

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/03/2018.



**unesp**

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

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

**FÁBIO FILIPPI MATIOLI**

**BOTUCATU – SP  
2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

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

**FÁBIO FILIPPI MATIOLI**

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

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

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

**BOTUCATU – SP**  
**2016**

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

Matioli, Fábio Filippi.

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

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

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientador: Ney Lemke

Capes: 20804008

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

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

## **Agradecimentos**

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

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

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

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

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

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

*Juscelino Vieira Mendes*

## RESUMO

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

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

## ABSTRACT

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

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

## Lista de Figuras

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **Lista de Tabelas**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **Lista de Quadros**

**Quadro 1.** Análise geral dos resultados selecionados para representar o complexo  $PLA_2$  ácida/ $PLI\alpha$ . Página 27.

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

## LISTA DE ABREVIATURAS

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

# SUMÁRIO

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

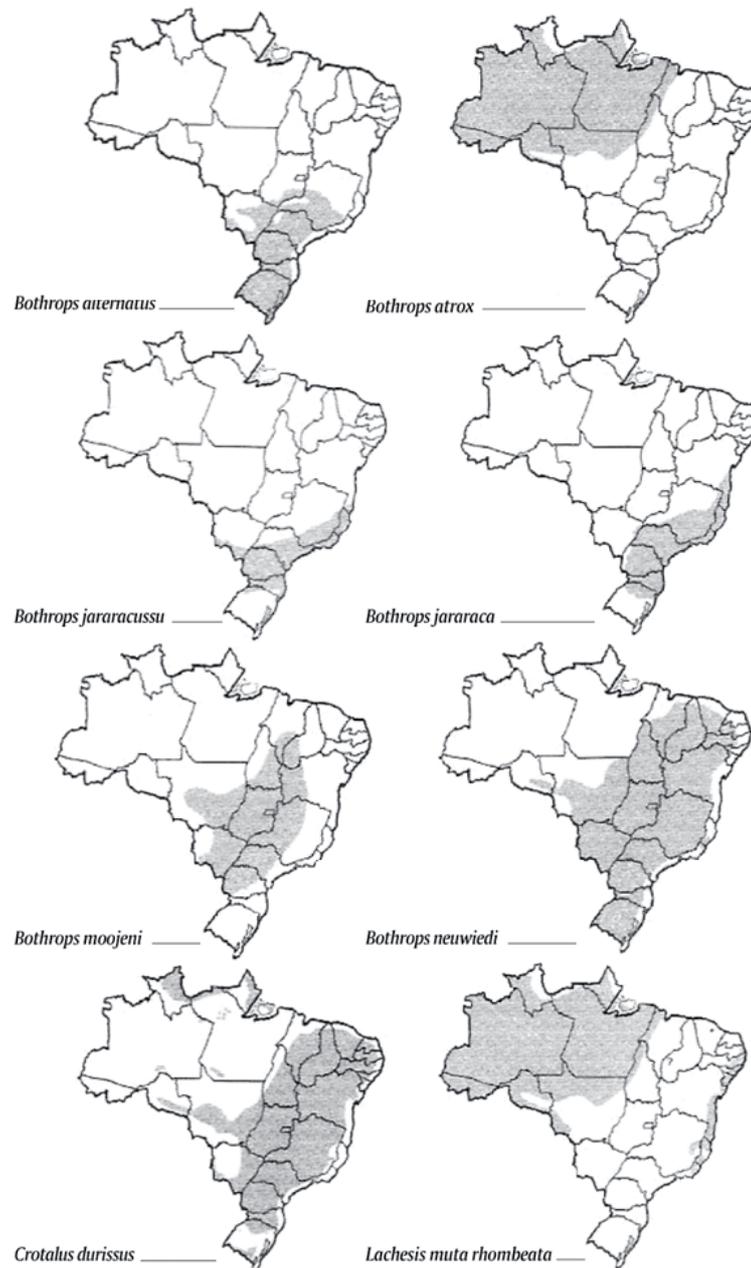
# INTRODUÇÃO

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Veneno de serpente

A substância que é injetada pelas presas das serpentes e que leva o nome de veneno é uma composição de diferentes substâncias, como proteínas (90%), carboidratos, metais, aminoácidos, lipídios, entre outros (Varanda *et al.*, 1999). Das proteínas encontradas, podemos destacar as L-amino-oxidases, fosfolipases, serino proteases e metaloproteases (Varanda *et al.*, 1999). Os estudos a cerca da grande variedade de efeitos farmacológicos e bioquímicos apresentados pelas proteínas e peptídeos que compõem os venenos destes répteis, pode contribuir para a aquisição de novos e importantes dados a respeito dos efeitos biológicos destas toxinas nos organismos. Por fim, estes estudos podem ser de grande utilidade para o desenvolvimento de novos medicamentos e produtos de interesse biotecnológico, como, por exemplo, o hipotensor captopril, desenvolvido a partir de uma bradicinina isolada do veneno de *Bothrops jararaca* (Smith & Vane, 2003) e a cola de fibrina utilizada como adesivo cirúrgico preparada a partir de uma *thrombin-like* isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Barbosa *et al.*, 2007).

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



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

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

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

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

O sítio catalítico das fosfolipases  $A_2$  é composto por uma histidina (His48, de acordo com o sistema de numeração para  $PLA_2$ s (Renetseder *et al.*, (1990)) próxima a um aspartato conservado (Asp99) e um ácido aspártico na posição 49, que é essencial para a mobilização do cofator  $Ca^{2+}$  (Arni & Ward, 1996; Magro *et al.*, 2009).

### 1.1.2. Crotoxina

A crotoxina é uma fosfolipase  $A_2$  que é a principal responsável pelo pronunciado efeito neurotóxico do veneno das serpentes da espécie *Crotalus durissus* por conta de sua potente atividade de bloqueio da transmissão neuromuscular (Changet *al.*, 1977). A crotoxina é formada por duas subunidades, uma ácida, não tóxica e desprovida de ação enzimática; conhecida como crotoxina A (CA) ou crotapotina; e uma básica, tóxica com atividade enzimática; conhecida como crotoxina B (CB) (Faure *et al.*, 2011) (Figura 2).



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

## 1.2. Inibidores plasmáticos de serpentes

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

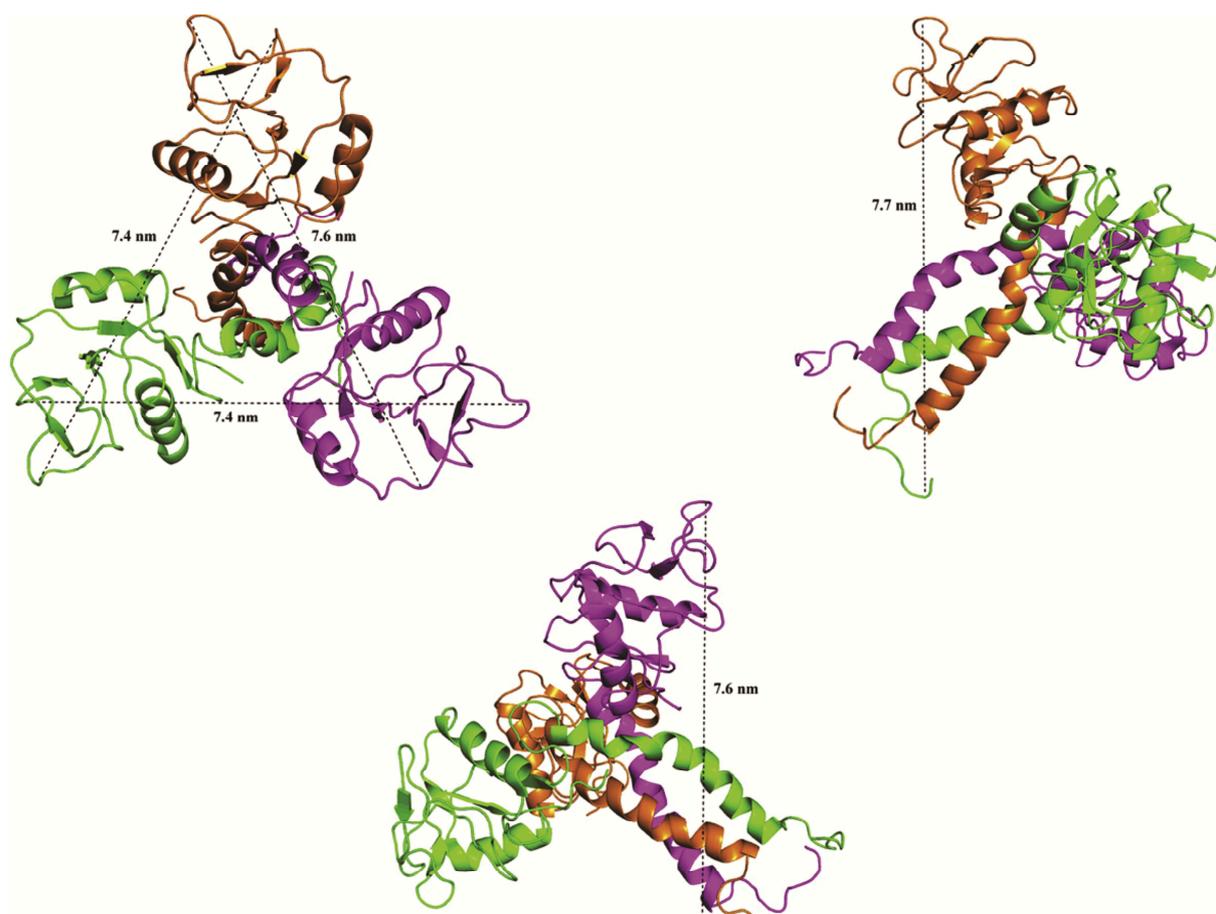
Os  $\alpha$  e  $\gamma$ -PLIs foram encontrados em um grande número de espécies de serpentes, ao contrário das  $\beta$ -PLIs, que foram encontrados em apenas três espécies de serpentes, sendo duas delas não peçonhentas (Forte-Dias *et al.*, 2002; Faure *et al.*, 2002). Cada uma destas classes é caracterizada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

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

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



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



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

Pesquisas encontradas na literatura tentam descrever as regiões em que os inibidores plasmáticos tipo alfa interagem com as fosfolipases  $A_2$  (tabela 1).

**Tabela 1.** Informações acerca das possíveis regiões de interação entre as PLI $\alpha$  e as PLA $_2$  ácidas

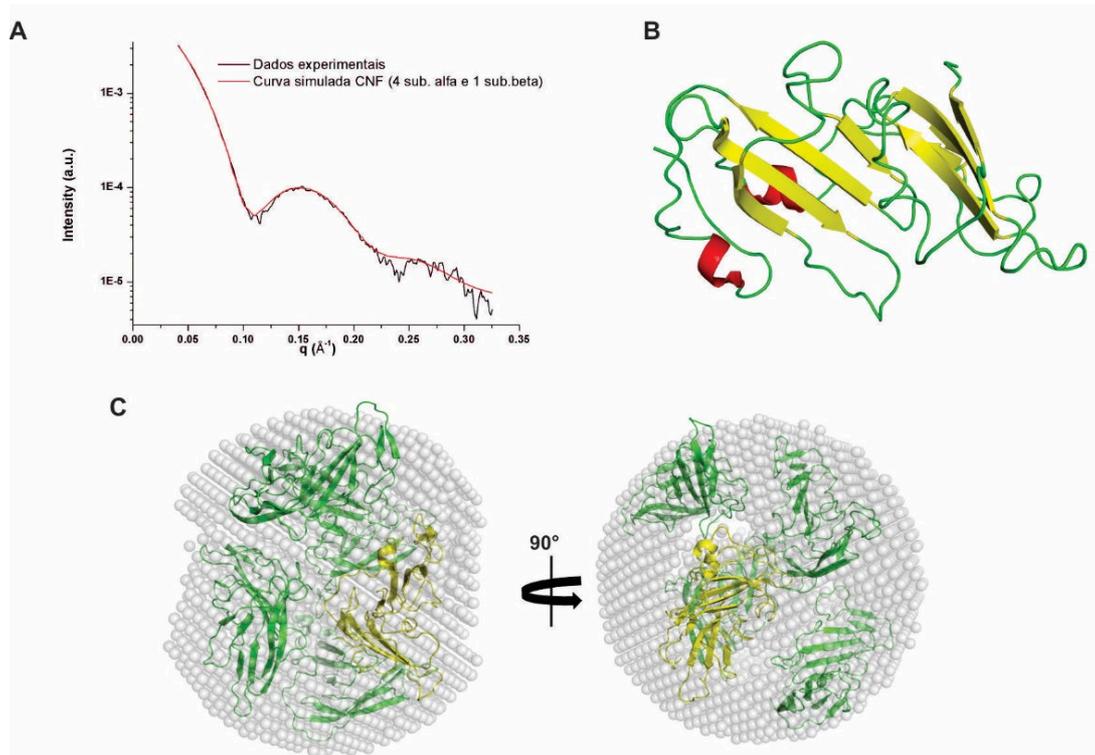
<b>Referência</b>	<b>Região de Interação</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Localização</b>
Nobuhisa <i>et al.</i> , 1998	N-terminal C-terminal	Peptídeos sintéticos	37 resíduos do N-Terminal e 12 últimos resíduos do C-terminal
Okumura <i>et al.</i> , 2005	Poro central	Modelo <i>in silico</i>	Região próxima ao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

### 1.2.2. Gama (CNF)

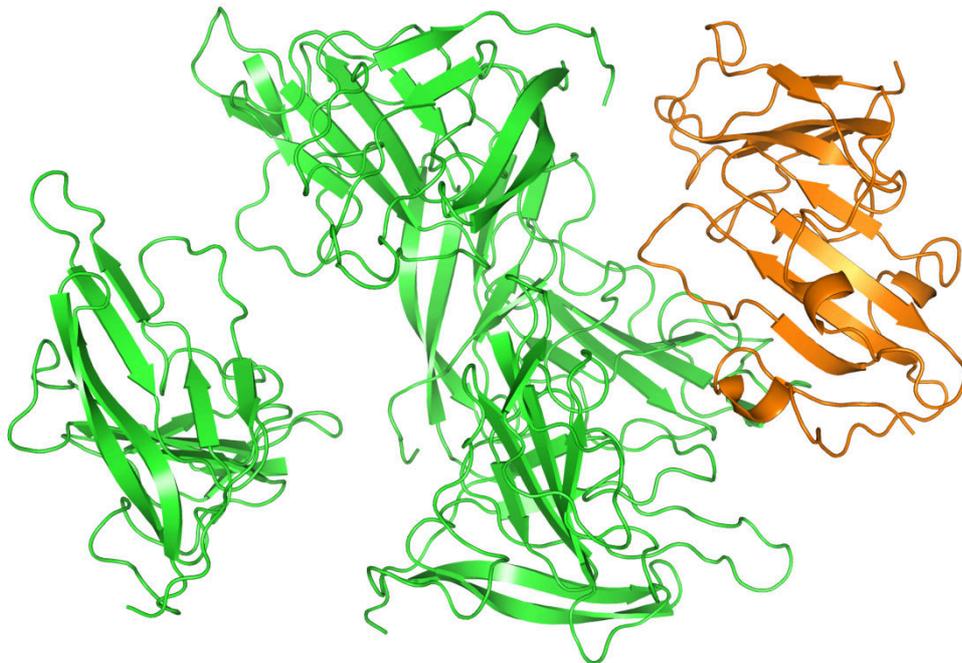
O inibidor  $\gamma$  encontrado no plasma das serpentes do gênero *Crotalus* e que se liga exclusivamente a subunidade básica e tóxica da crotoxina, levou o nome de CNF, *Crotalus Neutralization Factor* (Fortes-Dias *et al.*, 1994). Essas proteínas têm a capacidade de retirar a subunidade básica do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

#### 1.2.2.1. Refinamento da estrutura da CNF

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



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



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

## 1.3. Modelagem Molecular

### 1.3.1. Modos Normais

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

#### 1.3.1.1. Minimização energética

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

#### 1.3.1.2. Cálculo da Matriz Hessiana

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

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

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

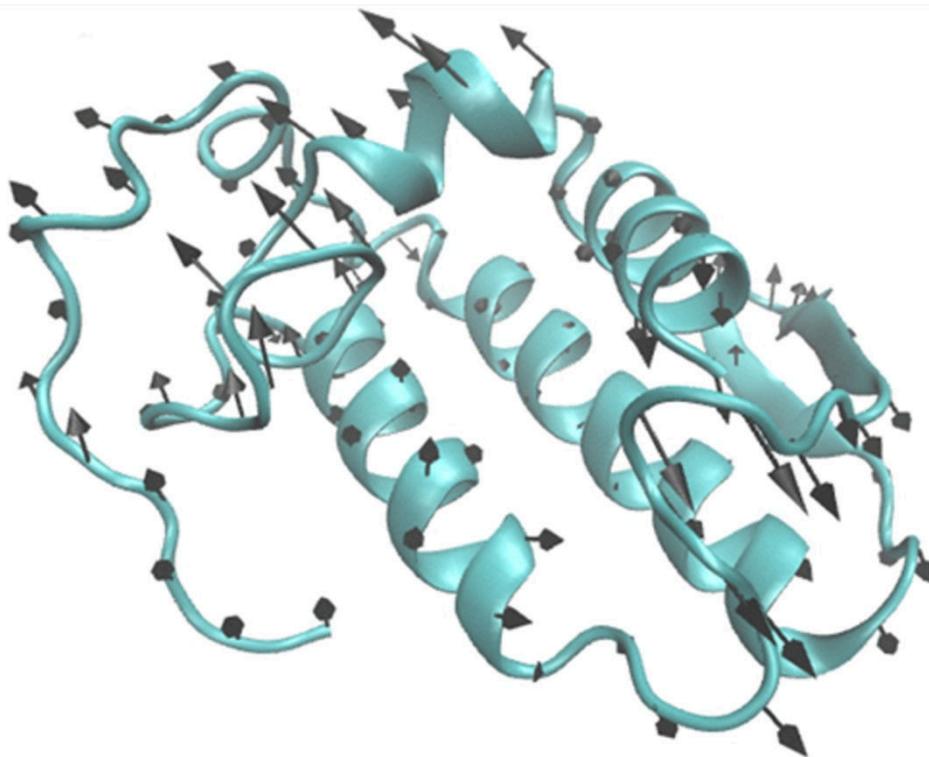
$$H(f) = \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 f}{\partial x_1^2} & \dots & \frac{\partial^2 f}{\partial x_1 \partial x_n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial^2 f}{\partial x_n \partial x_1} & \dots & \frac{\partial^2 f}{\partial x_n^2} \end{bmatrix} \quad (2)$$

### 1.3.1.3. Diagonalização da Matriz Hessiana

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

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

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



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

### 1.3.2. Clusterização

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

### **1.3.3. Docking Molecular**

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

### **1.3.4. Dinâmica Molecular**

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

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

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

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

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

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

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

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

# CONCLUSÃO

## 5. CONCLUSÃO

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

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

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arni, R. K.; Ward, R. J. Phospholipase A(2) - A structural review. **Toxicon**, v.34, p.827-841, 1996.
- Bachar, O., Fischer, D., Nussinov, R., & Wolfson, H. A computer vision based technique for 3-D sequence-independent structural comparison of proteins. **Protein Engineering**, 6(3), 279-287, 1993.
- Barbosa, M. D.; Gregh, S. L.; Passanezi, E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. **J Periodontol**, v.78, p.2026-2031, 2007.
- Batista, P. R.; Robert, C. H.; Maréchal, J. D.; Hamida-Rebaï, M. B.; Pascutti, P. G.; Bisch, P. M.; Perahia, D. Consensus modes, a robust description of protein collective motions from multiple-minima normal mode analysis—application to the HIV-1 protease. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 12(12), 2850-2859, 2010.
- Becker, O. M. & Karplus, M. Guide to biomolecular simulations. **Springer Science & Business Media**. 2006.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; Hermans, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. **Intermolecular Forces**, 331-342, 1981.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. **J. Chem. Phys.** 1984.
- Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; Van Drunen, R. GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation. **Comp. Phys. Commun.** 91, 43-56, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso**. 8. ed. Brasília, DF, pp. 431e437, 2010
- Brooks, B.R.; Bruccoleri, R.E.; Olafson, B.D.; States, D.J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **J. Comput. Chem.** 4, 187-217, 1983.
- Chang, C. C., & Lee, J. D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like  $\beta$ -bungarotoxin. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, 296(2), 159-168, 1977.
- Durrant, J. D.; McCammon, J. A. BINANA: A novel algorithm for ligand-binding characterization. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 29(6), 888-893, 2011.
- Faure, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A2. **Biochimie**, v.82, pp.833e840, 2000
- Faure, G.; Xu, H.; Saul, F.A. Crystal Structure of Crotoxin Reveals Key Residues Involved in the Stability and Toxicity of This Potent Heterodimeric  $\beta$ -Neurotoxin. **JMB**, v. 412, I. 2, pp. 176e191, 2011
- Floquet, N., Durand, P., Maigret, B., Badet, B., Badet-Denisot, M. A., & Perahia, D. Collective motions in glucosamine-6-phosphate synthase: influence of ligand binding and role in ammonia channelling and opening of the fructose-6-phosphate binding site. **Journal of molecular biology**, 385(2), 653-664, 2009.

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

Fortes-Dias, C.L. Endogenous inhibitors of snake venoms phospholipases A2 in the blood plasma of snakes. **Toxicon**, v.40, pp. 481-484, 2002

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

Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Phospholipases A2 myotoxins from Bothrops snake venoms, in: Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism. **John Wiley and Sons**, pp. 321-352, 1997

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

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

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

Lima, R.M.; Estevão-Costa, M.I.; Junqueira-de-Azevedo, I.L.; Ho, P.L.; Diniz, M.R.; Fortes-Dias, C.L. Phospholipase A2 inhibitors (bPLIs) are encoded in the venom glands of *Lachesis muta* (*Crotalinae*, *Viperidae*) snakes. **Toxicon**, v.57, pp.172-175, 2011

Lizano, S.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Fox, J.W.; Lambeau, G.; Lazdanski, M.; Gutiérrez, J.M. Two phospholipase A2 inhibitors from the plasma of *Cerrophidion* (*Bothrops*) *godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A2 myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. **Biochem J.** v.346, pp.631-639, 2000

Lizano, S.; Domont, G.; Perales, J. Natural phospholipase A2 myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants, **Toxicon** v.42, pp.963-977, 2003

Magro, A. J.; Murakami, M. T.; Marcussi, S.; Soares, A. M.; Arni, R. K.; Fontes, M. R. M. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 in the monomeric and dimeric states: insights into its oligomeric. **BBRC**, v. 323, pp. 24-31, 2004

Magro, A. J.; Fernandes, C. A.; Dos Santos, J. I.; Fontes, M. R. Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A2s from snake venoms. **Protein Pept Lett**, v.16, p.852-859, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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