE HAAS, G. H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 743-50, 1980.
- WALSH, M. A.; EVANS, G.; SANISHVILI, R.; DEMENTIEVA, I.; JOACHIMIAK, A. MAD data collection - current trends. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 55, n. Pt 10, p. 1726-32, 1999.
- WARD, R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SA, J. M. Active-site mutagenesis of a Lys(49)-phospholipase A(2): biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochemical Journal**, v. 362, p. 89-96, 2002.
- WATANABE, L.; SOARES, A. M.; WARD, R. J.; FONTES, M. R. M.; ARNI, R. K. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A(2): crystal structure of myotoxin II from *Bothrops molojeni* complexed with stearic acid. **Biochimie**, v. 87, n. 2, p. 161-167, 2005.
- WEI, J. F.; WEI, X. L.; CHEN, Q. Y.; HUANG, T.; QIAO, L. Y.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L.; HE, S. H. N49 phospholipase A2, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A2. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, n. 3, p. 462-71, 2006.
- YU, B. Z.; BERG, O. G.; JAIN, M. K. The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, v. 32, n. 25, p. 6485-92, 1993.