



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – UNESP

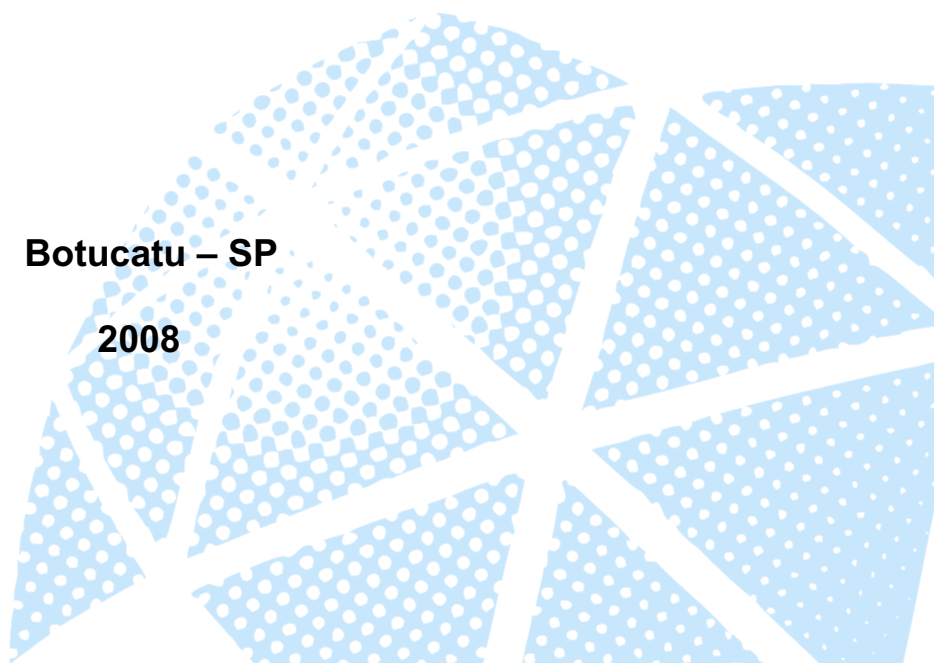
Câmpus de Botucatu

MILTON LAVOR

**Estudos Estruturais e Cristalização de Complexos
Formados entre Toxinas Botrópicas e Inibidores Vegetais**

Botucatu – SP

2008



MILTON LAVOR

**Estudos Estruturais e Cristalização de Complexos
Formados entre Toxinas Botrópicas e Inibidores Vegetais**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de
Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel
em Física Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes

Botucatu - SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Lavor, Milton.

Estudos estruturais e cristalização de complexos formados entre toxinas botrópicas e inibidores vegetais / Milton Lavor. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Física médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

1. Física médica 2. Farmacologia

Palavras-chave: Cristalização; Fosfolipases; Inibidores de Fosfolipases A₂; Toxinas botrópicas

**A toda minha família,
obrigado,
devo tudo a vocês.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus avós, Francisco Edmar e Maria Eunice, Edmilson Moreira (*in memoriam*) e Terezinha de Lavor, que sempre me ajudaram e orientaram muito.

Aos meus pais, Marcelo e Margarida, que nunca mediram esforços para ajudar na minha formação, com certeza, eles são os melhores do mundo!

Aos meus irmãos, Rafael e Pedro, por serem bons amigos e parceiros em todas as horas.

A Izabel Pinheiro, por todo amor, carinho, amizade, dedicação, cumplicidade, incentivo, paciência e companheirismo. Você, simplesmente, me completa!

Ao meu orientador, Marcos Roberto de Mattos Fontes, pela oportunidade de estágio e incentivo acadêmico.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural, Angelo, Agnes, Juliana, Matheus, Daniela e Carlos, obrigado por todos os ensinamentos.

Aos professores José Ricardo de Arruda Miranda, Roberto Morato Fernandez, Paulo Roberto R. Ramos, Paulo Fernando de Arruda Mancera e Claudia Helena Pellizzon, pelos valiosos ensinamentos e por sua dedicação a estruturação do curso de Física Médica.

A todos os alunos do curso de Física Médica da UNESP de Botucatu.

Aos amigos de faculdade, Guilherme, Ivan, Danilo, Antonio, Thalís, David, pelas horas de discussão, parcerias de estudos, apoios e conselhos quando precisei.

**"Grandes realizações não são feitas por impulso,
mas por uma soma de pequenas realizações."**

Vincent Van Gogh

RESUMO

Este trabalho apresenta um estudo estrutural dos complexos formados entre as toxinas botrópicas BthTX-I e PrTX-I e os inibidores de fosfolipases A₂ (PLA₂s) 12-metóxi-4-metil-voachalotina (MMV) de *Tabernamontana catharinensis* e ácido rosmarínico (Ro-RA) de *Rosmarinus officinalis*. Para tanto foram empregados experimentos de co-cristalização com as toxinas e inibidores. No futuro, as estruturas tridimensionais experimentais destes complexos sejam obtidas por intermédio da técnica de cristalografia. Concomitantemente, ocorreram trabalhos de construção *in silico* dos inibidores Ro-RA e MMV e tentativas de *docking* entre tais ligantes e as estruturas cristalográficas protéicas. Estes dados teóricos fornecem importantes informações a respeito da natureza das interações entre inibidores e toxinas e das modificações estruturais induzidas nas proteínas pelas moléculas inibidoras. Possivelmente, a aquisição destas informações tenha grande valia para a identificação, caracterização e desenvolvimento (*drug design*) de compostos com grande potencial de uso biotecnológico e farmacológico. Neste último caso, tais compostos poderiam ser utilizados para o controle de sintomas em muitos casos de envenenamento ofídico e, também, no combate a uma miríade de processos patológicos (doenças inflamatórias degenerativas e auto-imunes, mal de Alzheimer, esquizofrenia, entre outras) cujas etiologias estão relacionadas às moléculas pertencentes aos mesmos grupos de proteínas onde se encontram classificadas as toxinas botrópicas que foram estudadas neste projeto.

Palavras chave: Cristalização - Fosfolipases A₂ - Inibidores de Fosfolipases A₂ - Toxinas Botrópicas.

ABSTRACT

This research presents a study of structural complexes formed between the bothropstoxin BthTX-I and PrTX-I and phospholipase A₂ (PLA₂s) inhibitor 12-methoxy-4-methyl-voachalotine (MMV) of *Tabernamontana catharinensis* and rosmarinic acid (Cv-RA) of *Rosmarinus officinalis*. For both were used co-crystallization experiments with the toxins and inhibitors. In the future, the experimental three-dimensional structures of these complexes will be obtained through the technique of crystallography. Simultaneously, construction occurred in silico of inhibitors Cv-RA and MMV and attempts of docking between these binders and protein structures. These theoretical data provide important information regarding the nature of interactions between inhibitors, toxins and structural changes induced by the protein molecule inhibitors. Therefore, the acquisition of this information has great value to identification, characterization and development (drug design) of compounds with great potential for biotechnology and drug use. Considering further and more relevant applications, these compounds could be used to control symptoms in many cases of ophidic poisoning and also in combating of pathological processes (degenerative inflammatory diseases and auto-immune diseases, Alzheimer's disease, schizophrenia, among others) whose causes are related to molecules belonging to the same groups of proteins which are classified bothropstoxin that were studied in this project.

Key-words: Crystallization - Phospholipase A₂ - Phospholipase A₂ inhibitor - Bothropstoxin.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP, sob supervisão do Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Maior policristal de BthTX-I nativa formado após 9 dias.....	31
Figura 2 - Policristais de BthTX-I nativa em gotas com volume total de 2,0 µl formados após 10 dias.....	32
Figura 3 - Policristais de BthTX-I nativa formados após 11 dias depois da adição de óleo al's à solução de cristalização do poço.....	33
Figura 4 - Policristal de BthTX-I formado na presença do inibidor MMV após 10 dias.....	33
Figura 5 - Cristal irregular de BthTX-I formado na presença do inibidor MMV após 10 dias.....	34
Figura 6 - Cristal de BthTX-I obtido na presença do inibidor MMV após um período de doze dias e, posteriormente, submetido a experimentos de difração de raios-X.....	35
Figura 7 - Monocristais regulares de pequeno volume e cristais irregulares de BthTX-I obtidos na presença do inibidor MMV após um período de doze dias.....	35
Figura 8 - Policristal de BthTX-I obtido na presença do inibidor Ro-RA após um período de sete dias	36
Figura 9 - Policristais de BthTX-I obtidos na presença do inibidor Ro-RA após um período de vinte dias.....	36
Figura 10 - Policristal de PrTX-I obtidos na presença do inibidor Ro-RA após um período de quinze dias e, posteriormente, submetido a experimentos de difração de raios-X.....	37
Figura 11 - Policristais de PrTX-I obtidos na presença do inibidor Ro-RA após um período vinte de dias.....	38
Figura 12 - Mostra, por cores, os aminoácidos que estão alinhados da proteína submetida com a proteína MyotoxinII fhospolip.....	40
Figura 13 - Alinhamento em histograma.....	41
Figura 14 - Estrutura da proteína BthTX-I, arquivo (PDB 31989119) – programa Pymol.....	41
Figura 15 - Inibidor ácido rosmarínico (Ro-RA) - programa Pymol.....	42
Figura 16 - Inibidor clerodane diterpenoid - programa Pymol.....	43
Figura 17 - Visualização em estéreo da estrutura tridimensional final do inibidor Ro- RA.....	44

Figura 18 - Visualização em estéreo da estrutura tridimensional final do inibidor

MMV..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de difração de raios-X e processamento inicial das imagens do cristal de BthTX-I obtido na presença de MMV e do cristal de PrTX-I na presença de Ro-RA..... 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

kDa = Kilodaltons

PLA₂s = Fosfolipases A₂

pI = Ponto Isoelétrico

EDTA = “*Ethylenediamine tetraacetic acid*”

Ca = Cálcio

Asp = Ácido Aspártico

Lys = Lisina

Gly = Glicina ou Glicocola

Cys = Cisteína

MMV = 12-metóxi-4-metil-voachalotina

Ro-RA = Ácido Rosmarínico

USP = Universidade de São Paulo

PEG = Polietilenoglicol

ml = mililitros

μl = Microlitros

pH = Potencial Hidrogeniônico

°C = Grau Celsius

SP = São Paulo

ExPASy = “*Expert Protein Analysis System*”

HIC-Up = “*Hetero-compound Information Centre – Uppsala*”

MPD = 2-metil-2,4-pentanediol

mg = Miligramas

M = Massa Molar

Tris-HCl = Tris hidrocloreto

Li₂SO₄ = Sulfato de lítio

Linha MX-1 = Linha de Luz para Cristalografia de Macromoléculas

LNLS = Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

K = Kelvin

Å = Ångström

I = Intensidade

PDB = “*Protein Data Bank*”

HHpred = “*Protein homology detection and structure prediction by HMM-HMM comparison*”

HMM = “*Hidden Markov Model*”

SCOP = “*Structural Classification of Proteins*”

Bt-CD = *clerodane diterpenoid*

PM3 = “*Parametric Method 3*”

kcal = Quilocalorias

mol = Quantidade de Matéria

AMBER = “*Assisted Model Building with Energy Refinement*”

SUMÁRIO

Capítulo I.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
Capítulo II.....	17
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	18
2.1 Fosfolipases A ₂ e fosfolipases A ₂ homólogas.....	18
2.2 Moléculas inibidoras das atividades bioquímicas de toxinas botrópicas..	20
2.3 Cristalografia de proteínas e ferramentas computacionais teóricas.....	21
Capítulo III.....	24
3. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	25
Capítulo IV.....	26
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	27
4.1 Técnicas experimentais.....	27
4.1.1 Origem das toxinas e dos inibidores utilizados nos experimentos...	27
4.1.2 Experimentos de co-cristalização.....	27
4.1.3 Experimentos de difração de raios-x e obtenção de dados.....	28
4.2 Métodos computacionais teóricos.....	29
4.2.1 Estudo estrutural protéico e construção dos inibidores vegetais.....	29
4.2.2 Simulação de dinâmica molecular.....	29
Capítulo V.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Experimentos de cristalização.....	31
5.1.1 Cristalização da toxina botrópica BthTX-I nativa.....	31

5.1.2 Cristalização da toxina botrópica BthTX-I com inibidor MMV.....	33
5.1.3 Cristalização da toxina botrópica BthTX-I com inibidor Ro-RA....	35
5.1.4 Cristalização da toxina botrópica PrTX-I com inibidor Ro-RA.....	37
5.1.5 Coleta e processamento dos dados de difração de raios-X.....	38
5.2 Métodos computacionais teóricos.....	39
5.2.1 Estudo estrutural protéico.....	39
5.2.2 Construção dos inibidores vegetais.....	42
5.2.3 Simulações iniciais de <i>docking</i>	44
Capítulo VI	46
6. CONCLUSÃO.....	47
Referências Bibliográficas	48

CAPÍTULO I:

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As serpentes sempre despertaram curiosidade e fascínio entre os homens, o que pode ser comprovado pela influência destes animais em vários aspectos da vida humana (mitos, religião, símbolos). Este interesse também se refletiu na Ciência, com a conseqüente realização de muitos estudos a respeito das propriedades e componentes dos venenos de serpentes. A importância dada a tais estudos é claramente evidenciada pelo volume majoritário de artigos que tratam do estudo dos venenos destes animais e seus constituintes publicados em periódicos especializados em toxinologia [1].

No Brasil, o estudo dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* é especialmente relevante, uma vez que estes animais são responsáveis por mais de 70% dos acidentes ofídicos que ocorrem no país [2]. Além disso, em virtude da grande variedade de efeitos farmacológicos e bioquímicos apresentados pelas proteínas que compõem os venenos destes répteis, o estudo aprofundado destas toxinas pode ser grande utilidade para o desenvolvimento de novos medicamentos e produtos de interesse biotecnológico e na aquisição de novos e importantes dados a respeito de processos bioquímicos, fisiológicos e patológicos que ocorrem nos seres vivos. Um caminho que vem sendo utilizado para a obtenção de informações que possam permitir a concretização destes objetivos é o do estudo de complexos destas toxinas com inibidores, tanto naturais quanto sintéticos.

Nos fundamentos teóricos serão descritas as propriedades e atividades bioquímicas das fosfolipases A₂ e fosfolipases A₂ homólogas, duas classes de toxinas de elevado interesse científico encontradas em venenos botrópicos, além de alguns inibidores antiofídicos de origem vegetal que vem sendo estudados e caracterizados ao longo dos últimos anos. Do mesmo modo, serão mencionadas e discutidas as técnicas experimentais e teóricas que podem ser utilizadas para o estudo destas proteínas e de seus complexos com inibidores.

CAPÍTULO II:

Fundamentos

Teóricos

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 FOSFOLIPASES A₂ E FOSFOLIPASES A₂ HOMÓLOGAS

Um dos principais componentes dos venenos botrópicos são as fosfolipases A₂ (PLA₂s – E.C. 3.1.1.4). Estas substâncias são pequenas enzimas estáveis e cálcio-dependentes, com um peso molecular aproximado de 14 kDa, que promovem a hidrólise da ligação éster *sn*-2 de fosfolipídios, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos [3]. A superfamília das PLA₂s é composta por um conjunto de onze diferentes grupos que, a despeito de suas distribuições e ocorrências variadas, caracterizam-se por apresentar um alto grau de homologia seqüencial. A diferenciação entre estas moléculas somente pode ser realizada com base na localização de suas pontes dissulfeto e no comprimento de seus *loops* [4]. Cinco dessas classes (I, II, III, V e X) são abundantemente encontradas em uma grande variedade de fluidos biológicos, particularmente em secreções pancreáticas, exudatos inflamatórios e venenos de répteis e artrópodes [5]. As PLA₂s dos grupos I e II também são os componentes principais dos venenos de serpentes, sendo aquelas do segundo grupo os compostos predominantes dos venenos das serpentes pertencentes à família Viperidae (entre as quais também se incluem as espécies do gênero *Bothrops*) [5].

Apesar da pequena variação seqüencial e estrutural mencionada, as PLA₂s destacam-se pelo seu grande espectro de atividades biológicas, entre as quais incluem-se: neurotoxicidade, miotoxidade, cardiotoxidade, efeitos na agregação de plaquetas, ação anticoagulante, atividade convulsiva e hipotensiva, capacidade hemolítica e de indução de edema, entre outros efeitos [5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16]. Nossa equipe de pesquisa isolou duas moléculas representantes das PLA₂s: a BthTX-II e a BthA-I, ambas purificadas a partir do veneno de *Bothrops jararacussu* [14,17]. A BthTX-II é uma PLA₂ básica enzimaticamente ativa, miotóxica e com baixa atividade catalítica frente à fosfatidilcolina, um substrato lipídico [18]. Já a BthA-I é uma PLA₂ ácida (pI = 4,3) não-letal desprovida de atividade miotóxica ou citotóxica e que apresenta um poder de catálise três a quatro vezes superior a outras PLA₂s básicas miotóxicas presentes no veneno de *Bothrops jararacussu* (BthTX-I e II) ou em outros venenos de serpentes do gênero *Bothrops* [14]. Esta enzima também induz edema dependente de tempo (apesar de ser atóxica), o qual pode ser inibido pela presença de EDTA, e apresenta uma

atividade hipotensora em ratos, além de possuir a capacidade de inibir a agregação plaquetária [14].

Outro grupo de proteínas especialmente relacionadas às PLA₂s, também encontradas no veneno de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*, é aquele composto pelas PLA₂s homólogas ou Lys49-PLA₂s. Estas proteínas se diferenciam das demais PLA₂s por não possuírem atividade catalítica frente a substratos lipídicos. A razão da ausência de ação enzimática destas moléculas está relacionada a uma mutação específica responsável pela substituição de um resíduo de ácido aspártico (Asp) por outro de lisina (Lys), na posição 49 da cadeia polipeptídica [19,20,21]. A mutação em questão ocorre numa conhecida região de ligação de Ca⁺⁺ das PLA₂s cataliticamente ativas. Este íon, coordenado pelo resíduo Asp49, é responsável, conjuntamente com outros aminoácidos, pelo posicionamento do substrato no sítio enzimático das PLA₂s. Conforme alguns autores, a troca do resíduo Asp49 por uma lisina torna impossível a coordenação do íon Ca⁺⁺, o que conseqüentemente inviabiliza a ocorrência da reação catalítica [22]. Mais recentemente, foi sugerido que o resíduo Lys122 das Lys49-PLA₂s polariza a ligação peptídica entre os resíduos Gly29 e Cys30, favorecendo, desta forma, a retenção do produto da catálise no sítio ativo da proteína [23]. A não liberação deste produto explicaria, de acordo com os autores, a reduzida ou inexistente atividade catalítica desta classe de proteínas. Justamente em função da mutação mencionada, as PLA₂s homólogas são também conhecidas como Lys49-PLA₂s, enquanto que suas correspondentes enzimaticamente ativas são freqüentemente designadas como Asp49-PLA₂s.

Entre as Lys49-PLA₂s já isoladas e caracterizadas tanto funcionalmente quanto estruturalmente estão a BthTX-I de *Bothrops jararacussu* [24], a PrTX-I e PrTX-II de *Bothrops pirajai* [23,25], a MjTX-I e MjTX-II de *Bothrops moojeni* [26,27,28] e a BnSP-7 de *Bothrops neuwiedi* [29]. Um aspecto interessante a respeito destas toxinas e das Lys49-PLA₂s em geral é que todas as moléculas deste tipo já identificadas são básicas. Além disso, apesar da notória incapacidade das Lys49-PLA₂s de promover a hidrólise de substratos lipídicos, estas moléculas apresentam um pronunciado efeito miotóxico tanto *in vivo* quanto *in vitro* [9] e são capazes de romper membranas biológicas e sintéticas. Estas atividades aparentemente não são dependentes da ligação do íon Ca⁺⁺ ao sítio ativo, ao contrário do verificado no processo normal de catálise de lipídios [30,31]. Foi proposto, como forma de explicar estes fatos, que as regiões C-terminais das Lys49-PLA₂s seriam as responsáveis pelos mecanismos em

questão, por apresentarem uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos e básicos [32,33]. Aparentemente, tais regiões poderiam se insinuar através de membranas celulares ou artificiais, promovendo a desestabilização das camadas fosfolipídicas, ou atuariam como espécies de “âncoras”, possibilitando o contato de sítios protéicos reativos desconhecidos.

O aparente paradoxo relacionado à incongruência existente entre a uniformidade estrutural e o leque de ações farmacológicas e bioquímicas está na base do amplo interesse despertado pelas PLA₂s e PLA₂s homólogas na comunidade científica. As pequenas variações existentes entre estas moléculas facilitam a identificação de prováveis relações estruturais e funcionais, o que pode ser de extrema valia para o desenvolvimento de medicamentos e/ou derivados sintéticos com as mais variadas aplicações. No caso das PLA₂s, esta característica é especialmente importante, já que as moléculas desta classe encontradas em mamíferos atuam de maneira bastante ativa no estabelecimento de processos inflamatórios através da síntese de eicosanóides [34] e estão relacionadas a vários processos patológicos que ocorrem em humanos, tais como doenças inflamatórias degenerativas, mal de Alzheimer, mal de Parkinson e esquizofrenia [35,36,37,38]. Desta forma, estudos comparativos entre as Asp49-PLA₂s e Lys49-PLA₂s provenientes de venenos de serpentes e suas moléculas homólogas presentes em mamíferos também podem fornecer informações valiosas para uma melhor compreensão e controle destas doenças.

2.2 MOLÉCULAS INIBIDORAS DAS ATIVIDADES BIOQUÍMICAS DE TOXINAS BOTRÓPICAS

Vários estudos estruturais com toxinas de venenos de serpentes complexadas a moléculas inibidoras vêm sendo realizados ao longo dos últimos anos. Tanto substâncias naturais quanto outras de origem sintética incluem-se entre as inúmeras moléculas com propriedades inibitórias frente a venenos brutos de serpentes e/ou toxinas específicas já identificadas nestes trabalhos. Moléculas isoladas de plantas compõem a maioria destes compostos inibidores e possuem um enorme potencial para serem utilizadas como drogas ou modelos para o desenvolvimento de substâncias sintéticas que possam ser úteis para o tratamento de casos de envenenamento ofídico e inúmeras enfermidades. No Brasil, o estudo de moléculas inibidoras naturais obtidas a partir de plantas assume um papel estratégico, uma vez que somente 8% das espécies

vegetais brasileiras estão sendo sistematicamente analisadas com o intuito de se identificarem compostos bioativos [39]. Em um artigo científico publicado recentemente, foram listadas várias substâncias vegetais que apresentam propriedades inibitórias frente a venenos brutos e toxinas de várias serpentes da família Viperidae, incluindo-se aí muitas espécies do gênero *Bothrops* [39]. Várias destas substâncias são classificadas como compostos fenólicos (flavonóides, coumestanos, pterocarpanos e alcalóides), esteróides e terpenóides [39]. Assim, com base neste grande número de moléculas vegetais com propriedades antiofídicas, é bastante provável que um estudo aprofundado destes inibidores possa identificar importantes agentes terapêuticos e elucidar muitas questões referentes aos mecanismos de funcionamento de várias toxinas e outras moléculas a elas relacionadas.

2.3 CRISTALOGRAFIA DE PROTEÍNAS E FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS TEÓRICAS

Nos itens anteriores foram citados vários exemplos de proteínas de venenos de serpentes cujas conformações tridimensionais foram determinadas através da técnica de cristalografia. Isto demonstra a importância deste método experimental para o estudo das toxinas de serpentes, principalmente em função da acurácia das informações estruturais obtidas a partir dos experimentos de difração de raios-X. Contudo, devido ao aumento exponencial do número de seqüências de proteínas disponibilizadas em bancos de dados nos últimos anos, algumas ferramentas computacionais passaram a ter um papel relevante na execução de estudos estruturais e funcionais de moléculas protéicas. Estes *softwares*, que também vêm sendo otimizados e melhorados a uma velocidade crescente, são capazes de prever, construir e aperfeiçoar modelos tridimensionais teóricos de proteínas. No entanto, devido ao fato de não dependerem da produção de cristais protéicos para executarem a construção dos modelos (como é o caso da técnica de cristalografia), estes recursos computacionais se mostram bastantes úteis para a realização de estudos estruturais que envolvam um vasto número de proteínas e/ou complexos. Desta forma, estas ferramentas são ideais para o estudo de grande parte das proteínas cujas seqüências de aminoácidos já são conhecidas, mas que ainda não foram objeto de qualquer tipo de análise estrutural.

Dois dos recursos computacionais mais conhecidos e utilizados para a elaboração de modelos estruturais teóricos de proteínas são a modelagem por homologia

e as técnicas de *threading*. No primeiro método, uma molécula de estrutura não conhecida (*target*) é comparada com outra(s) que possua(m) uma estrutura tridimensional já determinada (*template*). Caso estas moléculas tenham um grau de identidade adequado, que depende basicamente do número de resíduos usado no alinhamento das duas seqüências, elas são consideradas homólogas, o que possibilita que as coordenadas espaciais da(s) molécula(s)-modelo (*template*) sejam utilizadas para a geração do modelo tridimensional teórico da molécula-alvo (*target*). Os métodos de *threading* (igualmente conhecidos como *fold recognition techniques*), por sua vez, não apenas se baseiam na identidade seqüencial para a execução do(s) alinhamento(s) necessário(s) à construção dos modelos estruturais teóricos, mas também no *fold* das moléculas envolvidas (no caso da molécula-alvo, a predição de sua estrutura secundária é realizada com base em sua seqüência de resíduos de aminoácidos). Ambos os métodos são bastante eficientes, porém as técnicas de *threading* parecem mostrar-se mais adequadas quando o grau de identidade entre a molécula-alvo e a(s) molécula(s)-modelo está aquém de valores considerados tradicionalmente mais adequados. Em alguns casos, a construção de modelos teóricos através do emprego de técnicas de *threading* foi realizada com sucesso mesmo quando os valores de identidade entre as moléculas utilizadas eram inferiores a 25% [40].

No caso específico do estudo das interações entre moléculas de inibidores e proteínas, a utilização de programas de *docking* e de simulação de dinâmica molecular é bastante importante. Os *softwares* de *docking* são responsáveis pelo “encaixe” de pequenas moléculas em sítios específicos de proteínas. Esta etapa é essencial para a identificação de moléculas com potencial de uso farmacológico e para a elaboração de drogas sintéticas baseadas nestes compostos, além de servir de ponto de partida para um estudo mais aprofundado a respeito das interações ligante/receptor por meio do emprego de *softwares* de simulação de dinâmica molecular. A execução destes processos de simulação de dinâmica molecular é crucial para a determinação de importantes parâmetros relativos ao real grau de estabilidade das interações entre inibidor e proteína inicialmente estabelecidas pelos programas de *docking*. Isto é possível devido ao controle das condições físico-químicas do meio onde ocorre a simulação e ao emprego de campos de força que ditam o tipo, grau e evolução temporal das interações que ocorrem entre as várias moléculas do sistema. É importante salientar que durante a simulação de dinâmica molecular também estão presentes no meio moléculas de solvente (água), o que não ocorre durante os processos de *docking*. Tal

fato é essencial para um estudo acurado das interações em questão, visto que as moléculas de água formam uma camada de solvatação em volta da proteína, o que afeta tanto a sua estrutura quanto a natureza dos seus contatos com eventuais inibidores.

CAPÍTULO III:

Objetivos do

Trabalho

3. OBJETIVOS DO TRABALHO

- i) Execução de ensaios de cristalização com a toxina botrópica BthTX-I nativa, co-cristalização com a toxina botrópica BthTX-I e os inibidores MMV e Ro-RA e co-cristalização com a toxina botrópica PrTX-I e o inibidor Ro-RA.
- ii) Coleta e processamento dos dados de difração de raios-X do cristal de BthTX-I obtido na presença do inibidor MMV e do cristal de PrTX-I obtido na presença do inibidor Ro-RA.
- iii) Treinamento em técnicas de bioinformática que inclui a construção de compostos com atividade inibitória e a realização de simulações iniciais de *docking* dos compostos inibidores vegetais, por meio do emprego de ferramentas computacionais teóricas.

CAPÍTULO IV:

Materiais e

Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

4.1.1 ORIGEM DAS TOXINAS E DOS INIBIDORES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

As toxinas botrópicas BthTX-I e PrTX-I foram purificadas e disponibilizadas pela equipe do Prof. Andreimar M. Soares, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP/Ribeirão Preto. Da mesma forma, a equipe de trabalho do Prof. Andreimar M. Soares foi responsável pelo fornecimento dos inibidores MMV e Ro-RA.

4.1.2 EXPERIMENTOS DE CO-CRISTALIZAÇÃO

A técnica utilizada nos experimentos de co-cristalização foi o *salting-out*. Esta consiste na preparação de uma solução de um agente precipitante (sal, PEG ou solvente orgânico) à qual serão adicionadas a proteína e a molécula inibidora de interesse. Em seguida, um aumento gradativo da concentração do agente precipitante fará com que o ponto de super saturação da proteína seja alcançado. Caso o processo seja conduzido de forma adequada, ocorrerá a precipitação e cristalização da proteína.

Um método bastante eficiente para o aumento gradativo da concentração do agente precipitante é aquele baseado na difusão de vapor. Neste método são colocadas, em um recipiente fechado, duas soluções que realizam trocas apenas pela fase gasosa. Uma das soluções contém um agente precipitante em alta concentração, enquanto que a outra é formada pelo mesmo agente e pela proteína e mais o composto que deverão formar o complexo desejado. Para tanto, pode-se utilizar o sistema denominado *hanging drop* (gota suspensa).

Neste sistema a gota suspensa é constituída pela solução que contém a proteína, a molécula inibidora e o precipitante, enquanto que a solução altamente concentrada do precipitante é colocada no recipiente. Deve-se lembrar que o volume do agente precipitante no recipiente (normalmente de 0,2-1,0 ml) é muito maior que o da lamínula (1-5 µl), podendo-se, desta maneira, considerar o volume do recipiente como infinito em relação à gota. A concentração final do agente precipitante da gota será,

portanto, após um período de um tempo suficientemente grande, igual ao do agente precipitante do recipiente, devido ao princípio de difusão gasosa.

Para que a cristalização de uma proteína ou complexo seja alcançada com sucesso, é necessário definir-se as melhores condições de crescimento dos cristais. Tais parâmetros são estabelecidos por meio da combinação de fatores como pH da solução de cristalização (daí a necessidade da adição de soluções-tampão às soluções que contêm proteína), concentração e tipo do agente precipitante utilizado (além de outros aditivos que também podem ser empregados) e temperatura do processo. Normalmente, o processo é executado sob temperatura constante (geralmente a 4°C ou 18°C), variando-se a concentração dos componentes da solução, tipos dos agentes precipitantes utilizados e pHs. Para tanto, pode-se utilizar o método da matriz esparsa [41] ou alguma variação desta metodologia, o que proporciona a verificação de um grande número de condições de cristalização (utilizando-se diferentes sais, precipitantes e pHs) em menos de uma centena de soluções.

Outras metodologias de cristalização, tais como o *macroseeding* (que consiste basicamente na colocação de um pequeno monocristal em uma solução estável de precipitante e proteína, com o intuito de promover o crescimento do mesmo) e a utilização de óleos nos reservatórios para diminuir a velocidade de crescimento dos cristais, entre outras técnicas, também poderão ser utilizadas para a obtenção de cristais de tamanho adequado.

4.1.3 EXPERIMENTOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X E OBTENÇÃO DE DADOS

Os dados de difração de raios-X correspondem às únicas informações experimentais para a elucidação de uma estrutura cristalográfica. Estes dados podem ser obtidos utilizando-se uma fonte de raios-X convencional, como um ânodo rotatório, ou utilizando-se raios-X provenientes de um síncrotron (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas - SP). Nestes equipamentos a coleta de dados é realizada por placas reutilizáveis de imagens com leitura a *laser*, que são ligadas, através de uma interface, a uma estação gráfica. Nesta é possível visualizar-se as imagens de difração de raios-X obtidas a partir do cristal utilizado no experimento e processar-se os dados para a obtenção das intensidades das reflexões obtidas e seus respectivos desvios padrão, que são as únicas medidas experimentais disponíveis para a determinação da estrutura tridimensional da(s) proteína(s) ou complexo(s) cristalizado(s). O

processamento destes dados e a obtenção de certas informações tais como a determinação do grupo espacial e parâmetros de rede do cristal foram realizados através da utilização do programa DENZO/SCALEPACK [42].

4.2 MÉTODOS COMPUTACIONAIS TEÓRICOS

4.2.1 ESTUDO A ESTRUTURAL PROTÉICO E CONSTRUÇÃO DOS INIBIDORES VEGETAIS

Algumas ferramentas computacionais passaram a ter um papel relevante na execução de estudos estruturais e funcionais de moléculas protéicas. Estes *softwares* são capazes de prever, construir e aperfeiçoar modelos tridimensionais teóricos de proteínas. Com a intenção de estudar a estrutura e origem da proteína botrópica BthTX-I, foi acessado o servidor ExPASy Proteomics (*Expert Protein Analysis System*) (<http://ca.expasy.org/>), que faz análise protéica. Outras análises dos dados foram feitas usando o programa Procheck [43].

Primeiramente, a construção dos compostos inibidores foi feita com o acesso ao servidor HIC-Up (*Hetero-compound Information Centre - Uppsala - Release 10.2*) (<http://xray.bmc.uu.se/hicup/>). Diante essas informações, utilizou-se o programa Pymol [44] para criar os modelos de inibidores. Com o acesso ao servidor The Dundee PRODRG2 (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>), foi feita a minimização da energia entre os átomos da molécula. Posteriormente, os inibidores Ro-RA e MMV foram construídos *in silico* através do emprego do programa HyperChem v.7.52 ®.

4.2.2 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

As simulações iniciais de *docking* para a validação dos modelos estruturais teóricos foram realizadas através do programa Hex v.4.5 [45] e em seguida com o programa AutoDock [46].

CAPÍTULO V:

Resultados e

Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTOS DE CRISTALIZAÇÃO

5.1.1 CRISTALIZAÇÃO DA TOXINA BOTRÓPICA BTHTX-I NATIVA

Uma vez que a amostra liofilizada de BthTX-I destinada para a execução deste projeto é distinta daquela cristalizada anteriormente em nosso laboratório, foram realizados novos experimentos de cristalização da forma nativa da toxina a fim de confirmar-se as condições de cristalização da toxina.

Para cristalização, se fez necessário uma busca das melhores condições precipitantes que atuam na nucleação e no crescimento dos cristais.

Foram analisados três parâmetros como variáveis principais que afetam a cristalização: pHs (tampões), aditivos (sais e/ou agentes orgânicos) e polímeros (polietileno glicol – PEG e 2-metil-2,4-pentanediol – MPD).

Inicialmente uma solução de proteína foi preparada com uma concentração de 12,0 mg/ml utilizando-se como solvente água destilada e deionizada. A técnica de cristalização utilizada foi a do tipo *hanging drop* [41] e os volumes empregados foram de 500 µl para o poço, 0,5 µl para a gota de proteína e 0,5 µl para a gota de solução do poço.

O melhor cristal foi encontrado na condição 30% PEG 4000; 0,1 M Tris HCl pH 8,5; 0,20 M Li₂SO₄, (figura 1).



Figura 1 - Maior policristal de BthTX-I nativa formado após 9 dias.

Devido à formação de policristais do tipo agulha maiores, a condição 30% PEG 4000; 0,1 M Tris HCl pH 8,5; 0,20 M Li₂SO₄ foi otimizada para a obtenção de cristais adequados para a realização de experimentos de difração de raios-X. Assim, para o crescimento de cristais maiores, o volume das novas gotas foi aumentado (1,0 µl da solução de proteína + 1,0 µl de solução do poço). Também foram testadas gotas compostas por 1,2 µl de solução de proteína e 0,8 µl de solução do poço. A partir deste segundo experimento foram obtidos os cristais mostrados na figura 2.

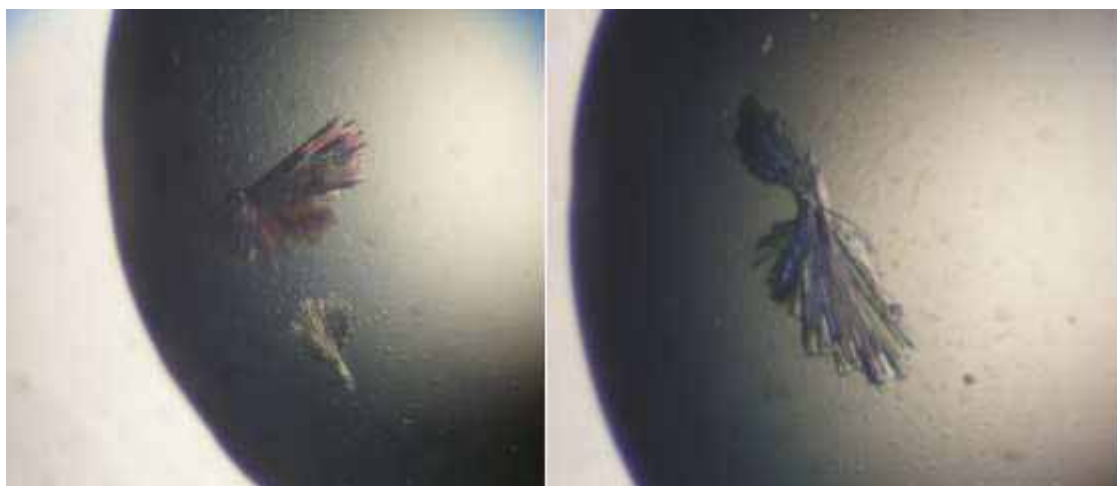


Figura 2 - Policristais de BthTX-I nativa em gotas com volume total de 2,0 µl formados após 10 dias.

Numa terceira etapa, foram adicionados 300 µl de óleo sobre a solução de poço de gotas com a mesma composição daquelas mostradas na figura 2. Tal procedimento foi executado com o intuito de desacelerar o estabelecimento do equilíbrio do sistema, permitindo, assim, o crescimento de um menor número de cristais. Para este fim, foram utilizados óleo de parafina, óleo al's (figura 3) e óleo de silicone. O emprego do óleo de parafina não apresentou bons resultados, porém a adição de óleo de silicone e óleo al's resultou no crescimento de policristais com dimensões e volumes maiores.

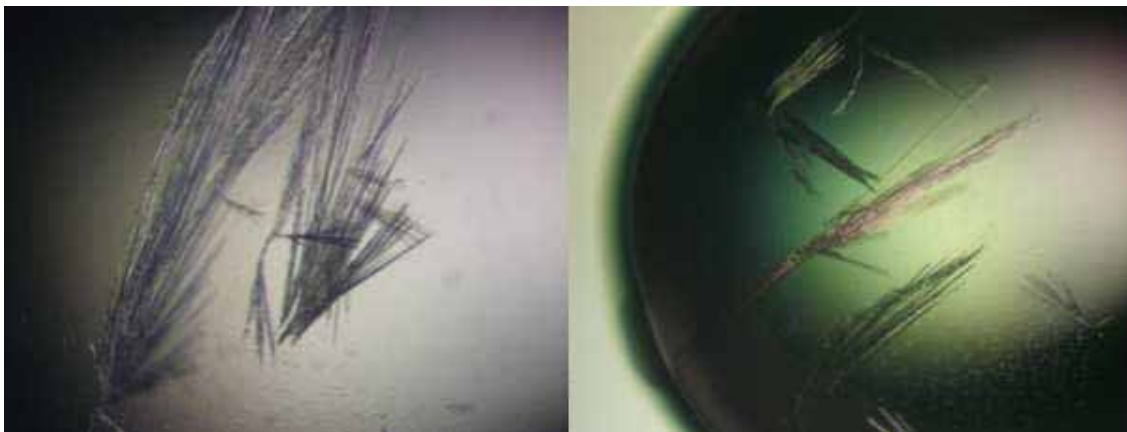


Figura 3 - Policristais de BthTX-I nativa formados após 11 dias depois da adição de óleo al's à solução de cristalização do poço.

5.1.2 CRISTALIZAÇÃO DA TOXINA BOTRÓPICA BHTX-I COM INIBIDOR MMV

Com base nos experimentos realizados com a BthTX-I nativa, foram realizados testes de co-cristalização da toxina com o inibidor MMV. Uma solução contendo 30% de PEG 4000, 0,1 M de Tris Hcl pH 8,5 e 0,2 M de Li_2SO_4 apresentou a formação de alguns policristais (figura 4) e cristais irregulares (figura 5).



Figura 4 - Policristal de BthTX-I formado na presença do inibidor MMV após 10 dias.



Figura 5 - Cristal irregular de BthTX-I formado na presença do inibidor MMV após 10 dias.

A tentativa de otimização dos cristais deu-se então através da variação da concentração dos componentes da solução de cristalização (26% a 36% de PEG 4000; 0,16 M a 0,26 M de Li_2SO_4 ; Tris HCl: 0,1 M a pH 8,1 e 0,1 M a pH 9,0). Em vista dos resultados obtidos nos experimentos de cristalização da proteína nativa, foram adicionados 300,0 μ l de óleo al's às soluções de poço de cada um destes testes.

Após um período de sete dias, verificou-se que o crescimento de cristais não ocorria nas soluções com concentração de 26% de PEG 4000. Com isso, foi possível inferir que o crescimento de cristais ocorria quando a concentração de PEG 4000 variava entre 34% e 28%, sendo que a 30% os cristais eram maiores em comparação a outros com um período de crescimento similar (uma ou duas semanas após a montagem das placas). Após quatorze dias a taxa de crescimento dos cristais diminuiu consideravelmente; cerca de um mês após o início dos experimentos o incremento das proporções dos mesmos foi desprezível de acordo com as observações feitas através de lupa.

A solução contendo 30% PEG 4000; 0,1 M Tris HCl pH 8,5; 0,22 M Li_2SO_4 (figura 6) possibilitou o crescimento de um cristal regular de grande volume que foi submetido a experimentos de difração de raios-X com sucesso. Outros cristais também foram obtidos nas seguintes condições: 32% PEG 4000; 0,1 M Tris HCl pH 8,5; 0,20 M Li_2SO_4 (monocristais regulares de pequeno volume) e 30% PEG 4000; 0,1 M Tris HCl pH 9,0; 0,20 M Li_2SO_4 cristais irregulares na condição (figura 7).



Figura 6 – Cristal de BthTX-I obtido na presença do inibidor MMV após um período de doze dias e, posteriormente, submetido a experimentos de difração de raios-X.



Figura 7 – Monocristais regulares de pequeno volume e cristais irregulares de BthTX-I obtidos na presença do inibidor MMV após um período de doze dias.

5.1.3 CRISTALIZAÇÃO DA TOXINA BOTRÓPICA BTHTX-I COM INIBIDOR RO-RA

Com base nos ensaios de cristalização da BthTX-I nativa, foram realizados múltiplos experimentos de co-cristalização da toxina com o inibidor Ro-RA, porém os resultados iniciais obtidos não foram promissores.

A solução de cristalização da toxina botrópica BthTX-I com inibidor Ro-RA (20% de PEG 4000; 0,1 M de citrato de sódio pH 5,6 e 20% de 2-propanol) foi estabelecida após diversos testes e emprego de variadas técnicas de cristalização (adição

de óleo no poço; diferentes temperaturas; diversos *screens* comerciais - comercializados pela Hampton Research - dentre outras).

Nesta condição descrita acima, um policristal foi formado (figura 8).

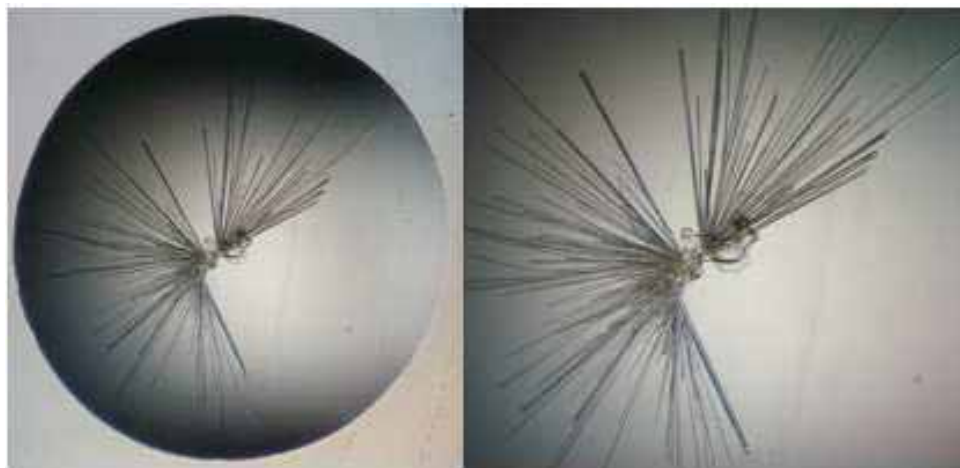


Figura 8 – Policristal de BthTX-I obtido na presença do inibidor Ro-RA após um período de sete dias .

Usando uma maior proporção de inibidor, 6 moléculas de inibidor : 1 monômero de proteína, a solução de cristalização contendo *20% de PEG 4000; 0,1 M de citrato de sódio pH 5,6; 18% de 2-propanol* propiciou a formação dos melhores cristais, figura 9. Esses cristais possuem boa dimensão e, por isso, são adequados para a realização dos experimentos de difração de raios-X. Esses experimentos já foram agendados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Campinas/SP).

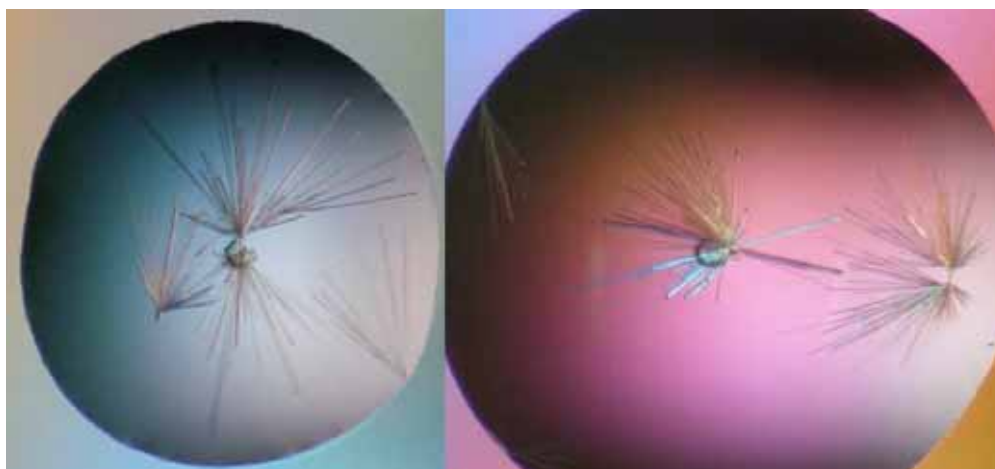


Figura 9 – Policristais de BthTX-I obtidos na presença do inibidor Ro-RA após um período de vinte dias.

5.1.4 CRISTALIZAÇÃO DA TOXINA BOTRÓPICA PRTX-I COM INIBIDOR RO-RA

Devido à grande semelhança entre as proteínas BthTX-I de *Bothrops jararacussu* e PrTX-I de *Bothrops pirajai*, já que ambas são Lys49-PLA₂s com estruturas e funcionamento bastante similar, e a disponibilidade da proteína em nosso laboratório, uma nova etapa do trabalho se iniciou com a cristalização da toxina botrópica PrTX-I com inibidor Ro-RA.

Com base nos ensaios anteriores de cristalização da proteína BthTX-I com o inibidor Ro-RA, foram feitos múltiplos experimentos de co-cristalização da toxina PrTX-I com o inibidor Ro-RA. Os resultados obtidos foram bastante promissores, pois, rapidamente, foi obtido um policristal (figura 10) de dimensões adequadas e assim foram realizados experimentos de difração de raios-X.

As soluções de cristalização contendo 20% de PEG 4000; 0,1 M de citrato de sódio pH 5,6; 22% de 2-propanol e 20% de PEG 4000; 0,1 M de citrato de sódio pH 5,6; 24% de 2-propanol propiciaram as formações dos melhores cristais.

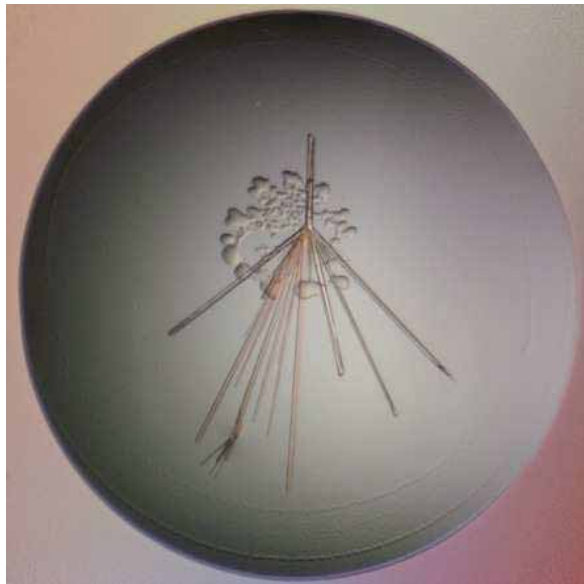


Figura 10 – Policristal de PrTX-I obtidos na presença do inibidor Ro-RA após um período de quinze dias e, posteriormente, submetido a experimentos de difração de raios-X.

Também usando uma maior proporção de inibidor, a solução de cristalização contendo 20% de PEG 4000; 0,1 M de citrato de sódio pH 5,6; 22% de 2-propanol propiciou a formação dos cristais mostardos na figura 11. Esses cristais possuem boa

dimensão e, por isso, são adequados para a realização dos experimentos de difração de raios-X. Esses experimentos já foram agendados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Campinas/SP).

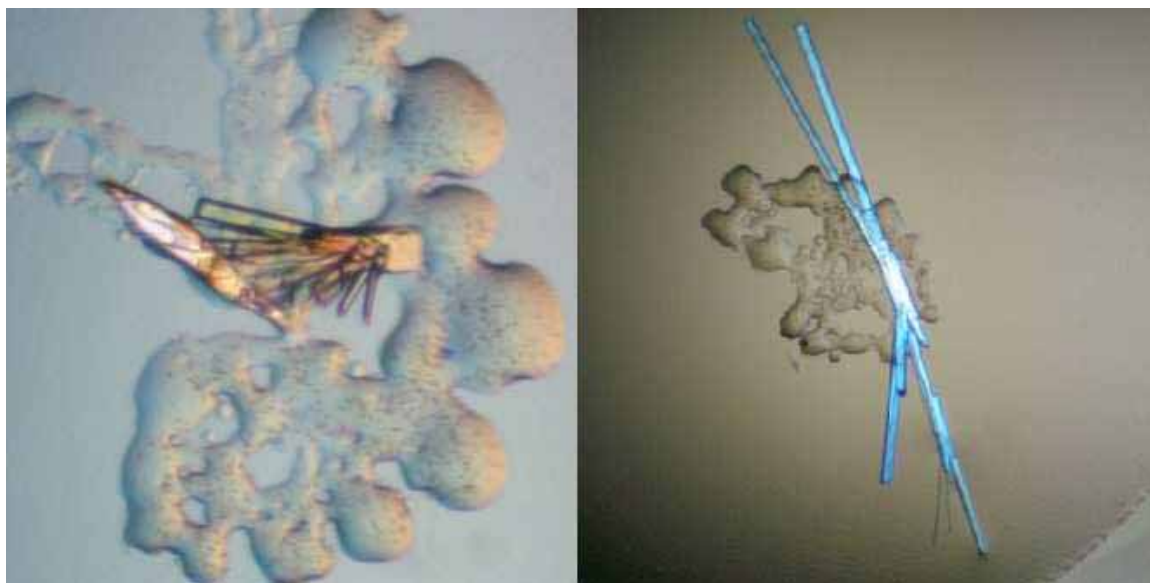


Figura 11 – Policristais de PrTX-I obtidos na presença do inibidor Ro-RA após um período vinte de dias.

5.1.5 COLETA E PROCESSAMENTO DOS DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

A coleta dos dados de difração de raios-X do cristal de BthTX-I obtido na presença do inibidor vegetal 12-metóxi-4-metil-voachalotina (MMV) e do cristal de PrTX-I na presença do inibidor ácido rosmarínico (Ro-RA) foi realizada com o emprego de radiação síncrotron, na linha MX-1 e MX-2, respectivamente, localizada nas dependências do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Campinas/SP). Os cristais foram acondicionados em um *loop* de *nylon* e congelados sob um fluxo de nitrogênio com temperatura de 100 K. As imagens foram obtidas através de uma placa de detecção de imagens MAR CCD (MAR research[®]) e apresentaram uma resolução aproximada de 1,9 Å para o cristal de BthTX-I e 2,55 Å para o cristal de PrTX-I. O processamento das imagens foi executado por meio dos programas DENZO e SCALEPACK [42]. Os dados referentes destes experimentos de difração e processamento das imagens são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados de difração de raios-X e processamento inicial das imagens do cristal de BthTX-I obtido na presença de MMV e do cristal de PrTX-I na presença de Ro-RA.

	BthTX-I /MMV	PrTX-I/Ro-RA
Cela unitária (Å)	a=55,73 b=55,73 c=127,80 $\gamma=120,00$	a=51,19 b=63,37 c=88,34 $\alpha=\beta=\gamma=90,00$
Grupo espacial	P3 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Resolução (Å)	40,0-1,95 (2,02-1,95) ^a	40,0-2,55 (2,64-2,55) ^a
Reflexões únicas	17206 (1698) ^a	17102(1447) ^a
Completeza (%)	98,2 (99,4) ^a	97,6 (90,1) ^a
R_{merge}^b (%)	9,9 (58,0) ^a	15,8 (55,5) ^a
Sigma <i>cutoff</i> (I) (processamento de dados)^c	-3,0	-3,0
I/σ (I)	13,9 (2,8) ^a	7,9 (2,04) ^a
Redundância	9,0 (9,1) ^a	3,0 (3,8) ^a

^a Números entre parênteses representam a faixa de mais alta resolução.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|)) / \sum_{hkl,i} \langle I_{hkl} \rangle$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual da reflexão com os índices de Miller h, k and l, e $\langle I_{hkl} \rangle$ é a intensidade média de cada reflexão. Calculado para $I > -3\sigma(I)$.

^c Processamento dos dados realizado com o pacote de programas HKL [42].

5.2 MÉTODOS COMPUTACIONAIS TEÓRICOS

5.2.1 ESTUDO ESTRUTURAL PROTÉICO

Com a finalidade de conhecer melhor a estrutura e origem das proteínas em estudo, que já têm estrutura elucidada, mas não têm seus dados depositados como PDB, foi acessado o servidor ExPASy Proteomics (*Expert Protein Analysis System*) (<http://ca.expasy.org/>), que faz análise protéica.

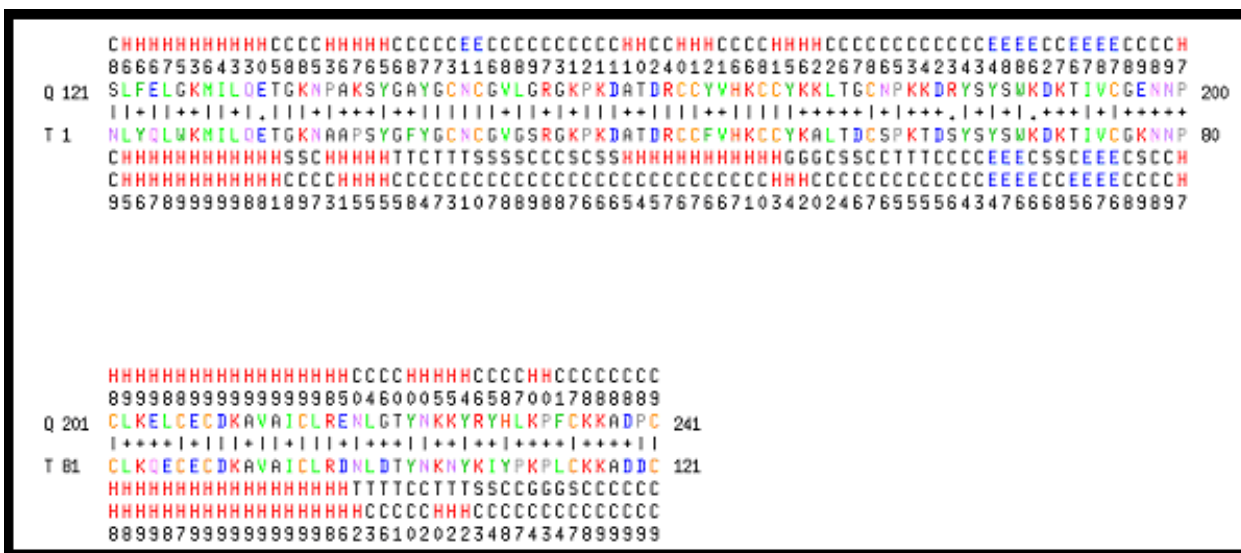


Figura 13 - Alinhamento em histograma.

Com essas informações, foi possível verificar que as duas proteínas comparadas têm homologia em 70% de suas estruturas e o modelo da proteína MyotoxinII fhospolip pode ser usado, com grande precisão, para a obtenção de um modelo teórico da estrutura da proteína BthTX-I.

Depois dessa avaliação, submetendo novamente o trabalho, é criado um modelo tridimensional. Com isso, um arquivo, no nosso caso (PDB 31989119), é gerado.

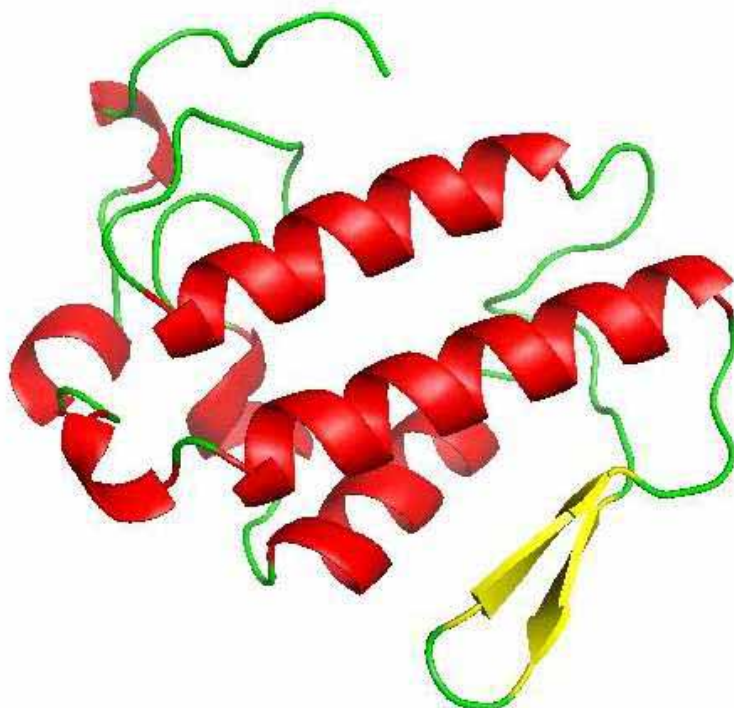


Figura 14 - Estrutura da proteína BthTX-I, arquivo (PDB 31989119) - programa Pymol [44]

Uma análise dos dados pode ser feita com o programa Procheck [43]. Nele, obtêm-se muitas informações sobre a estrutura das proteínas, através da geração de diagramas que auxiliam a modelagem manual. Um desses dados é o diagrama de Ramachandran que indica a disposição estereoquímica do modelo em relação aos ângulos ϕ e ψ dos aminoácidos – ligação peptídica.

5.2.2 CONSTRUÇÃO DOS INIBIDORES VEGETAIS

Inicialmente, a construção dos compostos inibidores foi feita com o acesso ao servidor HIC-Up (*Hetero-compound Information Centre - Uppsala - Release 10.2*) (<http://xray.bmc.uu.se/hicup/>), no qual foi possível obter informações sobre hetero-compostos encontrados em um banco de dados.

Diante essas informações, utilizou-se a função *builder* (“construção”) do programa Pymol [44] para criar os modelos de inibidores.

Com o acesso ao servidor The Dundee PRODRG2 (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>), foi possível converter pequenas moléculas inibidoras do formato PDB em formatos de topologia. Além disso, as coordenadas para os átomos do hidrogênio são, também, geradas. O mais importante feito nesse servidor é a minimização da energia entre os átomos da molécula.

Visando futuros teste de simulação para dinâmica molecular, foram construídos vários inibidores vegetais. Temos como exemplos os inibidores ácido rosmarínico (Ro-RA) e *clerodane diterpenoid* (Bt-CD), respectivamente figuras 15 e 16.

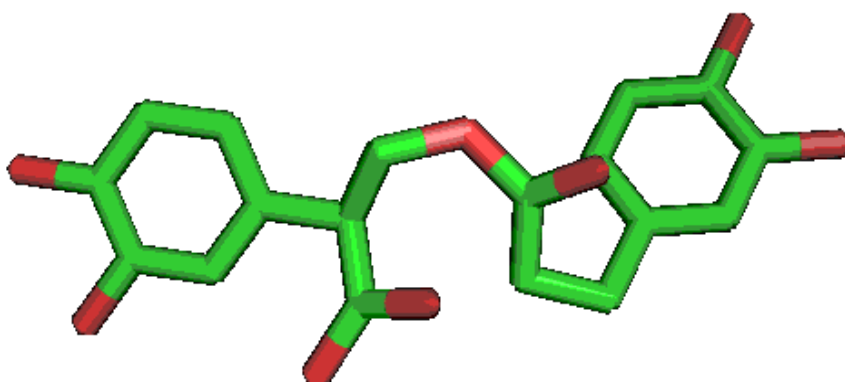


Figura 15 - Inibidor ácido rosmarínico (Ro-RA) - programa Pymol [44]

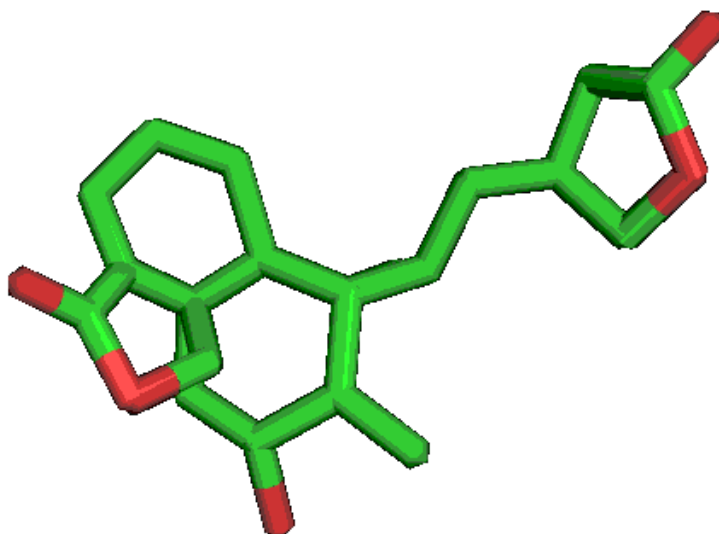


Figura 16 - Inibidor *clerodane diterpenoid* - programa Pymol [44]

Como os inibidores Ro-RA e MMV são de maior interesse para o aluno, uma nova fase do trabalho se iniciou com a construção *in silico* destes por um programa mais poderoso, o programa HyperChem v.7.52[®].

Para tanto, modelos iniciais dos compostos com todas as moléculas de hidrogênio foram gerados após o desenho das moléculas utilizando-se a interface gráfica do programa. Então, uma otimização de geometria dos modelos iniciais foi realizada utilizando-se o método semi-empírico PM3 [47] até um gradiente de 0,01 kcal/(Å.mol). Em seguida, uma nova otimização de geometria dos modelos foi executada em uma caixa periódica contendo moléculas de água explícitas. Os modelos finais foram minimizados em um campo dielétrico constante também até um gradiente de 0,01 kcal/(Å.mol), por meio do campo de força AMBER [48] presente no próprio programa. Ambas as otimizações de geometria foram executadas através do algoritmo Polak-Ribiere, o qual é bastante adequado para a minimização de uma grande variedade de sistemas, uma vez que ele calcula uma série de ciclos ou buscas unidimensionais através de gradientes conjugados de forma bastante rápida. Tais procedimentos visaram a construção de modelos realísticos dos inibidores para a realização de cálculos de *docking* entre os mesmos e os modelos cristalográficos das toxinas BthTX-I e BthTX-II. Os modelos tridimensionais finais dos inibidores são mostrados nas figuras 17 e 18.

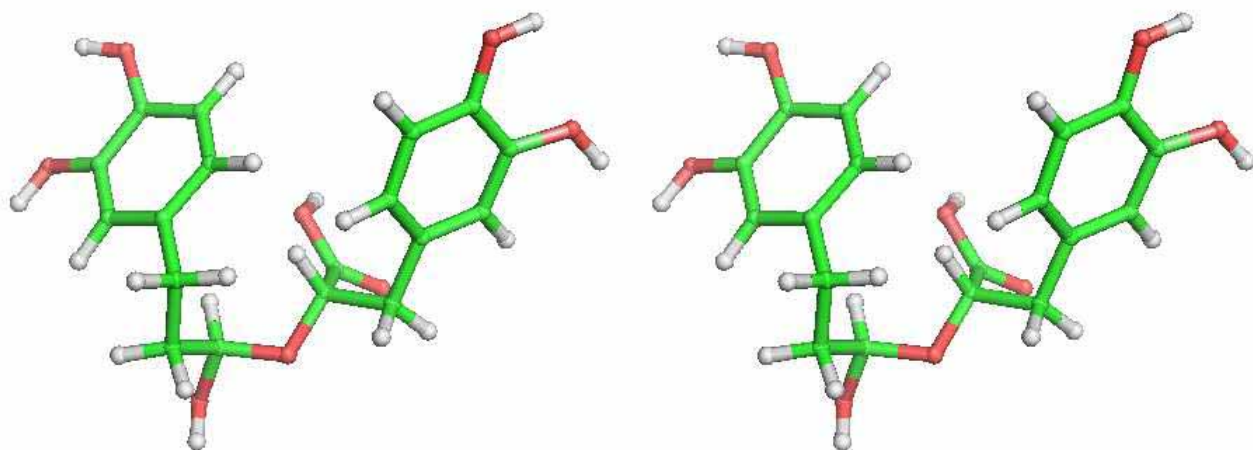


Figura 17 - Visualização em estéreo da estrutura tridimensional final do inibidor Ro-RA [44].

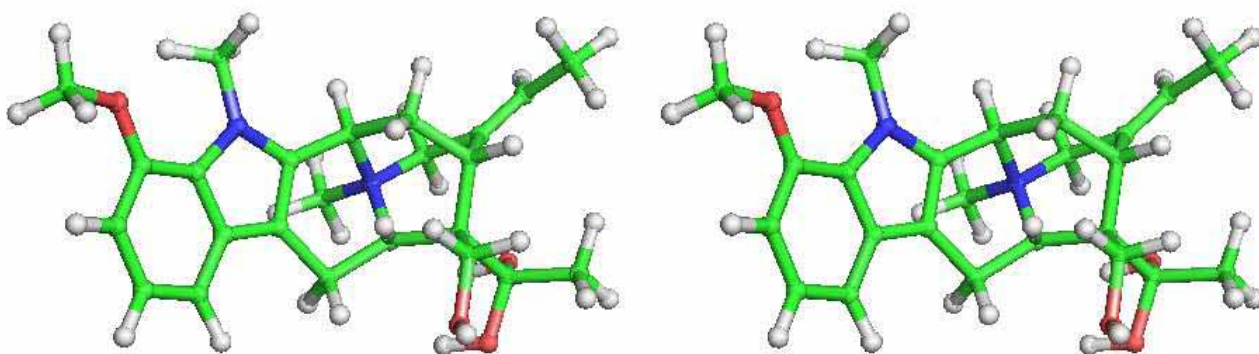


Figura 18 - Visualização em estéreo da estrutura tridimensional final do inibidor MMV [44].

5.2.3 SIMULAÇÕES INICIAIS DE DOCKING

As simulações iniciais de *docking* foram realizadas através do programa Hex v.4.5 [45] utilizando-se os modelos dos inibidores e as estruturas cristalográficas da BthTX-I [49] e BthTX-II [50]. O resultado dos cálculos, porém, não indicou a existência de sítios de ancoragem para os inibidores, apesar da clara existência de sítios positivamente carregados na superfície das duas estruturas.

Com base nisso, estamos realizando novos *screenings* de *docking* molecular com o programa AutoDock [46]. Este programa, ao contrário do Hex, possibilita o estabelecimento de certos graus de flexibilidade às superfícies das moléculas receptoras. Os testes realizados até o momento vêm se mostrando promissores, o que nos permite acreditar que obteremos complexos próximos daqueles presentes *in vitro* e *in vivo*.

Eventualmente, nos casos em que os *dockings* moleculares não sejam satisfatórios, realizaremos de dinâmica molecular com os inibidores em posições próximas aos sítios com maior potencial de complexação nas toxinas. Desta forma, poderemos avaliar o possível grau de afinidade dos inibidores aos sítios ativos da BthTX-I e BthTX-II e inferir possíveis relações estruturais-funcionais que ajudem a elucidar o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) estas moléculas vegetais são capazes de inibir muitas das propriedades farmacológicas das duas toxinas botrópicas em questão.

CAPÍTULO VI:

Conclusão

6. CONCLUSÃO

A cristalização da toxina botrópica BthTX-I nativa foi feita para o aperfeiçoamento da técnica pelo aluno e para testar qual a condição de cristalização ideal desta nova amostra de BthTX-I, que foi utilizada nos experimentos seguintes de co-cristalização.

Pela cristalização da toxina botrópica BthTX-I com o inibidor MMV, foram obtidos monocristais de boa dimensão que, quando submetidos a experimentos de difração de raios-X, apresentaram imagens com uma resolução aproximada de 1,9 Å. Após o processamento das imagens e refinamento foi revelada a não ligação do inibidor MMV com a proteína BthTX-I, provavelmente pela sua pequena concentração frente a concentração protéica, por isso os novos experimentos de cristalização estão sendo feitos com maior concentração de inibidor.

Devido à baixa qualidade dos dados estatísticos de difração de raios-X do cristal obtido na presença do inibidor ácido rosmarínico, foram crescidos novos cristais das toxinas botrópicas BthTX-I e PrTX-I com inibidor Ro-RA que, no mês de julho, serão submetidos a experimentos de difração de raios-X no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) (Campinas/SP).

A construção dos inibidores foi importante para o nosso grupo de pesquisa que estuda fosfolipases e para os trabalhos de simulação e dinâmica molecular. Com a construção e aperfeiçoamento de modelos tridimensionais teóricos dos inibidores, através dos *softwares* citados no trabalho, é possível tentar a realização de estudos estruturais com complexos envolvendo as toxinas botrópicas BthTX-I (Lys49-PLA₂) e BthTX-II (Asp49-PLA₂). Estas ferramentas de construção e aprimoramento se mostraram ideais para o estudo dessas substâncias cujas formulas já são conhecidas, mas as sua informações ainda não foram depositados em banco de dados.

As simulações iniciais de *docking* realizadas não indicaram a existência de sítios de ancoragem para os inibidores, apesar da clara existência de sítios positivamente carregados na superfície das duas estruturas, por isso estamos realizando novos *screenings* de *docking* molecular com o programa AutoDock.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- [1] Guimarães, J. A.; Carlini, C. R. **Toxicon**, v.4, p.345-359, 2004.
- [2] Fundação Nacional de Saúde. Manual de Diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Ministério da Saúde-Brasil, 112 pp., 2001.
- [3] Waite, M. **Handbook of Lipid Research**. New York: Plenum Press, 1987.
- [4] Dennis, E. A. **J. Bio. Chem.**, v.269, p.13057-13060, 1994.
- [5] Rosenberg, P. In: Shyer, W. T.; Mebs, D. (Eds.). **Handbook of toxinology**. New York: Dekker, 1990, p.67-277.
- [6] Kini, R. M.; Evans, H. J. **Toxicon**, v.27, p.613-635, 1989.
- [7] Evans, H. J.; Kini, R. M. In: Kini, R. M. (Ed), **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. Chichester: Wiley, 1997. p.1-28.
- [8] Kini, R. M. In: Kini, R. M. (Ed), **Venom Phospholipases A₂ Enzymes: structure, function and mechanism**. Chichester: Wiley, 1997. p.1-28.
- [9] Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. In: Kini, R. M. (Ed), **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. Chichester: Wiley, 1997. p.321-352.
- [10] Ownby, C. L. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, v.17, p.1003-1009, 1998.
- [11] Braud, S.; Bon, C.; Wisner, A. **Biochimie**, v.82, p.851-859, 2000.
- [12] Valentin, E.; Lambeau, G. **Biochimie**, v.82, p.815-831, 2000.
- [13] Andrião-Escarso, S. H.; Soares, A. M.; Rodrigues, V. M. et al. **Biochimie**, v.82, p.755-763, 2000.
- [14] Andrião-Escarso, S. H.; Soares, A. M.; Fontes, M. R. M. et al. **Biochem. Pharmacol.**, v.64, p.723-732, 2002.
- [15] Soares, A. M.; Sestito, W. P.; Marcussi, S. et al. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.C36, p.258-270, 2004.
- [16] Kini, R. M. **Toxicon**, v.45, p.1147-1161, 2005.
- [17] Pereira, M. F.; Novello, J. C.; Cintra, A. C. et al. **J. Protein Chem.**, v.17, p.381-386, 1998.
- [18] Gutiérrez, J. M.; Nunez, J.; Díaz, C. et al. **Exp. Mol. Pathol.**, v.55, p.217-229, 1991.
- [19] Marangone, J. M.; Merutka, G; CHO, W. et al. **J. Biol. Chem.**, v.259, p.13839-13843, 1984.
- [20] Liu, S. Y.; Yoshizumi, K.; Oda, N. et al. **J. Biochem.**, v.107, p.400-408, 1990.
- [21] Francis, B.; Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. et al. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.284, p.352-359, 1991.
- [22] Scott, D. L.; Achari, A.; Vidal, J. C. et al. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.22645-22657, 1992.
- [23] Lee, W. H.; da Silva-Giotto, M. T.; Marangoni, S. et al. **Biochemistry**, v.40, p.28-36, 2001.
- [24] da Silva-Giotto, M. T.; Garrat, R. C.; Oliva, G. et al. **Prot. Struc. Func. Gen.**, v.30, p.442-454, 1998.
- [25] de Azevedo Jr., W. F.; Ward, R. J.; Canduri, F. et al. **Toxicon**, v.36, p.1395-1406, 1998.

- [26] Soares, A. M.; Guerra-Sá, R.; Borja-Oliveira, C. R. et al. **Arch. Bioch. Biophys.**, v.378, p.201-209, 2000.
- [27] Marchi-Salvador, D. P.; Silveira, L. B.; Soares, A. M. et al. **Acta Crystallogr.**, v.F61, p.882-884, 2005
- [28] Watanabe, L.; Soares, A. M.; Ward, R. J. et al. **Biochemie**, v.87, p.161-167, 2005.
- [29] Magro, A. J.; Murakami, M. T.; Marcussi, S. et al. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.323, p.24-31, 2004.
- [30] Rufini, S.; Cesaroni, P.; Desideri, R. F. et al. **Biochemistry**, v.31, p.12424-12430, 1992.
- [31] Díaz, C.; Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.298, p.135-142, 1992.
- [32] Lomonte, B.; Moreno, E.; Tarkowski, A. et al. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.29867-29873, 1994.
- [33] Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. **Toxicon**, v.33, p.1405-1424, 1995.
- [34] Needleman, P.; Turk, J.; Jakschik, B. A. et al. **Annu. Rev. Biochem.**, v.55, p.69-102, 1986.
- [35] Noponen, M.; Sanfilipo, N.; Saminich, K. et al. **Biol. Psychiatry**, v.34, p.641-649, 1993.
- [36] Ross, B. M.; Hudson, C.; Erlich, J. et al. **Arch. Gen. Psychiatry**, v.54, p.487-494, 1997.
- [37] Ross, B. M.; Mamalias, N.; Moszczynska, A. et al. **Neuroscience**, v.102, p.899-904, 2001.
- [38] Bazan, N. G.; Colangelo, V.; Lukiw, W. J. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v.68-69, p.197-210, 2002.
- [39] Soares, A. M.; Tici, F. K.; Marcussi, S. et al. **Curr. Med. Chem.**, v.12, p.2626-2641, 2005.
- [40] Bourne, P. E.; Weissig, H. *Structural Bioinformatics*. New York: Wiley and Sons, 2002.
- [41] Jancarik, J.; Kim, S. H. **J. Appl. Crystallogr.**, v.24, p.409-411, 1991.
- [42] Otwinowski, Z.; Minor, W. **Methods Enzymol.**, v.276, p.307-326, 1997.
- [43] Laskowski R. A.; Arthur M. W. M.; Smith D. K. et al. **PROCHECK v.3.5**. Abr. 1998.
- [44] Delano, W.S. **The PyMOL molecular graphics system**. San Carlos: Delano Scientific, 2002.
- [45] Ritchie, D.W. **Proteins: Struct. Funct. Genet.**, v.52, p.98-106, 2003.
- [46] Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S. et al. **J. Computational Chemistry**, v.19, p.1639-1662, 1998.
- [47] Stewart, J.J.P. **J. Computer-Aided Molecular Design**, v.4, p.1-105, 1990.
- [48] Cornell, W.D.; Cieplak P.; Bayly, C.I.; et al. **J. Am. Chem. Soc.**, v.117, p.5179-5197, 1995.
- [49] da Silva-Giotto, M.T.; Garrat, R.C.; Oliva, G. et al. **Protein Struct. Func. Gen.**, v.30, p.442-454, 1998.
- [50] Corrêa, L.C.; Marchi-Salvador, D.P.; Cintra, A.C.O. et al. **Acta Cryst.**, v.F62, p.765-767, 2006.