

ANTONIEL AUGUSTO SEVERO GOMES

**ESTUDO COMPUTACIONAL DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DAS
MIOTOXINAS LYS49 DE SERPENTES (Família: Viperidae): MODELOS
MOLECULARES PARA CITOTOXICIDADE E MIOTOXICIDADE**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

João Pessoa – PB

2014

ANTONIEL AUGUSTO SEVERO GOMES

**ESTUDO COMPUTACIONAL DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS DAS
MIOTOXINAS LYS49 DE SERPENTES (Família: Viperidae): MODELOS
MOLECULARES PARA CITOTOXICIDADE E MIOTOXICIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular do Centro de Ciências Exatas e
da Natureza, da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos para
obtenção do título de **MESTRE EM
BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

Orientador: Prof. Dr. Plínio Delatorre

João Pessoa – PB

2014

G633e Gomes, Antoniel Augusto Severo.

Estudo computacional dos efeitos farmacológicos das
miotoxinas Lys49 de serpentes (Familia:Viperidae): modelos
moleculares para citotoxicidade e miotoxicidade / Antoniel Augusto
Severo Gomes.- João Pessoa, 2014.

130f. : il.

Orientador: Plínio Delatorre

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN

1. Biologia celular e molecular. 2. Miotoxinas Lys49.
3.Citotoxicidade. 4. VERGFR-II. 5. Docking moleculares.

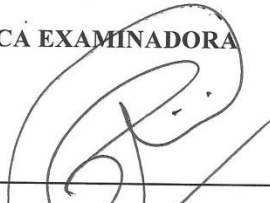
UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)

Antoniél Augusto Severo Gomes

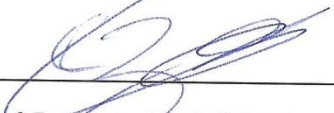
Dissertação de Mestrado avaliada em 14/08/2014

BANCA EXAMINADORA

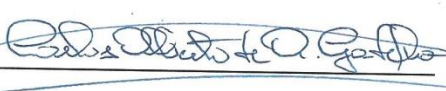


Prof. Dr. Plínio Delatorre

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da Paraíba
Orientador



Prof. Dr. Clayton Zambeli Oliveira
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo



Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno

Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima
Universidade Federal da Paraíba
Suplente Interno

Profa. Dra. Gláucia Marques Freitas Ribeiro
Universidade Federal da Paraíba
Suplente Externo

À minha base de equilíbrio emocional,
moral, fonte de inspiração e
conhecimento: meus genitores.

“A ciência é um empreendimento cooperativo, abrangendo gerações. É a passagem de uma tocha de professor para aluno, para professor. Uma comunidade de mentes, estudando a antiguidade e a caminho das estrelas.”

(Neil deGrasse Tyson)

AGRADECIMENTOS

A meus pais Antônio Gomes Basto e Rosilene Alves Severo, peças chave nas minhas conquistas e superações, por sempre acreditarem no meu potencial e me impulsionarem na minha caminhada na vida através de esforços inimagináveis;

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), por me incentivarem de modo a dedicar-me integralmente aos meus estudos;

A Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), por fornecerem a estrutura necessária para meu aprofundamento acadêmico;

Ao Prof. Dr. Plínio Delatorre, por ter me introduzido na área da biologia molecular, a qual tive grande afinidade;

Aos professores do programa que participaram direta ou indiretamente na minha formação acadêmica, notadamente a Profa. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira e Prof. Dr. Sávio Torres de Farias, por participarem das disciplinas mais importantes do programa compartilhando ativamente seus conhecimentos;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha e à Profa. Dra. Tatiane Santi Gadelha, em especial, por me inspirarem com sua solidariedade e agirem com paciência e razão em momentos difíceis;

A Anne Ludmilla Maul de Souza, por se mostrar disponível por não só desempenhar sua função, mas estendê-la sempre que necessário, constituindo assim uma excelente secretária para o PPGBCM;

A minha companheira Vanessa Pamela Oliveira Rodrigues, por compartilhar momentos e sempre me apoiar e incentivar a atingir meus objetivos;

A meus companheiros de turma 2012.1, pelas emoções e troca de conhecimentos ao longo do curso;

RESUMO

Acidentes ofídicos constituem um problema endêmico global, e o estudo de seus componentes é importante para compreender e preveni-los. Dentre seus componentes, fosfolipases A₂ têm sido fortemente estudadas, bem como as miotoxinas Lys49. Contudo, o entendimento dos mecanismos moleculares que promovem seus efeitos farmacológicos permanece controverso até hoje. O presente trabalho buscou estudar os determinantes estruturais dos efeitos farmacológicos das miotoxinas Lys49, enfaticamente seus efeitos citotóxicos e miotóxicos. Foram realizados testes de análise de sequências entre tais proteínas, bem como dockings moleculares entre a miotoxina Bn IV e o VEGFR-II e diferentes moléculas aniônicas, como fosfato, heparina e lipopolissacarídeo. As análises das sequências apresentaram regiões bem definidas dentro do grupo das miotoxinas Lys49, notadamente regiões catiônicas. Em concordância com isto, os dockings moleculares realizados neste trabalho apontam para a presença de um sítio não-específico para cargas aniônicas, bem como um sítio de reconhecimento para heparina. Já os dockings moleculares entre a miotoxina Bn IV e o VEGFR-II foram satisfatórias e apontaram a cauda C-terminal como uma importante região de interação. Tais resultados determinam regiões catiônicas importantes para a realização dos efeitos citotóxicos, através do reconhecimento de fosfolipídios aniônicos, e trazem uma nova abordagem molecular para os efeitos miotóxicos, via VEGFR-II. Além disso, são apresentados modelos moleculares para os efeitos citotóxicos e miotóxicos das miotoxinas Lys49.

Palavras-chave: miotoxinas Lys49, citotoxicidade, miotoxicidade, VEGFR-II, dockings moleculares

ABSTRACT

Snakebites are and global endemic problem and the study of its components is important to understand and prevent them. Among its components, phospholipase A2 have been strongly studies as Lys49 myotoxins. However, understanding the molecular mechanisms of its pharmacological effects remains controversial until now. This work studied the Lys49 myotoxins pharmacological structural determinants, emphasizing cytotoxic and myotoxic effects. Protein sequence analysis as well as molecular docking with myotoxin Bn IV and VEGFR-II receptor and different anionic molecules, such as phosphate, heparin and lipopolysaccharide were performed. Sequence analyses showed defied regions within Lys49 myotoxins group, especially cationic regions. In accordance with this, molecular dockings performed in this work observed the presence of anionic non-specific sites, also a heparin recognition site. Molecular dockings between myotoxin Bn IV and VEGFR-II were satisfactory and indicated C-terminal tail as an important interactive region. Our results determine cationic regions as important for cytotoxic effects and bring a new molecular approach to the myotoxic effects, via VEGFR-II. In additional, molecular cytotoxic and myotoxic models for myotoxic Lys49 were presented.

Keywords: Lys49 myotoxins, cytotoxicity, myotoxicity, VEGFR-II, molecular docking

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Sítios de catálise para as fosfolipases.....	04
FIGURA 2: Representação estrutural das PLA ₂ s.....	15
FIGURA 3: Representação das PLA ₂ s do Grupo I Grupo II.....	16
FIGURA 4: Representação do mecanismo de ação das PLA ₂ s.....	18
FIGURA 5. Representação eletrostática da BthA-I e BthTX-I.....	25
FIGURA 6. Representação dos modelos de citotoxicidade e miotoxicidade das miotoxinas Lys49.....	27
FIGURA 7. Representação da superfície de todas as solução entre a Bn IV e diheparina.....	35
FIGURA 8. Representação da solução -276, entre a Bn IV e diheparina.....	36
FIGURA 9. Representação da solução -247, entre a Bn IV e diheparina.....	37
FIGURA 10. Representação das soluções -220 e -274 entre a Bn IV e diheparina.....	38
FIGURA 11. Representação das soluções -218, -223, -225, -229, -233 e -238 entre a Bn IV e diheparina.....	38
FIGURA 12. Representação da solução -299 entre a Bn IV dimérica e diheparina.....	39
FIGURA 13. Representação da solução -230 entre a Bn IV dimérica e diheparina.....	40
FIGURA 14. Representação da solução -222 entre a Bn IV dimérica e diheparina.....	40
FIGURA 15. Representação da solução -210 entre a Bn IV dimérica e diheparina.....	41
FIGURA 16. Representação das soluções -217 e -222 entre a Bn IV dimérica e diheparina.....	42
FIGURA 17. Representação das soluções -230, -204 e -202 entre a Bn IV e diheparinas.....	42
FIGURA 18. Representação da solução -213 e -299 entre a Bn IV dimérica e diheparina.....	43
FIGURA 19. Representação da solução -208 entre a Bn IV dimérica e diheparina.....	44

FIGURA 20. Representação das cavidades identificadas na Bn IV utilizando o programa MVD.....	44
FIGURA 21. Representação da cavidade 'KKYRY' monomérica com as soluções 1 e 2.....	45
FIGURA 22. Representação da cavidade C-terminal/Hélice II monomérica com as solução 1 e 2.....	46
FIGURA 23. Representação da cavidade hidrofóbica monomérica com as solução 1 e 2.....	47
FIGURA 24. Representação da cavidade 4 monomérica com as soluções 1 e 2.....	47
FIGURA 25. Representação da cavidade KKYRY-1 dimérica com as soluções 1 e 2.....	48
FIGURA 26. Representação das cavidades KKYRY dos dois grupos de soluções.....	49
FIGURA 27. Representação da cavidade intermolecular com as soluções 1 e 2.....	50
FIGURA 28. Representação das soluções dos dockings entre fosfato e a Bn IV monomérica.....	51
FIGURA 29. Representação das soluções dos dockings entre fosfato e a Bn IV dimérica.....	52
FIGURA 30. Representação de todas soluções dos dockings entre lipopolissacarídeo e a Bn IV monomérica.....	53
FIGURA 31. Representação da solução -601 entre a Bn IV monomérica e LPS.....	53
FIGURA 32. Representação da solução -435 entre a Bn IV monomérica e LPS.....	54
FIGURA 33. Representação da solução -419 entre a Bn IV monomérica e LPS.....	54
FIGURA 34. Representação da solução -406 entre a Bn IV monomérica e LPS.....	55
FIGURA 35. Representação da solução -397 entre a Bn IV monomérica e LPS.....	56
FIGURA 36. Representação da solução -390 entre a Bn IV monomérica e LPS.....	56
FIGURA 37. Representação da solução -384 entre a Bn IV monomérica e LPS.....	57
FIGURA 38. Representação da solução -369 entre a Bn IV monomérica e LPS.....	58

FIGURA 39. Representação das soluções -378 e -373 entre a Bn IV monomérica e LPS.....	58
FIGURA 40. Representação das soluções geradas no sítio KKYRY do monômero B entre a Bn IV monomérica e LPS.....	60
FIGURA 41. Representação das soluções geradas no sítio KKYRY do monômero A entre a Bn IV monomérica e LPS.....	61
FIGURA 42. Representação das soluções geradas no sítio 'KKYRY' do monômero A entre a Bn IV monomérica e LPS.....	61
FIGURA 43. Representação das soluções dos dockings entre decaheparina e a Bn IV dimérica.....	63
FIGURA 44. Representação da solução do docking realizado no HEX 6.3 entre a Bn IV e o receptor VEGFR-II.....	64
FIGURA 45. Representação da solução do docking realizado no HEX 6.3 entre a Bn IV e o receptor VEGFR-II.....	65
FIGURA 46. Representação das soluções dos dockings entre a cauda C-terminal da Bn IV e o receptor VEGFR-II.....	65
FIGURA 47. Representação das soluções dos dockings entre a cauda C-terminal da Bn IV e o receptor VEGFR.....	66
FIGURA 48. Representação das soluções dos dockings entre a cauda C-terminal da Bn IV e o receptor VEGFR.....	67
FIGURA 49. Representação da substituição da cauda C-terminal pela Bn IV completa, realizada pelo Coot.....	68
Figura 50. Representação das estruturas secundárias da miotoxina Bn IV.....	73
Figura 51. Modelo hipotético do 'Mecanismo do Abraço' das miotoxina Lys49 do Grupo II.....	76
FIGURA 52. Representação eletrostática da miotoxina de <i>Bothrops neuwiedi</i>	77

FIGURA 53. Comparação de peptídeos bactericida com a miotoxina Bn IV e a fosfolipase BthA-I.....	78
Figura 54. Representação da estabilização realizada pelo resíduo Met8 à β -asa e Hélice III da miotoxina Bn IV.....	81
FIGURA 55. Caracterização da interação entre o VEGF e seu receptor VEGFR-II.....	85
FIGURA 56. Representação da interação entre o receptor VEGFR-II e seu ligante VEGF....	86
FIGURA 57. Representação da piratoxina I de <i>Bothrops pirajai</i> complexada ao ácido rosmarínico.....	87
FIGURA 58. Representação estrutural do sítio KKYRY e hélice curta.....	88
FIGURA 59. Representação da interação VEGFR-II e miotoxina Bn IV.....	89
FIGURA 60. Representação eletrostática da interação VEGFR-II/Bn IV e VEGFR-II/VEGF.....	90
FIGURA 61. Representação superficial da miotoxina Bn IV.....	93
FIGURA 62. Representação das cadeias laterais correspondentes entre a PLA ₂ e a miotoxina de <i>B. neuwiedi</i>	93
FIGURA 63. Representação esquemática das duas vias moleculares de expressão dos efeitos farmacológicos de citotoxicidade e miotoxicidade das miotoxinas Lys49.....	94
FIGURA 64. Representação das moléculas simétricas mais próximas do cristal de BjTX-I complexado a moléculas de PEG 4000.....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Famílias das Fosfolipases A ₂ até então identificadas.....	10
TABELA 2. Efeitos farmacológicos das Fosfolipases A ₂	14

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 FOSFOLIPASES.....	4
2.2 EFEITOS FARMACOLÓGICOS.....	11
2.3 ASPECTOS ESTRUTURAIS DAS FOSFOLIPASES A ₂ DE SERPENTES	14
2.3.1 Mecanismo de Ação.....	17
2.4 MIOTOXINAS DE SERPENTES	19
2.4.1 Miotoxinas Lys49.....	21
3. OBJETIVOS	30
4. METODOLOGIA	31
4.1 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS	31
4.2 DOCKINGS MOLECULARES.....	32
5. RESULTADOS.....	35
5.1 ASPECTOS ESTRUTURAIS DA CITOTOXICIDADE	35
5.2 ASPECTOS ESTRUTURAIS DA MIOTOXICIDADE.....	62
6. DISCUSSÃO.....	69
6.1 ATIVIDADE PERTURBADORA DE MEMBRANAS DAS MIOTOXINAS LYS49	69
6.1.2 Proteínas Miotóxicas Lys49 Atuam como Gigantes Perturbadores de Membranas	76
6.2 HEPARINA COMO UM EXCELENTE INIBIDOR DE MIOTOXINAS DO GRUPO II: UMA PORTA PARA A COMPREENSÃO DO MECANISMO MIOTÓXICO.....	79
6.3 MECANISMO MIOTÓXICO DAS PROTEÍNAS MIOTÓXICAS LYS49	82
6.4 OS SÍTIOS MIOTÓXICOS E CITOTÓXICOS SÃO DISTINTOS, PORÉM SOBREPOSTOS	90
6.5 IMPORTÂNCIA DO DÍMERO CONVENCIONAL	94
7. CONCLUSÕES.....	98
8. REFERÊNCIAS	99

1. INTRODUÇÃO

As serpentes peçonhentas – que apresentam um órgão termorregulador chamado de fosseta loreal e dentes bem desenvolvidos e móveis – são classificadas em dois grupos de acordo com a família. O primeiro grupo corresponde a três gêneros da família Viperidae, são eles: *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. O gênero *Bothrops* (jararacas), representado pela sua extremidade caudal lisa, contém mais de 60 espécies encontradas em todo o território brasileiro. Na região Norte, especialmente na Amazônia, a espécie mais abundante é a *Bothrops atrox*; Na região Nordeste é notado maior predominância da espécie *Bothrops erythromelas*; No Sudeste, a *Bothrops jararaca*; No Sul e Sudeste a espécie *Bothrops jararacuçu* tem maior predominância. No cerrado e regiões próximas a espécie *Bothrops moojeni* apresenta-se em destaque, além de ser altamente adaptável a outros ambientes. Por fim, a *Bothrops alternatus*, característica da região Centro-oeste e Sul. Todas estas espécies concentram-se em regiões úmidas, especialmente regiões de mata ou áreas litorâneas. O gênero *Crotalus* (cascavel), onde é notada a presença de um guizo ou chocalho em sua extremidade caudal, é representado pela espécie *Crotalus durissus*, espécie com ampla distribuição geográfica, que vai do cerrado brasileiro a regiões áridas e semiáridas do Nordeste, além de campos abertos das regiões Sul, Sudeste e Norte. O terceiro gênero do grupo se trata do gênero *Lachesis* (surucucu, pico-de-jaca), representado pelas espécies *Lachesis muta* (bacia Amazônica) e *Lachesis rhombeata* (mata Atlântica, do norte do Rio de Janeiro até a Paraíba) e pode alcançar até 4,0m de comprimento. Por fim, o gênero *Micrurus* (coral verdadeira), representado pela família Elapidae. Destacam-se no Brasil as espécies *Micrurus corallinus*, *Micrurus frontalis*, *Micrurus ibiboboca*, *Micrurus lemniscatus*, *Micrurus spixii* e *Micrurus surinamensis*. Diferentemente dos demais grupos, este não apresenta fosseta loreal ou presas inoculadoras de veneno bem desenvolvidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Os acidentes ofídicos são de grande importância médica dada sua frequência e gravidade. Dados de 1990-1993 demonstraram que estes aconteceram numa média de 20.000 casos por ano no Brasil, sendo a maioria proveniente das regiões Sudeste e Sul, com 40% e 17,8%, respectivamente. A região Nordeste corresponde a 13,8% dos casos. Dentro dos casos onde o gênero da serpente foi identificado, apenas o gênero *Bothrops* foi responsável por 90,5% dos casos (o que corresponde a 59.619 casos), seguido do gênero *Crotalus* e *Lachesis*, com 7,7% e 1,4%, respectivamente. Apesar da maciça quantidade de casos por envenenamento pelo gênero *Bothrops*, foi observado que este não apresenta maior letalidade,

representando apenas 0,31% dos casos. O gênero *Crotalus*, por sua vez, apresentou letalidade de 1,87. É curioso notar que, apesar da maioria dos casos de envenenamento por serpentes ocorrerem no Sul e Sudeste, o Nordeste, com 13,8% dos casos, apresenta o maior índice de letalidade, com 81% dos casos (FUNASA, 2001).

Em acordo com estes dados, um levantamento bibliográfico realizado por Bochner e Struchiner demonstrou que os casos de acidentes ofídicos mantiveram-se constantes no Brasil durante 100 anos de estudos e que, epidemiologicamente, os casos acontecem no início e fim do ano, em pessoas do sexo masculino, em trabalhadores rurais, com idades de 15 a 49 anos, além do principal grupo de serpentes causador de tais acidentes é o gênero *Bothrops* (BOCHINER; STRUCHINER, 2001). Por outro lado, a partir de 2001, os acidentes ofídicos têm aumentado consideravelmente, com 26.156 casos no ano de 2008 e pico em 2005. A região Norte apresenta o maior número de casos, 8.065, seguida da região Nordeste, com 6.865 casos. Além disso, o envenenamento bothrópico foi mantido como o grupo mais recorrente – apesar de corresponder a 73,5% dos casos – identificado, seguido do veneno crotálico (7,5%), laquéutico (3,0%) e elapídico (0,7%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Para dados globais dos acidentes ofídicos, ler Kasturiratne et al. (2008).

A identificação do gênero da serpente causadora do envenenamento é de suma importância, uma vez que o tratamento é feito através da administração de antivenenos específicos para cada gênero: antibothrópico (SAB), anticrotálico (SAC) e antielapídico (SAE). Para o gênero *Lachesis* ou quando não se sabe tal gênero, é administrado o antiveneno antibothrópico-laquéutico (SABL). Dessa forma, o tratamento dos acidentes ofídicos é baseado essencialmente na produção de compostos que bloqueiam as diferentes moléculas presentes nele (FUNASA, 2001). Cunha e Martins (2012) realizaram um levantamento bibliográfico na busca dos principais compostos presentes nos venenos dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. O primeiro gênero foi observado a presença de proteinases do tipo metaloproteinases – responsável pelos efeitos hemorrágicos – e serinoproteinases – responsáveis por otimizar a hemorragia ao atuar bloqueando a cascata de coagulação. Outro grupo de enzimas presente no veneno de *Bothrops* é formado pelas PLA₂s, capazes de hidrolisar fosfolipídios de membrana liberando ácido araquidônico, gerando respostas inflamatórias por meio da ativação de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, além de efeitos como desordens inflamatórias, hemorragia e atividade anticoagulante. Outro grupo de moléculas químicas presente no veneno bothrópico é formado pelas desintegrinas, peptídeos de baixo peso molecular capaz de bloquear integrinas. As integrinas são proteínas de superfície celular responsáveis por

respostas celulares proliferativas, de diferenciação e ativação celular. Por fim, o último grupo é formado por miotoxina e neurotoxinas. As miotoxinas, muitas vezes chamadas de fosfolipases A_2 cataliticamente inativa, são responsáveis por promover mionecrose, além de promover influxo de Ca^{2+} e perturbação de biomembranas. As neurotoxinas atuam no sistema nervoso, competindo com receptores pós-sinápticos, impedindo a transmissão neuromuscular e consequente morte desses tecidos.

Já o gênero *Crotalus*, apresenta maior concentração de crotoxinas, PLA_2 s que atuam na junção neuromuscular bloqueando a transmissão do sinal e consequente morte de tais tecidos. É observada também a presença de crotaminas, que são polipeptídeos que atuam nas membranas miomusculares e promovem mionecrose, além da despolarização de membrana destas células. Outro grupo de compostos químicos presente no gênero *Crotalus*, é formado pelas convulxininas, glicoproteínas que atuam induzindo agregação plaquetária e isquemia cerebral, o que resulta em respostas como convulsões, perda de equilíbrio e ainda efeitos gastrointestinais. Por fim, as girottoxinas, que também são glicoproteínas, atuam no sistema nervoso central promovendo lesões labirínticas (CUNHA; MARTINS, 2012).

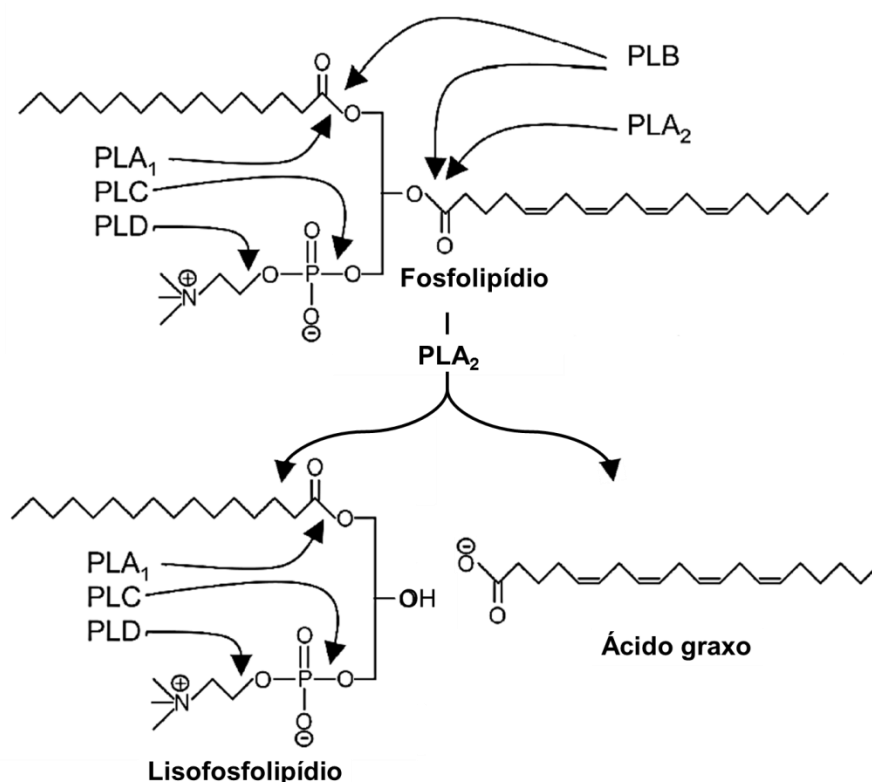
Dentre tais moléculas, as PLA_2 s representam um grupo de grande interesse científico, dada seu envolvimento em diversos eventos farmacológicos e doenças, como veremos a seguir.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FOSFOLIPASES

Fosfolipases constituem um importante grupo de enzimas envolvidas em diversos processos de homeostase de membranas, aquisição de nutrientes e geração de moléculas bioativas. Elas compartilham um substrato comum, os fosfolipídios, liberando vários produtos, como lisofosfolipídios, ácidos graxo livres, diacilglicerol, colina fosfato, e fosfatidatos, dependendo do sítio de hidrólise (MARIA et al., 2007). A especificidade por um sítio de clivagem permitem que possamos classificá-las em fosfolipase A, B, C ou D. As fosfolipases A hidrolizam fosfolipídios nas posições 1-acil éster (PLA₁) ou 2-acil éster (PLA₂). Já as fosfolipases B correspondem a um grupo plural capaz de hidrolisar ambos os grupos. As fosfolipases C são fosfodiesterases que clivam ligações glicerofosfato, enquanto que as fosfolipases D removem o grupo base dos fosfolipídios (KÖHLER et al., 2006). Portanto, as fosfolipases são classificadas em A₁, A₂, B, C e D (FIGURA 1).

FIGURA 1. Sítios de catálise para as fosfolipases A (PLA), B (PLB), C (PLC) e D (PLD), com detalhe para os produtos da catálise da PLA₂. Retirada de Köhler et al. (2006).



Destacando o grupo das PLA₂s, pode-se notar que estas enzimas possuem a capacidade de promover hidrólise na ligação éster central (*sn*-2) de fosfolipídio e, como produtos dessa hidrólise, são gerados ácidos graxos livres e lisofosfolipídios. Os ácidos graxos são importantes na produção de outras moléculas, como o ácido araquidônico e o ácido oleico, que, além de sua importância no estoque de energia, o ácido araquidônico pode atuar como segundo mensageiro e precursor de eicosanoides, potentes mediadores da inflamação e transdução de sinal. O outro produto, lisofosfolipídios, é importante na sinalização celular, remodelamento de fosfolipídios e perturbação da membrana (SIX; DENNIS, 2000).

Atualmente os dezesseis grupos (I-XVI) das PLA₂s, assim como novas proteínas candidatas, são agrupadas através de quatro critérios essenciais determinados por Six e Dennis (2000):

- I. - Promover hidrólise da ligação éster *sn*-2 de fosfolipídios;
- II. - Possuir a sequência completa de aminoácidos da proteína madura (estrutura primária) conhecida;
- III. - Cada grupo deve incluir todas as enzimas que apresentam alto grau de homologia. Em casos de enzimas parálogas, cada gene da PLA₂ deve ser determinado como um Subgrupo caracterizado por uma letra, como nos casos das PLA₂s dos Grupos IVA, IVB e IVC. Em caso de ortólogos as PLA₂s devem ser organizadas no mesmo Subgrupo, como no caso do grupo IVA, presente em zebra-fish e humanos;
- IV. - PLA₂s que apresentam diferentes *splicing* devem ser numeradas, como no Grupo VIA PLA₂s, onde são encontradas dois tipos: Grupo IVA-1 PLA₂s e Grupo IVA-2 PLA₂s.

Tais grupos podem ser organizados por características funcionais, como a utilização de resíduos necessários para sua atividade, e resultar em outros seis diferentes grupos: PLA₂s secretadas, citosólicas, independentes de cálcio, PAF-AH, lisossomais e adiposa-específica (TABELA 1).

As PLA₂s secretadas compreendem os grupos I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII e XIV e são fortemente relacionadas por compartilharem um mecanismo comum de clivagem da ligação éster na posição *sn*-2, como já mencionado. Contudo, o fator determinante para a organização destes grupos é a atividade catalítica do resíduo de histidina 48, que é comum a

todos estes grupos, que, com o auxílio da água e dependendo de um pH básico (7-9), atua catalisando a clivagem do fosfolipídio. Existe ainda outro resíduo crucial conservado, o aspartato 49, que, junto com o His48, formam a díade His/Asp. O Asp49 é essencial para a reação porque, com a participação do cálcio, auxilia na estabilização de cargas do fosfolipídio, facilitando a reação enzimática. Apresentam ainda peso molecular de ~14kDa e 6-8 pontes dissulfeto (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

O Grupo I é formado por fosfolipases encontradas em venenos de serpentes dos gêneros *Naja* e *Laticauda*. São retratadas por apresentarem atividade neurotóxica via apoptose mediada por bloqueio de receptores ionotrópicos (YAGAMI et al., 2013). O grupo IB é caracterizado pela presença do 'loop pancreático' e é encontrado em veneno de serpentes dos gêneros *Pseudonaja* (ARMUGAM et al., 2004) e *Micropechis* (GAO et al., 2001). Ambos os grupos constituem, em serpentes, um grupo coeso formado pela Família Elapidae (FUJIMI; TSUCHIYA; TAMIYA, 2002). As PLA₂s IB ainda podem ser encontradas em suco pancreático de mamíferos, participando da regulação de lipídios e colesterol (YU et al., 2007), bem como na estimulação de neutrófilos na produção de leucotrienos (LEE et al., 2005).

O Grupo II pode ser dividido, de modo geral, em PLA₂s de mamíferos e serpentes. O primeiro é formado por fosfolipases que atuam no metabolismo e, portanto, desempenham funções favoráveis nos organismos. As PLA₂s de mamíferos estão fortemente relacionadas a processos de morte celular, por meio do aumento da hidrólise de biomembranas (OLSON et al., 2010), senescência através da ativação da via p53 (AUGERT et al., 2009; KIM et al., 2009), bem como processos inflamatórios (MENSCHIKOWSKI et al., 2008) e desordens relacionadas, tais como o Mal de Alzheimer (VILLANUEVA et al., 2012) e arteriosclerose (DIVCHEV; SCHIEFFER 2008). Dessa forma, as PLA₂s tornam-se um alvo promissor de pesquisa e tratamento direcionado de doenças relacionadas com processos inflamatórios, conhecendo as moléculas e vias de controle da expressão destas proteínas (KOROTAEVA et al., 2013). É relatada ainda a participação da PLA₂ como alvo de tratamento para câncer (WANG et al., 2013) e atividade bactericida (FONSECA-MALDONADO; FERREIRA; WARD, 2012). Já as PLA₂s de serpentes constituem as principais proteínas do grupo capazes de promover diversos efeitos farmacológicos, uma vez que são produzidas para tal finalidade. Estas PLA₂s são formadas pelas PLA₂s da família Viperidae e induzem efeitos, como agregação plaquetária, ação antiplaquetária, indução de edema, miotoxicidade, indução de prostaglandinas, hemorragia, atividade bactericida, antiparasitária, dentre outros (FULY et al., 2004; SANTOS-FILHO et al., 2008; ROJAS et al., 2001; STÁBELI et al., 2006).

As fosfolipases do Grupo III são encontradas em artrópodes, como abelhas e escorpiões (HARIPRASAD et al., 2011; NOMURA et al., 2013), com peso molecular de ~15kDa, onde desempenham atividades neurotóxica e influxo de cálcio, bem como apoptose em células neuronais (DeCOSTER, 2003; TURCO et al., 2002), liberação de ácido araquidônico e sinalização para crescimento e formação de tumores (HERNÁNDEZ et al., 1999). As PLA₂s do Grupo III são encontradas também em mamíferos, com peso molecular de ~55kDa, onde estudos realizados por MITSUISHI et al. (2007) mostraram que estas proteínas desempenham um papel protetor contra infecções de adenovírus.

O Grupo V é formado exclusivamente por mamíferos e apresenta PLA₂s com peso molecular de 14kDa. Este grupo é destacado por participar de eventos de respostas inflamatórias de degeneração macular (DIEZ et al., 2013), metabolismo de apolipoproteínas relacionado à arteriosclerose (LÄHDESMÄKI et al., 2012), amplificação da expressão de COX-2 e inibição da produção de prostaglandinas em mastócitos (DIAZ et al., 2006). O Grupo IX é formado pela PLA₂ conodipina-M, purificada do molusco marinho *Conus magus*. Esta PLA₂ possui peso molecular de 14kDa, onde a única região de forte similaridade é representada pela díade His/Asp e então é sugerido que seu mecanismo catalítico ocorre da mesma forma das demais. Até então, apenas este representante foi identificado (MCINTOSH et al., 1995). Recentemente foi descoberto mais um representante desse grupo em metazoários, onde apresenta a díade catalítica His/Asp conservada e cinco pontes dissulfeto em sua estrutura. Além do mais, apresentam similaridades estruturais com PLA₂s do Grupo XIV (NEVALAINEN; MORGADO; CARDOSO, 2013).

O Grupo XI compreende as PLA₂s de plantas, distribuídas em diferentes tecidos. Tais PLA₂s apresentam baixo peso molecular de 13-18kDa, seis pontes dissulfeto e requerimento de cálcio para catálise. Sua característica mais marcante é a substituição do resíduo de ácido aspártico da díade catalítica His/Asp por histidina ou asparagina no subgrupo XIA, e por serina ou asparagina no subgrupo XIB (MANSFELD, 2009). O Grupo XII apresenta PLA₂s encontradas em vertebrados, onde suas características estruturais são únicas, exceto pelo conservado sítio catalítico com o loop de cálcio e a díade His/Asp ativo no subgrupo XIIA e inativo no XIIB (GELB et al., 2000; ROUAULT et al., 2003). Já o Grupo XIII compreende um grupo de fosfolipases presentes em capsídeo de parvovírus, que apresenta loop de cálcio e, além da díade catalítica His/Asp conservada, os resíduos His41, Asp42 e Asp63 em seu sítio catalítico (ZÁDORI et al., 2001).

O último grupo das fosfolipases secretadas é formado pelo Grupo XIV, encontradas em fungos e bactérias. Sua estrutura apresenta a díade catalítica conservada, mas seu loop de cálcio é um pouco distinto, formado por duas carboxilas de resíduos de ácido aspártico e um oxigênio carbonil do resíduo de leucina (CAVAZZINI et al., 2013; SUGIYAMA et al., 2002).

As PLA₂s citosólicas (cPLA₂) compreendem o Grupo IV, possui peso molecular de ~85kDa, é dependente de cálcio e, interessantemente, é o único grupo que tem preferência por ácido araquidônico na posição sn-2. Seu mecanismo de catálise envolve a ligação no domínio C2 da PLA₂, onde são encontrados os resíduos Ser228 e Aps549, responsáveis pela atividade (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Uma vez que estas fosfolipases estão presentes em mamíferos e, devido à localização intracelular destas proteínas, elas podem atuar de diferentes maneiras no citosol como um efetor regulador do comportamento celular. Estas PLA₂s participam de eventos celulares de inflamação, ulceração intestinal, injúria pumolar, polipose, injúria cerebral promovida por isquemia/perfusão, anafilaxia e processos referentes ao parto (UOZUMI; SHIMIZU, 2002).

É relatada também a participação de cPLA₂s na modulação do cálcio intracelular pela interação com o receptor colecistoquinina tipo A (LANKISCH et al., 1999) e também por mecanismos de fosforilação glicose-induzido (DUNLOP; CLARK, 1995); na interferência da agregação plaquetária através da relação com actina e resistência à EGTA (HASTINGS et al., 2009); na indução de estresse do retículo endoplasmático, como sua influencia na hidrólise de fosfolipídios e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (REN et al., 2010), além de estarem fortemente relacionadas com alguns tipos de câncer (HUNG et al., 2010; SCHLEICHER et al., 2010; THOMAS et al., 2012). Para mais detalhes do envolvimento das fosfolipases citosólicas com câncer, ler o review publicado por Hu, Tian e Zhang (2011).

As PLA₂s independentes de cálcio (iPLA₂) compreendem os representantes do grupo VI, tendo seu primeiro representante purificado de macrófagos, a PLA₂ GVIA. Estas PLA₂s também usam serina como catalizador da reação de clivagem sn-2 de pontes éster, porém não são específicas para ácido araquidônico, além de apresentarem atividade transacetilase. Têm como característica formas variantes por *splicing*, peso molecular de 88-146kDa, 7-8 repetições de anquirina e um domínio catalítico, além de apresentar um domínio de ligação a ATP (LIO; DENNIS, 1998; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Estudos sugerem que as iPLA₂s têm sua expressão regulada através da interação de genes relacionados com o metabolismo do esteroide e glicerofosfolipídios (SEASHOLS et al., 2004), participação importante na regulação do metabolismo cerebral por meio da modulação de ácido docosahexanoico (ROSA; RAPOPORT 2009), regulação de vias de sinalização em receptores tirosino-quinase, como os Receptores do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), e ativação da via das Proteínas Quinase Ativadas por Mitógeno (MAPK) na indução do crescimento celular, além de garantirem tal sinal por meio do metabolismo do ácido araquidônico e ácido lisofosfatídico (HOOKS; CUMMINGS 2008). É relatada ainda sua relação em eventos apoptóticos por diversos estímulos, como na geração de lisofosfatidilcolina, importante na ativação de fagócitos identificadores de células em estado de morte avançado; e na geração de ácido araquidônico, molécula indutora da apoptose, quando presentes nas células em concentrações altas (BALSINDE; PÉREZ, R; BALBOA, 2006).

As PLA₂s PAF-AH constituem um pequeno grupo formado pelas PLA₂s VII e VIII, onde são capazes de hidrolisar o grupo acetil na posição *sn*-2 de fator ativador plaquetário (PAF) e, por isto, recebem esse nome. O PAF é uma molécula presente nas biomembranas que induz uma grande quantidade de respostas fisiológicas, como fagocitose, agregação, adesão, degranulação, bem como diferentes modificações morfológicas em mamíferos (PRESCOTT et al., 2000; NETO et al., 2005). As PAF-AH apresentam em seu sítio catalítico uma tríade específica formada pelos aminoácidos Ser/His/Asp e são responsáveis pela atividade de hidrólise de cadeias de ácidos graxo curtos/médios, onde sua atividade é inversamente proporcional ao tamanho do comprimento do ácido graxo. Vários estudos apontam que estas fosfolipases atuam em vias do desenvolvimento cerebral, como no controle da migração neuronal, por meio da regulação do balanço entre as diferentes subunidades constituintes de tal PLA₂ (SCHALOSKE DENNIS, 2006). As PAF-AH ainda estão relacionadas com respostas imunológicas (FIGUEIREDO et al.; 2008), controle da biossíntese de PAF (BENVENISTE et al., 1982) e participação na homeostasia corporal através da atividade sinérgica com outras enzimas relacionadas com o metabolismo do PAF (DETOPOULOU et al., 2012).

TABELA 1. Famílias das Fosfolipases A₂ até então identificadas. Adaptada de Quach, Arnold e Cummings (2014) e Six e Dennis (2000).

Famílias das Fosfolipases A ₂						
Família	Grupo	Nome do Gene	Fonte	Massa Molar (kDa)	Resíduos Catalíticos	[CA ²⁺]
sPLA ₂	IA	PLA2G1A	Elapidae (Serpentes)	~14	His/Asp	mM
	IB	PLA2G1B	Humano/Pâncreas suíno	~14		
	IIA	PLA2G2A	Sinovial humano/Viperidae (Serpentes)	~14		
	IIB	PLA2G2B	Serpentes Gaboon	~14		
	IIC	PLA2G2C	Rato/Testículo murino	~14		
	IID	PLA2G2D	Humano/Murino/ Pâncreas/Baço	~14		
	IIE	PLA2G2E	Humano/Murino/ Cérebro/Coração/ Útero	~14		
	IIF	PLA2G2F	Humano/Murino/ Testículo/Embrião	~14		
	III	PLA2G3	Lagarto/Abelha/ Humano/Murino	~55		
	V	PLA2G5	Humano/Murino/ Coração/Pulmão/ Macrófago	~14		
	IX	PLA2G9	Molusco/Metazoários	~14		
	X	PLA2G10	Humano/Baço/Timo/Leucócito	~17		
	XIA	PLA2G11A	Plantas	~13		
	XIB	PLA2G11B		~13		
	XIIA	PLA2G12A	Humano/Murino	~14		
	XIIB	PLA2G12B		~14		
	XIII	PLA2G13	Parvovírus	<10		
	XIV	PLA2G14	Fungos/Bactérias simbióticas (as)	13-19		
cPLA ₂	IVA-IVF	PLA2G4A-PLA2G4F	Humano/Murino	60-85	Ser/Asp	μM
iPLA ₂	VIA-VIF	PLA2G6A-PLA2G6F	Humano/Murino	28-146		Nenhum
PAF-AH	VIIA e VIIB	PLA2G7A e PLA2G7B	Humano/Murino/ Suínos/Bovinos	40-45	Ser/His/Asp	
	VIIIA e VIIIB	PLA2G8A e PLA2G8B	Humano	~26		
Ly-PLA ₂	XV	PLA2G15	Humano	~45		
AdPLA ₂	XVI	PLA2G16	Adipócito humano	~18	His/Cys	

As fosfolipases lisossomais correspondem ao grupo XV e foram primeiramente identificadas em cérebro bovino, com peso molecular de ~40kDa, capazes de esterificar um grupo acil com o grupo hidroxil na posição C-1 de fosfolipídios de ceramidas, onde os fosfolipídios atuam como um doador do grupo acil (ABE; SHAYMAN, 1998). Estas PLA₂s são capazes de desestabilizar membranas através do auxílio de metais pesados (MARCHI et al., 2004), atuam na participação do balanço osmótico através do aumento da sensibilidade osmótica dos lisossomos, resultante do influxo de potássio. Este processo é responsável pela capacidade destas fosfolipases de desestabilizar tal organela em situações de estresse osmótico (WANG et al., 2006). Para mais detalhes desse grupo de fosfolipases, ver Shayman et al. (2011).

Por fim, as fosfolipases adiposo-específica (AdPLA) constituem um grupo de enzimas específicas do tecido adiposo que atuam no metabolismo deste, hidrolisando fosfatidilcolina na posição *sn*-2 em ácido graxo e lisofosfolipídios (DUNCAN et al., 2008). Estas características conferem informações suficientes para que tais fosfolipases entrem para o grupo das PLA₂s e, sendo uma enzima específica do tecido adiposo, passou a ser considerado como o primeiro representante do novo grupo XVI.

2.2 EFEITOS FARMACOLÓGICOS

De modo geral, as PLA₂s podem ser divididas em dois grandes grupos, fortemente dependentes da importância dessa proteína para o organismo. Elas podem participar de processos primordiais na homeostasia e fisiologia do organismo a qual pertence e, portanto, não apresenta toxicidade.

É relatada participação das fosfolipases em diferentes processos da fertilização. Foi demonstrado que pacientes com problemas de fertilidade apresentam concentrações dessa enzima 4-6 vezes mais baixas que pacientes considerados normais (SEDÓ et al., 2011), estudos realizados em camundongos que apresentam espermatozoides disfuncionais na expressão de fosfolipase C normalmente falham em ativar oócitos e isto acarreta em eventos irregulares na formação do blastocisto (NOMIKOS et al., 2013). Recentemente, Nahed et al. (2014) demonstraram que fosfolipases do Grupo X armazenadas em acrossoma de camundongos, além de terem função essencial na fertilização, desempenham sua função de

forma específica e insubstituível de modo a garantirem o reconhecimento espécie-específico. Fosfolipases participam de diversas vias metabólicas associadas à contração muscular lisa, como a indução da contração de músculo aórtico em ratos via adenoreceptores (JINSI; PARADISE; DETH, 1996), contração da musculatura lisa gástrica de gatos via contração induzida por etanol (SIM et al., 2001), participam das concentrações musculares espontâneas do miométrio de ratas (PHILLIPPE; SWEET; ENGLE, 2007), além de participarem de eventos de diferenciação e maturação das funções contrácteis da musculatura lisa em humanos (MACKENZIE; LYMN; HUGHES, 2013). É relatado ainda que as fosfolipases participam de cascatas sinalizadoras envolvendo receptores adrenérgicos e este sinal está relacionado com a proliferação e estímulo do tráfico vesicular e transporte de proteínas durante o crescimento cerebral (KÖTTER; KLEIN, 1999), induzem ainda a proliferação de miofibroblastos intestinais (CHRISTERSON et al., 2009) e regulam a proliferação de células pigmentares retinais (KOLKO et al., 2009). Estão ainda relacionadas com o controle da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares (CAGLAYAN et al., 2011), além de regularem a produção de colágeno do tipo I em células hepáticas via mecanismos de autofagia (SEO et al., 2014).

Processos inflamatórios constituem um grande ramo dos processos fisiológicos de organismos e a participação das fosfolipases é fundamental, uma vez que o seu desbalanço está fortemente relacionado com problemas dessa natureza. PLA₂s estão relacionadas com processos proliferativos e sua disfunção pode induzir inflamação em epiderme de camundongos, pois, com a perda do controle, as células epidérmicas entram em estado de hiperplasia e isto favorece a indução da inflamação (ICHINOHE et al., 2007); alterações em sua produção e/ou regulação estão relacionadas com processos inflamatórios crônicos, como a indução de artrite reumática, doenças inflamatórias vasculares, psoríase, arteriosclerose e asma (CHOI et al., 2005; MALAVIYA et al., 2006; FERGUSON et al., 2012; MAHMUT et al., 2014). Outra participação das fosfolipases na fisiologia celular diz respeito à homeostase membranar e reparo dos lipídios de membrana, através da incorporação e remodelamento destes, especialmente em células induzidas a apoptose (BALSINDE, 2002; CHIOU; LIN; CHANG, 2010; GIBBONS et al., 2013).

Por outro lado, as PLA₂s podem desempenhar suas atividades fora do organismo as quais são produzidas. Estas, apresentam toxicidade e são comumente encontradas em serpentes, lagartos e abelhas, como mostrado acima nos Grupos I, II e III. Especialmente em serpentes, além da sua possível via na digestão de presas, as PLA₂s apresentam uma variedade

de efeitos farmacológicos pela interferência nos processos fisiológicos normais. Alguns componentes mais tóxicos e farmacologicamente potentes ativos de veneno de serpentes são as PLA₂s enzimáticas ou seus complexos proteicos. Todas as neurotoxinas pressinápticas conhecidas são PLA₂s ou contém PLA₂s como parte integral de sua estrutura ativa. Além do mais, PLA₂s miotóxicas são mais potentes e agem mais rápido que suas contrapartes não-enzimáticas. A habilidade de induzir efeitos farmacológicos potentes enfatiza a importância das PLA₂s na toxicidade de veneno de serpentes e desperta o interesse de pesquisadores em diversas áreas (KINI, 2003). Alguns efeitos farmacológicos de fosfolipases de serpentes podem ser observados na Tabela 2.

As fosfolipases de serpentes apresentam uma grande quantidade de isoenzimas, distribuídas ao longo dos diferentes gêneros das famílias Elapidae e Viperidae (CHUMAN et al., 2000; JAN et al., 2007). OGAWA e colaboradores (1995) demonstraram que as PLA₂s de serpentes apresentam taxas de substituição significativamente maiores que as de mamíferos, o que pode explicar a grande variedade de atividades farmacológicas destas enzimas. Além do mais, a diversidade funcional das PLA₂s, associada à grande quantidade de isoenzimas, sugere que os venenos de serpentes passaram por um processo de evolução acelerada, a partir de um gene ancestral que sofreu duplicações e, estas, passaram por processo de seleção natural. Este processo evolutivo das PLA₂s pode ser explicado por três eventos: (1) as regiões de exons, exceto as regiões que contém as sequências sinal, apresentam maior taxa de substituição que íntrons e demais regiões, (2) as taxas de substituições não-sinônimas (quando o aminoácido é alterado) são próximas ou maiores que as taxas de substituições sinônimas (quando o aminoácido não é alterado), e (3) o produto desses genes, após seleção natural, exibem diversa atividade fisiológica (OHNO et al 2003).

Além da purificação relativamente fácil, alta estabilidade e notáveis efeitos farmacológicos, as PLA₂s de serpente constituem um grupo de alta concentração de pesquisas. Uma variedade de técnicas, como cristalografia de raios X, ressonância magnética nuclear, dinâmica molecular e espalhamento de raios X a baixo ângulo – do inglês, *small angle X-ray scattering* (SAXS) – têm sido combinados com espectroscopia e dados bioquímicos na tentativa de compreender melhor a relação estrutura-função (ARNI; WARD 1996).

TABELA 2. Efeitos farmacológicos das Fosfolipases A₂. Retirada de KINI (2003).

Efeitos farmacológicos das Fosfolipases A ₂
Neurotoxicidade
Pré e pós-sináptica
Miotoxicidade
Mionecrose local
Mionecrose sistêmica
Cardiotoxicidade
Efeito anticoagulante
Iniciação de agregação plaquetária
Inibição de agregação plaquetária
Atividade hemolítica
Atividade indutora de hemoglobínúria
Hemorragia
Atividade convulsante
Atividade hipotensiva
Atividade indutora de edema
Danos de tecidos ou órgãos
Fígado, rins, pulmões, testículos e glândula pituitária

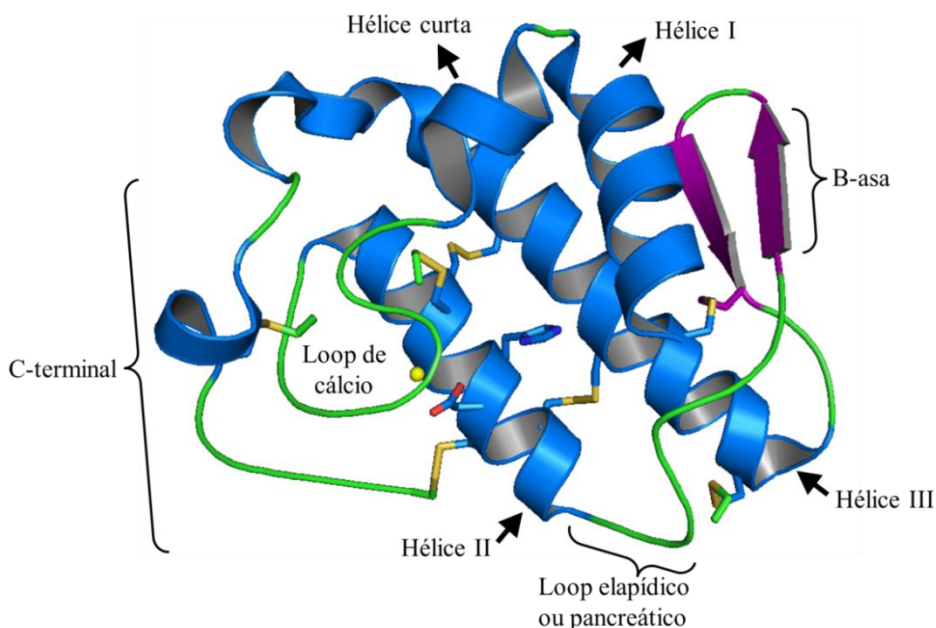
2.3 ASPECTOS ESTRUTURAIS DAS FOSFOLIPASES A₂ DE SERPENTES

As PLA₂s de serpentes constituem os Grupos I e II e são identificadas como pequenas proteínas de 119 a 143 aminoácidos, com peso molecular que varia entre 12 e 15kDa. O Grupo I tem sido isolado de venenos de serpentes das famílias Elapidae e Hydrophidae e pâncreas de mamíferos, enquanto que o Grupo II está presente em venenos de serpente das famílias Crotalidae e Viperidae (ARNI; WARD, 1996).

A característica estrutural mais notável das PLA₂s de serpentes é a presença de duas α -hélices antiparalelas (Hélice II e III) separadas por uma distância aproximada de 10Å com características relativamente anfipáticas, onde os resíduos hidrofílicos são expostos ao solvente e os hidrofóbicos dispostos para seu interior. Representando a exceção desta tendência, os resíduos do sítio catalítico de caráter polar estão voltados para o interior das duas hélices, sendo eles os resíduos His48 e Asp49. As PLA₂s são também construídas por uma região N-terminal, representada pela Hélice I (resíduos 1 a 12), seguida por uma hélice curta (*short helix*) formada pelos resíduos 18 a 23. Entre os resíduos 25 e 34 está o loop

ligante de cálcio, seguido pela Hélice II (40 a 55). Após a região β -asa (55 a 89) está a Hélice III (90 a 107), seguida de um loop C-terminal bastante flexível (108 a 113), conhecido por cauda C-terminal (RENETSEDER et al., 1985). Tais estruturas podem ser observadas abaixo (FIGURA 2).

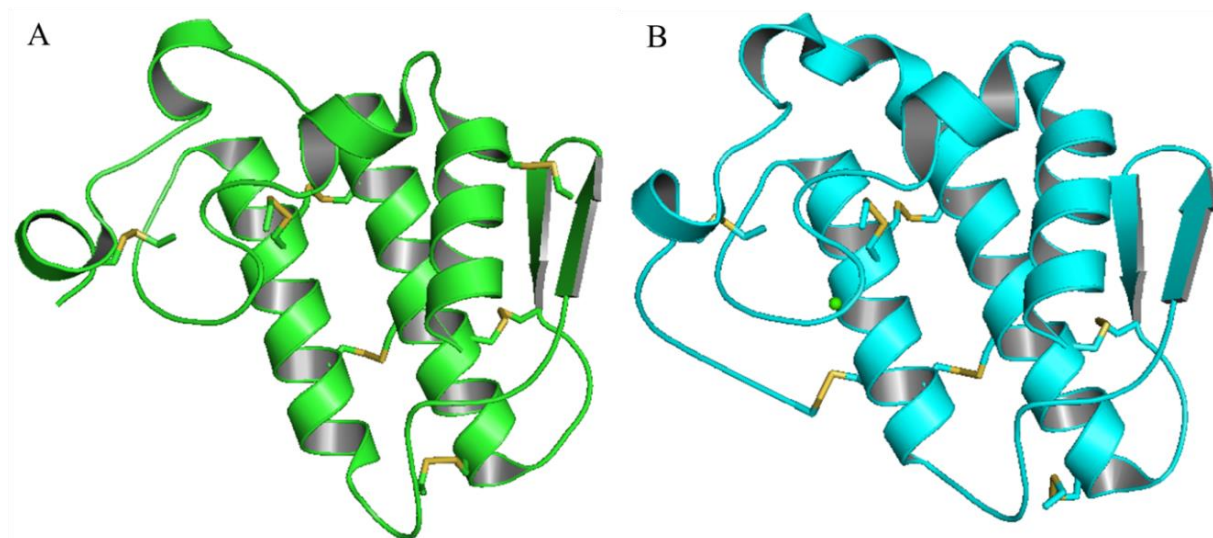
FIGURA 2: Representação estrutural das PLA₂s. Estruturas secundárias em azul (α -hélice) e roxo (β -asa) e loops em verde, além dos resíduos His48 e Asp49, o íon cálcio (amarelo) e do loop elapídico/pancreático (PDB: 3MLM). Adaptada de Arni e Ward (1996). Imagem gerada pelo Pymol.



A despeito da diversidade de fontes, três regiões nas classes I e II retêm um alto grau de homologia nas sequências dos aminoácidos. Essas regiões contribuem para a formação de estruturas secundárias e terciárias altamente conservadas, representadas pela hélice N-terminal, o sítio de ligação a Ca^{2+} e regiões do sítio ativo que formam o canal hidrofóbico, o qual se liga a cadeias de ácidos graxo de fosfolipídios. As regiões com menor grau de homologia de aminoácidos correspondem a elementos estruturais menos conservados e são comumente determinantes da diversidade dos efeitos farmacológicos dessas proteínas. Apesar das homologias entre tais grupos, existem dois critérios importantes na distinção entre o Grupo I e II. A posição das pontes dissulfeto difere entre tais grupos, onde o Grupo I apresenta a ponte Cys11-Cys-77, enquanto que o Grupo II possui uma ponte alternativa entre Cys55-Cys133 (FIGURA 3). Na região 52-65, o Grupo I apresenta de duas a três inserções de aminoácidos, o que gera um loop característico, chamado de loop elapídico. Enquanto que nas PLA₂s pancreáticas, esse loop apresenta ~5 aminoácidos e recebe o nome de loop pancreático.

Além deste loop ser truncado no Grupo II, esta ainda apresenta um peptídeo adicional de 5-7 resíduos na sua cauda C-terminal, a qual é estabilizada por meio da ponte dissulfeto Cys55-Cys133 mencionada acima (ARNI; WARD, 1996).

FIGURA 3: Representação das PLA₂s do Grupo I (PDB: 2OSH), A, e Grupo II (PDB: 3MLM), B. Diferenças estruturais entre tais grupos são representadas pela posição das pontes dissulfeto, loop pancreático e tamanho da cauda C-terminal. Imagem gerada pelo Pymol.



Outra característica estrutural marcante das PLA₂s é sua dependência do íon cálcio, que atua como um cofator para a catálise. O cálcio é coordenado pelos dois oxigênios da carboxila do resíduo Asp49 e três oxigênios das cadeias principais de resíduos altamente conservados, que fazem parte do loop de ligação a cálcio, além de duas moléculas de água coordenando tal ligação. Vale ressaltar ainda a importância da flexibilidade do loop de ligação a cálcio garantida pela considerável quantidade de resíduos de glicina presentes nela, o que permite maior liberdade de interações com o cálcio. Por outro lado, as pontes dissulfeto geradas entre os resíduos Cys27-Cys43 conferem ao loop a correta orientação em relação ao sítio catalítico (ARNI; WARD, 1996).

O resíduo Asp49 é de extrema importância para a ligação coordenada com o cálcio e isto foi demonstrado por Li e colaboradores (1994) ao realizarem mutagênese numa PLA₂ pancreática bovina. Foram desenvolvidos quatro mutantes com substituição da posição 49 de ácido aspártico pelos aminoácidos alanina, asparagina, ácido glutâmico, glutamina e lisina. Apenas o mutante substituído por ácido glutâmico apresentou interações com cálcio, porém sua interação foi doze vezes mais fraca que a da proteína nativa. Por outro lado, esses mutantes mantiveram a capacidade de interação com membranas, especialmente nos

fosfolipídios zwitteriônicos. Ward et al. (2002) reforçaram esta ideia ao desenvolverem miotoxina mutantes Lys49Asp e confirmaram que, apesar do resíduo de ácido aspártico ser importante para o mecanismo de ação, ele não é o único que a favorece, pois não foi observada alguma atividade catalítica. Isto favorece a ideia que as fosfolipases apresentam uma região de reconhecimento a fosfolipídios importante para garantir que a atividade catalítica seja então exercida. Essa região de reconhecimento é chamada *iface*, abordada a seguir.

2.3.1 Mecanismo de Ação

Antes da PLA₂ realizar atividade catalítica, é preciso que haja o reconhecimento do substrato por sua face, que apresenta o sítio ativo, chamada de *i-face*. Através de estudos cristalográficos foi analisada uma PLA₂ IB juntamente com ânions de sulfato e observaram que as subunidades interagem formando dímeros mantendo suas *i-faces* voltadas para dentro, e, entre elas, seis sulfatos se organizam num plano estabilizando o dímero. Desta forma, é sugerido que as cabeças aniônicas dos fosfolipídios facilitem a interação entre a PLA₂ e sua *i-face*, otimizando sua ação (PAN et al., 2001). Esta interação com a *i-face* pode ser dada de dois modos distintos. O primeiro modo é o '*pure hopping mode*', onde a ligação e dissociação ocorrem durante cada ciclo catalítico. Num outro modo, o chamado '*scooting mode*', a enzima continua ligada na interface enquanto que ocorrem os ciclos catalíticos (KINI, 2003).

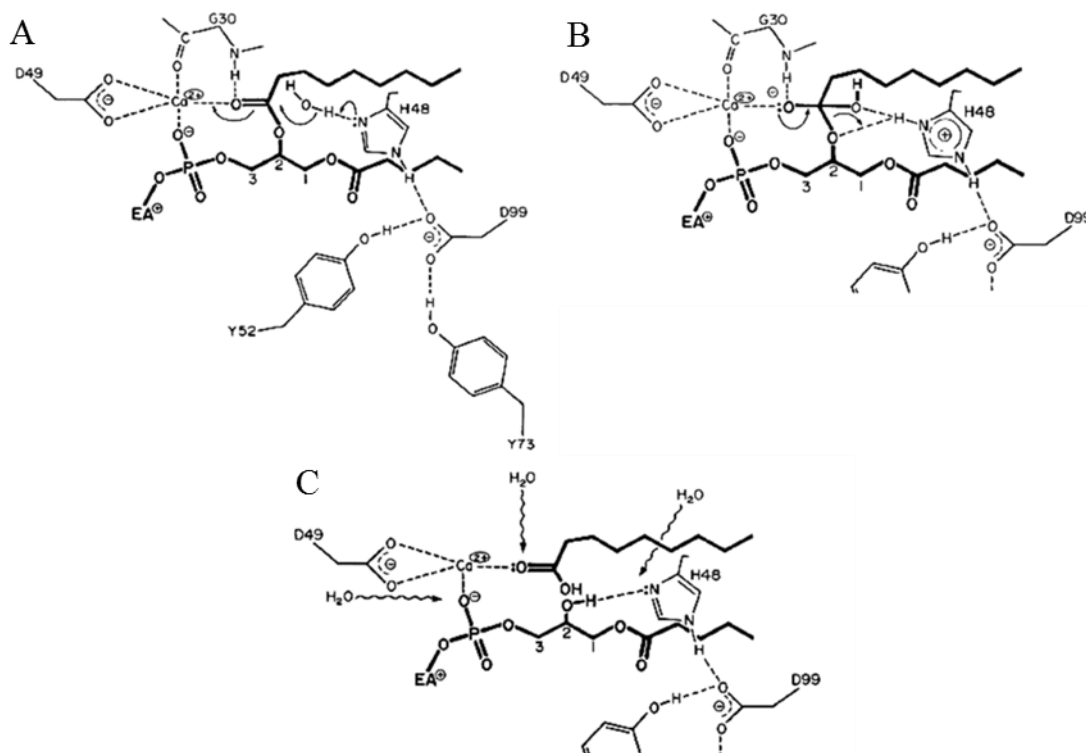
Bahnson (2005) aborda duas vias de mecanismos de ação das PLA₂s baseado na atividade de moléculas de água: o mecanismo *single-water* (SCOTT et al., 1990) e o mecanismo *assisting-water* (YU et al., 1998). Em ambos, os resíduos His48 e Aps49 são essenciais, assim como o íon cálcio, que estabiliza os radicais negativos da Aps49 e dos oxigênios do fosfolipídio, mantendo-o no sítio. Outra característica é a formação geométrica entre moléculas de água e o fosfolipídio, chamada de tetraedral.

No mecanismo de *single-water* o nitrogênio da His48 favorece o ataque nucleofílico da água, que se liga covalentemente ao fosfolipídio formando um intermediário tetraedral. Em seguida o cálcio estabiliza as cargas do fosfolipídio, que favorece a polarização do radical R2 da ligação éster do carbono C2 e então a quebra da ligação, liberando o ácido graxo do radical 2 (R2). No mecanismo *assisting-water* o His48 rouba elétrons de uma molécula de água,

fazendo com que esta roube elétrons de outra água e então esta última ataca o fosfolipídio se ligando covalentemente, formando uma primeira estrutura tetraedral. Posteriormente, A primeira água é liberada, deixando um hidrogênio pareado com o nitrogênio da His48 e então outra água, a água ‘assistente’, recebe o hidrogênio da His48 e cede outro para a água ligada covalentemente ao fosfolipídio, formando uma segunda estrutura tetraedral. Então esta água se emparelha com o nitrogênio da His48 e o cálcio, novamente, favorece a quebra da ligação éster do C2 liberando o ácido graxo R2. Uma representação simplificada do mecanismo de ação das PLA₂s é mostrada na FIGURA 4.

Atualmente o mecanismo *assisting-water* é o mais aceito por considerar outros estudos, como efeitos de solventes de isótopos, substituição cinética de cálcio, ab initio docking e busca das coordenadas do espaço Euleriano no sítio ativo (YU et al., 1998). Posteriormente, um estudo utilizando um mutante His48Gln realizado por Edwards et al. (2002) veio a fundamentar ainda mais este mecanismo.

FIGURA 4: Representação do mecanismo de ação das PLA₂s com ênfase em seu sítio catalítico, mostrando os resíduos participantes. Adaptada de Scott et al. (1990).



Vale salientar que este mecanismo de ação é válido apenas para as fosfolipases que apresentam o resíduo de ácido aspártico na posição 49. Por outro lado, venenos de serpentes apresentam isoenzimas com diferentes substituições nessa posição e, portanto, incapacidade de realizar alguma atividade fosfolipásica. Dentro deste grupo estão as miotoxinas de serpentes derivadas das PLA₂ do Grupo II, que apresentam atividade farmacológica de maneira independente de catálise e da ligação a cálcio. Este grupo será abordado com mais detalhes abaixo.

2.4 MIOTOXINAS DE SERPENTES

A miotoxicidade é definida como uma ação específica do veneno em músculo esquelético, afetando apenas as fibras musculares e deixando os demais tecidos e estruturas – como nervos e vasos – inalterados. Mionecrose é o resultado da ação miotóxica. Os eventos característicos da miotoxicidade aparecem em 0,25-3 horas após a picada ou injeção no tecido ou modelo animal de estudo. Os efeitos imediatos da ação da miotoxina são identificados pela lise da membrana plasmática sarcoplasmática e hipercontração. Já em situações de maior atraso, a dilatação do retículo sarcoplasmático se mostra como uma característica importante. Em ambos os casos, após 24-48 horas as células musculares danificadas se mostram como uma massa amorfa repleta de células fagocíticas, especialmente macrófagos. Na maioria dos casos a lâmina basal não sofre ruptura e então serve como base para as células musculares regenerarem-se. O grau de regeneração depende do tipo e dose da toxina, porém é comum que as células assumem tamanhos similares às antigas células, mas com os núcleos centralmente dispostos (MEBS; OWNBY, 1990).

Diante desta definição, proteínas miotóxicas podem ser classificadas e identificadas de diferentes fontes. Considerando as miotoxinas especificamente das serpentes, Lomonte e Rangel (2012) as classificam em três grupos distintos:

1. Cadeia polipeptídica contendo 42-45 resíduos de aminoácidos, com caráter básico e enzimaticamente inativa. Um representante deste grupo é a crotamina, miotoxina presente no gênero *Crotalus* (OGUIURA et al., 2000; SIEBER et al., 2014);

2. Cadeia polipeptídica contendo 60-62 resíduos de aminoácidos e conhecidas por atuarem como cardiotoxinas e citotoxinas. O gênero *Naja* é um representante de tal grupo (CHEN et al., 2007; WANG et al., 2006);

3. Cadeia polipeptídica contendo ~120 resíduos de aminoácidos, com atividade neurotóxica e miotóxicas. Representantes desse estão dispersos em vários gêneros de veneno de serpentes, como os gêneros *Crotalus* (DORANDEU et al., 2002), *Naja* (MACHIAH; GOWDA, 2006), *Vipera* (PRIJATELJ et al., 2006a) e *Bothrops* (GALLACCI; CAVALCANTE, 2010), por exemplo.

As PLA₂s estão presentes neste último grupo e, dentro deste, pode-se observar dois subgrupos estruturalmente falando. O primeiro, representado pelas fosfolipases do gênero *Crotalus* e *Naja* apresentam-se em forma de heteromérica – com uma subunidade fosfolipásica e outra importante para o desenvolvimento das propriedades farmacológicas – ou em forma oligomérica (notadamente trimérica), respectivamente. Já o segundo subgrupo é responsável por apresentar as PLA₂s homoméricas, com uma boa variedade de isoenzimas. Diferenças notáveis dessas isoenzimas podem ser relacionadas com a substituição do resíduo 49 por um aminoácido diferente do ácido aspártico, como são observadas substituições por alanina, serina, arginina, asparagina ou lisina nessa mesma posição e, em concordância com os estudos de mutagênese (LI et al., 1994; WARD et al., 2002), essas isoenzimas naturais não apresentam atividade catalítica ou afinidade a cálcio, mas um amplo efeito farmacológico, notadamente miotóxico (CONLON et al., 2013; LIU et al., 1991; LIU et al., 1992; MURAKAMI et al., 2008; WEI et al., 2006). Apesar disso, é relatada a presença de isoenzimas Asp49 com atividade catalítica e miotóxica. Isto implica fortemente que esses dois mecanismos atuam de formas diferentes (CORRÊA et al., 2008; SANTOS-FILHO et al., 2008).

Apesar de certa diversidade das PLA₂s do Grupo II, as proteínas miotóxicas são comumente associadas às Lys49, visto que corresponde ao grupo mais conhecido até então, contando com 65 homólogos até 2012. Análises filogenéticas apontam que as Lys49 constituem um grupo coeso originário de uma Asp49 ancestral exclusiva das serpentes da família Viperidae, ou Grupo IIA (ANGULO et al., 2002; SANTOS et al., 2011a). Além do mais, essas proteínas tornam-se interessantes por serem cataliticamente inativas – graças à substituição por Asp49 – e promoverem tal atividade específica de uma forma até então desconhecida. Consequentemente, um número crescente de estudos vem sendo realizado para

identificar seu real mecanismo de ação e definição dos seus determinantes estruturais (LOMONTE; RANGEL, 2012).

2.4.1 Miotoxinas Lys49

Maraganore e colaboradores (1984) foram os responsáveis pela identificação de uma nova classe de fosfolipases – as fosfolipases Lys49 – e foram importantes por estabelecerem algumas características importantes para tal grupo: as Lys49 apresentam baixíssima atividade fosfolipásica e atuam independentemente da ligação a cálcio para realização da sua atividade, bem como sua ligação com fosfolipídios. Além da marcante diferença na posição 49 dessas proteínas, diferenças nos loops ligantes de cálcio nas posições Tyr28Asn e Gly33His ou Gly33Ser demonstram que a atividade catalítica não depende apenas do resíduo Asp49. Foi sugerido então que as Lys49 atuam de uma forma diferente e que apresentavam atividade mais fraca que as Asp49, por meio da necessidade de moléculas carregadas negativamente, como o fosfato, que permitiam a formação de um complexo ternário e consequente ação fosfolipásica.

Estudos de venenos de *Bothrops asper* vieram a confirmar e fortalecer esse novo grupo emergente de proteínas. Foram purificadas duas novas miotoxinas: a miotoxina e miotoxina-II. A primeira foi purificada por cromatografia de troca iônica numa coluna de Sefadex G-75. A miotoxina possui caráter básico com peso molecular estimado de 10,7kDa. Testes realizados em camundongos demonstraram que a miotoxina apresenta atividade hemolítica, efeitos hemorrágicos, forte indução no aumento dos níveis de cálcio intracelular, rápido aumento dos níveis de creatina quinase citoplasmática e uma série de eventos miotóxicos, que levaram à mionecrose (GUTIÉRREZ; OWNBY; ODELL, 1984). Já a miotoxina-II compartilhou dos procedimentos de purificação, bem como seu caráter básico, porém com peso molecular de ~14kDa e identificada sua conformação biologicamente ativa: conformação dimérica. Dos 118 resíduos de aminoácidos constituintes, notou-se uma grande quantidade de resíduos de lisina, aspartato e resíduos hidrofóbicos, como leucina e tirosina. A miotoxina-II induz mionecrose, edema e liberação de creatina quinase sérica em camundongos (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 1989).

Os estudos, até então, apontavam que as miotoxina apresentavam uma baixa atividade fosfolipásica, porém foram rapidamente rebatidos por outros pesquisadores. Estudos realizados por van den Bergh et al. (1988) e Scoot et al. (1992), sugeriram que essa baixa atividade catalítica era oriunda de uma possível contaminação por fosfolipases cataliticamente ativas e, portanto, geraria essa falsa atividade. Uma forma de solucionar esta questão pode ser a execução de uma metodologia que garantisse 100% de pureza da proteína de estudo por meio da produção de Lys49 recombinantes. Ward et al. (2002) desenvolveram recombinantes da bothropstoxina (BthTX-I) e confirmaram sua inatividade *in vitro*, porém ao analisarem frações purificadas de substratos naturais, corroboraram a possibilidade de contaminação por fosfolipases ativas ao identificarem uma pequena atividade.

Em 1988, Homsí-Brandeburgo e colaboradores foram capazes de purificar exemplares das miotoxina ao estudar frações do veneno de *Bothrops jararacussu*, intitulada bothropstoxina. Do veneno bothrópico foram extraídas cinco frações (S-III-SPI à SIII-SPV) de fosfolipases, onde duas delas foram ácidas, uma neutra e duas básicas com alta atividade catalítica, baixa e quase nula ou nenhuma atividade fosfolipásica, respectivamente. A bothropstoxina correspondeu à fração SIII-SPV, que apresentou peso molecular de ~14kDa e pI 8,2, além de compor 15% do veneno e 40% das proteínas totais. Por não apresentar atividade catalítica e alta similaridade com as demais PLA₂s, estas proteínas passaram a ser chamadas de PLA₂s cataliticamente inativa ou apenas fosfolipase A2 inativa. Apesar disso, a bothropstoxina apresenta características peculiares, como a atividade necrótica específica em células musculares – mas não em células arteriais – e, portanto, atividade mionecrótica ou miotóxica, onde o termo ‘miotoxina’ vem tendo maior aceitação atualmente. Com este ‘pontapé’ o estudo e identificação das miotoxinas vêm crescendo exponencialmente ao longo dos anos (LOMONTE; RANGEL, 2012).

A despeito das atividades farmacológicas apresentadas acima, as Lys49 apresentam uma série de outros efeitos. A miotoxina Bp-12 de *B. pauloensis* e BthTX-I de *B. jararacussu* apresentam atividade neuromuscular em camundongos (GALLACI et al., 2006; GALLACCI; CAVALCANTI, 2010). Correia-de-Sá et al. (2013), ao estudarem a BthTX-I, demonstraram que o efeito neurotóxico está relacionada com a inibição da liberação de acetilcolina em terminais nervosos motores por meio do bloqueio da junção neuromuscular, o que ocasiona despolarização das fibras musculares e, então, progressão do efeito farmacológico. Além do mais, miotoxinas bothrópicas apresentam efeito genotóxico, capaz de danificar/quebrar o DNA em até 85%. (MARCUSI et al., 2013)

Eventos miotóxicos são fortemente relacionados com o fluxo de íons. Leite et al. (2006) demonstraram que o efeito miotóxico da miotoxina ACLMT de *Agkistrodon contortrix laticinctus* pode ser reduzido por meio da inibição da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ em bexiga de sapo. Cintra-Francischinelli et al. (2010a), ao estudarem o processo necrótico em células musculares C2C12, demonstraram que as miotoxinas I e II de *B. asper* induzem o efluxo de ATP e K^+ , que pode ser interpretado como um ‘sinal de perigo’ pelas células, favorecendo a entrada na via apoptótica e otimização do processo necrótico. Ainda sobre a participação de íons nos efeitos farmacológicos, Mora et al. (2005) demonstraram que as miotoxinas I e II de *B. asper* apresentam atividade tripla, dependente da concentração, em células linfoblastóides B. Foi notado que em concentrações de $\geq 5\mu\text{g/mL}$ a miotoxina apresenta efeito proliferativo, em concentrações de $5\text{-}25\mu\text{g/mL}$ o efeito notado é citolítico e miotóxico, já em concentrações acima de $25\mu\text{g/mL}$ há predominância do efeito necrótico. No ano seguinte, este mesmo grupo de pesquisadores observou que tais efeitos são fortemente relacionados com o influxo de cálcio (MORA et al., 2006).

Estudos realizados com miotoxina I e II de *B. jararacussu* demonstraram sua atividade pró-inflamatória em ratos Wistar por meio da indução de mediadores inflamatórios (BARBOSA et al., 2005). Este estudo foi corroborado por Oliveira et al. (2009) ao estudarem a miotoxina BnSP-7 de *B. neuwiedi*, capaz de induzir a produção de metaloproteinases de matriz extracelular e expressão de citocinas IL8, IL6 e IL-1 de células inflamatórias e células satélite. Tais eventos são importantes no progresso da necrose, bem como eventos de regeneração tecidual. A participação da IL-6, responsável pela indução de respostas inflamatórias sistêmicas, no processo de mionecrose e edema também foi observado em testes realizados com a miotoxina I de *B. atrox* (NÚÑEZ et al., 2004). Estudos com miotoxina II de *B. asper* demonstraram que sua atividade inflamatória tá relacionada com a produção de cicloxigenase-2 e prostaglandinas, por meio da ativação da proteína quinase C (PKC), proteína tirosina quinase (PTK), ativação da via intracelular ERK e MAPK p38, além da expressão do fator de transcrição NF- $\kappa\beta$ (MOREIRA et al., 2013).

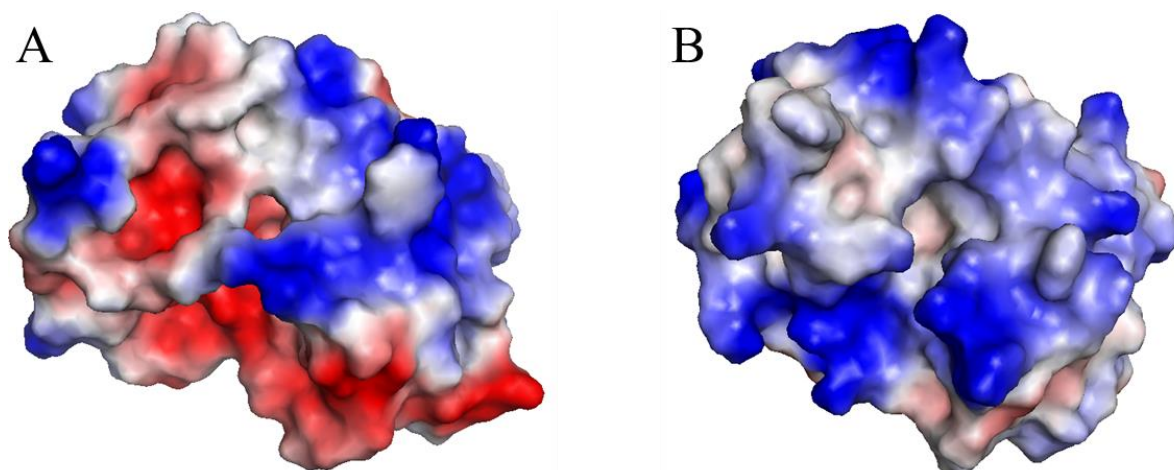
Em contrapartida, miotoxinas podem apresentar efeitos anti-inflamatórios de forma indireta através da interação com lipopolissacarídeos de *E. coli*. É relatado que esta interação é dada por concentrações de 10 nM e, ao ligarem-se, há o impedimento dos efeitos farmacológicos de ambas as moléculas na ativação de macrófagos de camundongos (TSAI et al., 2007). A interação com lipopolissacarídeos demonstra que as miotoxinas são capazes de induzir efeitos bactericida, corroborado por Stábili et al. (2006), frente à *E. coli* e *Candida*

albicans. Além do mais, foi relatado o efeito antiparasítico para o verme *Schistosoma mansoni* e protozoários de *Leishmania spp.* O efeito bactericida associado à ligação com lipopolissacarídeos infere que as miotoxinas atuam diretamente na membrana desses organismos e células musculares, desestabilizando-a. Esse efeito é chamado de citotoxicidade ou efeito citolítico. Uma comprovação de tal efeito foi confirmada após a identificação da desestabilização das membranas interna e externa de *E. coli* (ARAGÃO; CHIOATO; WARD, 2008), além de diferentes estudos utilizando diferentes miotoxinas Lys49 em modelos com células musculares (LOMONTE; TARKOWSKI; HANSON, 1994; NÚÑEZ et al., 2004; VILLALOBOS et al., 2007). Este efeito é ainda corroborado através de estudos que mostram que lipossomas – micelas simuladoras de biomembranas – são facilmente desestabilizadas/perturbadas na presença de miotoxinas, liberando seu conteúdo interno. (BORTELO-BUGS et al., 2007; OLIVEIRA; FERREIRA; WARD, 2009).

Após 30 anos da descoberta do grupo das miotoxinas Lys49, o real mecanismo de ação destas proteínas permanece um paradigma e diversas estratégias, como modificação química, análise comparativa de sequência, interação com moléculas neutralizantes, estudos de peptídeos sintéticos e mutagênese sítio dirigida, têm sido aplicadas na tentativa de elucidar os determinantes estruturais de sua miotoxidade (MURAKAMI et al., 2007).

Além de apresentarem determinantes estruturais essenciais para que seja considerada uma PLA₂ do Grupo II, as Lys49 possuem características estruturais peculiares e específicas. Uma dessas características é a grande presença de resíduos básicos, a maioria deles de lisina (cerca de 15%), como podemos observar na Figura 5. As sequências 53-56 (KKLT) e 13-15 (TGK) correspondem a sítios passíveis de fosforilação por proteínas quinase monofosfato cíclico de adenona (cAMP) e monofosfato cíclico de guanosina (cGMP)-dependente e proteína quinase C, respectivamente, apesar de compartilhada com algumas Asp49 (OWNBY et al., 1999). Isso pode explicar o incremento da atividade fosfolipásica em PLA₂s citosólicas (MIURA; HUBBARD; MACGLASHAN JR, 1998). Estudos de superfície dentro do grupo das Lys49 estão de acordo com a grande quantidade de resíduos básicos. Além da sua quantidade, esses resíduos encontram-se concentrados na íface da proteína e são considerados importantes para a miotoxidade (MURAKAMI; ARNI, 2003).

FIGURA 5. Representação eletrostática da BthA-I (PDB:1Z76) e BthTX-I (PDB:2H8I) de *Bothrops jararacussu*. À esquerda a BthA-I a PLA₂ ácida cataliticamente ativa e à direita a BthTX-I básica miotóxica. Resíduos catiônicos, aniônicos e apolares representados em azul, vermelho e branco, respectivamente. Imagem gerada pelo Pymol.



Giotto et al. (1998), ao estudarem a miotoxina BthTX-I, observaram que sua estrutura quaternária apresenta oscilações conformacionais, onde o dímero atua como uma espécie de dobradiça, variando entre a conformação ‘aberta’ ou ‘fechada’. Mais tarde foi observado que, na verdade, existem pelo menos seis alterações conformacionais com intermediários entre as duas conformações propostas acima e que essa alteração permite uma angulação de aproximadamente 23°, o que pode ser importante para a citotoxicidade (MAGRO et al., 2003). Para que tais eventos ocorram com certa estabilidade, resíduos de cada monômero devem apresentar interações que favoreçam a mesma. Dessa forma, RULLER et al. (2003) demonstraram que a estabilização dimérica das miotoxinas ocorre por meio de forças suficientemente fortes ao ponto que apenas interações hidrofóbicas não satisfariam, e, portanto, pontes de hidrogênio deviam participar efetivamente da estabilização quaternária. Mais tarde, foi demonstrado que a tríade Glu12/Trp77/Lys80, extremamente conservada, é responsável por garantir a estabilidade dimérica (RULLER et al., 2005).

Outra característica estrutural específica é a presença do resíduo Lys112 e sua função na estabilização do loop de cálcio. Sua importância foi inicialmente proposta por LEE e colaboradores (2001), ao estudarem a piratoxina de *B. pirajai*, e sugerirem que o resíduo Lys112 é responsável por estabilizar interações envolvendo sua cadeia lateral com carboxilas dos resíduos do loop de cálcio, especialmente o resíduo Cys29. Essa estabilização favorece a polarização dessa região, favorecendo o aumento da afinidade da cavidade hidrofóbica a ligantes de mesma característica, como ácido graxos. Sua importância foi fortalecida ao

observarem que mutantes Lys112Ala apresentaram citotoxicidade reduzida (CHIOATO et al., 2002). Estudos de mutagênese realizados por Sá et al. (2004) fortaleceram a importância da participação da cavidade hidrofóbica nos eventos farmacológicos ao demonstrarem que mutantes Val102Ala/Leu106Phe e Leu5Phe/Val102Ala/Leu106Phe apresentaram baixa atividade citotóxica, apesar de manterem a miotoxicidade. A cavidade hidrofóbica tem sido alvo de atenção dos pesquisadores há anos atrás, como mostra um estudo realizado por Ward et al. (1998), ao relatarem que o tamanho da cavidade hidrofóbica deve manter um volume aproximado de $470 \text{ \AA}^3$. AMBROSIO et al. (2005) foram mais além e demonstraram o resíduo Lys112 polariza não só o loop de cálcio, mas também a cauda C-terminal das miotoxina. Esta polarização é importante no aparecimento de uma saliência hidrofóbica na cauda C-terminal, relatada como importante nos processos de penetração de membranas.

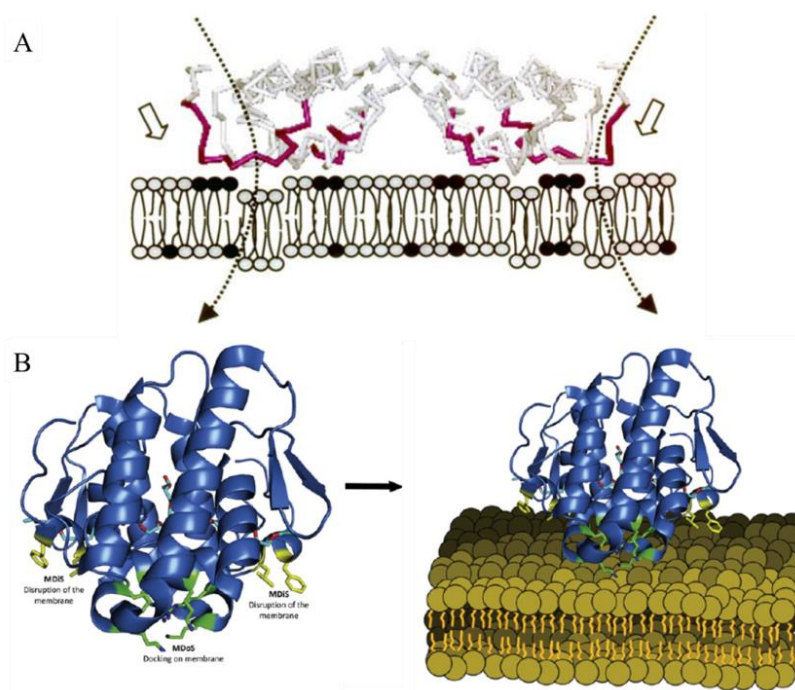
A cauda C-terminal é um determinante estrutural importante das miotoxina Lys49, além de apresentar características únicas. É relatada sua importância por meio de estudos de peptídeos sintéticos, que reproduzem sua atividade citolítica, apesar de ser mais fraca; além de ser bloqueado por heparina, assim como a proteína completa (LOMONTE et al., 1994a; NÚÑEZ; ANGULO; LOMONTE, 2001). Em acordo, Araujo, White e Ownby (1996), ao analisar sequências genéticas na busca de sequências particulares das miotoxinas, apontaram os resíduos Lys115 e Lys116 da cauda C-terminal – além de resíduos como Lys7, Lys78 e Lys80 – como determinantes específicos de tais proteínas. Estudos de mutagênese na porção C-terminal de miotoxinas foram capazes de reduzir os efeitos miotóxicos e citotóxicos por meio de mutações como Tyr117Trp, Arg118Ala, Lys122Ala e Lys115Ala, Lys116Ala, Lys122Ala, respectivamente (CHIOATO et al., 2002). Com este trabalho, Chioato e colaboradores sugeriram que a miotoxicidade e citotoxicidade apresentam sítios distintos, apesar de compartilharem regiões. Posteriormente, Chioato et al. (2007) vieram a confirmar a distinção de tais sítios, apesar de presentes na região C-terminal.

A inibição por heparina é outra evidência que corrobora a importância da cauda C-terminal nos eventos farmacológicos. Não só a heparina, mas moléculas aniônicas geralmente servem como um ótimo inibidor das proteínas miotóxica. MELO et al. (1993) demonstraram que heparina heterogênea, heparina de baixo peso molecular ou dextrana sulfatos, mas não dextrana não sulfatada ou condroitin sulfato, são capazes de inibir os efeitos miotóxicos da BthTX-I. Estes dados favorecem a ideia que as miotoxina desenvolvem suas atividades miotóxica e citotóxicas sobre fosfolipídios aniônicos, desestabilizando-os por meio da interação das duas caudas C-terminal presentes no dímero. Estes dados favoreceram a

elaboração de um modelo de atividade das miotoxinas, apresentado por Lomonte Angulo e Calderón (2003), apresentado na Figura 6 (A).

Em contraposto, outro modelo (FIGURA 6B) para explicar os eventos miotóxicos e citotóxicos foi desenvolvido por Santos, Soares e Fontes (2009), baseado em cristais da miotoxina-II de *B. asper* complexada a suramina (MURAKAMI et al.; 2005). Ao estudar uma estrutura de *Bothrops* cristalizada com α -tocoferol foi notado que a miotoxina assumiu uma nova conformação estrutural, chamada de Dímero Alternativo. Nesta configuração os monômeros da miotoxina não são unidos por meio de suas β -asas, mas por interações hidrofóbicas entre a cauda C-terminal e Helice I. Foi proposto que o sítio miotóxico é formado pelos resíduos Lys20, Lys115 e Arg118 de cada monômero, formando uma região de alta afinidade à cargas negativas, responsável pelo reconhecimento e interação com membranas. O modelo propõe que a miotoxina torna-se ativa após a internalização de um ácido graxo livre na cavidade hidrofóbica e isto é suficiente para que os efeitos miotóxicos e citotóxicos sejam efetivados. Posteriormente este modelo foi aprimorado e incorporou a saliência hidrofóbica presente na cauda C-terminal como um agente penetrante da membrana e catalizador nos eventos de perturbação de membranas (FERNANDES et al., 2013).

FIGURA 6. Representação dos modelos de citotoxicidade e miotoxicidade das miotoxinas Lys49. Mecanismo de ação para as conformações de Dímero Convencional (A) e Dímero alternativo (B). Retirada de Lomonte, Ângulo e Calderón (2003) (A) e Fernandes et al. (2013) (B).



Tornando a identificação dos determinantes estruturais farmacológicos das miotoxina ainda mais controversa, alguns trabalhos sugerem que estas proteínas agem por meio de sinalização celular via receptor de superfície celular, dada sua especificidade frente a tecidos e tipos celulares. Lambeau et al. (1990), na tentativa de desvendar a especificidade de fosfolipases tóxicas de serpentes da família Elapidae frente a células musculares, identificaram um receptor de alta afinidade a tais toxinas presente em tecido muscular, chamado de receptor M-type. Posteriormente foi encontrada uma isoformas deste receptor em tecido nervoso de córtex cerebral de suínos (ČOPRIČ et al., 1999). Mais tarde, foi observado que a interação do receptor M-type com toxinas de Viperinae não é necessária para a expressão de suas atividades farmacológicas, o que sugere que ela atua, pelo menos, por uma via distinta (PRIJATELJ et al., 2006b).

Apesar destes estudos, não é conhecida a relação das miotoxinas Lys49, especialmente as bothrópicas, com receptores M-type até o momento. Por outro lado, estudantes do Japão foram responsáveis por um achado involuntário. Na busca de identificar novos Fatores de Crescimento Endotelial (VEGF), ao analisarem a sequência de um novo VEGF, notaram que se tratava de uma miotoxina de serpente da espécie *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Foi relatada ainda sua especificidade para com os receptores, a qual liga-se especificamente ao VEGFR-II – ou receptor KDR (*Kinase Domain Receptor*) – em concentrações subnanomolar (YAMAZAKI et al., 2005). Em concordância com este trabalho, Fujisawa et al. (2008) confirmaram que a alta afinidade ao VEGFR-II é específica das miotoxina de serpentes do Grupo IIA e foram além: buscaram pela região de ligação com o receptor através da síntese de peptídeos de diferentes regiões da miotoxina. Surpreendentemente, esses pesquisadores observaram que peptídeos C-terminal ligam-se ao receptor em concentrações de 10^{-8} μ M. Apesar desses achados, pouco se estuda sobre a interação dessas miotoxinas com VEGFR.

Diante da pluralidade entre os modelos de miotoxicidade e evidências recentes, pesquisadores insistem no desenvolvimento de um modelo congruente. Modelos tridimensionais são importantes na predição de como as proteínas interagem e constituem uma ferramenta importante no auxílio do desenvolvimento de modelos de atividade de proteínas. Uma série de miotoxina Lys49 foi cristalizada com diferentes inibidores na tentativa de encontrar pistas de características funcionais que indiquem como ocorre o real mecanismo miotóxico dessas proteínas (DÍAZ-OREIRO; GUTIÉRREZ 1997; PATRÃO-NETO et al., 2013).

No entanto, diferentes limitações podem inviabilizar tal estudo, especialmente quando se trata de interações proteína-proteína, necessária para identificar da interação Lys49-VEGFR-II. Para isso, modelos computacionais de mostram como uma boa ferramenta, através de Dockings moleculares. Docking de proteínas trata-se de cálculos de estruturas tridimensionais (3D) de um complexo proteico gerado a partir de duas individuais estruturas com o objetivo de prever como estas proteínas interagem. Essa área de estudo tem sido desenvolvida em meados dos anos 80 e, desde então, seus métodos foram se aprimorando a partir do conhecimento obtido de diferentes áreas, como física, química, biologia, matemática e computação na tentativa de descrever *in silico* como macromoléculas se comportam (RITCHIE, 2008).

Para calcular tais interações são utilizados diferentes algoritmos com estratégias de *scoring* baseados em energia, como, por exemplo, correlações fast Fourier transform (FFT), geométrico hash e técnica Monte Carlo (MC). Estas técnicas geralmente produzem uma pequena lista de milhares de orientações encontradas no docking que são próximas do modelo de ligação nativa. Com a finalidade de reduzir o número do conjunto de dockings, são utilizadas diferentes informações, como complementariedade de formas, eletrostática e dados bioquímicos para gerar um conjunto mais coeso e direcionado na análise da interface proteína-proteína, o chamado docking dirigido (GABB; JACKSON; STERNBERG, 1997).

Cristalografia de raios X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) são as duas fontes principais para o desenvolvimento de estruturas tridimensionais de macromoléculas e atualmente existem mais de 12 mil estruturas que têm sido depositadas no Protein Data Bank (PDB). Contudo, apenas uma pequena quantidade destas estruturas corresponde a complexos proteína-proteína e isto ocorre graças a dificuldades que tornam tal execução inviável. O grande aumento no sequenciamento de proteínas e dados estruturais, bem como computadores e algoritmos mais eficientes permitem maior sucesso no desenvolvimento de modelos estruturais com alta precisão para várias proteínas presentes num organismo. Portanto, técnicas computacionais como docking proteicos têm se tornado uma importante ferramenta para ajudar a entender os mecanismos moleculares de proteínas e também de sistemas biológicos (ALOY et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar os determinantes estruturais dos efeitos farmacológicos citotóxicos e miotóxicos da miotoxina Lys49 de *Bothrops neuwiedi* (Bn IV) de serpente do Grupo II da Família Viperidae.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as sequências de aminoácidos de diferentes miotoxinas Lys49 e compará-las com fosfolipases cataliticamente ativas Asp49;
- Realizar dockings moleculares entre as miotoxinas Lys49 e moléculas de grande importância na literatura;
- Determinar as características estruturais intrínsecas das miotoxinas Lys49;
- Estudar os determinantes estruturais importantes para os efeitos citotóxicos e miotóxicos;
- Desenvolver modelos estruturais que expliquem suas propriedades citotóxicas e miotóxicas.

4. METODOLOGIA

O presente trabalho fundamentou-se em duas etapas metodológicas características: análise das sequências de aminoácidos das miotoxinas Lys49 e fosfolipases Asp49 de serpentes do Grupo II e realização de dockings moleculares entre a miotoxina Bn IV e moléculas consideradas importantes na literatura. Todas as moléculas utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir do Protein Data Bank (BERNSTEIN et al., 1977).

4.1 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS

O CLC Sequence Viewer é um software capaz de alinhar nucleotídeos ou proteínas usando o algoritmo de Alinhamento Progressivo. Este algoritmo organiza as sequências analisadas por homologia em repetidos ciclos, que resultam numa tabela onde cada linha corresponde a uma sequência estudada e cada coluna corresponde a sua posição no alinhamento. Uma coluna constitui uma sequência onde todos seus resíduos divergiram do seu ancestral comum. Lacunas presentes na tabela – geralmente representadas por um hífen – representam posições onde os resíduos foram inseridos ou excluídos do seu ancestral comum.

Foram utilizadas 15 miotoxinas: miotoxina-II de *Bothrops asper* (PDB: 1CLP) (ARNI et al., 1995), miotoxina-II de *Bothrops godmani* (PDB: 1GOD) (ARNI et al., 1999), miotoxina de *Agkistrodon acutus* (PDB: 1MC2) (LIU et al., 2003), miotoxina de *Bothrops neuwiedi* BnSP-7 (PDB: 1PA0) (MAGRO et al., 2003), miotoxina de *Bothrops neuwiedi* BnSP-6 (PDB: 1PC9) (MAGRO et al., 2003), piratoxina-II de *Bothrops pirajai* (PDB: 1QLL) (LEE et al., 2001), miotoxina de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (PDB: 1S8G) (ABROSIO et al., 2005), miotoxina-II de *Atropoides nummifer* (PDB: 1AOZ) (MURAKAMI et al., 2006), bothropstoxina-I de *Bothrops jararacussu* (PDB: 2H8I) (MURAKAMI et al., 2007), piratoxina-I de *Bothrops pirajai* (PDB: 3CYL) (SANTOS et al., 2009), miotoxina de *Bothrops neuwiedi* Bn IV (PDB: 3MLM) (DELATORRE et al., 2011), miotoxina de *Bothrops moojeni* BjTX-I (PDB: 3T0R)*, miotoxina-II de *Bothrops brazili* (PDB: 4DCF) (ULLAH et al., 2012), miotoxina-II de *Bothrops brazili* BbTX-II (PDB: 4K09) (FERNANDES et al., 2013) e miotoxina-I de *Bothrops moojeni* BjTX-I (PDB: 4KF3) (SALVADOR et al., 2013).

*: Não publicado

Quanto às fosfolipases cataliticamente ativas, foram utilizadas apenas três: fosfolipase A2 de *Agkistrodon halys pallas* (PDB: 1M8R) (XU et al., 2003), fosfolipase A2 de *Deinagkistrodon acutus* (PDB: 1IJL) (GU et al., 2002) e fosfolipase A2 de *Bothrops jararacussu* BthA-I (PDB: 1Z76) (MAGRO et al., 2005).

4.2 DOCKINGS MOLECULARES

Para a realização dos dockings moleculares, foram utilizados dois softwares: HEX 6.3 e Molegro Virtual Docker (MVD). A miotoxina BN IV de *Bothrops neuwiedi* (PDB: 3MLM) foi escolhida como modelo base para todos os testes por se tratar de uma miotoxina de veneno bothrópico e sua estrutura depositada no PDB apresentou-se não-truncada, o que poderia prejudicar os testes.

As moléculas utilizadas como ligantes foram selecionadas de outras estruturas também depositadas no PDB, exceto a molécula de fosfato (PO_4), que foi retirada da molécula de LPS (PDB: 1FI1). As moléculas de diheparina e decaheparina foram retiradas da estrutura 3IRJ – solução de RMN da estrutura de heparina com 24 resíduos – e foram modificadas de acordo com as necessidades. Moléculas de heparina são polissacarídeos, que apresentam como unidade repetitiva um dissacarídeo formado pelos açúcares ácido idurônico e glicosamina. Heparan sulfato, em aproximadamente 90% das moléculas, a unidade repetitiva é formada pelo dissacarídeo [4- β -L-ácido idurônico-2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glicosamina-2,6-disulfato-(1)], ou, resumidamente, Ido-(1,4)-GlcNS (KHAN et al., 2010).

A molécula de LPS foi retirada a partir do PDB 1FI1 (FERGUSON et al., 2001) e foram realizadas torções e edições, quando necessário. E, por fim, a última molécula utilizada nos testes de docking foi extraída do PDB 2X1W, onde foi utilizado apenas um monômero do receptor VEGFR-II (LEPPÄNEN et al., 2010).

O Hex 6.3 é um software que realiza dockings entre proteína e DNA e proteínas com ligantes, além de dockings proteína-proteína, assumindo que tais moléculas são rígidas. Cada molécula é modelada tridimensionalmente a partir de esferas ortogonais, onde são codificadas sua superfície e carga eletrostática através de modelos de densidade estérica de van der Waals e teoria eletrostática, respectivamente. Devido à propriedade ortogonal dos dados, é utilizado um método de cálculo das interações, similar ao método rápido da Transformada de Fourier

(FFT), que usa dados da forma da proteína em questão e demais propriedades num plano Cartesiano para encontrar as correlações entre as estruturas, onde o resultado é dado em forma da energia de interação (E_{Total}) (RITCHIE, 2008). Este software foi responsável pelos dockings realizados entre a miotoxina BN IV e fosfato (PO_4), diheparina, LPS e o receptor VEGFR-II. Vale salientar que os três primeiros representam um docking proteína-ligante e este último, proteína-proteína.

O Molegro Virtual Docker (MVD) trata-se de um software desenvolvido para determinar conformações de como ligantes interagem com macromoléculas, no caso, proteínas. Esta interação é feita por validação iterativa, que consiste na estimativa de inúmeras soluções candidatas, cada uma com uma conformação específica, que têm suas energias calculadas e a solução de melhor energia é então selecionada para outro ciclo de iterações até atingir o melhor resultado energeticamente favorável. Vale destacar que o MDV é capaz de realizar torções no ligante estudado e, portanto, a melhor geometria do ligante será determinada durante o processo de docking. Outra característica importante deste software é que ele permite a realização de docking sítio-dirigido, por meio da escolha da cavidade desejada, o que aumenta fortemente a precisão e velocidade do docking (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

O MVD utiliza o algoritmo PLP, que capta informações intermoleculares entre a proteína e o ligante, como eletrostática, interações estéricas de van der Waals e pontes de hidrogênio; bem como informações intramoleculares do ligante, como flexões e torções das ligações. O MVD também utiliza de outro algoritmo, especializado na busca da melhor solução. Este algoritmo é chamado de Algoritmos Evolucionários (EAs), inspirado na teoria da evolução de Darwin, onde são produzidas diferentes populações de soluções candidatas, que são expostas a variações aleatórias como mutações e recombinações, favorecendo o aumento de soluções candidatas. As soluções que foram alteradas são chamadas de ‘prole’ e as que foram utilizadas como base são chamadas de ‘parentes’. Destas soluções, as de melhores energias são selecionadas para um novo ciclo até o processo final, processo chamado de Clustering Algorithm (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Neste programa foram realizados dockings entre a miotoxina e diheparina e decaheparina. Para estudar as interações proteína-proteína entre a miotoxina e o receptor VEGFR-II, foi utilizada apenas a cauda C-terminal da primeira, que foi transformada em um ligante. Após os testes, a proteína foi reconstituída para a elaboração dos modelos.

Os programas utilizados para edições, torções, deleções e reconstituição da miotoxina foram o Pymol (DELANO, 2002) e Coot (EMSLEY et al., 2010).

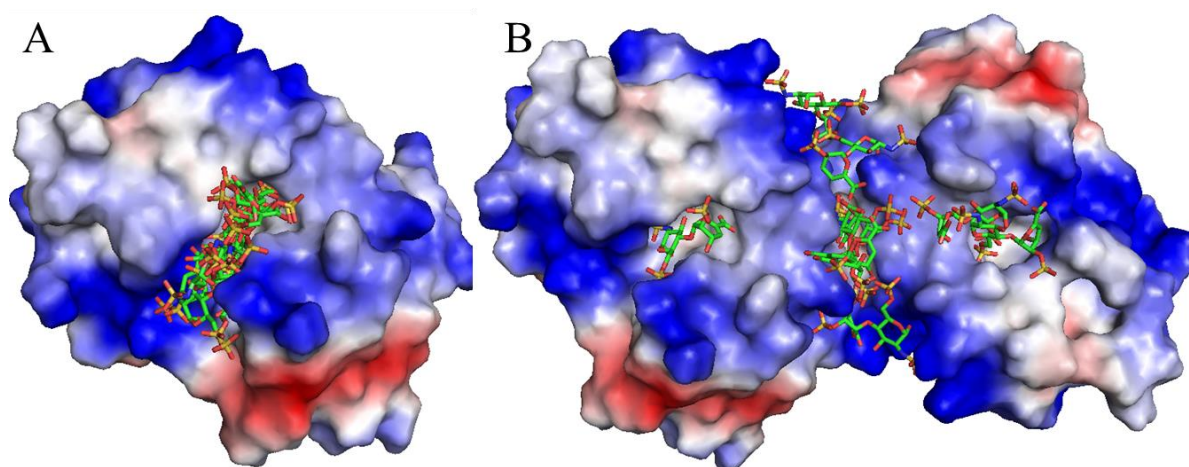
5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho podem ser organizados em dois grupos, com finalidade de compreender os efeitos citotóxicos e miotóxicos. Neste primeiro, foram desenvolvidos dockings entre moléculas aniônicas e anfifílicas com o intuito de encontrar determinantes estruturais responsáveis pelo seu poder perturbador de membranas. Já o segundo, tratou-se de estudar interações com heparan sulfato e o Receptor de Crescimento Endotelial VEGFR-II na busca de determinantes estruturais que justifiquem a ação miotóxica das Lys49 via cascata sinalizadora. Suplementando esses estudos, as análises de sequência entre as proteínas estudadas serão citadas sempre que necessário (APÊNDICE-A).

5.1 ASPECTOS ESTRUTURAIS DA CITOTOXICIDADE

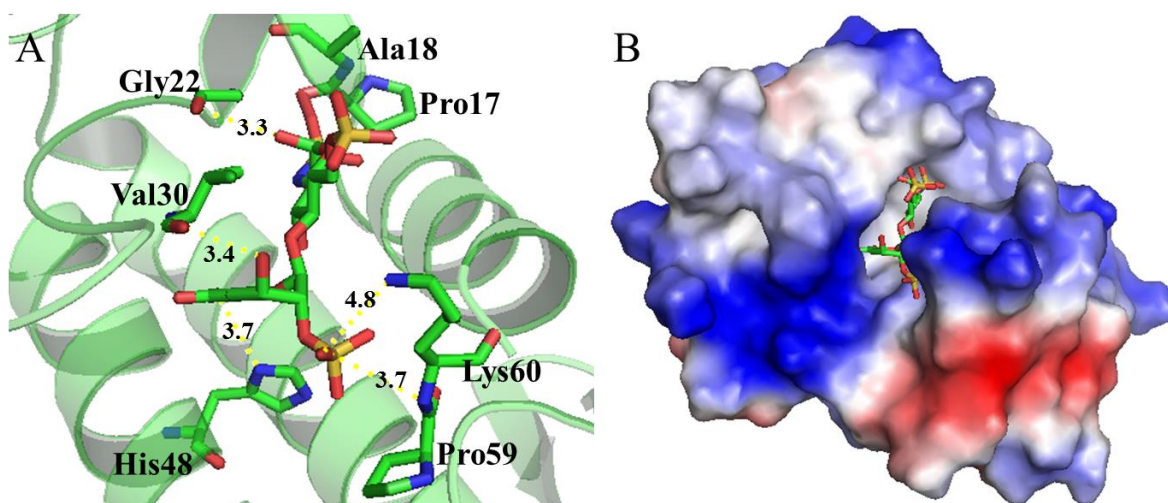
O primeiro grupo de resultados analisados estudou como a miotoxina Bn IV se comporta frente a moléculas aniônicas e anfifílicas. Para isto, foram realizados testes entre a miotoxina e moléculas de diheparina, fosfato e lipopolissacarídeo. Tais testes se mostraram promissores e coesos, como pode ser visto a seguir. Os resultados encontrados no Hex 6.3 entre a Bn IV e diheparina podem ser observados na Figura 7.

FIGURA 7. Representação da superfície de todas as solução entre Bn IV e diheparina para monômero (A) e dímero (B). Imagem gerada pelo Pymol.



Os estudos das interações do monômero da Bn IV com diheparina resultou em interações dentro ou muito próximas da cavidade hidrofóbica. É interessante notar que os dois resultados de menor energia localizaram-se nas regiões extremas do teste. A melhor solução (E_{Total} : -276) apresentou a diheparina dentro da cavidade hidrofóbica. Analisando as interações via WinCoot, pôde-se constatar interações com nove resíduos: Pro17, Ala18, Gly22, Gly29, Val30, His48, Lys49, Pro59 e Lys60. Apesar da maioria destes resíduos serem hidrofóbicos, suas cadeias principais foram capazes de realizar pontes de hidrogênio com os sulfatos do C2 do resíduo de ácido idurônico (Ido), bem como o sulfato N-ligado do resíduo de glicosamina (Glc). Quanto os resíduos His48 e Lys49, foi observado uma boa estabilização entre estes resíduos e a carboxila C6-Ido, totalizando 16 pontes de hidrogênio, sendo oito delas com os sulfatos da estrutura (FIGURA 8).

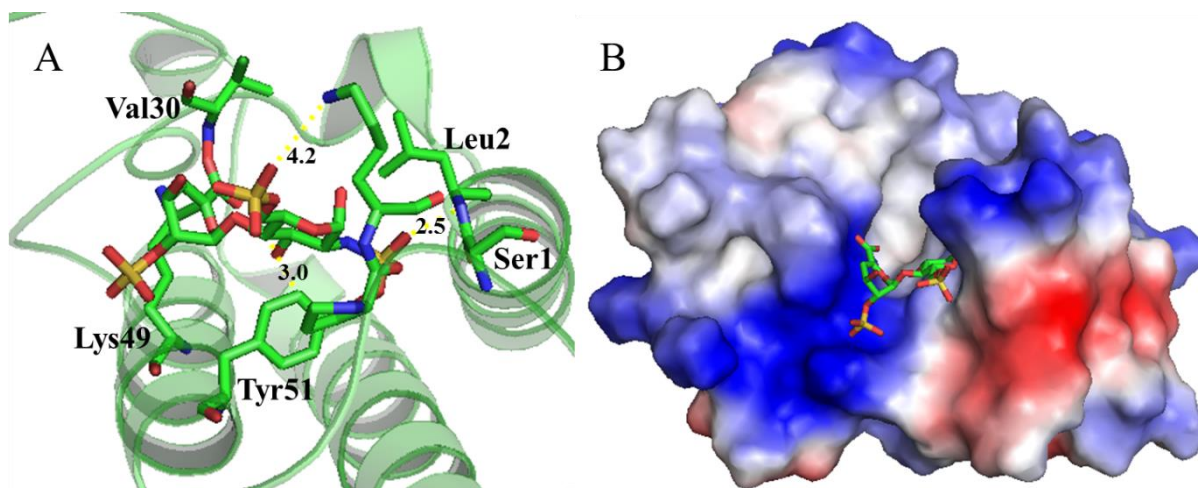
FIGURA 8. Representação da solução -276, entre miotoxina e diheparina: (A) representação das estruturas secundárias e resíduos participantes da interação, com destaque para Pro17, Ala18, Gly22, Val30, His48, Pro59 e Lys60; (B) representação da superfície da proteína interagindo com o ligante. Imagem gerada pelo Pymol.



Por outro lado, a segunda melhor solução (E_{Total} : -247) apresentou a diheparina deslocada para próximo da Hélice II da Bn IV. Apesar de uma energia menor, esta solução mostrou interações com dez resíduos, sendo eles: Ser1, Leu2, Gly29, Val30, Leu31, Lys49, Tyr51, Asp58, Pro59 e Lys60. Além disso, mais interações de hidrogênio foram encontradas, totalizando 24 delas. Todos os três sulfatos da diheparina realizaram pontes de hidrogênio com a Bn IV, além de interações com o O-C5 e nitrogênio da glicosamina. No ponto de vista eletrostático, este último resultado – diferentemente da primeira solução, onde a cavidade tem caráter hidrofóbico – se mostrou mais interessante, uma vez que apresentou uma concentração

maior de cargas positivas (Lys49 e Lys60), se tornando um sítio mais susceptível a cargas negativas dos sulfatos da diheparina (FIGURA 9).

FIGURA 9. Representação da solução -247, entre miotoxina e diheparina: (A) representação das estruturas secundárias e resíduos participantes da interação, com destaque para os resíduos Ser1, Leu2, Val30, Lys49, Tyr51, Asp58, Pro59 e Lys60; (B) representação da superfície da proteína interagindo com o ligante. Imagem gerada pelo Pymol.



A solução de E_{Total} -220 exibiu resultados espacialmente similares com a solução acima. Contudo, suas interações foram diminutas, contando apenas com cinco resíduos – dentre eles Val30 e Lys60 – e novas interações através dos resíduos Glr32, Arg33 e Asp58, totalizando 10 pontes de hidrogênio (FIGURA 10).

Outro resultado que merece atenção apresentou E_{Total} -218, onde a interação da heparina com os resíduos Leu2, Gly6, Ala18, Gly22, Ala23, Val30, His48, Tyr51 e Lys60 resultou em 13 pontes de hidrogênio, dentre elas, todos os três sulfatos participantes da diheparina (FIGURA 11, em verde). O que chama atenção nesta solução é o fato da diheparina assumir uma interação mais intensa com a Hélice I. Isto pode ser interessante para discussões sobre inibições das proteínas miotóxicas. Similarmente, a solução de E_{Total} -216 mostrou-se espacialmente próxima, salve uma pequena alteração que distanciou a diheparina dos resíduos Ala18 e GLy22, impedindo interações hidrofílicas com estes, mas interagindo com o resíduo de Tyr21 através do oxigênio de sua cadeia principal. Além desses dois, os demais resultados seguem a mesma tendência e podem ser observados na Figura 11, com E_{Total} -223, -225, -229, -233 e -238. De modo geral, todos estes resultados se assemelham muito com o melhor resultado e isto indica que os testes na proteína monomérica são mais restritos à cavidade hidrofóbica e a região catiônica próxima a ela.

FIGURA 10. Representação das soluções -220 (diheparina em verde) e -247 (diheparina em roxo) entre miotoxina e diheparina: (A) representação das estruturas secundárias e resíduos participantes da interação, com destaque para os resíduos Val30, Gly32, Arg33, Asp58 e Lys60; (B) representação da superfície da proteína interagindo com o ligante. Imagem gerada pelo Pymol.

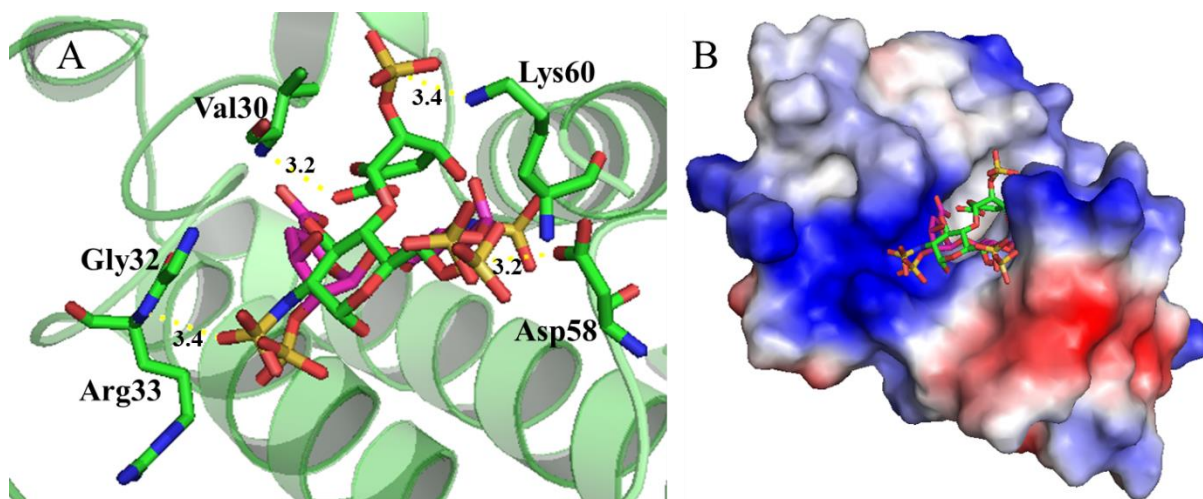
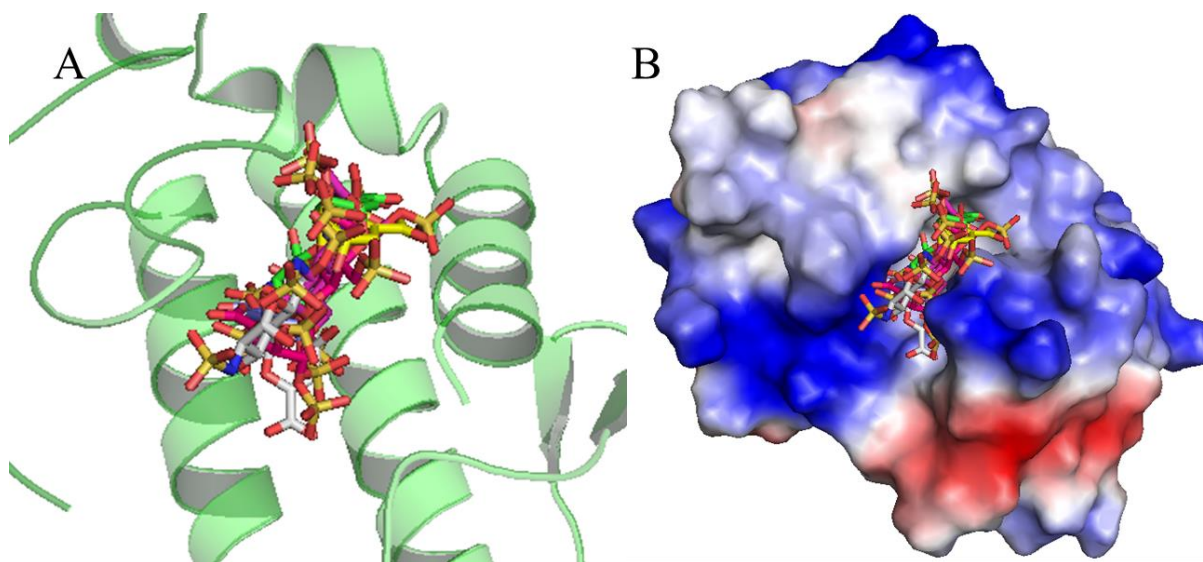


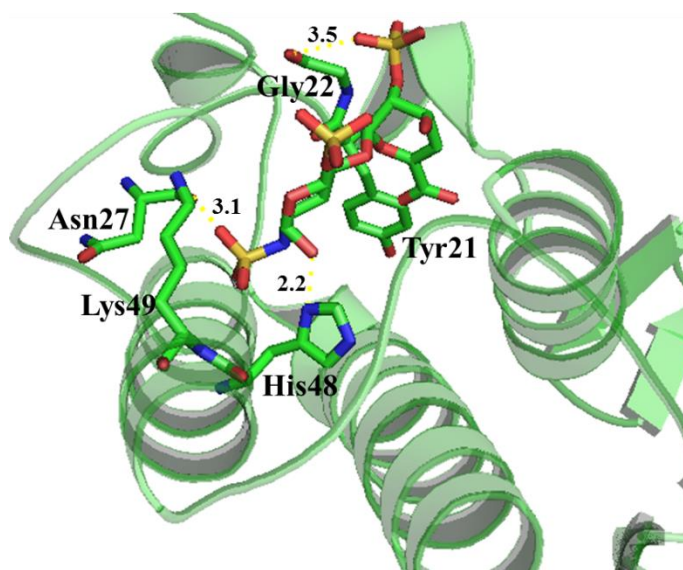
FIGURA 11. Representação das soluções -218, -223, -225, -229, -233 e -238, com diheparinas representadas em roxo, amarelo, branco, vermelho, azul e verde, respectivamente, entre miotoxina e diheparina: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina; (B) representação da superfície da proteína interagindo com os ligantes. Imagem gerada pelo Pymol.



Com relação aos testes realizados entre a miotoxina na forma dimérica e a diheparina (Figura 7B), foram encontradas 10 soluções. De modo geral, as soluções apresentaram diheparinas distribuídas na região intermolecular, salve quatro exceções. A melhor solução, com E_{Total} -299, apresentou a diheparina dentro da cavidade hidrofóbica da miotoxina e contou com interações de seis resíduos, sendo eles: Tyr21, Gly22, Asn27, Cys44, His48 e

Lys49. As cadeias laterais participantes das interações dos resíduos His48 e Lys49 estabilizaram a ligação da diheparina com quatro pontes de hidrogênio das 14 totais (FIGURA 12).

FIGURA 12. Representação da solução -299 entre miotoxina dimérica e diheparina: representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Tyr21, Gly22, Asn27, His48 e Lys49 do monômero A. Imagem gerada pelo Pymol.



A solução seguinte (E_{Total} : -230), apresentou uma solução diferente até então encontrada nos monômeros: localizada na região intermolecular próxima dos resíduos Lys7 dos dois monômeros, dentro da cavidade intermolecular. Esta solução contou com 16 pontes de hidrogênio envolvendo os resíduos Lys7, Leu10, Gln11, Glu12 e Gly14 do monômero A; e Gln11 e Trp69 do monômero B. Apesar de muito próxima do resíduo Lys7 do monômero B, a diheparina não foi capaz de realizar interações polares com tal monômero, diferentemente do nitrogênio da cadeia lateral do resíduo Trp69, que foi importante na sua estabilização, via pontes de hidrogênio com o sulfato N-ligado (FIGURA 13).

Seguindo as soluções localizadas na região intermolecular, foram encontradas mais cinco das 10 soluções do experimento. Na solução de E_{Total} -222 a diheparina dispôs-se mais periférica com relação à solução -230, interagindo com a β -asa do monômero B. Nesta solução foram encontradas 11 pontes de hidrogênio envolvendo os resíduos Thr13, Lys15 e Lys105 do monômero A e os resíduos Ser66, Tyr67, Ser68 e Trp69 do monômero B. Diferente da solução -230, o resíduo Trp69 passou a interagir por meio de sua cadeia principal com o sulfato C2-Ido, uma vez que sua cadeia lateral encontrou-se em posição distal à

diheparina, impedindo interações. Nota-se ainda a participação do resíduo Lys105 – pertencente ao segmento C-terminal ‘KKYRY’ – do monômero A com o sulfato N-ligado da diheparina. Por outro lado, o nitrogênio da cadeia lateral do resíduo Lys15 interagiu com a diheparina por meio da hidroxila C1-Glc, estabilizando a ligação. O resíduo Lys69, apesar de não interagir com o ligante, encontrou-se próximo e poderia participar na interação através de alterações conformacionais da proteína em solução. Já o resíduo Ser66 realizou interações por meio da sua hidroxila com o sulfato C6-Glc (FIGURA 14).

FIGURA 13. Representação da solução -230 entre miotoxina dimérica e diheparina: representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Lys7, Leu10 e Gln11 do monômero A (azul) e Gln11 e Trp69 do monômero B (amarelo). Imagem gerada pelo Pymol.

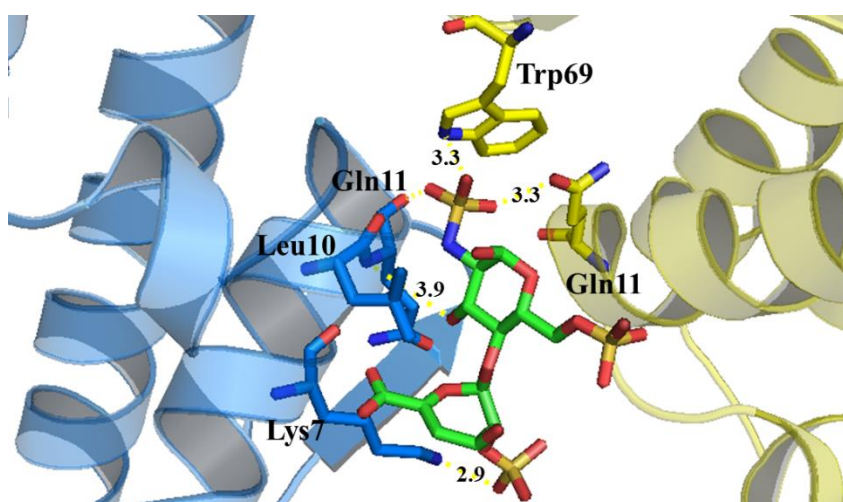
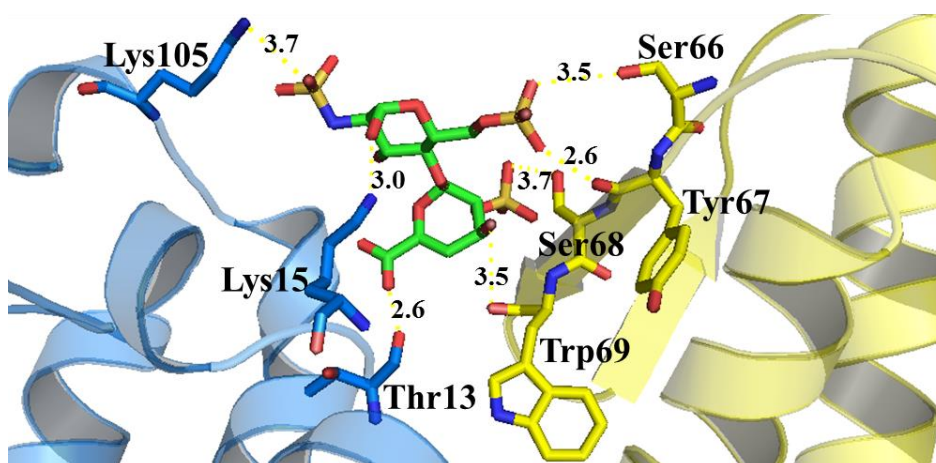
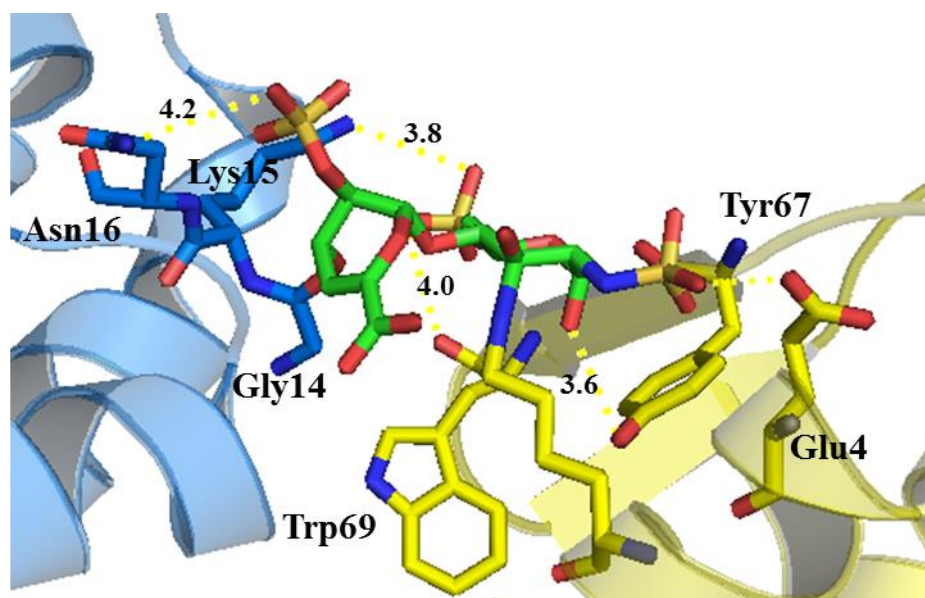


FIGURA 14. Representação da solução -222 entre miotoxina dimérica e diheparina: representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Thr13, Lys15 e Lys105 do monômero A (azul) e Ser66, Tyr67, Ser68 e Trp69 do monômero B (amarelo). Imagem gerada pelo Pymol.



A solução de $E_{\text{Total}} -210$ apresentou a diheparina interagindo com os resíduos Gly14, Lys15 e Asn16 do monômero A e os resíduos Glu4, Lys7, Tyr67 e Trp69 do monômero B. Desta vez o resíduo Lys15 foi capaz de interagir com o sulfato C6-Glc, e o nitrogênio da cadeia principal do resíduo Asn16 estabilizou interações com o sulfato C2-Ido, além da participação da cadeia lateral do resíduo Lys7 na estabilização da hidroxila C3-Glc (FIGURA 15).

FIGURA 15. Representação da solução -210 entre miotoxina dimérica e diheparina: representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Glu14, Lys15 e Asn16 do monômero A (azul) e Glu4, Tyr67 e Trp69 do monômero B (amarelo). Imagem gerada pelo Pymol.



A solução de $E_{\text{Total}} -217$ mostrou-se, em partes, como o simétrica da solução -222 (FIGURA 14), próximo do sítio 'KKYRY' do monômero B, mas localizada mais internamente à proteína com relação ao sítio do resíduo Lys105. Nesta solução foram realizadas interações da diheparina com os resíduos Lys7, Tyr67, Ser68 e Trp69 do monômero A e Gly14, Asn16 e Lys19 do monômero B. É importante notar que a diheparina localizou-se também próxima ao sítio 'KKYRY' com seu sulfato N-ligado mais próximos do resíduo Arg108 (FIGURA 16).

Para finalizar as soluções com diheparina dispostas na região intermolecular, foram geradas ainda as soluções de $E_{\text{Total}} -204$ e -202. Ambas foram encontradas muito próximas do sítio da solução -230. A primeira solução, a diheparina se dispôs similarmente à solução -230, porém mais próxima ao monômero B. Já a segunda solução, a diheparina encontrou-se levemente rotacionada no seu próprio eixo (FIGURA 17).

FIGURA 16. Representação das soluções -217 e -222 entre miotoxina dimérica e diheparina, com a diheparina em verde e roxa, respectivamente: representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Tyr67, Ser68 e Trp69 do monômero A (azul) e Asn16 e Lys19 do monômero B (amarelo). Imagem gerada pelo Pymol.

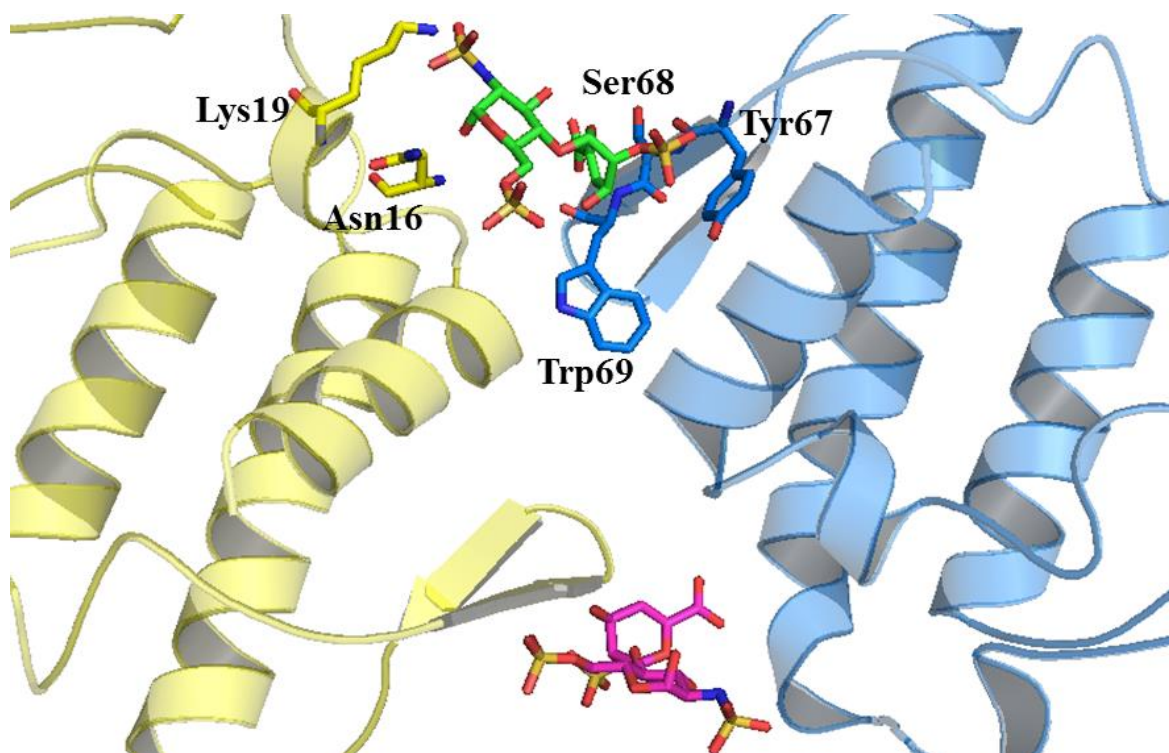
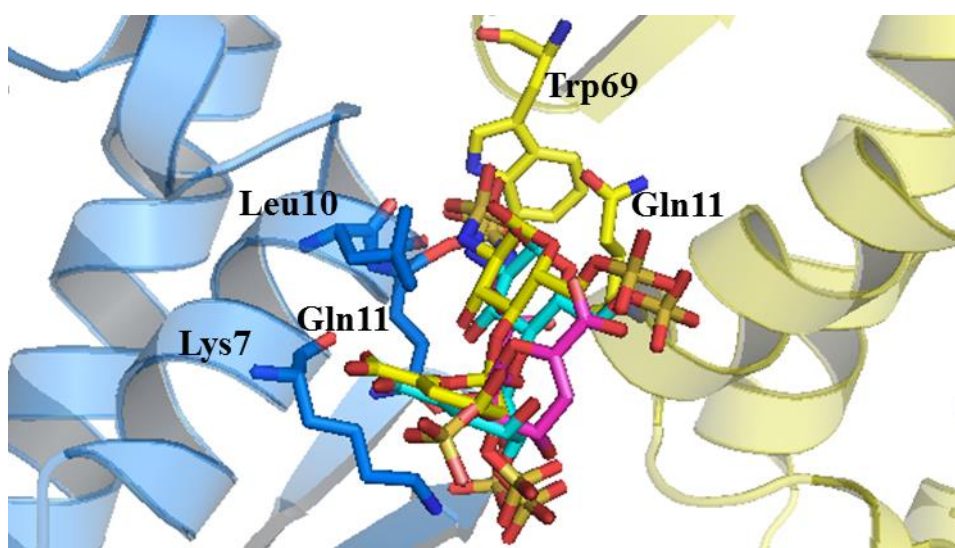
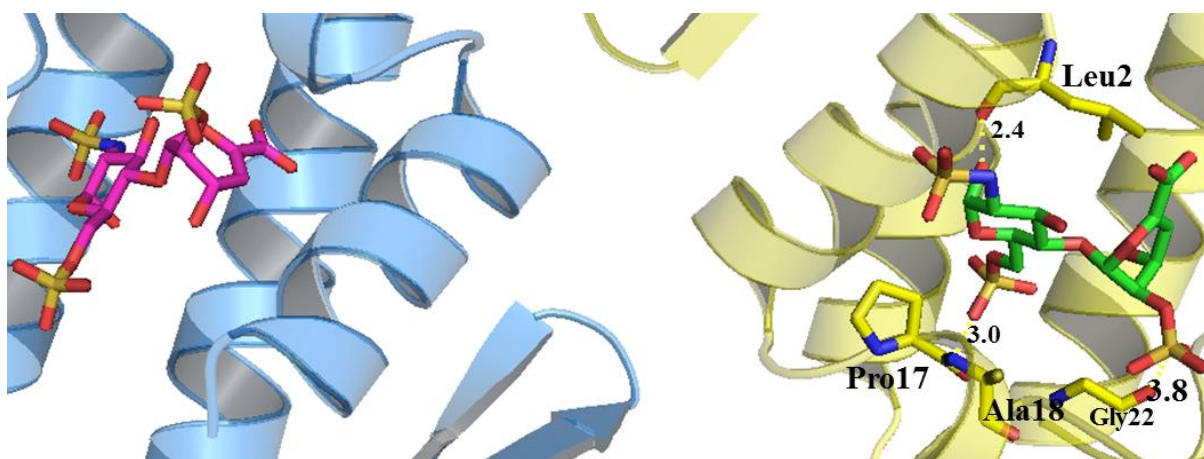


FIGURA 17. Representação das soluções -230, -204 e -202 com diheparina em amarelo, ciano e roxo, respectivamente, com destaque para os resíduos Lys7, Leu10 e Gln11 do monômero A (azul) e Gln11 e Trp69 do monômero B (amarelo). Imagem gerada pelo Pymol.



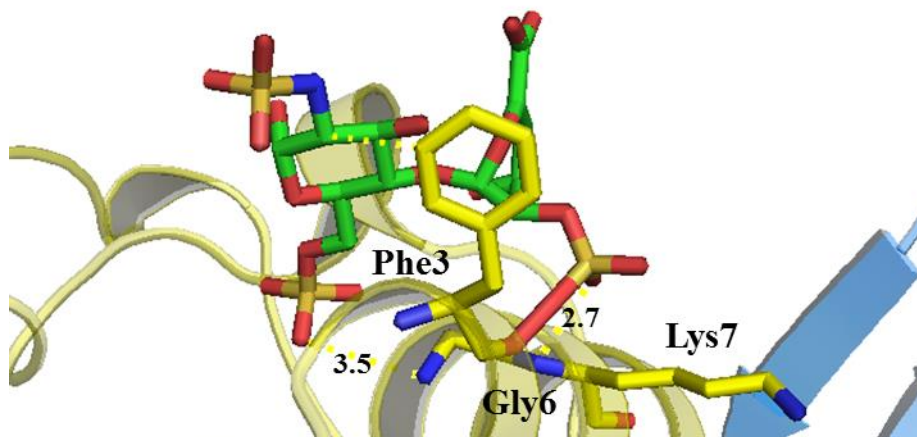
Dos três resultados restantes, o de $E_{\text{Total}} -213$ mostrou-se como um próximo simétrico da solução -299, exceto por a diheparina adotar uma alteração de aproximadamente 180° da solução de menor energia, além de posicionar-se mais externamente à cavidade. Essas alterações resultaram numa menor interação tanto de interações polares – apenas quatro pontes de hidrogênio – quanto de quantidade de resíduos – Leu2, Pro17, Ala18 e Gly25 (FIGURA 18).

FIGURA 18. Representação da solução -213 e -299 entre miotoxina dimérica e diheparina, com a diheparina em verde e roxa, respectivamente: representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Leu2, Pro17, Ala18 e Gly22 do monômero B (amarelo). Imagem gerada pelo Pymol.



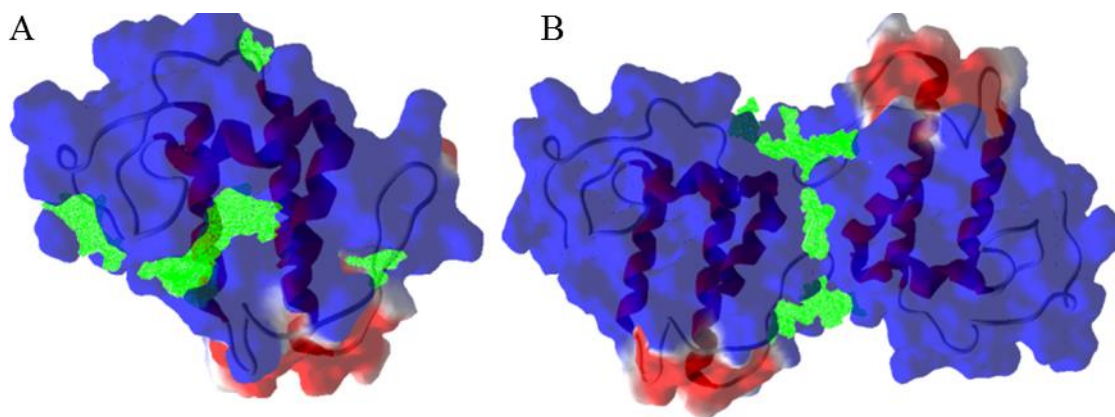
Já a solução de $E_{\text{Total}} -208$ foi gerada com a diheparina disposta fora da cavidade hidrofóbica e próxima à Hélice I do monômero B, onde interagiu somente com três resíduos: Phe3, Gly6 e Lys7. A carboxila da cadeia principal do resíduo Gly6 e nitrogênio da cadeia principal do resíduo Lys7 participaram na estabilização do sulfato C2-Ido, bem como o nitrogênio do resíduo 6G participou na estabilização do sulfato C6-Glc da diheparina (FIGURA 19). Por fim, a solução mais inesperada, de $E_{\text{Total}} -206$, apresentou a diheparina localizada exatamente nas ‘cotas’ da miotoxina. A diheparina se dispôs entre a β -asa e os resíduos Arg97 de ambos monômeros. Contou com interações polares dos resíduos Asp70, Lys71, Thr72 e Arg97 do monômero A e Glu12, Asp70, Lys71 e Thr72 do monômero B.

FIGURA 19. Representação da solução -208 entre miotoxina dimérica e diheparina: representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Phe3, Gly6 e Lys7 do monômero B (amarelo). Imagem gerada pelo Pymol.



Para tentar estabelecer com maior satisfação os sítios de afinidade eletrostática não-específica, foram realizados testes entre a miotoxina e diheparina também no Molegro Virtual Docker, com finalidade comparativa. Para a realização tais testes, foi necessário encontrar e determinar quais as cavidades de interesse para os dockings com o ligante. Então, baseado nos resultados encontrados no HEX 6.3, foram estudadas quatro cavidades para a miotoxina monomérica e três para a dimérica, onde duas soluções foram geradas para cada uma delas (FIGURA 20).

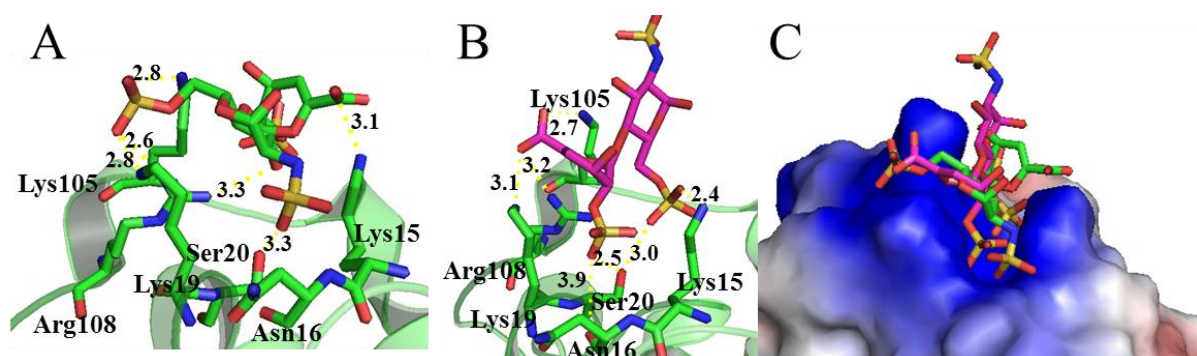
FIGURA 20. Representação das cavidades identificadas no monômero (A) e dímero (B) da miotoxina utilizando o programa MVD. Imagem gerada pelo MVD.



No estudo do monômero da Bn IV (FIGURA 20A), a primeira cavidade estudada localizou-se próxima a região 'KKYRY' e ambas as soluções apresentaram Score de -118 (FIGURA 21). A solução 1 fez interações com os resíduos Lys15, Asn16, Lys19, Ser20,

Tyr103, Lys105 e Arg108 da proteína. Por se tratar de uma região notadamente catiônica, foram encontradas 20 interações de pontes de hidrogênio. Notou-se a estabilização do sulfato N-ligado da diheparina com a cadeia principal do resíduo Asn16, além da hidroxila do resíduo Ser20. O sulfato C6-Glc foi estabilizado pelas cadeias laterais dos resíduos Lys19, Lys105 e Arg108, garantindo uma boa estabilização, além da participação do resíduo Lys105 na estabilização do oxigênio que liga os monômeros da diheparina e hidroxila C3-Ido. Por fim, foi observada uma sutil estabilização entre a carboxila da cadeia principal do resíduo Tyr103 com o sulfato C2-Ido (FIGURA 21A). A solução 2, na mesma cavidade, contou também com 20 pontes de hidrogênios realizadas entre os mesmos resíduos, exceto o resíduo Asn16. Foram observadas ainda interações interessantes, como a cadeia lateral do resíduo Ser20 estabilizando os sulfatos C2-Ido e C6-Glc da diheparina, além da Lys105 estabilizar o dissacarídeo com pontes na hidroxila do carbono 3-Glc e O-C5-Ido, o resíduo Arg108 estabilizar a diheparina via O-C5 e sulfato C2-Ido e sulfato C6-Glc (FIGURA 21B). Esta solução, apesar de não ter exibido interações com o resíduo Asn16 da miotoxina, apresentou-se mais estável superficialmente como a primeira solução, uma vez que seus sulfatos C2-Ido e C6-Glc apresentaram-se cada um dentro de um sulco característico da região (FIGURA 2C).

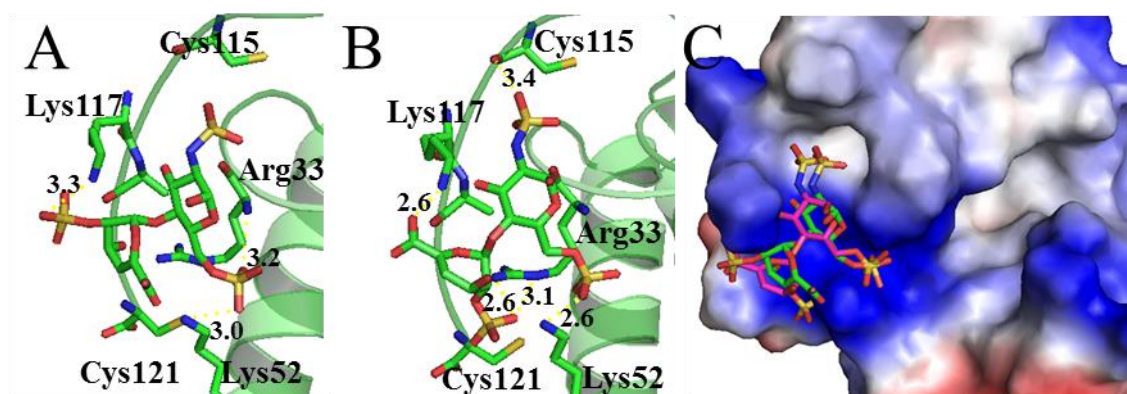
FIGURA 21. Representação da cavidade ‘KKYRY’ monomérica com as soluções 1 (A) e 2 (B), ambas com Score de -118, entre a miotoxina e diheparina: (A e B) representação das estruturas secundárias, com destaque para os resíduos Lys15, Asn16, Lys19, Ser20, Lys105 e Arg108; (C) representação da superfície da miotoxina. Imagem gerada pelo Pymol.



A segunda cavidade localizou-se na região envolvendo a região C-terminal/Hélice II, o que permitiu a interação com o loop de cálcio (FIGURA 22). A solução 1, com Score de -146, mostrou interações com os resíduos Arg33, Lys52, Cys115, Lys117, Ala118 e Cys121. Tal solução apresentou 23 pontes de hidrogênio e estrutura bem estabilizada pelas cadeias laterais dos resíduos Lys52 e Lys117. Superficialmente, apesar do fosfato N-ligado da diheparina encontrar-se num sítio com caráter hidrofóbico, ela interage com os resíduos

Arg33 e Cys115 através de suas cadeias principais (FIGURA 22A). A solução 2, Score de -124 teve mesma disposição espacial, contando com uma pequena aproximação da diheparina para o resíduo Arg33, favorecendo pontes de hidrogênio com seu nitrogênio com a carboxila da cadeia principal dos resíduos Leu31 e Arg33. Com 25 pontes de hidrogênio, foi estabilizada de forma semelhante à solução 1 (FIGURA 22B).

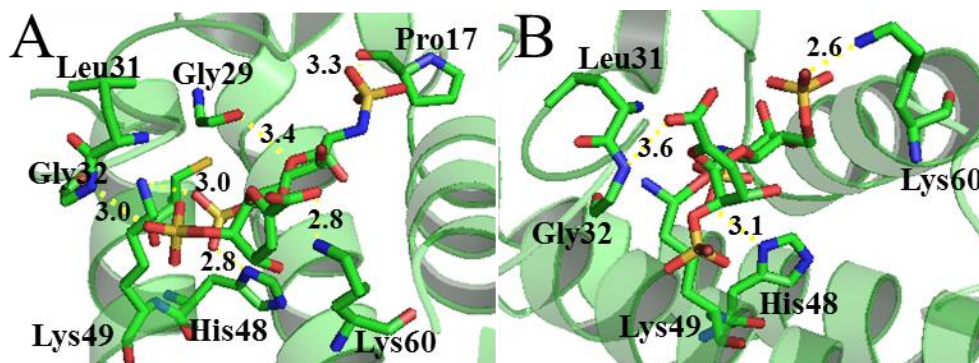
FIGURA 22. Representação da cavidade C-terminal/Hélice II monomérica com as solução 1 e 2, Scores de (A) -146 e (B) -124, respectivamente, entre a Bn IV e diheparina: (A e B) representação das estruturas secundárias, com destaque para os resíduos Arg33, Lys52, Cys115, Lys117, Ala118 e Cys121. Diheparina representadas em verde; (C) representação da superfície da miotoxina com diheparinas em verde e roxo para as soluções 1 e 2, respectivamente. Imagem gerada pelo Pymol.



A terceira cavidade estudada localizou-se na cavidade hidrofóbica da miotoxina, onde o resíduo Lys49 é encontrado (FIGURA 23). A solução 1 apresentou Score de -136 e contou com quinze pontes de hidrogênio, envolvendo os resíduos Pro17, Asn27, Gly29, Val30, Leu31, Gly32, Cys44, His48, Lys49 e Lys60. Apesar do caráter hidrofóbico, é encontrada uma boa densidade de cargas positivas, além da participação do resíduo Lys60, que pôde estabilizar melhor a interação com cargas positivas. Notou-se uma boa estabilização dos sulfatos C2-Ido e C6-Glc da diheparina através dos resíduos His48 e Lys49, além de uma sutil interação com o sulfato N-ligado da diheparina. Além dos sulfatos, notou-se a participação da Lys60, estabilizando a carboxila C6-Ido, e da carboxila do resíduo Gly29 da miotoxina, estabilizando o O-5-Glc (FIGURA 23A). A solução 2, com Score de -123, mostrou uma leve aproximação da diheparina para o resíduo Lys52, e, conseqüentemente, uma leve migração para fora da cavidade hidrofóbica. Devido estas modificações espaciais, o nitrogênio da diheparina deixou de interagir com a Pro17 e passou a interagir com a His48. Os resíduos 29-32 do loop, bem como o resíduo Lys60, continuaram estabilizando a ligação, mas

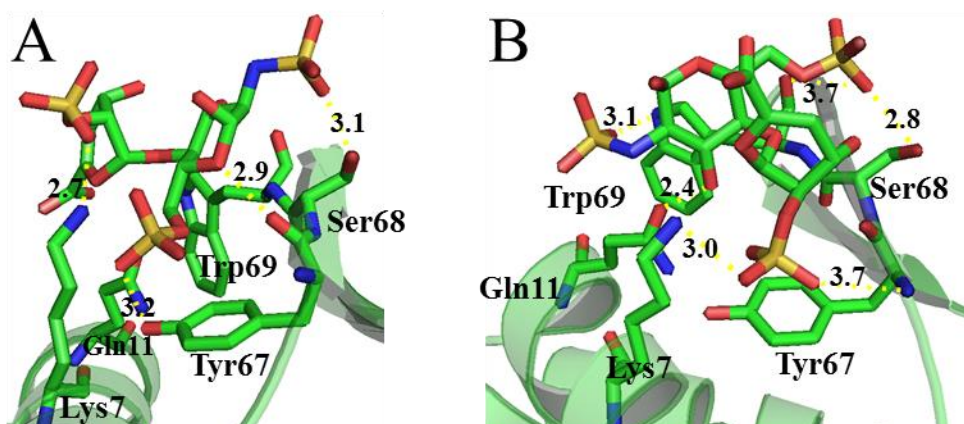
vale salientar a importância dos resíduos Lys52 e Arg33, possíveis candidatos para interações eletrostáticas (FIGURA 23B).

FIGURA 23. Representação da cavidade hidrofóbica monomérica com as solução 1 e 2, Scores de (A) -136 e (B) -123, respectivamente, entre a miotoxina e diheparina: representação das estruturas secundárias, com destaque para os resíduos Pro17, Gly29, Leu31, Gly32, Cys44, His48, Lys49 e Lys60. Diheparinas representadas em verde. Imagem gerada pelo Pymol.



A quarta, e última, cavidade estudada não se trata exatamente de uma cavidade, mas de um sulco gerado entre a Hélice I e a região de β -asa da proteína. Dessa forma, os Scores foram baixas para os parâmetros do programa: -79 e 65. Em ambas as soluções os resíduos participantes foram os resíduos Lys7, Gln11, Tyr67, Ser68 e Trp69. A solução de -79 contou com quinze pontes de hidrogênio estabilizada pelo resíduo Lys7, bem como a cadeia lateral do resíduo Trp69. Já a segunda solução, apresentou 19 pontes de hidrogênio, também estabilizada pelo resíduo Lys7, mas não interagiu com a cadeia lateral do resíduo Trp69, permanecendo apenas a interação com sua cadeia principal.

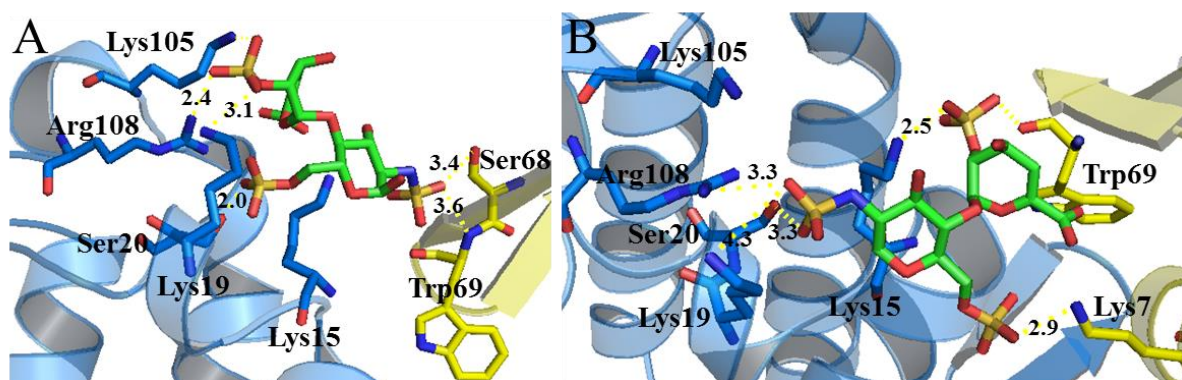
FIGURA 24. Representação da cavidade 4 monomérica com as soluções 1 (A) e 2 (B), Scores -79 e -65, respectivamente, entre a miotoxina e diheparina: representação das estruturas secundárias, com destaque para os resíduos Lys7, Gln11, Tyr67, Ser68 e Trp69. Imagem gerada pelo Pymol.



Com relação aos testes envolvendo o dímero da miotoxina, novamente, os resultados do HEX 6.3 serviram como base para a busca de cavidades na região intermolecular. Para tal feito, foram selecionadas três cavidades (FIGURA 20B).

A primeira cavidade estudada foi localizada na região KKYRY do monômero A (KKYRY-1). Dos resultados obtidos, dois foram interessantes. A solução 1, de Score -130, localizou-se nos sulcos encontrados no sítio 'KKYRY', onde a diheparina foi estabilizada pelos resíduos Gly14, Lys15, Lys19, Ser20, Lys105 e Arg108 do monômero A e apenas o resíduo Ser68 do monômero, através de 24 pontes de hidrogênio. Foi possível observar a importância dos resíduos Lys105 e Arg108 na estabilização do sulfato C2-Ido e da Ser20 na estabilização do fosfato C2-Glc (FIGURA 25A). A solução 2, com Score -128, localizou-se próximo ao resíduo Trp69, fazendo com que a diheparina se posicionasse mais próxima à região intermolecular. As interações desta solução foram idênticas para o monômero A, mas para o monômero B os resíduos Lys7 e Trp69 participaram da estabilização da diheparina por meio de dezessete pontes de hidrogênio, através da interação com os sulfatos C6-Glc e C2-Ido da diheparina (FIGURA 25B).

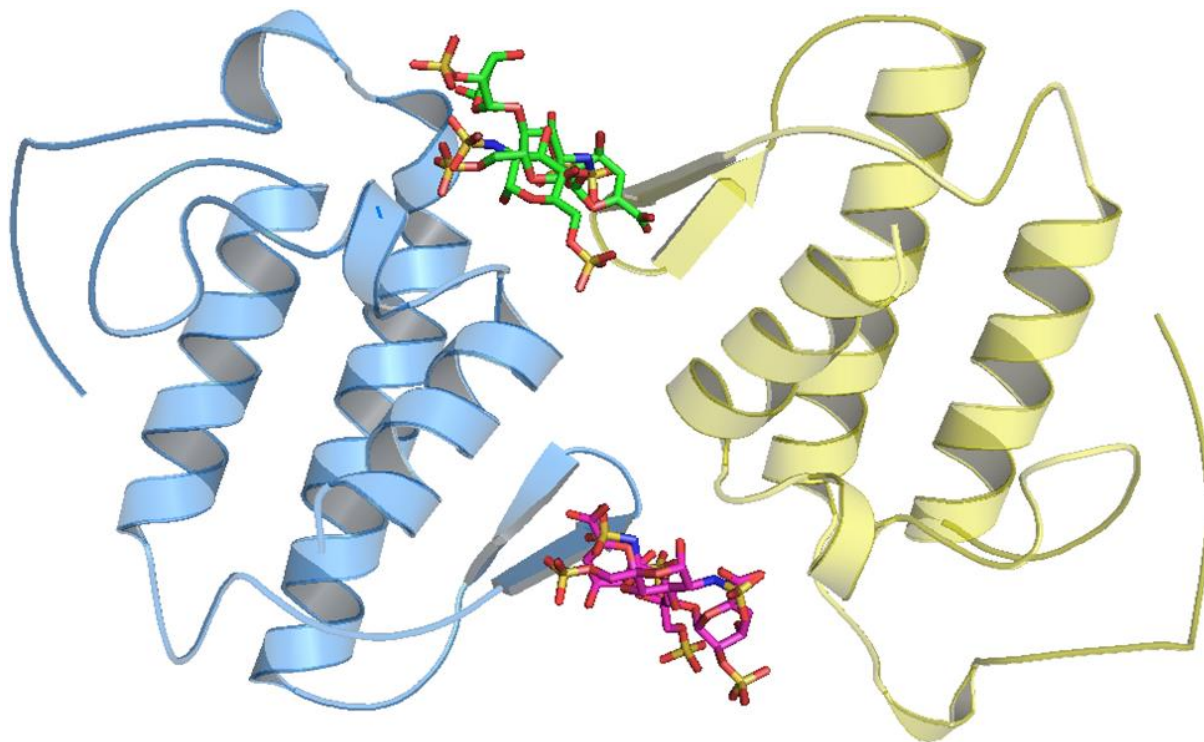
FIGURA 25. Representação da cavidade KKYRY-1 dimérica com as soluções 1 e 2, Scores de (A) -130 e (B) -128, respectivamente, entre a miotoxina e diheparina: representação das estruturas secundárias, com destaque para os resíduos Lys15, Lys19, Ser20, Lys105 e Arg108 do monômero A (azul) e Lys7, Ser68 e Trp69 do monômero B (amarelo). Imagem gerada pelo Pymol.



Como podemos observar na Figura 26, o segundo grupo de soluções foi gerado como simétrico ao primeiro grupo, sendo localizado na região KKYRY do monômero B (KKYRY-2). A solução 1, Score -159, mostrou-se muito próximo dos resultados simétricos, com exceção da participação dos resíduos Asn16 do monômero B e dos resíduos Gln11 e Lys69. A solução 2, Score -154, também se aproximou da segunda solução do simétrico, com a

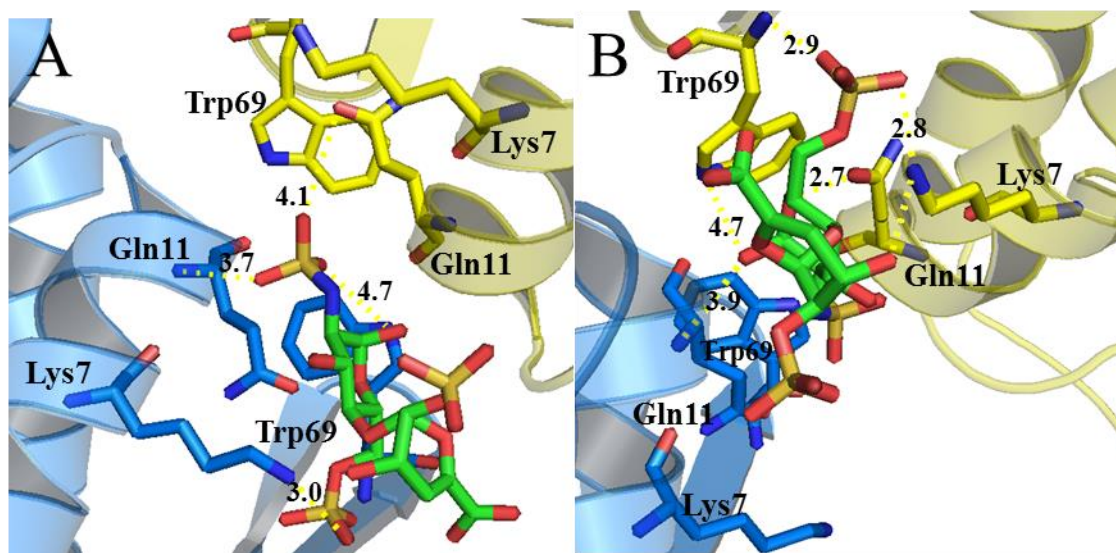
diheparina localizada mais próxima da região intermolecular. Esta, contou com as mesmas interações, exceto pela ausência de pontes de hidrogênio com os resíduos Lys105 e Arg108 do monômero B e, para o monômero A, os resíduos Gln11 e Lys69 participaram da estabilização.

FIGURA 26. Representação das cavidades KKYRY dos dois grupos de soluções para este sítio. Solução de diheparina (verde) complexada no sítio KKYRY do monômero A (azul) e (roxo) no sítio KKYRY do monômero B (amarelo). Imagem gerada pelo Pymol.



A terceira e última cavidade estudada trata-se da cavidade intermolecular, com caráter levemente carregado em suas extremidades e hidrofóbico em seu centro. De modo geral, as soluções desse teste apresentaram poucas interações, com Scores de -129 e -132, onde as diheparinas se encontraram dispostas dispersas sobre a extensão intermolecular da miotoxina. Na solução 1 a diheparina localizou-se de forma mais periférica à miotoxina. Apresentou interações com os resíduos Lys7, Gln11 e Trp69 do monômero A e Leu10, Gly14 e Asn16 do monômero B, totalizando quatorze pontes de hidrogênio. Já na solução 2, a diheparina adquiriu uma posição mais central com relação à miotoxina. Esta, contou com interações dos resíduos Leu10, Gly14 e Asn16 do monômero A e Lys7, Gln11, Trp66 e Trp69 do monômero B, totalizando doze pontes de hidrogênio.

FIGURA 27. Representação da cavidade intermolecular com as soluções 1 (A) e 2 (B), Scores de -129 e -132, respectivamente, entre a miotoxina e diheparina: representação das estruturas secundárias, com destaque para os resíduos Lys7, Gln11, Trp69 de ambos os monômeros. Imagem gerada pelo Pymol.

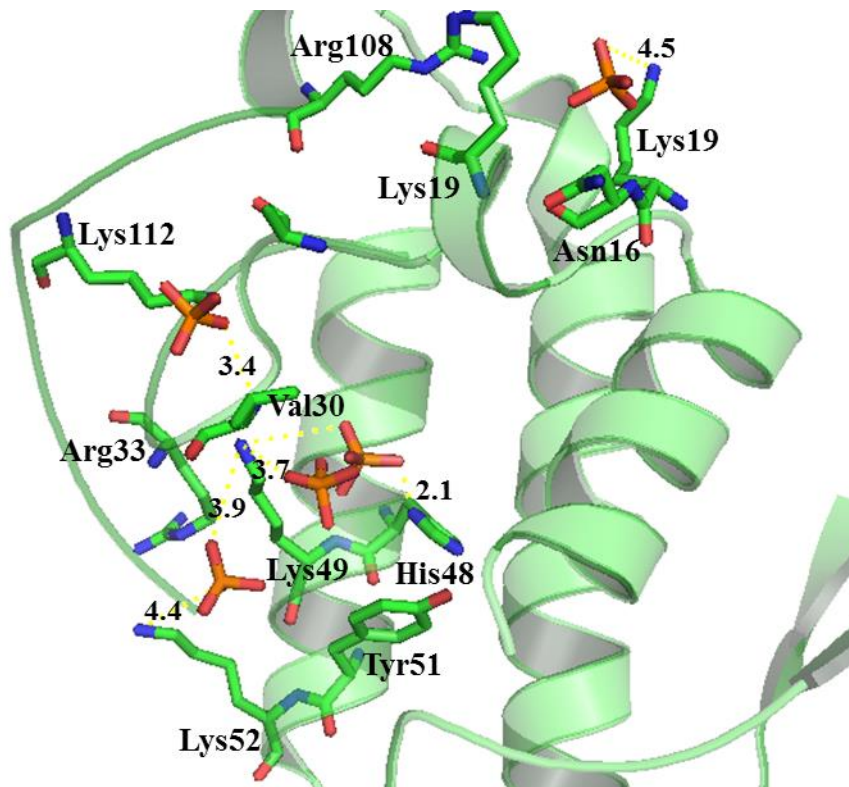


Os testes realizados com moléculas de fosfato apresentaram resultados interessantes na busca de regiões com afinidade a cargas negativas para as miotoxina Lys49 do Grupo II de serpentes. Além do mais, estes resultados mostram boa congruência com os resultados até então obtidos com diheparina.

Nos testes com a Bn IV monomérica, foram encontradas cinco soluções, todas interagindo com 3-4 resíduos. A melhor solução, com E_{Total} -367, apresentou o PO_4 no sítio onde é encontrada a sequência KKYRY, região de alta densidade de cargas positivas, interagindo com os resíduos Lys15, Lys19, Ser20 e Lys108 dentro de uma pequena cavidade formada pelos resíduos Lys15, Lys19 e Lys105. A segunda melhor solução, com E_{Total} -297, foi localizada numa outra região cavidade de grande densidade de cargas positivas, onde interagiu com os resíduos Lys49, Tyr51 e Lys52.

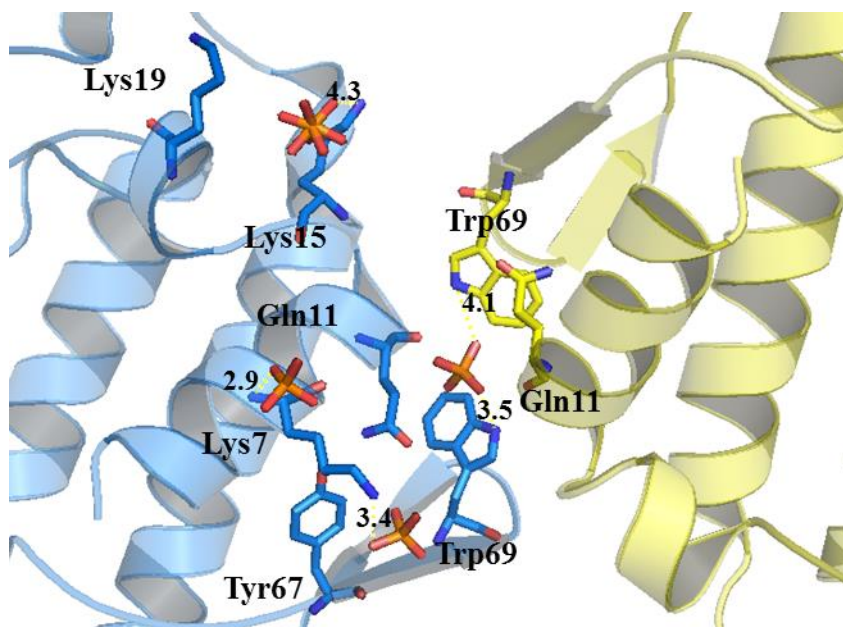
A solução seguinte, E_{Total} : -296, encontrou-se próxima à segunda, porém mais próxima da cavidade hidrofóbica. Foram encontradas interações com os resíduos Val30, His48 e Lys49. Aqui, é interessante notar a participação do loop de cálcio. Na penúltima solução, E_{Total} : -293, o PO_4 localizou-se dentro da cavidade hidrofóbica interagindo com os resíduos Cys44, His48 e Lys49. Por fim, a última solução, E_{Total} : -286, localizou-se próximo ao loop de cálcio e densidade hidrofóbica da região C-terminal – próxima ao resíduo Lys112 – e apresentou interações com os resíduos Gly22, Val30 e Leu31.

FIGURA 28. Representação das soluções dos dockings entre fosfato (PO_4) e miotoxina monomérica: representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Lys15, Asn16, Lys19, Ala23, Val30, His48, Lys49, Tyr51, Lys52, Arg108 e Lys112. Imagem gerada pelo Pymol.



Os testes realizados com dímeros mostraram resultados bem diferentes. Os dois melhores resultados, E_{Total} -436 e -425, localizaram-se exatamente na mesma cavidade da melhor solução dos testes com monômeros: no sítio da sequência KKYRY. Estas soluções interagiram com os resíduos Lys15, Asn16, Lys19 e Ser20. A terceira solução, E_{Total} : -396, mostrou o PO_4 numa outra região positiva, porém localizada na região do resíduo Lys7, contando ainda com interações dos resíduos Gln11, Tyr67, Ser68 e Trp69. A penúltima solução, E_{Total} -355, localizou-se em cima do resíduo Lys7, sobre a Hélice I, interagindo apenas com os resíduos Lys7 e Leu10. Na última solução, E_{Total} -353, o PO_4 localizou-se dentro da cavidade intermolecular, com caráter negativo, envolvendo os resíduos Gln11 e Trp69 (FIGURA 29).

FIGURA 29. Representação das soluções dos dockings entre fosfato e miotoxina dimérica: representação das estruturas secundárias, com destaque para os resíduos Lys7, Gln11, Lys15, Asn16, Lys19, Tyr67 e Trp69 do monômero A (azul) e Gln11 e Trp69 do monômero B (amarelo). Imagem gerada pelo Pymol.



Para finalizar os testes na busca de regiões com afinidade a regiões aniônicas, foram realizados testes entre a miotoxina e lipopolissacarídeo (LPS).

Os testes envolvendo LPS e apenas um monômero da PLA apresentaram dez soluções, com E_{Total} variando de -601 à -378. Dos sítios encontrados nas soluções, três foram essenciais para a ligação do LPS: a cavidade hidrofóbica nas proximidades do loop de cálcio, próximo ao resíduo His48; a região da alça referente ao loop elapídico, no qual pertence o resíduo Lys52 e uma boa densidade de carga positiva; e a região do sítio KKYRY, próximo à região C-terminal. Vale ressaltar ainda a participação inevitável das regiões das caudas hidrofóbicas, diminuindo a energia de ativação e favorecendo um resultado mais satisfatório (FIGURA 30).

A melhor solução, E_{Total} -601, apresentou apenas cinco pontes de hidrogênio, com os resíduos Gly32, Lys49 e Lys52 participantes desta interação. O fosfato da cabeça do LPS encontrou-se estabilizado pelos resíduos positivos Arg33 e Lys52 da miotoxina, contando como um possível candidato para estabilização de cabeças de fosfolipídios. Interações hidrofóbicas foram encontradas envolvendo uma cauda do LPS e a região C-terminal da

proteína composta por três resíduos hidrofóbicos conservados: Leu111, Pro113 e Phe114 (FIGURA 31).

FIGURA 30. Representação de todas as soluções dos dockings entre lipopolissacarídeo (LPS) e miotoxina monomérica: representação da superfície eletrostática e das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os três sítios encontrados, evidenciados pelos LPS roxo, amarelo e azul claro. Imagem gerada pelo Pymol.

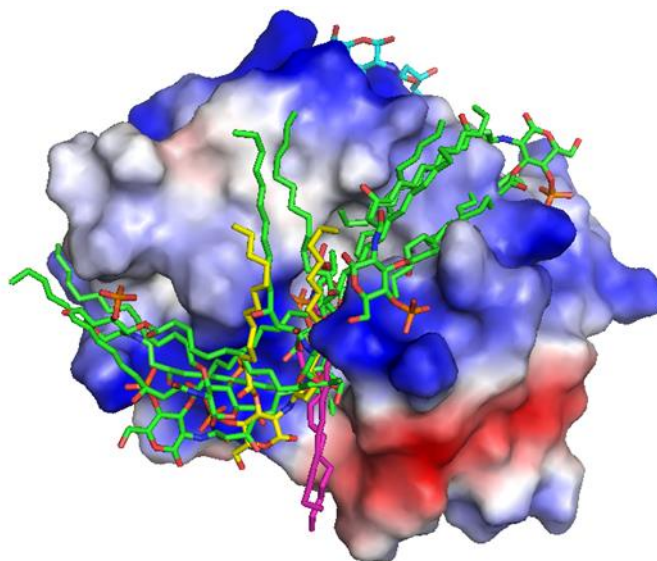
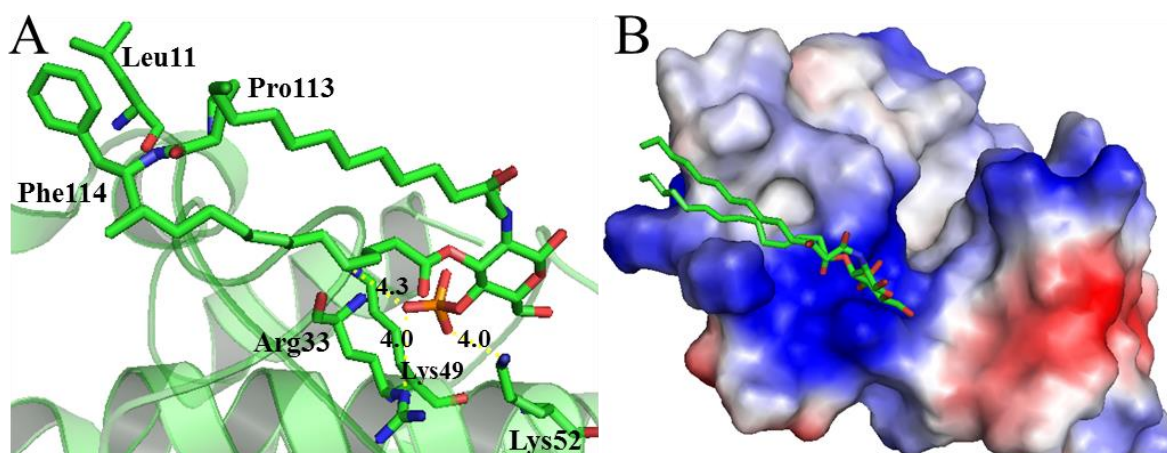


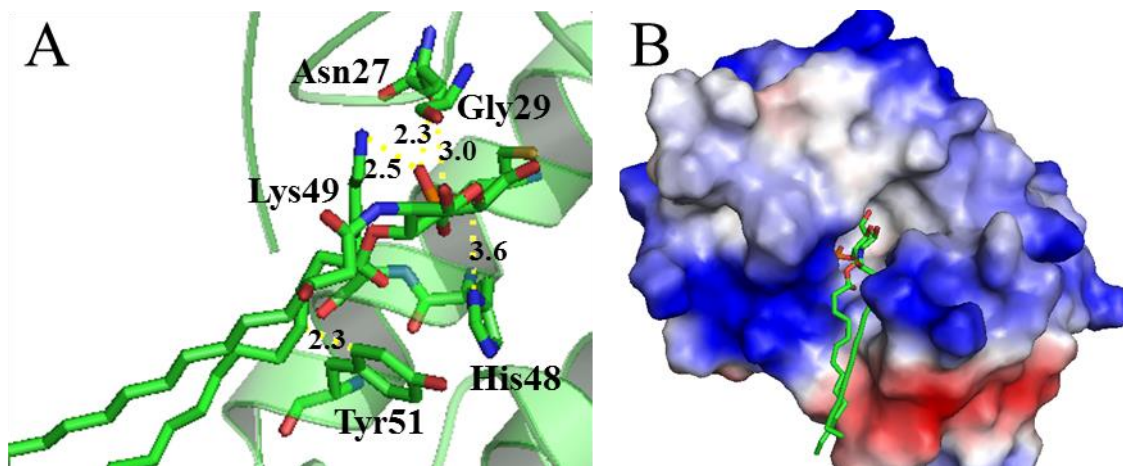
FIGURA 31. Representação da solução -601 entre a miotoxina monomérica e LPS: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Arg33, Lys49, Lys52, Leu111, Pro113 e Phe114 e (B) representação da superfície da miotoxina e o LPS ligado. Imagem gerada pelo Pymol.



O resultado de E_{Total} -435 apresentou interações envolvendo a cabeça polar do LPS dentro da cavidade hidrofóbica da proteína e suas caudas dispostas para o loop elapídico. Esta solução contou com interações envolvendo os resíduos Tyr21, Asn27, Gly29, Cys44, His48 e

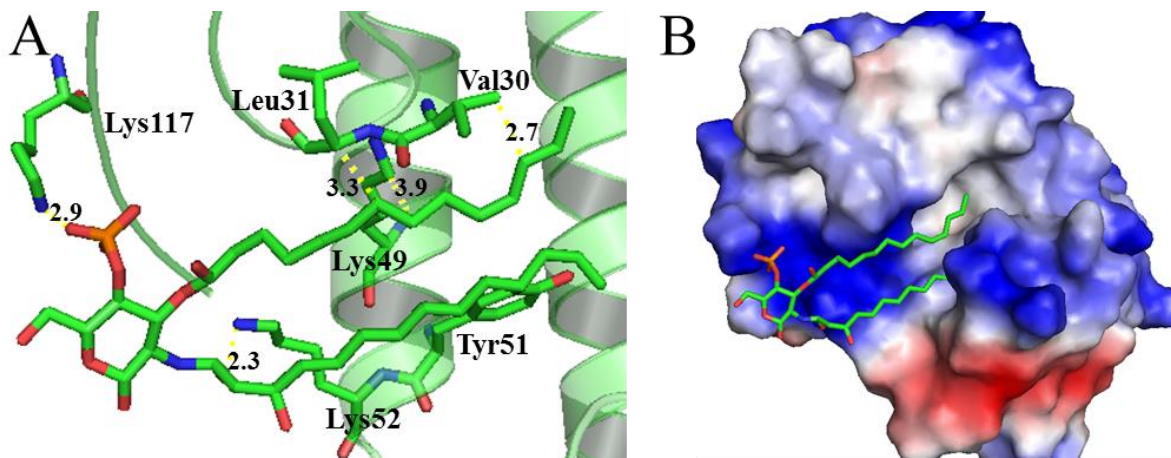
Lys49 da miotoxina, que participaram das interações polares com a cabeça do LPS, totalizando treze pontes de hidrogênio. Quanto às interações hidrofóbicas, foi encontrada uma densidade sutil envolvendo a cadeia lateral do resíduo Tyr51 (FIGURA 32).

FIGURA 32. Representação da solução -435 entre a miotoxina monomérica e LPS: representação das estruturas secundárias, com destaque para os resíduos Asn27, Gly29, Cys44, His48, Lys49 e Tyr51 (A) e representação da superfície da miotoxina e o LPS (B). Imagem gerada pelo Pymol.



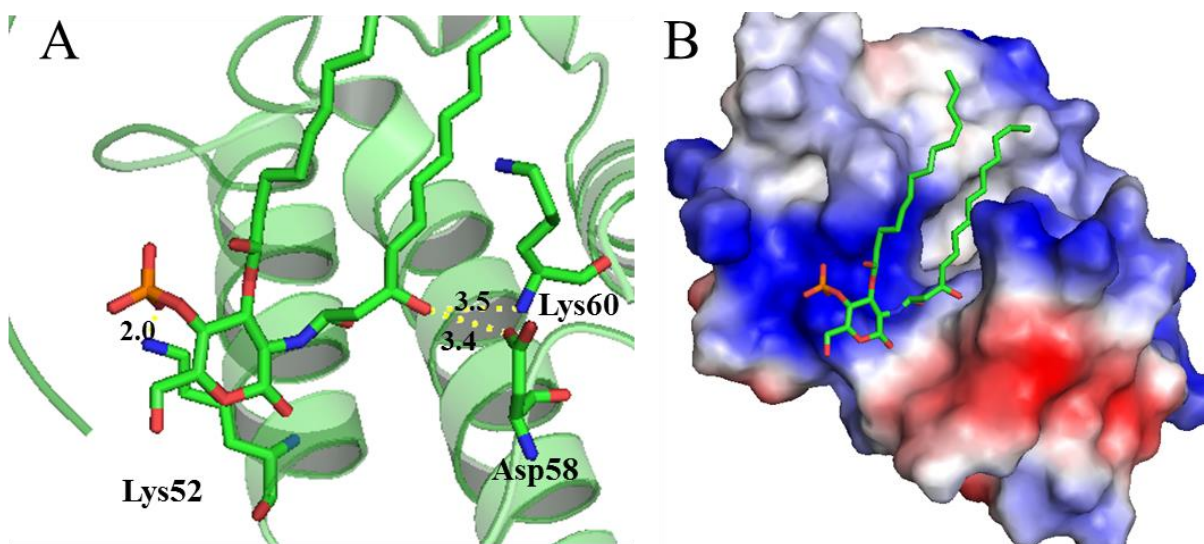
O resultado seguinte, $E_{\text{Total}} -419$, apresentou o LPS disposto de forma inversa à anterior: sua porção polar passou a interagir com a região terminal da Hélice II e suas caudas penetraram a cavidade hidrofóbica da proteína. Esta solução contou com apenas duas pontes de hidrogênio, estabilizadas pelos resíduos Lys52 e Lys117. Por outro lado, há uma forte densidade de interações hidrofóbicas entre as caudas do LPS e a cadeia lateral do resíduo Tyr51 e o dipeptídeo Val30-Gly31 (FIGURA 33).

FIGURA 33. Representação da solução -419 entre a miotoxina monomérica e LPS: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Val30, Leu31, Lys49, Tyr51 e Lys117 e (B) representação da superfície da miotoxina e o LPS ligado. Imagem gerada pelo Pymol.



O resultado seguinte tem solução próxima à anterior, com as caudas do LPS dispostas para o loop do tripeptídeo Gly29-Gly31 e sua cabeça voltada para a densidade positiva da porção terminal da Hélice II, apesar de uma leve migração para o loop elapídico. Esta solução apresentou $E_{\text{Total}} -406$, onde os resíduos Lys52 e Asp58 participaram da estabilização da cabeça polar do LPS por três pontes de hidrogênio. Apresentou ainda pouca interação hidrofóbica, dentre elas, interações envolvendo a cadeia lateral do resíduo Lys60 (FIGURA 34).

FIGURA 34. Representação da solução -406 entre a miotoxina monomérica e LPS: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Lys52, Asp58 e Lys60 e (B) representação da superfície da miotoxina e o LPS ligado. Imagem gerada pelo Pymol.



A solução seguinte, $E_{\text{Total}} -397$, apresentou a cabeça do LPS disposta para a região C-terminal da proteína, próxima à região de loop dos resíduos hidrofóbicos Leu111, Pro113 e Phe114. Suas caudas estenderam-se sobre a região terminal da Hélice II da miotoxina. Devido a essa disposição as interações foram diminutas e contou com duas pontes de hidrogênio entre a cadeia lateral do resíduo Arg33 e a cadeia principal do resíduo Ala118. Interações hidrofóbicas foram feitas através das cadeias laterais dos resíduos Tyr51 e Lys52 (FIGURA 35).

A solução de $E_{\text{Total}} -390$ apresentou o LPS numa posição interessante: sobre o sítio catiônico KKYRY. Nesta solução, o fosfato da cabeça do LPS realizou interações polares com os resíduos Ser20, Lys105 e Arg108, resultando em doze pontes de hidrogênio. Vale ressaltar a presença do resíduo Lys15, com sua cadeia lateral entre as caudas do LPS, que poderia ter sua conformação alterada, caso o docking realizasse torções na proteína. O resíduo

Lys19 encontrou-se próximo ao sítio, o que o faz um possível estabilizante da ligação. Por outro lado, foi encontrada uma pequena interação hidrofóbica envolvendo as caudas do LPS com a região terminal da Hélice III, contando com os resíduos Glu98 e Leu100 (FIGURA 36).

FIGURA 35. Representação da solução -397 entre a miotoxina monomérica e LPS: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Arg33, Tyr51, Lys52 e Ala118 e (B) representação da superfície da miotoxina e o LPS ligado. Imagem gerada pelo Pymol.

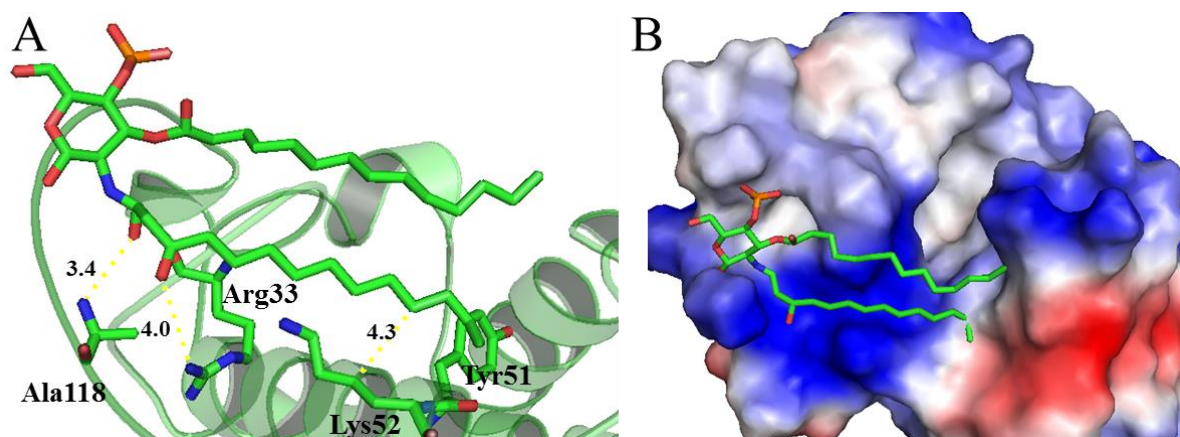
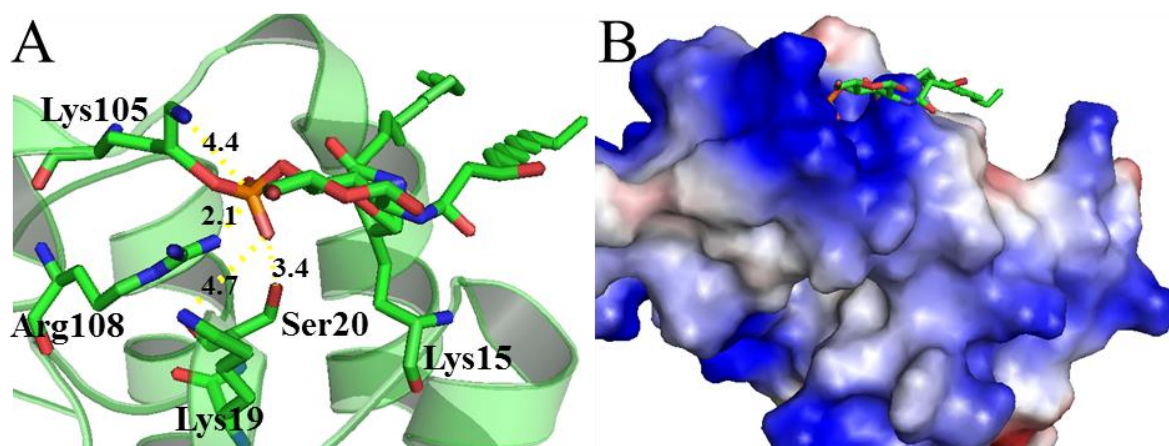


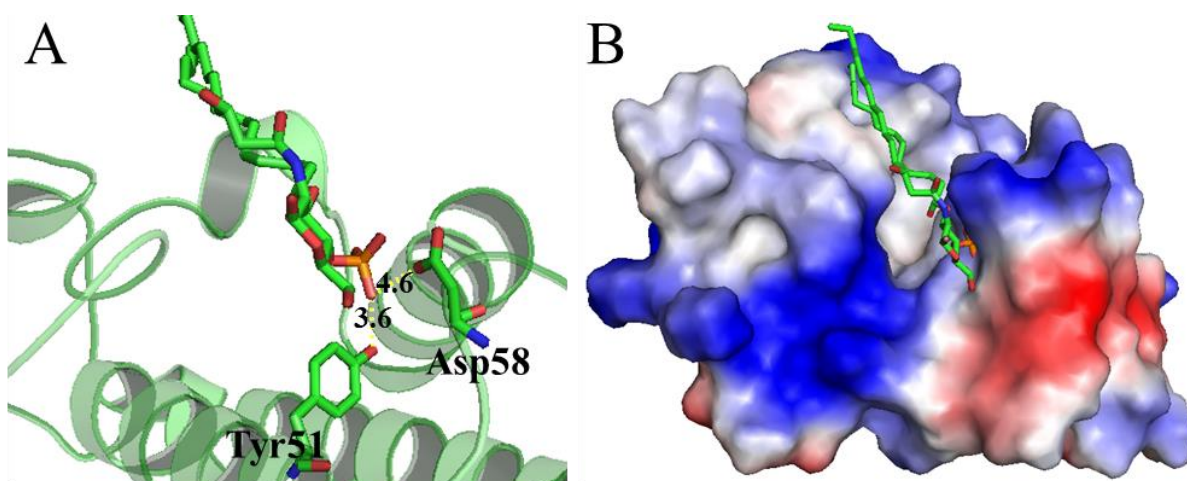
FIGURA 36. Representação da solução -390 entre a miotoxina monomérica e LPS: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Lys15, Lys19, Ser20, Lys105 e Arg108 e (B) representação da superfície da miotoxina e o LPS ligado. Imagem gerada pelo Pymol.



Com E_{Total} de -384, a solução seguinte assemelhou-se à solução de E_{Total} -406: a região polar do LPS interagindo com o loop elapídico. Porém, suas interações hidrofóbicas encontram-se acentuadas, devido uma maior aproximação ao tripeptídeo Gly29-Gly31, além de sua cabeça encontra-se mais próxima da Hélice I. Esta solução apresentou dez pontes de hidrogênio, contando interações das cadeias laterais dos resíduos Tyr51 e Asp58 e cadeias principais dos resíduos Pro59 e Lys60. Além das interações hidrofóbicas comentadas acima,

houve participação também da cadeia lateral do resíduo Tyr109, localizado na região C-terminal da proteína (FIGURA 37).

FIGURA 37. Representação da solução -384 entre a miotoxina monomérica e LPS: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Tyr51 e Asp58 e (B) representação da superfície da miotoxina e o LPS ligado. Imagem gerada pelo Pymol.



Semelhante ao resultado -406, a solução com E_{Total} -369 apresentou a cabeça do LPS com mesma disposição, porém suas caudas seguiram outro direcionamento, partindo para próximo da Hélice I. Esta solução apresentou nove pontes de hidrogênio, realizadas pelas cadeias laterais dos resíduos His48, Lys49, Tyr51 e Lys60. As interações hidrofóbicas desta solução apresentaram densidades envolvendo os resíduos Leu2 e Leu5 da Hélice I, bem como resíduos da hélice curta, por meio dos resíduos Pro17 e Ala18 (FIGURA 38).

Seguindo a tendência de migração para a Hélice I, a solução de E_{Total} -378 apresentou o LPS disposto sobre tal hélice. Esta solução contou com duas pontes de hidrogênio realizadas pelo resíduo Lys60, onde sua cadeia principal interagiu com o fosfato da cabeça do LPS e sua cadeia lateral com a hidroxila C6 do oxigênio do açúcar de sua cabeça. As interações hidrofóbicas surpreenderam, mostrando uma boa densidade de resíduos com características hidrofóbicas na Hélice I. Os participantes destas interações são os resíduos Leu2, Phe3, Lys7 e Leu10. Por fim, o resultado de E_{Total} -373 apresentou a mesma disposição sobre a Hélice I, porém com disposição contrária: sua cabeça polar voltada para o término da hélice e suas caudas voltadas para o início da mesma. Esta solução conta com quatro pontes de hidrogênio, envolvendo os resíduos Lys7 e Gln11, estabilizando a cabeça polar do LPS. Interagindo com as caudas do ligante, foram encontrados os resíduos Leu2, Phe3, Lys7, Leu10, Pro17 e Ala18 (FIGURA 39).

FIGURA 38. Representação da solução -369 entre a miotoxina monomérica e LPS: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Leu2, Leu5, His48, Lys49, Tyr52 e Lys60 e (B) representação da superfície da miotoxina e o LPS ligado. Imagem gerada pelo Pymol.

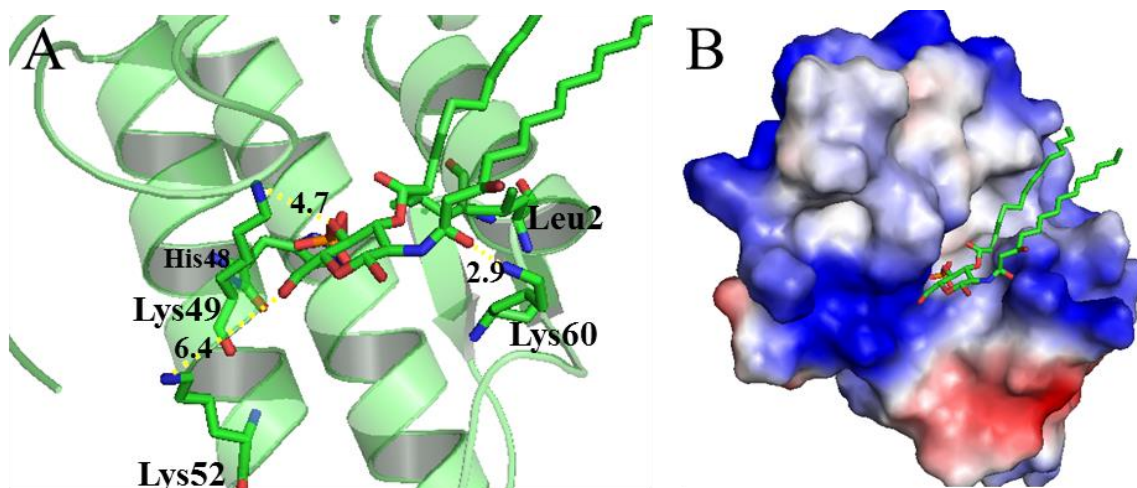
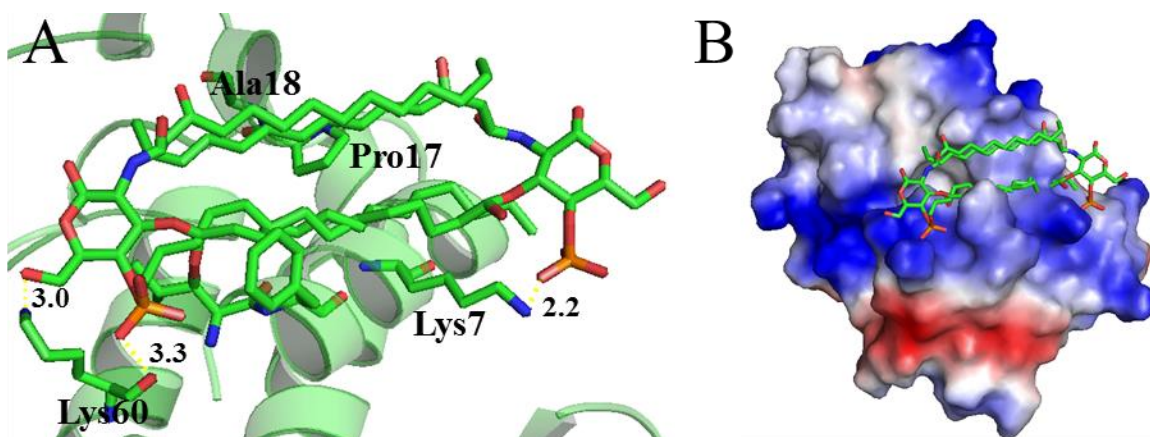


FIGURA 39. Representação das soluções -378 e -373 entre a miotoxina monomérica e LPS: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Leu2, Phe3, Lys7, Pro17, Ala18 e Lys60 e (B) representação da superfície da miotoxina e o LPS ligado. Imagem gerada pelo Pymol.



Os resultados da interação com a Bn IV dimérica apresentaram o LPS restrito à região intermolecular, o que é interessante. De modo geral, tais resultados podem ser separados em três grupos: região KKYRY dos monômeros A e B e a região intermolecular propriamente dita, próxima às hélices I de ambos os monômeros. Vale salientar que os dois primeiros grupos nada mais são que resultados simétricos, pois se tratam da mesma região da proteína.

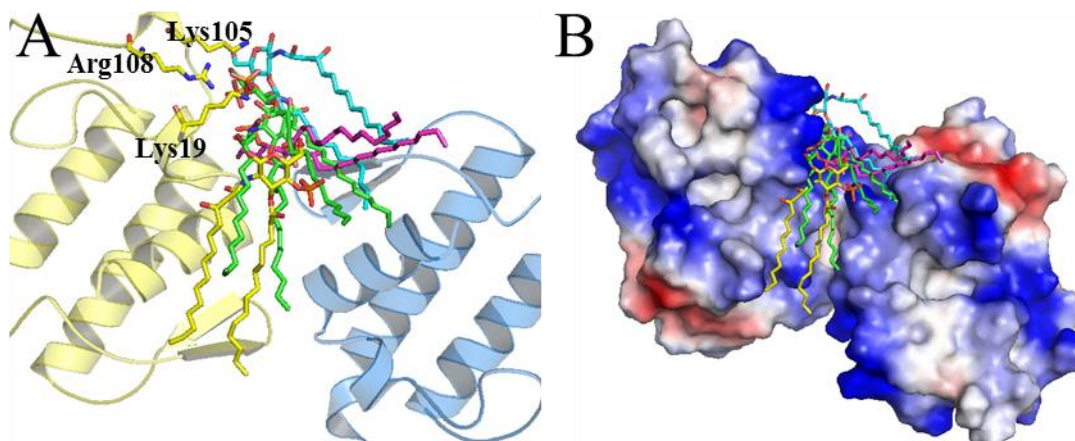
Baseando-se nos melhores resultados, o primeiro conjunto analisado foi o do sítio KKYRY do monômero B (FIGURA 40). Com $E_{\text{Total}} -748$, a primeira solução apresentou o monômero B interagindo com o fosfato e açúcar do LPS através dos resíduos Lys19, Lys105 e Arg108 e Lys15, respectivamente. Quanto às interações polares envolvendo os resíduos do monômero A, a miotoxina interagiu com os resíduos Ser68 e Lys69 por meio de suas cadeias laterais e, pela sua cadeia principal, o resíduo Trp69. No geral, esta solução apresentou nove pontes de hidrogênio. Quanto às interações hidrofóbicas, foi possível notar interações envolvendo as cadeias laterais dos resíduos Glu4, Lys7 e Tyr67, todos pertencentes ao monômero A (FIGURA 40, LPS em verde). O segundo resultado similar apresentou $E_{\text{Total}} -622$ e contou com os resíduos Thr13, Gly14, Lys15, Lys19 e Ser20 do monômero B e Tyr67, Ser68 e Trp69, totalizando quinze pontes de hidrogênio envolvendo as moléculas. Com relação às interações hidrofóbicas, dois resíduos foram importantes na estabilização de uma das caudas do LPS, foram eles Arg63 e Tyr67, ambos do monômero A e através de suas cadeias laterais (FIGURA 40, LPS em roxo).

Desse grupo de resultados, outras duas soluções as pertencem. A primeira trata-se da solução de $E_{\text{Total}} -597$ e contou com a interação dos resíduos Lys15, Leu100 e Tyr103 do monômero B participando da estabilização da cabeça do LPS e, pertencente ao monômero A, apenas o resíduo Ala69, resultando em apenas cinco pontes de hidrogênio. Os resíduos Lys7 e Tyr67 do monômero A foram importantes para a estabilização de uma das caudas do LPS, por meio de interações hidrofóbicas através de suas cadeias laterais (FIGURA 40, LPS em ciano). A última solução apresentou $E_{\text{Total}} -585$ e os resíduos estabilizantes da cabeça do LPS foram apenas dois: Lys15 do monômero B e Trp69 do monômero A. Apesar disso, a solução apresentou nove pontes de hidrogênio. Os resíduos Leu10, Gly14 e Asn16 participaram da estabilização do LPS por meio de interações hidrofóbicas (FIGURA 40, LPS em amarelo).

O último grupo contou com três soluções similares e foi localizado próximo ao sítio 'KKYRY' do monômero A, o que o tornou um simétrico do primeiro grupo de soluções apresentado acima (FIGURA 41). O resultado de melhor energia do segundo grupo apresentou E_{Total} de -645 e contou com apenas duas pontes de hidrogênio, formadas pelos resíduos Lys19 e Arg108 do monômero A. Apesar da baixa interação polar, essa solução apresentou boa densidade de interações hidrofóbicas, devida a aproximação das caudas do LPS para a região intermolecular, diferentemente da solução -748 , onde as caudas migraram para a superfície da Hélice I. Sendo assim, os resíduos participantes das interações

hidrofóbicas foram Leu10, Gln11 do monômero B e os resíduos Leu10 e Asn16 do monômero A (FIGURA 41, LPS em verde).

FIGURA 40. Representação das soluções geradas no sítio KKYRY do monômero B (amarelo) entre a miotoxina monomérica e LPS: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Lys19, Lys105 e Arg108 e (B) representação da superfície da miotoxina com os LPS ligados. Imagem gerada pelo Pymol.



A segunda solução pertencente ao mesmo grupo apresentou E_{Total} -590 e apenas o resíduo Asn16 do monômero A participou de pontes de hidrogênio, que resultou em cinco delas. Novamente, esta solução apresentou uma considerável densidade de interações hidrofóbicas. Dessa vez os resíduos foram Phe3, Lys7 e Leu10 do monômero A e Lys7 e Gln11 do monômero B, que estabilizaram as interações com as caudas do LPS (FIGURA 41, LPS em roxo). A última solução desse conjunto apresentou E_{Total} -576, seis pontes de hidrogênio geradas pelas cadeias principais dos resíduos Asn16 e Gly14. As interações hidrofóbicas dessa solução foram geradas pelos resíduos Phe3 e Lys7 do monômero A e o resíduo Leu10 de ambos os monômeros e estabilizaram ambas as caudas do LPS (FIGURA 41, LPS em amarelo).

As soluções restantes fizeram parte do último grupo, com o LPS localizado na região intermolecular da miotoxina e apresentaram grande interação hidrofóbica com a mesma. A melhor solução desse grupo apresentou E_{Total} de -606 e contou com apenas uma ponte de hidrogênio gerada pela cadeia principal do resíduo Phe3 do monômero B. Já as interações hidrofóbicas, envolveram os resíduos Leu10, Asn16 e Lys19 do monômero A e o resíduo Lys7 do monômero B, todas através de suas cadeias laterais (FIGURA 42, LPS em verde). A penúltima solução apresentou E_{Total} de -580 e contou com seis pontes de hidrogênio geradas pelos resíduos Lys7 do monômero A e Asn16 e Pro17 do monômero B. Apenas a cadeia

principal do resíduo Lys7 do monômero B participou das interações hidrofóbicas (FIGURA 42, LPS em roxo). A última solução, tanto do grupo, quanto de menor energia apresentou E_{Total} -572. Esta, não apresentou pontes de hidrogênio, apenas interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Leu2, Phe3, Pro17 e Ala18 do monômero A e Lys7 do monômero B (FIGURA 42, LPS em ciano).

FIGURA 41. Representação das soluções geradas no sítio KKYRY do monômero A (azul) entre a miotoxina monomérica e LPS: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Lys19, Lys105 e Arg108 e (B) representação da superfície da miotoxina com os LPS ligados. Imagem gerada pelo Pymol.

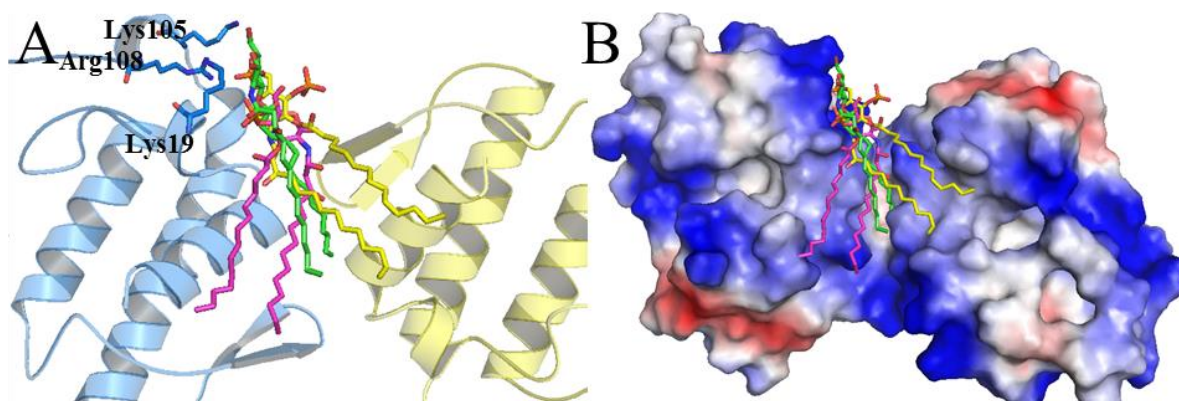
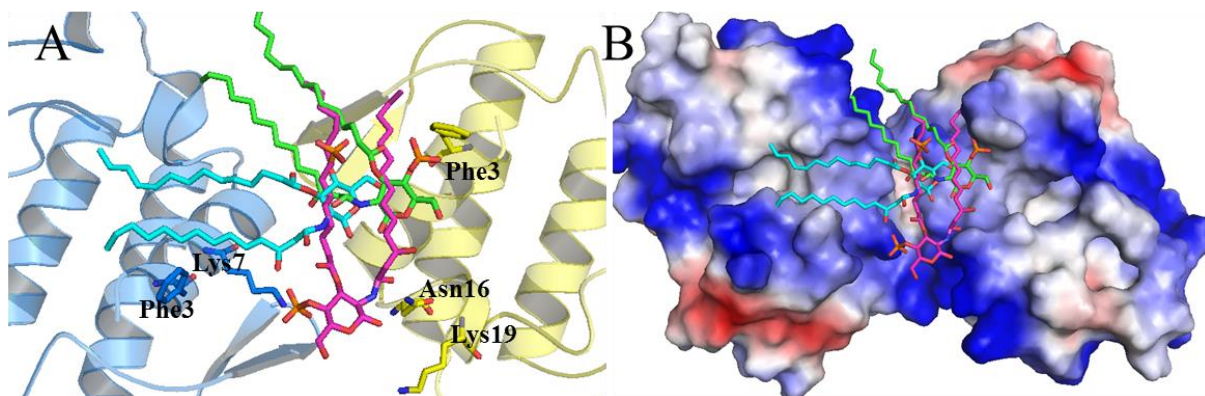


FIGURA 42. Representação das soluções geradas no sítio 'KKYRY' do monômero A entre a miotoxina monomérica e LPS: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Phe3 e Lys7 do monômero A e Phe3, Lys7, Leu10, Asn16 e Lys19 do monômero B; e (B) representação da superfície da miotoxina com os LPS ligados. Imagem gerada pelo Pymol.

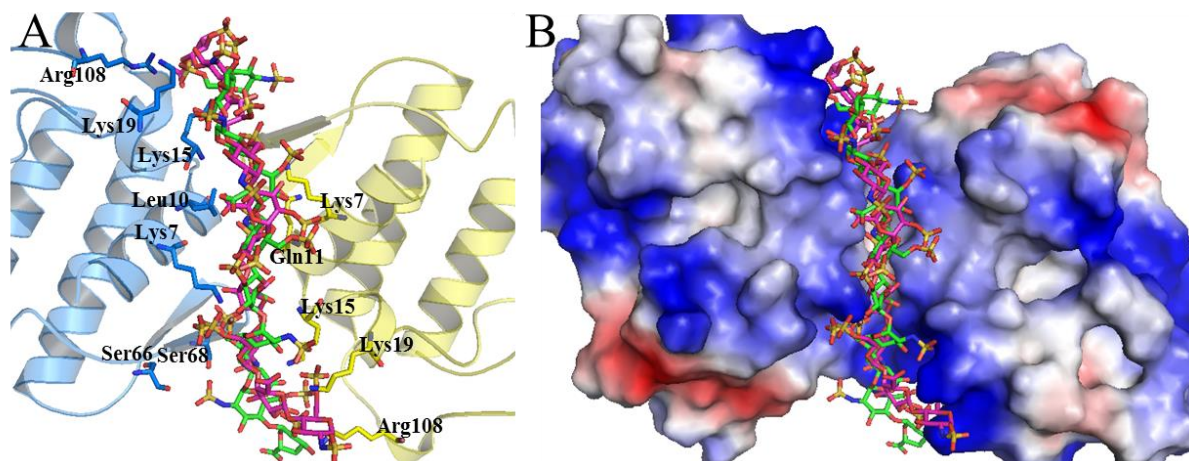


5.2 ASPECTOS ESTRUTURAIS DA MIOTOXICIDADE

Os dockings entre decaheparina e a miotoxina Bn IV foram realizados exclusivamente no MVD, uma vez que este software é capaz de promover alterações conformacionais no ligante e garantir melhores resultados de interações. O HEX 6.3 não se mostrou como um bom programa para dockings de moléculas longas, pois, além de não realizar torções no ligante, é fortemente influenciado de acordo com a conformação da molécula no momento do teste. Diferentemente dos demais resultados realizados até então, foram realizados testes apenas com a miotoxina na conformação dimérica, uma vez que testes com monômeros para este experimento não satisfazem o objetivo do presente trabalho.

Os testes realizados entre diheparina e a miotoxina foram essenciais para o direcionamento dos testes com decaheparina (FIGURA 7B) e, assim, apenas um sítio foi escolhido para as interações, localizado na região intermolecular estendendo-se até os sítios KKYRY de cada monômero. Para os resultados envolvendo as interações com decaheparina na região intermolecular, foram escolhidas duas soluções similares e com melhor acomodação na estrutura da miotoxina. A primeira solução apresentou energia surpreendente de -475 e contou com 52 pontes de hidrogênio envolvendo os resíduos Lys7, Leu10, Gly14, Lys15, Asn16, Ser66, Ser68, Trp69 e Arg108 do monômero A e os resíduos Lys7, Gln11, Gly14, Lys15, Asn16, Lys19, Lys69 e Lys105 do monômero B. Poucas interações hidrofóbicas foram observadas – dentre elas, os resíduos Leu10 e Asn16 de ambos os monômeros se destacaram. A segunda solução apresentou energia um pouco maior, com -457 e contou com 42 pontes de hidrogênio. Os resíduos envolvidos foram Lys7, Gln11, Gly14, Lys15, Asn16, Ser67, Trp69, Lys69, Lys105 e Arg108 do monômero A e os resíduos Lys7, Gly14, Lys15, Lys19, Ser20, Lys105 e Arg108. As interações hidrofóbicas também foram baixas, onde os resíduos Gln11 e Asn16 se destacaram. Estes resultados tornam o sítio KKYRY como o principal estabilizador de heparina por garantir que ela se estenda por toda a região intermolecular. Além de tal sítio, o resíduo Lys7 se mostrou como um importante auxiliador nessa interação e estabilização (FIGURA 43).

FIGURA 43. Representação das soluções dos dockings entre decaheparina e miotoxina dimérica: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Lys7, Leu10, Gly14, Lys15, Ser66, Ser68 e Arg108 do monômero A (azul) e os resíduos Lys7, Gln11, Gly14, Lys15, Lys19, Lys105 e Arg108 do monômero B (amarelo). Imagem gerada pelo Pymol.

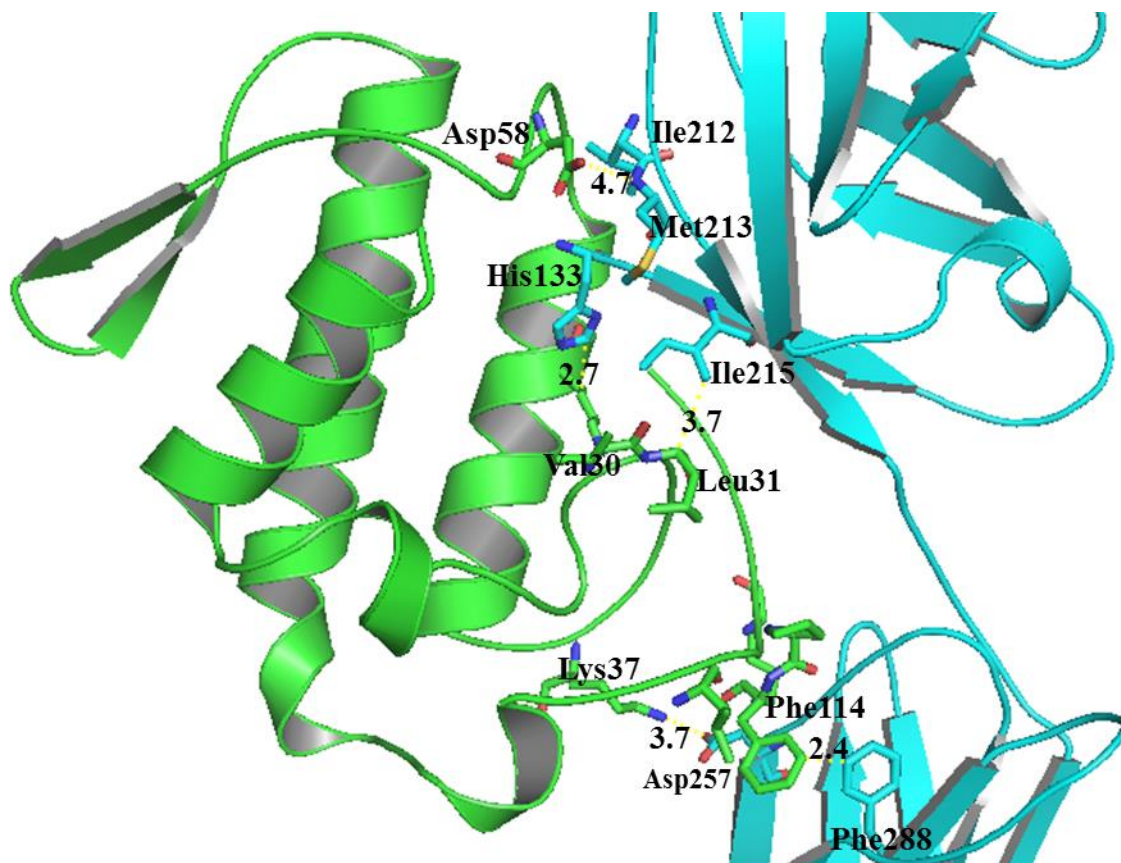


Com relação ao último grupo de testes, foram realizados dockings entre o receptor VEGFR-II e a miotoxina Bn IV, onde apenas três soluções mereceram destaque. Nesta análise foram realizados testes com o Hex 6.3 e com o MVD. Vale salientar: apenas o Hex 6.3 é capaz de realizar dockings proteína-proteína e, portanto, é possível fazer testes mais gerais e diretos, apesar de necessitar de uma configuração especializada. Para garantir que os testes também fossem realizados pelo MVD, foi gerado um peptídeo da cauda C-terminal da miotoxina com o auxílio do Pymol para que fosse reconhecido como um ligante, e então foram realizados os docking moleculares. Apenas para o MDV foi necessário que a estrutura completa da miotoxina fosse restaurada e isto foi feito através da substituição da estrutura sobre a cauda C-terminal de cada solução através da utilização do software WinCoot e elaboração da estrutura completa com o auxílio do Pymol.

Supreendentemente, utilizando o Hex 6.3, a melhor solução apresentou energia satisfatória de $E_{\text{Total}} -624$ e foi escolhida para melhor especificação. Tal solução contou com a interação da cauda C-terminal e também uma outra região até então desconsiderada para tal função: o loop elapídico. Foram observadas 11 pontes de hidrogênio realizadas pelos resíduos Lys37, Tyr51, Lys52, Pro113 e Lys116 da miotoxina com os resíduos His133, Val135, Val254 e Asp257 do receptor. Com relação às interações hidrofóbicas, foi possível notar que os resíduos Val30 e Leu31, Ile54 e a saliência hidrofóbica Leu111, Pro113 e Phe114 da miotoxina com os resíduos Ile215 e Phe288 do receptor, respectivamente. A interação mais

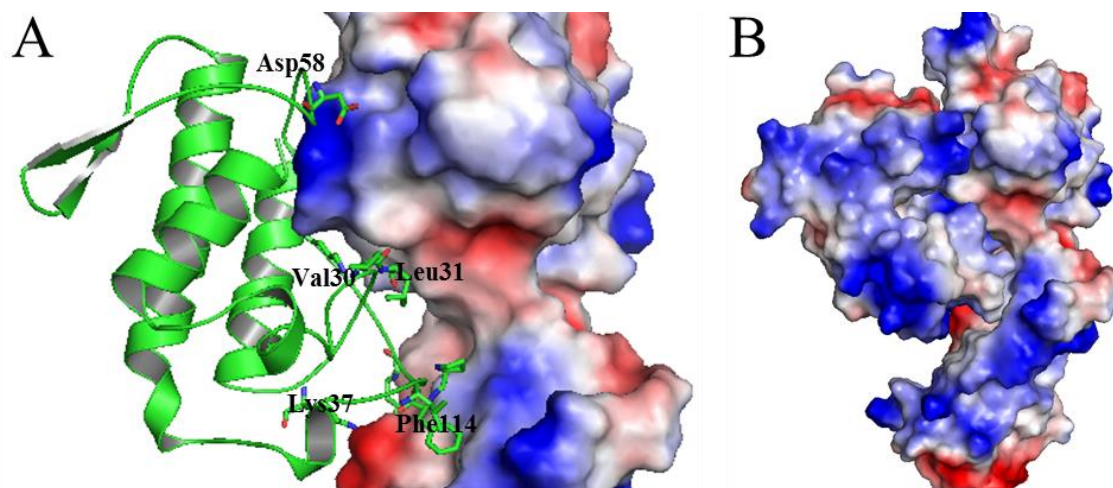
notável consistiu da relação entre o resíduo Phe114 da miotoxina com o resíduo Phe288 do receptor (FIGURA 44).

FIGURA 44. Representação da solução do docking realizado no HEX 6.3 entre a miotoxina e o receptor VEGFR-II: representação das estruturas secundárias da miotoxina, com destaque para os resíduos Val30, Leu31, Lys37, Asp58, Leu111, Pro113 e Phe114 da Bn IV (verde) e resíduos His133, Ile212, Met213, Ile215, Asp257 e Phe288 do receptor VEGFR-II (ciano). Imagem gerada pelo Pymol.



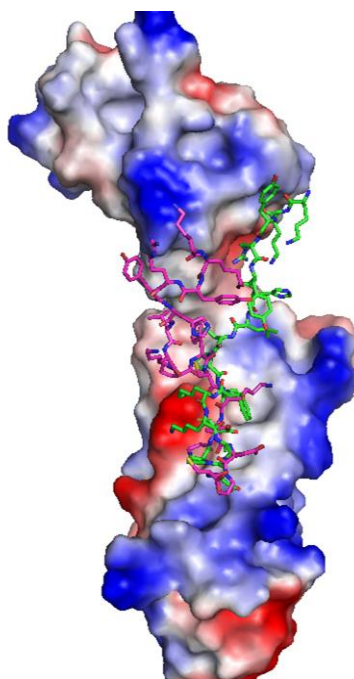
Ao analisar a superfície eletrostática dessas moléculas, foi possível observar um bom acoplamento entre tais proteínas. Interações iônicas foram observadas entre resíduos catiônicos da Hélice II próximos ao sítio KKYRY e cauda C-terminal com porções aniônicas do receptor. Quanto às interações hidrofóbicas, foi notada a interação do pescoço hidrofóbico C-terminal com regiões próximas do sítio entre domínios do receptor, de caráter notadamente hidrofóbico (FIGURA 45).

FIGURA 45. Representação da solução do docking realizado no HEX 6.3 entre a miotoxina e o receptor VEGFR-II: (A) representação das estruturas secundárias da miotoxina e superfície do receptor, com destaque para os resíduos em contato da miotoxina com o VEGFR-II e (B) representação da superfície de ambas as proteínas. Imagem gerada pelo Pymol.



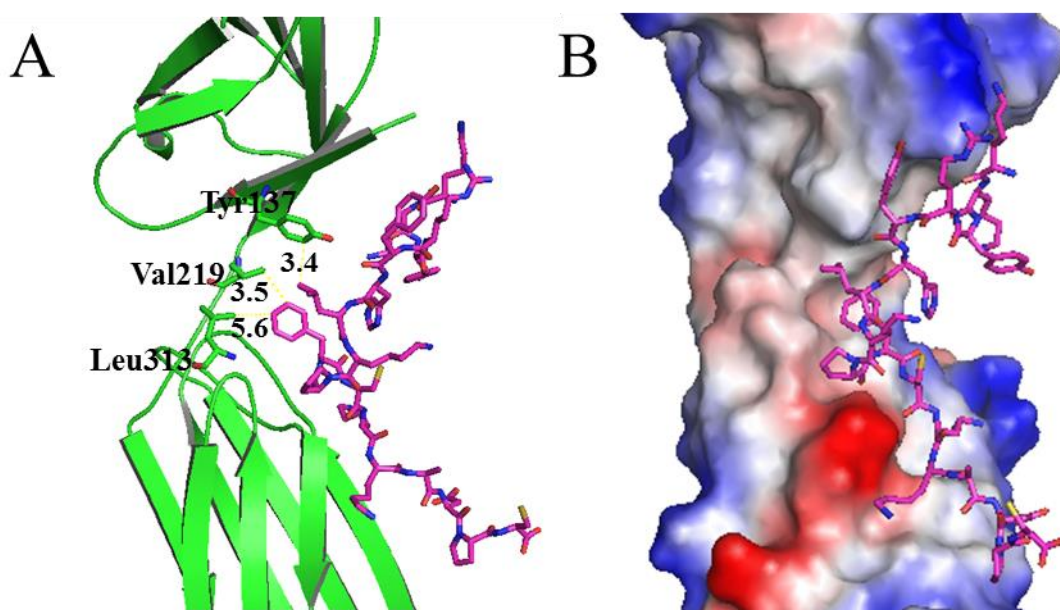
Os demais resultados para os mesmos testes foram realizados no MVD e, portanto, como explicado acima, foi utilizada a cauda C-terminal da miotoxina para interagir com o receptor no sítio de ligação com o VEGF. Dos resultados encontrados, apenas dois foram selecionados e todos se encontraram na mesma região, como mostra a Figura 46.

FIGURA 46. Representação das soluções dos dockings entre a cauda C-terminal da miotoxina e receptor VEGFR-II. Estão destacadas as soluções de Score -136 e -235, com caudas C-terminal em roxo e verde, respectivamente. Imagem gerada pelo Pymol.



No primeiro resultado não foram realizadas torções na cauda C-terminal, o que diminuiu a capacidade de interações entre as moléculas em questão, e, portanto, apresentou um Score menor de -136. Apesar disso, foram encontradas 12 pontes de hidrogênio realizadas pelos resíduos Lys105, Arg108, Tyr109, Pro113, Cys115 e Lys117 da miotoxina com os resíduos His113, Tyr137, Gly255, Ile256, Asp257, Phe258, Asn274 e Ser310 do receptor. Uma característica marcante deste resultado foi a estabilização hidrofóbica realizada entre o pescoço hidrofóbico do peptídeo C-terminal da miotoxina com a região entre domínios do receptor, onde os resíduos Tyr137, Val219 e Leu313 estão presentes (FIGURA 47).

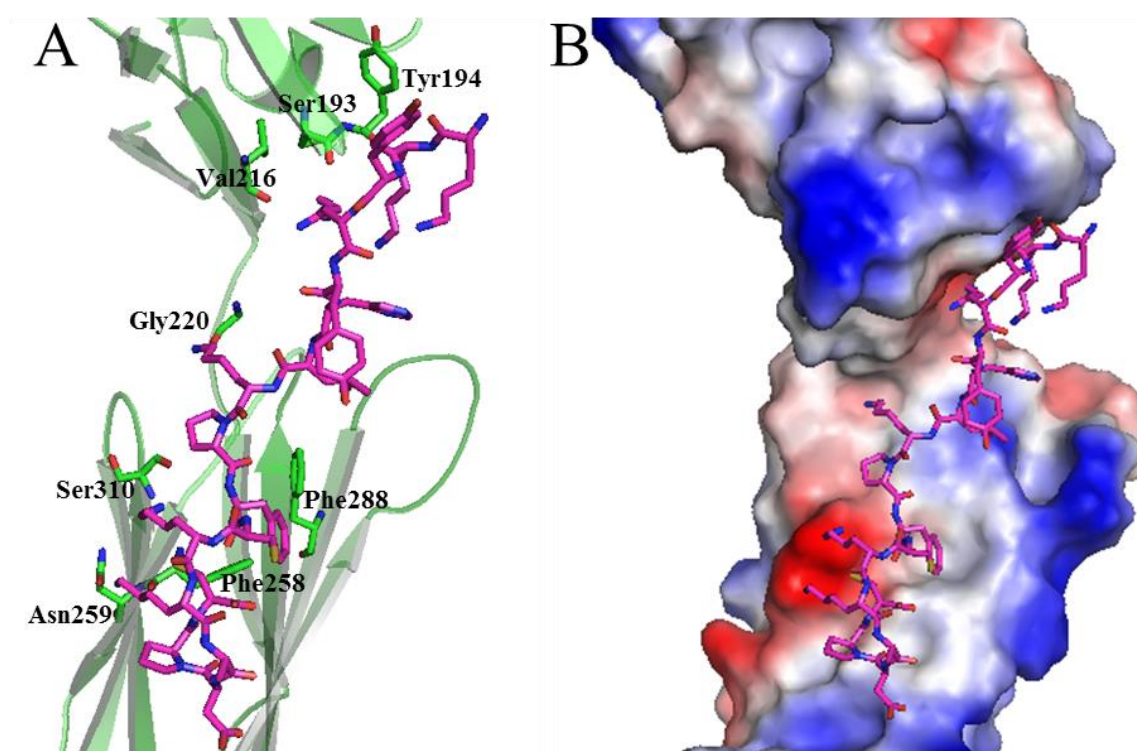
FIGURA 47. Representação das soluções dos dockings entre a cauda C-terminal da miotoxina (roxo) e receptor VEGFR-II (verde) da solução de Score -136 detalhando as interações hidrofóbicas realizadas entre os resíduos Leu111, Pro113 e Phe114 da miotoxina e os resíduos Tyr137, Val219 e Leu313 do receptor VEGFR-II. Imagem gerada pelo Pymol.



No segundo e último resultado, dessa vez foram realizadas torções por toda a cauda C-terminal com o objetivo de melhorar as interações entre as proteínas, e, portanto obteve-se um Score mais satisfatório de -235. Nesta solução foram encontradas 18 pontes de hidrogênio, onde a cauda C-terminal interagiu livremente sobre o receptor, o que garantiu um melhor acomodamento da estrutura, como podemos observar na Figura 48. Dessa vez o pescoço hidrofóbico da miotoxina não interagiu com a região entre domínios do receptor, entretanto a cadeia lateral do resíduo Phe114 aproximou-se do sítio hidrofóbico formado pelos resíduos Phe258 e Phe288. Por outro lado, na região entre domínios do receptor, o resíduo Lys112 interagiu com os oxigênios das cadeias principais dos resíduos Gly220 e Ser331 do receptor,

apesar dessa região possuir boa hidrofobicidade. Por fim, duas interações iônicas foram interessantes, realizadas pelas cadeias laterais dos resíduos Lys106 e Arg108 da miotoxina com um sítio aniônico formado pelos oxigênios das cadeias laterais dos resíduos Ser193, Tyr194 e Val216, presentes no domínio 2 do receptor; e outra interação similar no domínio 3, formada pelas cadeias laterais dos resíduos Lys116 e Lys117 da miotoxina com a cadeia lateral do resíduo Asn259 e oxigênio da cadeia principal do resíduo Phe258 do receptor. Esta interação eletrostática pode ser visualizada ao observar a superfície do receptor e como o peptídeo C-terminal da miotoxina interage com o mesmo (FIGURA 48B).

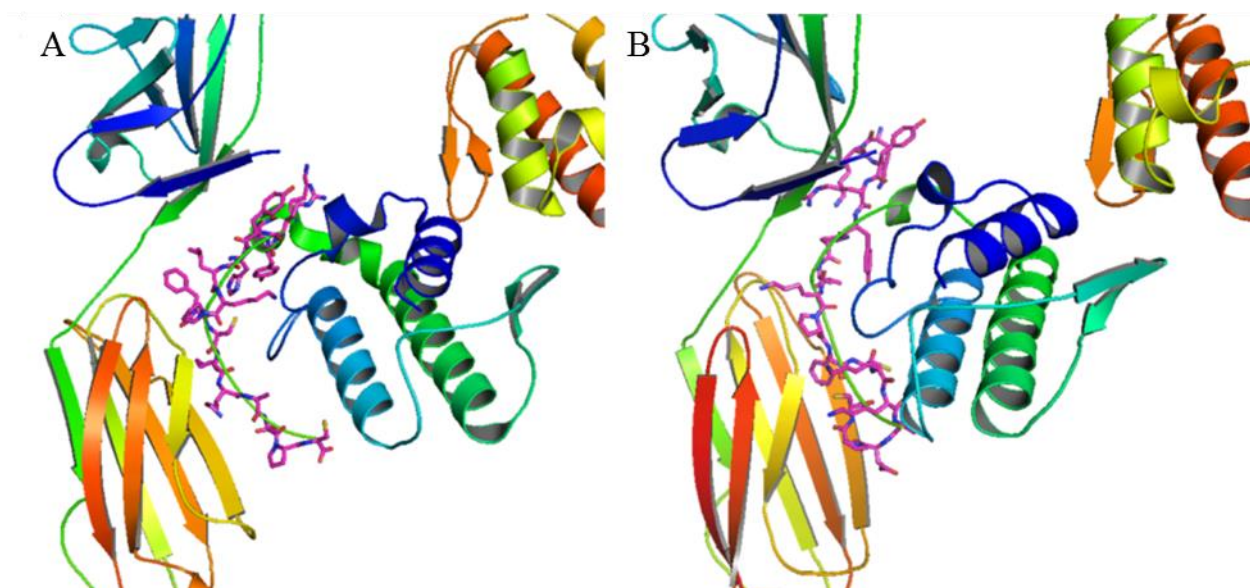
FIGURA 48. Representação das soluções dos dockings entre a cauda C-terminal da miotoxina (roxo) e receptor VEGFR da solução de Score -235: (A) representação das estruturas secundárias do receptor com destaques para os resíduos Ser193, Tyr194, Val216, Gly220, Phe258, Asn259, Phe288 e Ser310 e (B) superfície eletrostática do receptor VEGFR-II com a cauda C-terminal da miotoxina ligada. Imagem gerada pelo Pymol.



Os resultados da interação VEGFR-II/cauda C-terminal da miotoxina foram manualmente tratados para que a cauda C-terminal pudesse ser substituída pela proteína completa. Com o resultado onde a cauda C-terminal não sofreu torções a sobreposição foi fidedigna e podemos observar o modelo na Figura 49 (A). Por outro lado, o resultado onde as torções foram realizadas a sobreposição não foi perfeita, mas ainda assim foi possível fazê-la

Figura 49 (B). Por fim, foram montados os modelos de interação VEGFR-II/Miotoxina, discutido adiante.

FIGURA 49. Representação da substituição da cauda C-terminal pela miotoxina completa, realizada pelo Coot: (A) resultado de Score -136 e (B) resultado de Score -235. Cauda C-terminal representada em roxo, VEGFR à esquerda e miotoxina representada à direita nas cores azul-verde e laranja-amarelo. Imagem gerada pelo Pymol.



6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho trazem novas informações para o entendimento de como atuam estruturalmente as proteínas miotóxicas Lys49 do Grupo II de serpentes. Diante da discussão sobre suas características catiônicas e hidrofóbicas, bem como sua conformação nativa e biologicamente ativa, foram formulados dois modelos: para atividade citotóxica – propriedades farmacológicas de atividade perturbadora de membranas anfifílicas – e miotóxica – propriedade farmacológica que causa danos severos em células musculares. Dessa forma, cada modelo será discutido num tópico específico, bem como a apresentação de cada modelo proposto e suas implicações estruturais.

6.1 ATIVIDADE PERTURBADORA DE MEMBRANAS DAS MIOTOXINAS LYS49

Um dos cuidados na realização de dockings moleculares é saber reconhecer a conformação quaternária biologicamente ativa da molécula em questão, que podem ser importante na formação de novos sítios com conformações aceitáveis para interações com o ligante. Para isso, foram realizados testes em monômeros e também em dímeros da Bn IV. De modo geral, os dockings para fosfato mostram quatro regiões importantes para a discussão. Em ambos os testes, a região de melhor resultado favorável energeticamente foi localizada na densidade positiva da cauda C-terminal, compondo o sítio KKYRY. Os resíduos de destaque para este sítio foram Lys15, Lys19, Ser20 e Arg108. Além destes, o resíduo Lys105 se torna importante para o sítio, apesar de não realizar interações com o fosfato nos experimentos executados. Ainda nestes testes, outra região interessante para o debate está localizada na cavidade hidrofóbica, encontrada apenas nos testes realizados em monômeros. Estas soluções apresentaram a importância do resíduo His48, principal nas interações com fosfato, além da presença de outra solução onde o fosfato interagiu com a cadeia principal do resíduo Val30, presente no loop de cálcio. Estes achados estão de acordo com estudos de cristalização realizados com ácidos graxo, por exemplo. Murakami e Arni (2003) sugerem a importância do resíduo His48 – conservado também em fosfolipases Asp49 – como um importante estabilizador da interação com o fosfolipídios, favorecendo a ação do resíduo de ácido aspártico, que realiza sua função enzimática. Em proteínas miotóxicas, cataliticamente inativas, a conservação do resíduo His48 pode apresentar outra função, através do

reconhecimento e interação com fosfolipídios, o que o torna um importante resíduo para a realização dos eventos de citotoxicidade (FIGURA 28).

Tais sítios encontrados – o sítio formado pelos resíduos His48 e Lys49 e o sítio KKYRY – formam locais de reconhecimento e estabilização de cargas aniônicas. Diferentes cristais de miotoxinas Lys49 fortalecem esses achados e apontam para sua importância na interação com moléculas de sulfato (ambos os sítios), ou moléculas estruturalmente próximas de fosfolipídios (sítio His48), como ácido graxo, polietilenoglicol (PEG), tetraetilenoglicol, ácido mirístico e ácido estérico, por exemplo (ABROSIO et al., 2005; DELATORRE et al., 2011; FERNANDES et al., 2013; MURAKAMI et al., 2007; SALVADOR et al., 2013; SANTOS; SOARES; FONTES, 2009; ULLAH et al., 2012; WATANABE et al., 2005).

É curioso notar que, quando os mesmos testes foram realizados com a proteína na forma dimérica, não foram encontradas soluções dentro da cavidade hidrofóbica. Isto pode ser explicado pelo fato de que a conformação dimérica permite a formação de novos sítios que competem energeticamente com tal cavidade e, então, algumas possíveis soluções são dispensadas. Por outro lado, os testes com a miotoxina dimérica apresentaram dois resultados intrigantes e, até então, sem relevância na literatura. Uma delas é a cavidade formada entre a Hélice I e a β -asa, onde se destaca o resíduo conservado Lys7, importante em outros resultados deste trabalho, e também os resíduos Gln11 e Trp69. Estas duas soluções abrem espaço para uma maior atenção para a região intermolecular, especialmente na hélice próxima, a qual carrega o resíduo Lys7. Como podemos ver na Figura 43, esta região é importante por formar uma barreira catiônica na definição do sulco que se estende por toda a região intermolecular (FIGURA 29).

Os resultados encontrados nos dockings com fosfatos estão de acordo com o grupo de resultados gerados com diheparina. Da mesma forma, foram realizados testes com monômeros e dímeros da proteína, para garantir que novos sítios formados pudessem chamar atenção para interações moleculares com o ligante. Diferentemente dos testes com fosfatos, os testes com diheparina e monômero da proteína miotóxica apresentou as melhores soluções dentro da cavidade hidrofóbica, esta que foi a segunda cavidade importante nos resultados deste primeiro, compondo 80% dos resultados. Em congruência com os resultados dos testes com fosfato, o resíduo His48 também se mostrou importante na estabilização dos sulfatos da estrutura da diheparina, bem como o dipeptídeo Gly29-Val30, especialmente o resíduo Val30,

importantes na estabilização dos carbonos dos anéis da diheparina, mantendo sua característica de afinidade lipofílica.

Os resultados dos testes com diheparina em dímeros se mostraram concentrados na região intermolecular, exceto pelo resultado de melhor energia ter sido localizado dentro da região hidrofóbica. Na verdade, este resultado de melhor energia pode reforçar a importância dessa região na estabilização de moléculas carregadas negativamente, além de enfatizar a importância dos resíduos His48 e Lys49. Os demais resultados foram dispostos em dois grupos. O primeiro, similar aos testes da miotoxina dimérica com fosfato, localizado sobre a Hélice I, estabilizadas pelos resíduos Lys7 e Trp69. O segundo, também encontrado nos testes com fosfatos, se mostrou ainda mais interessante, pois apresentaram a diheparina disposta por toda a região intermolecular. Este grupo de resultados inspirou outros testes realizados no presente estudo, que foram importantes para o estabelecimento do modelo de ação miotóxica, como será abordado na seção 6.2.

Como novidade, os resultados dos testes com diheparina apresentaram o resíduo Lys60 como um importante estabilizador dos sulfatos da estrutura. Este resíduo traz um novo possível sítio de interações aniônicas, por estar próximo de uma região rica em cargas positivas, formada pela tríade Arg33/Lys52/Lys60 (FIGURA 22 e 23), capaz de formar um sítio não-específico catiônico, onde os resíduos Arg33 e Lys52 atuam como receptores moleculares e o resíduo Lys60 atua como um suporte na estabilização da interação. Este possível sítio é encontrado em diferentes estudos cristalográficos (AMBROSIO et al., 2005; DELATORRE et al., 2011; FERNANDES et al., 2013; MURAKAMI et al., 2006; SANTOS; SOARES; FONTES, 2009; WATANABE et al., 2005).

Acreditamos que a tríade catiônica, juntamente com os resíduos His48 e Lys49, formam um sítio de reconhecimento não-específico de reconhecimento a cargas negativas, importante no reconhecimento de fosfolipídios aniônicos. Além do mais, este sítio é conservado dentro das miotoxinas Lys49 (APÊNDICE-A). Na verdade, este sítio deve constituir a *i*-face da proteína, permitindo que a mesma reconheça e ligue-se a seu substrato para então facilitar alterações conformacionais importantes para a expressão da citotoxicidade. Por outro lado, o sítio KKYRY pode auxiliar essa interação de forma indireta.

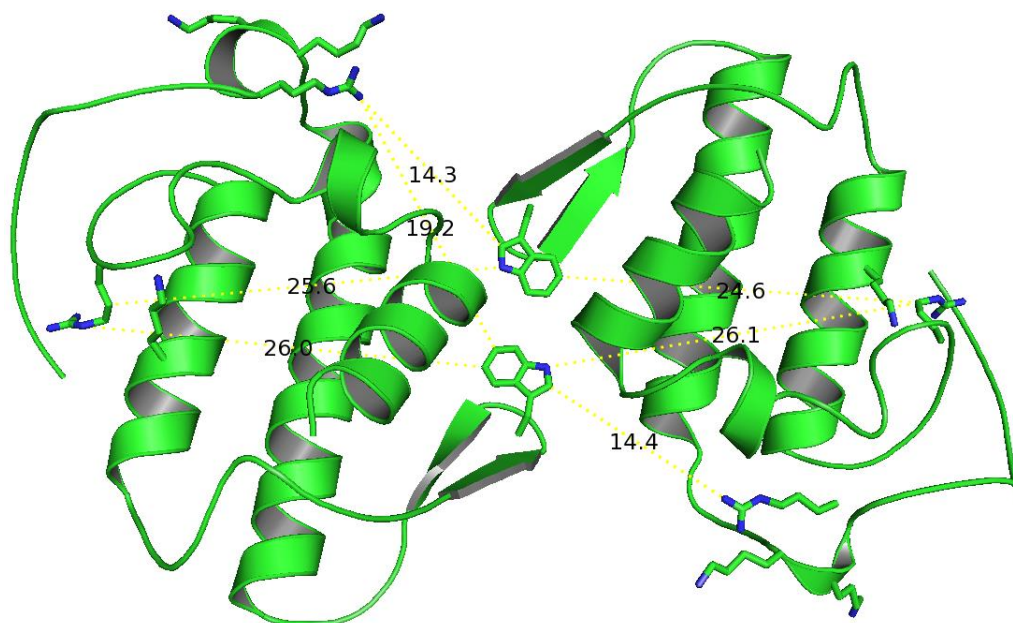
É sabido que as proteínas miotóxicas do Grupo II precisam não só se ligar às membranas, mas precisam de que moléculas carregadas negativamente liguem-se a elas para que possa ser ativada. Bortelo-Bugs, Neto e Ward (2004) estudaram a capacidade

perturbadora das proteínas miotóxicas utilizando micelas contendo 10% de fosfolipídios carregados negativamente, que carregavam compostos fluorescentes dentro delas. Eles notaram que a BthTX-I não conseguiu desestabilizar as micelas quando presentes apenas em solução tampão, porém, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), foi observada a liberação dos marcadores fluorescentes, confirmando então sua atividade citotóxica. Os pesquisadores calcularam ainda a proporção SDS:Proteína e observaram uma razão de 4:1, ou seja: são necessárias, no mínimo, quatro moléculas de SDS, por monômero, para que sua atividade citolítica seja ativada. Num outro trabalho, Bortelo-Bugs et al. (2007) aumentaram essa proporção e observaram que razões de 10:1 ou 40:1 impedem a ação da proteína por meio da alteração da sua conformação quaternária. Neste mesmo trabalho, é enfatizada a presença de 24 resíduos positivos, dentre eles, 12 podem ser importantes na atividade citotóxica. Estes 12 resíduos rodeiam um grupo de resíduos hidrofóbicos, que é apontado como o Sítio de Reconhecimento Interfacial (SRI) – ou *i*-face – e estes resíduos são os responsáveis pela penetração à membrana, perturbando-a. Dessa forma, estes trabalhos mostram que os resíduos positivos atuam como uma espécie de âncora – apontados no nosso trabalho como os resíduos Arg33, His48, Lys52 e Lys60 –, para que então os resíduos hidrofóbicos possam atuar.

Outro trabalho que corrobora a hipótese da presença de uma região ativadora que reconhece e estabiliza a proteína às membranas carregadas negativamente foi desenvolvido por Oliveira et al. (2009), o qual demonstraram que a atividade citotóxica da BthTX-I é alterada pela concentração de cargas positivas presentes nas micelas, bem como alterações no pH. Para isso, foram desenvolvidas micelas com cargas negativas formadas por DMPA nas concentrações de 10 ou 50%, e, para ambas as concentrações, foram alterados os pHs para 5,0 ou 7,0. Foi demonstrado que o pH 5,0 desfaz a conformação dimérica da proteína – característica importante para a atividade citotóxica, também demonstrado por Ruller et al. (2005) – mas não impede que a proteína se ligue às micelas, apesar de numa quantidade quase nula. Já em pH 7,0, as proteínas são capazes de ligaram-se às micelas. Outro dado importante observado foi que a BthTX-I tem maior ligação e liberação dos componentes fluorescentes das micelas quando estas eram compostas por 50% de DMPA, demonstrando que a concentração de cargas negativas influencia positivamente tanto no reconhecimento, quanto na ativação da perturbação de membranas. Foi demonstrado ainda que, através de técnicas transferência de energia por ressonância fluorescente (FRET), o DMPA liga-se à miotoxina a uma distância igual ou menor a 30 Å de distância do resíduo Trp69. Esta observação

corroborar os resultados do presente trabalho, pois o sítio Arg33/His48/Lys49/Lys52/Lys60 está a $\sim 26\text{\AA}$ de distância dos resíduos Trp69 de cada monômero. Além do mais, o sítio KKYRY, considerado importante para nosso trabalho está localizado a 14-19 $\text{\AA}$ de distância do resíduo Trp69 (FIGURA 50).

Figura 50. Representação das estruturas secundárias da miotoxina Bn IV. Detalhe das distâncias para os sítios KKYRY e cavidade hidrofóbica com relação aos resíduos de triptofano.



Essa hipótese foi corroborada por Ferreira et. al (2008), ao estudar BthTX-I mutantes triptofano-substituídos. Nesse trabalho, foi observado que a BthTX-I liga-se com mais intensidades com micelas contendo DMPA 50% e ainda buscou pelas regiões de contato com membranas, através de técnicas de emissão de fluorescência intrínseca de triptofano (ITFEC). Foi observado que as regiões de contato com as micelas foram estavas próximas dos resíduos Val31, Tyr117 e Tyr119 e, portanto, foi sugerido que as regiões capazes de penetrar as membranas estavas próximas dos resíduos citados, colocando a cauda C-terminal como um participante ativo no processo de citotoxicidade.

As miotoxinas Lys49 apresentam uma densidade de resíduos hidrofóbicos conservados localizados na região C-terminal, resíduos Leu111, Pro113 e Phe114, que formam uma espécie de ‘saliência’ hidrofóbica, considerada a provável estrutura penetrante de membranas. Como podemos ver na Figura 31, estes três resíduos estão voltados para o meio aquoso, sendo assim um indicativo de alguma provável função. Essa ‘saliência’ chamou a atenção de Ambrosio e colaboradores (2005), que propuseram ser esta a responsável pela

penetração da membrana e sua atividade influenciada pela cavidade hidrofóbica da proteína. Dependendo da presença de ligantes com caráter hidrofóbico na cavidade hidrofóbica, esta ‘saliência’ se comportava de formas diferentes, expondo-se ou contraindo-se, confirmado ao analisar diversas estruturas de proteínas miotóxicas do Grupo II.

O link entre essas regiões é realizado pela interação que o resíduo 112K realiza com o loop de cálcio, o qual permite a polarização tanto do loop quanto da cauda C-terminal. Essa polarização é aumentada quando uma molécula anfifílica, como um fosfolipídio ou ácido graxo, é adicionada à cavidade hidrofóbica. A função do resíduo 112K foi inicialmente proposta por Lee et. al (2001) e discutida também por Chioato et. al (2002), ao observarem que mutantes K112A apresentaram citotoxicidade reduzidas.

Esses trabalhos corroboram o presente estudo por estabelecer a cavidade hidrofóbica como uma região importante para o ancoramento da miotoxina a fosfolipídios carregados negativamente de forma não-específica. Ainda permitem o entendimento da relação entre tal sítio com a saliência hidrofóbica, seguida de alterações conformacionais (exposição da ‘saliência’ hidrofóbica) necessárias para a ativação da proteína e realização da sua atividade citotóxica. Ainda sobre o poder penetrante da proteína miotóxicas através do seu pescoço, trabalhos realizados por Giotto et. al (1998) e Magro et. al (2003) contribuem ainda mais para elucidar o mecanismo molecular envolvido nessas proteínas. Estes trabalhos propõem que as proteínas miotóxicas atuam naturalmente como uma fechadura, variando entre conformações ‘aberta’ e ‘fechada’ e que essas alterações permitem que o dímero da proteína obtenha uma alteração de 23° em relação ao monômero simétrico entre tais conformações.

A junção dessas informações com os resultados encontrados no presente trabalho foi suficiente para que fosse desenvolvida uma hipótese de atividade perturbadora de biomembranas, chamada de “Mecanismo do Abraço” (FIGURA 51). Esta hipótese sugere como as proteínas miotóxicas do Grupo II atuam frente à biomembranas por meio de cinco etapas:

I: A miotoxina livre, oscilando entre as conformações ‘aberta’ e ‘fechada’ reconhecem fosfolipídios carregados negativamente através do sítio Arg33/His48/Lys52/Lys60 presente na cavidade hidrofóbica de cada monômero, componente da *i*-face. De forma secundária, o sítio KKYRY pode atuar reconhecendo e interagindo com fosfolipídios carregados negativamente, otimizando a interação da proteína com a membrana, ou auxiliando na separação desta pela interação com fosfolipídios zwitteriônicos ou catiônicos.

É possível sugerir que cada um dos sítios é capaz de sustentar duas moléculas simples, resultando em quatro moléculas por monômero, como proposto nos testes do SDS realizados por Bortelo-Bugs, Neto e Ward (2004);

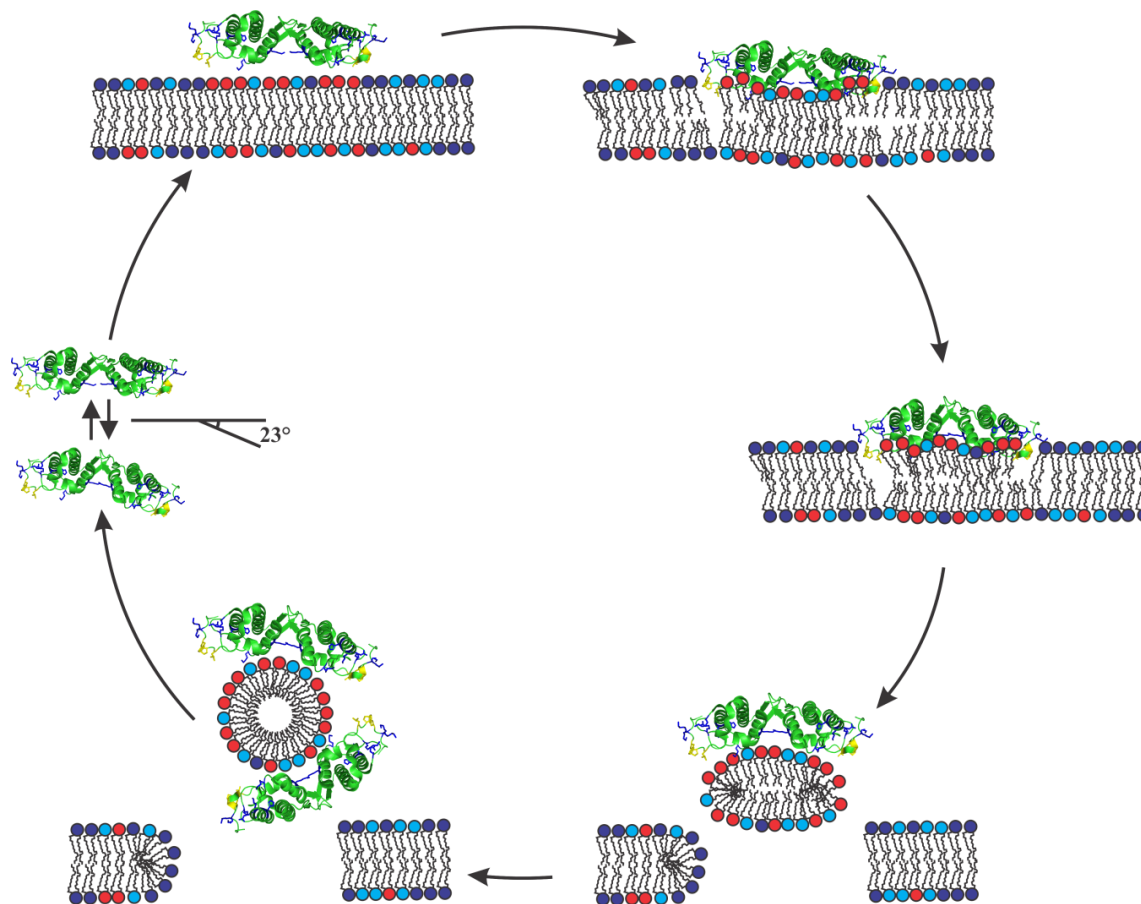
II: Após o reconhecimento pela *i*-face, há a ativação da proteína, realizada por diferentes alterações conformacionais, dentre elas a exposição do pescoço hidrofóbico C-terminal, favorecida pela polarização do resíduo 112K (LEE et al., 2001). Esta polarização pode ainda permitir que o loop de cálcio modifique-se, tornando-se mais polarizado e favorecendo sua participação na etapa seguinte (AMBROSIO et al., 2005);

III: Penetração da saliência hidrofóbica C-terminal na bicamada de fosfolipídios. Neste momento, cada monômero, com sua saliência exposta, penetra a membrana e mantém-se ligada a ela por meio da forte interação gerada pelas caudas dos fosfolipídios. Então, o dímero ligado à membrana tenderá a permanecer muito mais tempo em sua conformação ‘fechada’, o que permitirá que penetre a membrana cerca de 13 Å;

IV: Após a penetração, os fosfolipídios vizinhos tendem a interagir com os resíduos positivos da miotoxina próximos à saliência hidrofóbica: aqueles voltados para a porção terminal (Lys116 e Lys117) e, ao mesmo tempo, aqueles voltados para o sítio KKYRY, como o Lys37. Esta interação iônica favorece a separação da membrana à micela que está sendo formada dependendo do tipo de fosfolipídio presente na membrana;

V: Por fim, é necessário que existam alterações posteriores que favoreçam a separação da proteína e da micela recém-formada. Esta última, naturalmente tenderá a organizar-se esfericamente através das forças hidrofóbicas das caudas dos fosfolipídios. Essa alteração tornará sua superfície pequena o suficiente para permitir uma seguinte penetração da miotoxina e, então a proteína voltará a alterar entre conformações ‘aberta’/‘fechada’. Assim, a micela formada, será liberada no meio e a proteína estará livre para outro ciclo.

Figura 51. Modelo hipotético do “Mecanismo do Abraço” das miotoxina Lys49 do Grupo II. Miotoxina representava em verde, com detalhes para os resíduos importantes para citotoxicidade: catiônicos em azul e hidrofóbicos em amarelo. Fosfolipídios com cabeças positivas, neutras e negativas são representados em azul, ciano e vermelho, respectivamente.



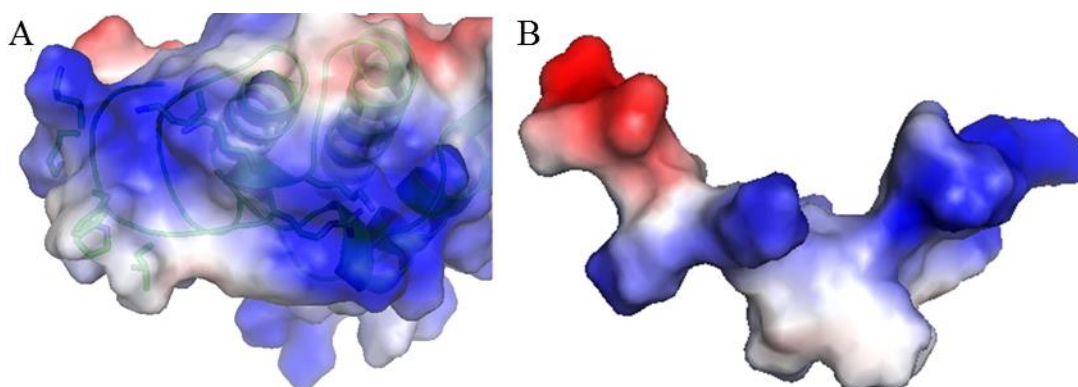
6.1.2 Proteínas Miotóxicas Lys49 Atuam como Gigantes Perturbadores de Membranas

Nosso modelo põe as proteínas miotóxicas do Grupo II sob uma visão maximizada do que são os diferentes peptídeos perturbadores de membrana, funcionalmente bactericida, como mostram vários estudos (ARAGÃO; CHIOATO; WARD, 2008; FONSECA-MALDONADO; FERREIRA; WARD, 2012; STÁBELI et al., 2006). A chave para moléculas perturbadoras de membrana reside numa característica: serem anfifílicos. Notadamente, os peptídeos bactericida apresentam porções iônicas que interagem com as cabeças polares dos fosfolipídios de membrana e outra porção hidrofóbica, responsável pela penetração à membrana e então sua desestabilização por meio da formação de micelas. Estes peptídeos

variam em tamanhos de ~10 resíduos (GUPTA; SRIVASTAVA, 2014) à ~30 (PAPAREDDY et al., 2014) e esta característica altera fortemente seu mecanismo de ação, onde os peptídeos menores são capazes de adsorverem à membrana e favorecer a micelização, ou, os maiores, atuarem interagindo com os fosfolipídios e formando poros, lizando biomembrana. Por outro lado, alguns peptídeos atuam de forma alternativa, chamada de *carpete-like*, ligando-se aos fosfolipídios e desestabilizando a membrana de forma gradual, por meio da separação dos fosfolipídios e então aumento de sua permeabilidade até sua ruptura; ou de forma instantânea, com sua penetração facilitada pelo aumento da permeabilidade da membrana afetada e consequente formação de micelas (LEE et al., 2014).

Interessantemente, as proteínas miotóxicas apresentam essa anfipatia quando observadas de forma geral, porém os sítios polares e apolares são formados por resíduos de diferentes regiões, dada a complexidade proteica em relação a peptídeos. Ao observar a Figura 52 (A), podemos notar que os resíduos hidrofóbicos Leu111, Pro113 e Phe114 estão voltados para ‘baixo’, enquanto que, ao seu redor, são encontrados resíduos carregados positivamente, formados pelos resíduos Lys37, Lys105, Lys106, Lys116, Lys117.

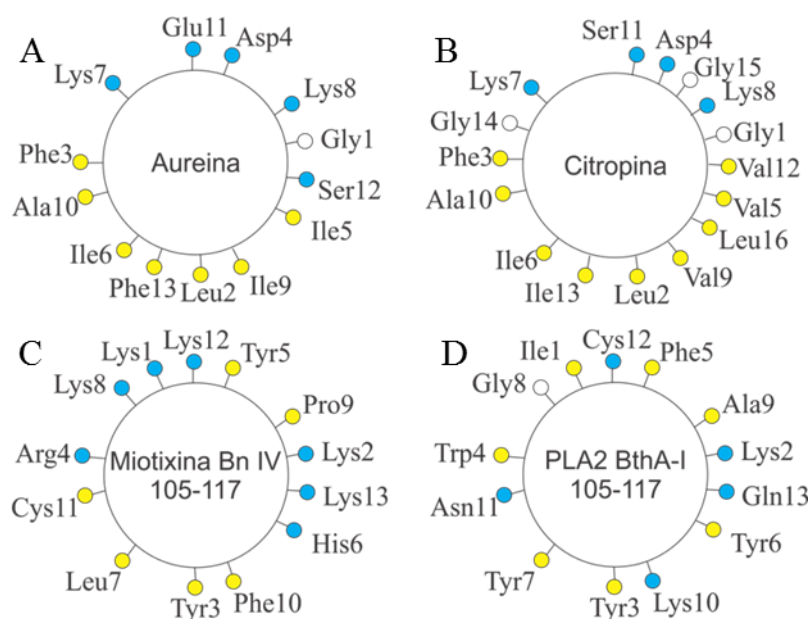
FIGURA 52. Representação eletrostática da miotoxina de *Bothrops neuwiedi* com detalhe para sua cauda C-terminal. (A) Detalhe da porção C-terminal da miotoxina com resíduos hidrofóbicos voltados para baixo e resíduos catiônicos voltados para cima; (B) representação eletrostática da cauda C-terminal. Imagem gerada pelo Pymol.



Essa região pode ser capaz de simular peptídeos antimicrobianos e atuar penetrando, desestabilizando e promovendo micelização de biomembranas, provavelmente de uma forma próxima ao mecanismo *carpete-like* (LEE et al., 2014). Diferentemente dos peptídeos antimicrobianos, nosso modelo mostra que as proteínas miotóxicas podem ‘abraçar’ os fosfolipídios por toda sua extensão dimérica, sendo capaz de englobar 70-80 fosfolipídios por dímero (GIOTTO et al., 1998).

Uma forma de estudar e aperfeiçoar funções de determinadas proteínas é produzir peptídeos a partir de sua estrutura na tentativa de manter sua mesma função, mas de forma mais específica. Na busca de moléculas ‘limpas’ com atividade bactericida, este procedimento também ocorre. Dessa forma, proteínas como o cofator de heparina (HCII) (PAPAREDDY et al., 2014) e histonas H2A (BUSTILLO et al., 2014), que tiveram peptídeos isolados de sua estrutura na tentativa de aprimorar, manter ou desenvolver atividades bactericida. De forma intrigante, foram desenvolvidos peptídeos de proteínas miotóxicas e foi observado que o peptídeo gerado de sua cauda C-terminal apresentou atividade citolítica, assim como a proteína (PÁRAMO et al., 1998; SAMY et al., 2010; STÁBELI et al., 2006). Deve-se notar que esses peptídeos desestabilizadores de membranas estão de acordo com o modelo proposto no presente trabalho, uma vez que o pescoço hidrofóbico, necessário para penetração na membrana, pertence à cauda C-terminal. E mais: ao observar este peptídeo isoladamente, é notável sua característica anfifílica, o que o torna um peptídeo similar aos demais antimicrobianos (FIGURA 52 B). Ao comparar a cauda C-terminal da miotoxina BnIV com peptídeos bactericida, como aureina e citropina, é possível notar que a miotoxina segue o padrão de polarização de tais peptídeos quando observados em α -hélice. Por outro lado, a fosfolipase cataliticamente ativa de *B. jararacussu* BthA-I não apresenta tais características (FIGURA 53).

FIGURA 53. Comparação de peptídeos bactericida (A e B) com a miotoxina Bn IV e a fosfolipase BthA-I (C e D). Peptídeos convertidos em α -hélice com identificação dos resíduos polares, neutros e apolares em azul, branco e amarelo, respectivamente.



Assim como os peptídeos antimicrobianos interagem com LPS e outras moléculas catiônicas das membranas de bactérias, era esperado que as proteínas miotóxicas também realizassem esta interação, o que foi observado por Tsai et al. (2007). Então, baseado nesse trabalho, foram realizados dockings entre a proteína e LPS, onde os resultados encontrados foram promissores. Mais uma vez foi observada congruência entre os resultados encontrados no nosso trabalho, com interações formadas pela cavidade hidrofóbica e no sítio KKRYR (FIGURAS 30 e 40). Estes dados mostram ainda que, além dos mesmos sítios de reconhecimento, o mecanismo de ação deve ser similar para bactérias ou, dada a complexidade das membranas destas comparada com micelas, mais complexa. Portanto, uma vez que membranas apresentem fosfolipídios que satisfaçam as exigências iônicas do mecanismo aqui proposto, as miotoxinas Lys49 devem atuar desestabilizando-as de acordo com o “Mecanismo do Abraço” (FIGURA 51).

6.2 HEPARINA COMO UM EXCELENTE INIBIDOR DE MIOTOXINAS DO GRUPO II: UMA PORTA PARA A COMPREENSÃO DO MECANISMO MIOTÓXICO

De modo geral, a heparina é um bloqueador de fosfolipases que faz parte de um grupo maior, o grupo dos poliânions (MELO et al., 1993; PERCHUC et al., 2010). O fato de um grupo sutilmente diverso estruturalmente inativar estas proteínas nos leva a acreditar que essa interação é elétrica, porém não-específica. Melo et al. (1993) demonstraram que heparinas não-sulfatadas são incapazes de inibir a BthTX-I. Estes resultados foram reforçados por Lomonte e colaboradores (1994a), ao mostrarem que além da heparina, outras moléculas com configurações espaciais com sulfato O-ligados, como heparan sulfato, condroitin sulfato e dermatan sulfato podem inibir a miotoxina II, apesar de ser de uma forma mais branda. Num outro estudo (1994b), foi observado por Lomonte que, de fato, essa interação variava de acordo com a estrutura e heparan sulfato e heparina de baixo peso molecular eram capazes de inibir a atividade das miotoxinas, porém diheparina e condroitin sulfato não.

Apesar do real sítio de ligação a heparina ser controverso, ainda mais por não ter sido produzida nenhum estudo cristalográfico, existe a possibilidade de outros sítios terem afinidade, o que pode abrir uma janela maior para observar esta interação. Por exemplo, estudos computacionais revelados por Delatorre et al. (2011) apontaram dois possíveis sítios de heparina: um localizado dentro da cavidade hidrofóbica e outro envolvendo parte da cauda

C-terminal e uma porção do loop de cálcio. Este trabalho sugere que cada monômero apresenta um sítio de reconhecimento a heparina.

Por outro lado, estudos de inibição realizados por Lomonte et al. (1994a) demonstraram que a razão proteína:heparina que permite a formação de complexos macromoleculares é de até 5:1 e isto infere que as miotoxinas apresentam um sítio de reconhecimento por cada dímero, estrutura biologicamente ativa. Dessa forma, cada monômero compõe uma parte deste sítio. Além do mais, o número necessário de unidades repetitivas de heparina para que ocorra a interação heparina/miotoxina é restrito, pois apenas a partir de oito monômeros a heparina é capaz de inibir suas propriedades farmacológicas, como a citotoxicidade. Outro trabalho confirmou tais complexos macromoleculares através de eletroforese em gel de agarose (LOMONTE et al., 1994b).

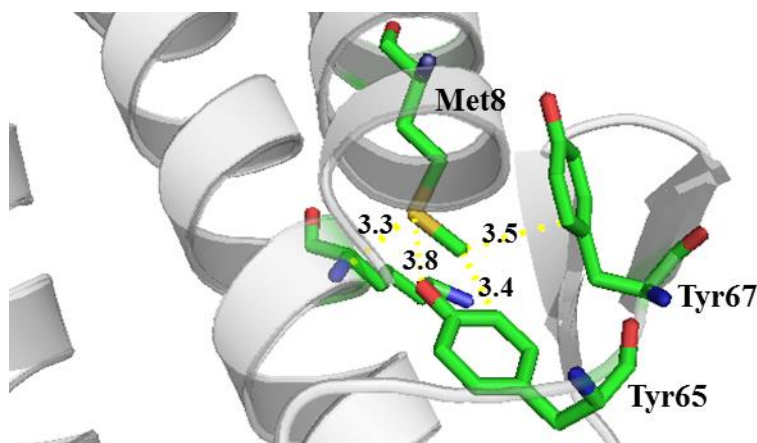
É interessante como esses achados de Lomonte se encaixam nos resultados encontrados no nosso trabalho. Os testes realizados com diheparina foram importantes para o norteamento de novos testes envolvendo decaheparina. Ao observar apenas os resultados envolvendo a miotoxina na sua conformação quaternária, foi possível observar que a diheparina se liga nas duas regiões KKYRY de cada monômero e estende-se ao longo de toda região intermolecular, como podemos observar na Figura 7B. Estes resultados deram indicativos que o sítio de heparina pudesse ser o encontro dos sítios KKYRY de cada monômero, tornando-se assim um único sítio compartilhado pelos monômeros, exatamente como foi proposto por Lomonte e colaboradores. Os resultados gerados pelo Molegro Virtual Docker vieram a confirmar tal hipótese com soluções mostrando a heparina sobre toda a região intermolecular da proteína interagindo com cada sítio KKYRY, como observado nas Figuras 26 e 27.

A busca do sítio de heparina para proteína miotóxicas visa atender a hipótese qual sugere que as proteínas miotóxicas ligam-se a receptores tirosina quinase e medeia uma reação em cadeia específica em células musculares maduras. Trata-se de Receptores a Fatores de Crescimento Endotelial do tipo II, bem documentados pela sua necessidade a co-receptores, como proteoglicanos e neuropilinas, que são proteínas ligadas covalentemente a polissacarídeos sulfatados. Dessa forma, se justifica por que heparina bloqueia a atividade miotóxicas dessas proteínas de forma tão eficaz.

Dentre os resíduos considerados relevantes neste trabalho para a interação com heparina, foi possível destacar o resíduo Lys7, importante na estabilização de cargas negativas

da heparina (FIGURA 43). As hélices I são importantes para o modelamento do sulco intermolecular e capazes de fornecer carga que favorecem interações com heparina. Stábeli et al. (2006) corroboraram a importância da Hélice I ao realizarem modificações por toda a miotoxina-II de *Bothrops moojeni* MjTX-II, sendo uma delas a clivagem do octapeptídeo N-terminal que compõe a Hélice I e foi observado que a atividade miotóxica foi reduzida em torno de 75%. Outro resíduo importante dentro da região intermolecular foi o resíduo Lys70, conservado em 100% das miotoxinas analisadas (APÊNDICE-A), onde atua estabilizando os sulfatos da estrutura da heparina, garantindo mais coesão à ligação. Além desses, o resíduo Met8 também foi considerado importante para a miotoxidade. Neste caso, observamos que ele atua de forma diferente ao Lys7. Sua atuação diz respeito à estabilização da estrutura terciária, onde sua cadeia lateral estabiliza resíduos da Hélice III: Tyr65, Tyr67 e Lys90 (FIGURA 54).

Figura 54. Representação da estabilização realizada pelo resíduo Met8 à β -asa e Hélice III da miotoxina Bn IV. Resíduos Met8, Tyr65, Tyr67 e Lys90 em verde. Imagem gerada pelo Pymol.



De fato, o Met8 – assim como os resíduos Lys7, Tyr65 e Tyr67, conservados 100% nas miotoxinas estudadas (APÊNDICE-A) – não garante que cada estrutura secundária seja formada, mas estabelecem interações importantes com cadeias laterais próximas e isto pode influenciar diretamente a posição da Hélice I e da β -asa. Esta última se tornou interessante pelo fato de compor a região intermolecular e as cadeias laterais dos resíduos presentes nela podem influenciar na estabilização da heparina à miotoxina. É importante notar que os resíduos Lys7 e Met8, assim como a Hélice I, são importantes para a miotoxidade, apesar de estarem muito distantes da cauda C-terminal. Esta observação sugere que a cauda C-terminal é importante, porém não é exclusiva para a execução da miotoxidade. Como veremos a seguir.

6.3 MECANISMO MIOTÓXICO DAS PROTEÍNAS MIOTÓXICAS LYS49

O modelo de miotoxicidade apresentado neste trabalho surgiu após resultados encontrados por pesquisadores do Japão. Estes pesquisadores trabalham com Fatores de Crescimento Endotelial (VEGF) identificando e caracterizando-os. Curiosamente, um de seus trabalhos identificaram um novo VEGF e, após analisarem sua sequência primária, perceberam que se tratava de uma miotoxina Lys49 de serpente da espécie *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Eles relataram que esta miotoxina se liga especificamente ao VEGFR-II – ou receptor KDR – em concentrações subnanomolar (YAMAZAKI et al., 2005). Outro trabalho importante foi realizado por Fujisawa e colaboradores (2008), que mostraram que miotoxinas ligam-se ao receptor VEGFR-II em unidades subnanomolar e foram além: buscaram pela região de ligação com o receptor através da síntese de peptídeos de diferentes regiões da miotoxina. Surpreendentemente, esses pesquisadores observaram que os peptídeos C-terminal ligaram-se ao receptor em concentrações de 10^{-8} μ M. Estes trabalhos foram suficientes para realizarmos docking moleculares envolvendo o receptor VEGFR-II com miotoxinas do Grupo II em busca de possíveis sítios específicos para esta interação.

VEGFRs são receptores de superfície celular do tipo tirosina quinase que apresentam um domínio extracelular formado por sete domínios imunoglobulina-like, um seguimento transmembrana, outro seguimento justamembranar e, por fim, um seguimento C-terminal composto por 70 resíduos de aminoácidos. Sua ativação é dada pela ligação de fatores de crescimento em domínios extracelulares específicos e consequente dimerização do receptor. Neste momento o padrão de interação com o ligante resulta num padrão específico de autofosforilação do receptor na sua porção intracelular, que desencadeia uma cascata de sinalização intracelular (ROSKOSKI JR, 2007). Os fatores de crescimento compõem uma família de ligantes especializados nessa função e recebem o nome de Fatores de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), onde, até o momento, foram encontrados sete tipos – VEGF-A e isoformas VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-F – que atuam nos três diferentes receptores – VEGFR-I, VEGFR-II e VEGFR-III – e são responsáveis por mediar uma resposta específica. As diferentes isoformas formadas são obtidas por meio de *splicing*. (GRÜNEWALD et al., 2010).

Os receptores VEGFR estão fortemente relacionados com sinais de crescimento e sobrevivência. São os responsáveis pelo crescimento de vasos sanguíneos e linfáticos

preexistentes, são importantes no desenvolvimento embrionário, crescimento de tecidos, cicatrização e etc. De modo geral, esses receptores são os responsáveis pelos processos de angiogênese e linfagiogênese. Estas diferentes respostas são dadas pela variedade de ligantes e interações entre domínios diferentes, mas também é regulada por co-receptores glicosilados (ROSKOSKI JR, 2007). Uma classe desses receptores são as neuropilinas, glicoproteínas que interagem com os VEGFs na mediação de sinais ainda mais específicos, como em vias no desenvolvimento do sistema cardiovascular. As neuropilinas são controladas por outro grupo de co-receptores, os proteoglicanos. Estas moléculas são compostas por várias cadeias de glicosaminoglicanos ligados covalentemente a região proteica, como os glicosaminoglicanos aniônicos heparan sulfato, e atuam na regulação da sinalização diretamente nas neuropilinas ou também na ligação em VEGFs. Vale ressaltar que as moléculas de heparan sulfato podem ser formadas por 40-200 unidades monossacarídicas. Atualmente sabe-se que o VEGF-A apresenta um sítio específico para heparan sulfato, formado pela região C-terminal da molécula. Esta interação, apesar de não poder ser mimetizada por outros glicosaminoglicanos como heparina desulfatada ou condroitin sulfato, pode ser realizada através de heparina sulfatada (GRÜNEWALD et al., 2010).

Tessler et al. (1994) demonstraram que a heparina é capaz de bloquear a atividade do VEGF₁₆₅ em receptores VEGFR-I, indicando que esta compete com os proteoglicanos de membrana responsáveis pela modulação e mediação do sinal celular. Dessa forma, os proteoglicanos apresentam-se como um potencial regulador do sinal da via VEGF/VEGFR (ASHIKARI-HADA et al., 2005). O presente trabalho busca trazer esse panorama para as proteínas miotóxicas, uma vez que elas ligam-se a receptores VEGFR e suas atividades são fortemente bloqueadas por heparina sulfatada, da mesma forma que os VEGFs são bloqueados. E, diferentemente da sinalização de sobrevivência dos VEGFs, as proteínas miotóxicas atuam numa sinalização específica, que é interpretada por células musculares maduras como um sinal pró-apoptótico. Este sinal é o responsável pela consumação da miotoxicidade. Como o nome sugere, a miotoxicidade é um processo específico de células musculares e, portanto, estas células carregam características próprias que favorecem a sinalização para apoptose. Lomonte, Tarkowski e Hanson (1994) demonstraram a especificidade da miotoxina II de *B. asper* após testarem diferentes células, como células de endotélio capilar, mioblasto, células cancerígenas como rhabdomyosarcoma e monócitos de leucemia aguda, onde as células mais afetadas foram as duas primeiras. Angulo e Lomonte (2005) encontraram resultados que reforçam mais ainda a especificidade das miotoxinas, pois

observaram que células musculares C2C12 adultas apresentaram-se mais vulneráveis aos processos de miotoxicidade e citotoxicidade que as indiferenciadas.

É notado ainda que as miotoxinas induzem um acelerado influxo de cálcio, como mostrado por Villalobos e colaboradores (2007) ao estudarem a miotoxina II de *B. asper* em miotubos C2C12, e sugeriram que esta característica pode ser explicada por duas formas: na tentativa da célula responder o stress gerado pela miotoxina ou pela sinalização apoptótica. Além disso, há participação do cálcio em processos de apoptose, como alterações na organização da cromatina, indução e expressão de genes relacionados com a clivagem do DNA e genotoxicidade (NICOTERA; ROSSI, 1994; MARCUSSI et al., 2013).

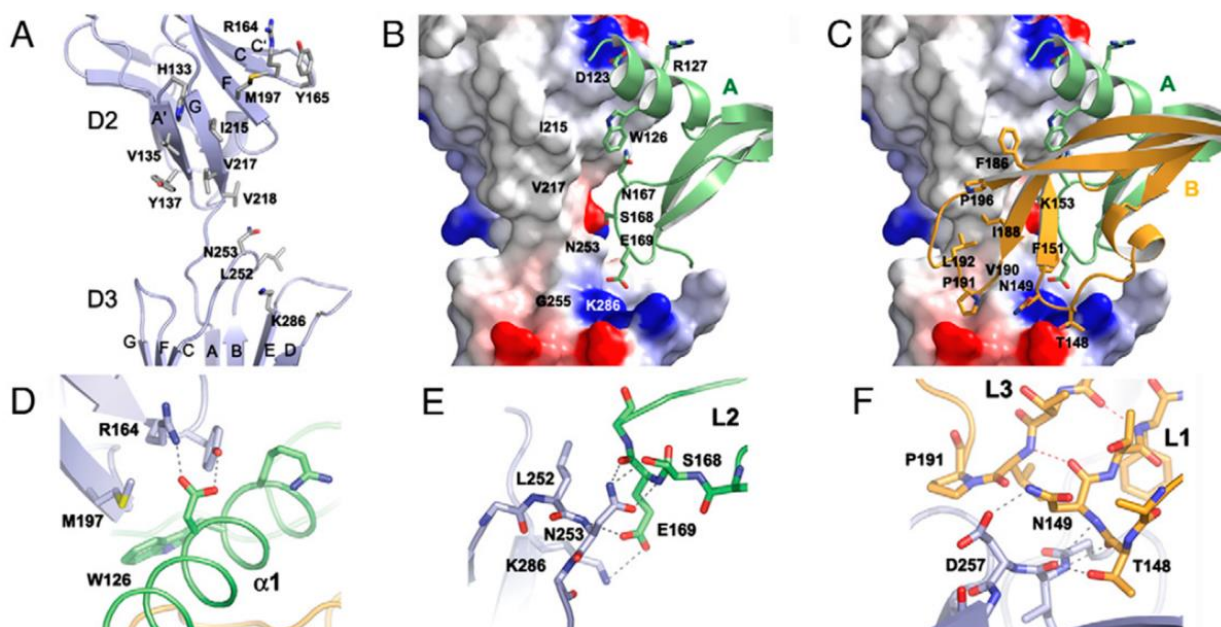
Em acordo com isto, MORA et al. (2005) encontraram resultados promissores ao estudarem células linfoblastóides e miotoxina II de *B. asper*. Foi observado que a miotoxina II atua por uma via tripla dependente da sua concentração: concentrações mínimas (0,5-5µg/mL) resultam em proliferação, concentrações médias (5-25µg/mL) resultam em apoptose e concentrações altas ($\geq 25\mu\text{g/mL}$) resultam em necrose. Associado a estes eventos, influxo de cálcio foi requerido (MORA et al., 2006). Moreira et al. (2013) demonstraram que prostaglandinas e Cox2 são ativadas em macrófagos, além de diferentes fatores intracelulares, como por exemplo NF- κ B, PKC, PTK, ERK e MAPK p38. Estes achados apontam que a especificidade miotóxica pode ser dada pela característica intrínseca da célula e não pela própria miotoxina. Isto reforça mais ainda a hipótese que as miotoxinas atuam através de um receptor específico, no caso o VEGFR-II.

É interessante notar que a via p38 está notadamente relacionada não só com processos de apoptose e stress, mas também com eventos no controle do ciclo celular, proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração de células. Contudo, sua atividade parece depender do tipo celular em questão, da intensidade e duração do sinal (CUADRADO; NEBREDÁ, 2010). Provavelmente as especificidades celulares refletem na variação da atividade das miotoxinas e, para células musculares maduras, seu sinal é rapidamente interpretado como apoptótico. Dessa forma, é possível explicar a via tripla dependente da concentração em células linfoblastóides, bem como a produção de prostaglandinas e Cox2 em macrófagos.

Os resultados encontrados nos docking moleculares envolvendo o receptor VEGFR-II e miotoxinas trazem uma boa discussão sobre uma provável região de ligação entre estas moléculas. Ao comparar as interações formadas entre o complexo VEGFR-II/VEGF (PDB:

2X1W) com os nossos resultados, foi possível determinar quais resíduos foram importantes para a inibição da interação VEGFR-II/VEGF. Dos resíduos-alvo da estrutura, as soluções do complexo VEGFR-II/Miotoxina que os sobrepuseram os resíduos da interação VEGFR-II/VEGF foram os resíduos His113, Val135, Tyr137, Tyr165, Gly196, Val219 e Asp257 do VEGFR-II. Apesar de esses resíduos serem compartilhados com o VEGF, eles não devem ser considerados como os únicos capazes de inibir as interações entre VEGFR-II e VEGF. Como esperado, a miotoxina interage com outros resíduos próximos aos resíduos-alvo, como, por exemplo, os resíduos Val216, Val219, Gly255, Ile256, Phe258 e Phe288, que estão próximos dos resíduos-alvo e interações entre eles certamente serão eficientes na inibição do VEGF. De modo geral, os resultados do nosso trabalho mostram certa congruência ao apresentarem soluções próximas entre si tanto para as caudas C-terminal quanto para a miotoxina completa (FIGURA 56). Como Leppänen e colaboradores 2010 demonstraram, o VEGFR-II apresenta dois sítios específicos para o reconhecimento do VEGF, que o estabiliza através de sua hélice N-terminal ou loops L1, L2 e L3 (FIGURA 55).

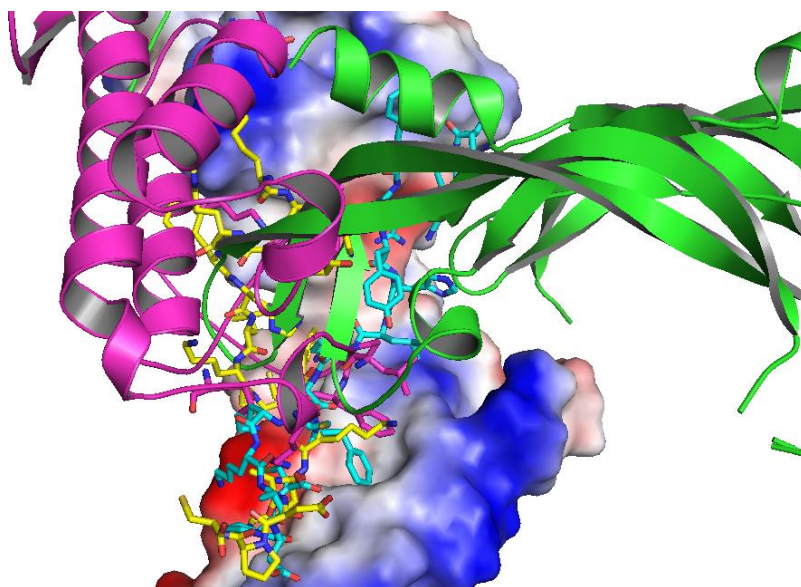
FIGURA 55. Caracterização da interação entre VEGF e seu receptor VEGFR-II. Regiões do VEGF consideradas importantes para a interação VEGF/VEGFR-II são identificadas como $\alpha 1$, L2 e L1 e representados em D, E e F, respectivamente.



Nossos resultados se mostraram promissores por serem capazes de interagir com o VEGFR-II sobre tais sítios. Dessa forma, a miotoxina Bn IV não só se liga ao VEGFR-II, mas também compete pelo mesmo sítio com o VEGF por sobrepor os loops L1 e L3 do VEGF e,

consequentemente, capazes de disputar pelo mesmo sítio (FIGURA 56), como observado previamente por Fujisawa et al. (2008).

FIGURA 56. Representação da interação entre o receptor VEGFR-II (superfície eletrostática) e seu ligante VEGF (verde), juntamente com as soluções geradas com a miotoxina (roxo, azul e amarelo), mostrando a disputa pelo mesmo sítio entre tais moléculas. Imagem gerada pelo Pymol.



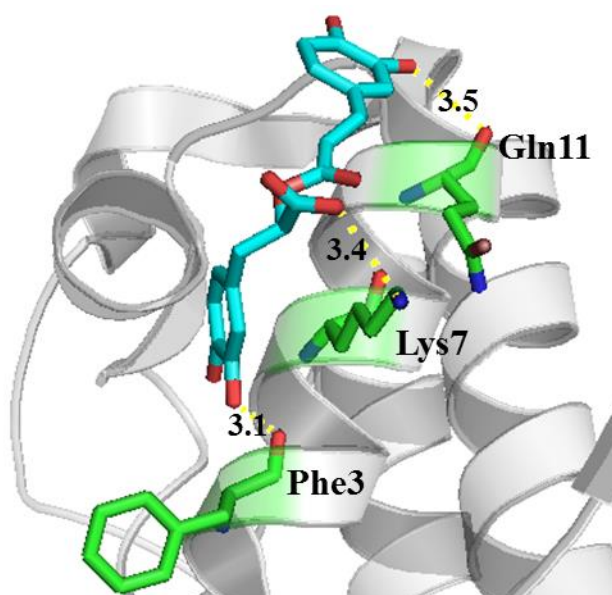
Estes resultados devem ser considerados como uma possível nova abordagem sobre a atividade das miotoxinas no que diz respeito à miotoxicidade. Vale ressaltar que o receptor cristalizado, bem como a proteína testada, estão em condições diferentes e sua interação pode ser mais complexa, favorecida por alterações conformacionais capazes de acomodar melhor os resíduos, garantindo uma melhor interação. O estudo de microscopia eletrônica realizado por Ruch et al. (2007) demonstra um grau de liberdade considerável na interação VEGFR/VEGF, visto que os domínios extracelulares dos VEGFRs são compostos por mais de 500 resíduos de aminoácidos, e, portanto, são bastante flexíveis.

Muito se discute sobre o verdadeiro sítio miotóxico das Lys49. A cauda C-terminal é a região mais atribuída para a atividade miotóxicas destas proteínas. Isto se dá por estudos envolvendo a síntese de peptídeos da cauda C-terminal, capazes de reproduzir tais efeitos (CINTRA-FRANCISCHINELLI et al. 2010; FERNANDES et al., 2013; NÚÑEZ; ANGULO; LOMONTE, 2001). Nosso trabalho também considera a cauda C-terminal como uma região importante para a miotoxicidade. O resíduo Phe114 – assim como a saliência hidrofóbica – e os resíduos catiônicos Lys37 e Lys117 são apontados como importantes para a interação das miotoxinas com o receptor VEGFR-II. Em concordância com isso, as análises de sequência

apontam que estes resíduos são fortemente conservados dentro do grupo das miotoxinas. Por outro lado, as fosfolipases ativas não apresentam tais resíduos (APÊNDICE–A).

Além da cauda C-terminal, nosso trabalho aponta a Hélice I como outro importante sítio para a miotoxidade, por estabilizar a interação com heparina via Lys7 e estabilizar a β -asa via Met8, importante para a formação da região intermolecular, como foi mostrado nas Figuras 43 e 54. Dando suporte estrutural a esses achados, a estrutura cristalográfica da pirotoxina I de *B. pirajai* e ácido rosmarínico (PDB: 3QNL) mostram que sua interação é feita sobre a Hélice I da miotoxina e seu principal estabilizante é o resíduo Lys7 (SANTOS et al., 2011b).

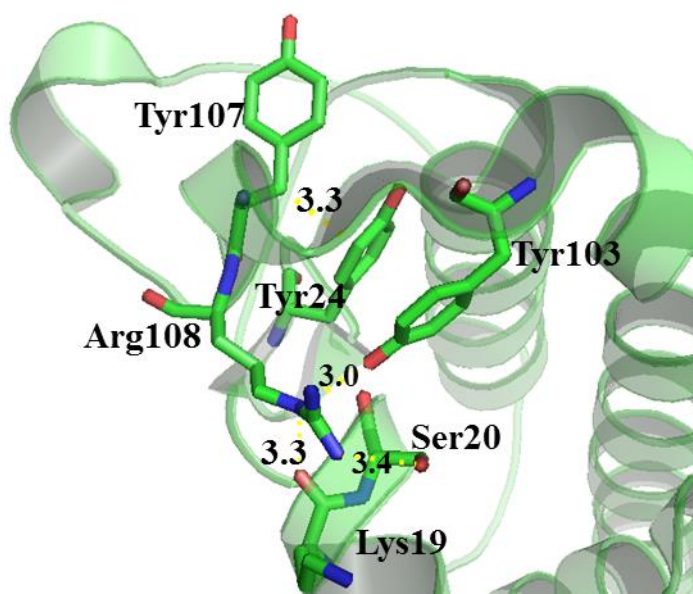
FIGURA 57. Representação da pirotoxina I de *Bothrops pirajai* (branco) complexada ao ácido rosmarínico (ciano). Detalhe para os resíduos Phe3, Lys7 e Gln11 da Hélice I representados em verde.



Por fim, o sítio KKYRY, apresentado até então como um importante sítio para a citotoxicidade, é fundamental para a expressão da miotoxidade. Ele é o responsável pela estabilização da heparina na miotoxina. Desestabilização nesse sítio pode acarretar em diminuições consideráveis da miotoxidade. Chioato et. al (2002) demonstraram que a mutação do resíduo Arg118Ala de BthTX-I resulta numa considerável diminuição da miotoxidade, bem como as mutações Tyr117Trp e Lys112Ala. Os resíduos Tyr117 e Arg118 (referentes aos Tyr107 e Arg108 no nosso trabalho) fazem parte do sítio KKYRY, como podemos observar na Figura 58. Já o resíduo Lys112 participa na polarização do loop de cálcio da saliência hidrofóbica presente na região C-terminal. Como vimos em nossos

resultados, estes resíduos hidrofóbicos são importantes na estabilização da interação da miotoxina na região entre os domínios 2 e 3 do VEGFR (FIGURA 47).

FIGURA 58. Representação estrutural do sítio KKYRY (direita) e hélice curta (esquerda) da Bn IV. Detalhamento das interações entre os resíduos Tyr107 e Arg108 envolvendo os resíduos Lys19, Ser20, Tyr24 e Tyr103. Imagem gerada pelo Pymol.

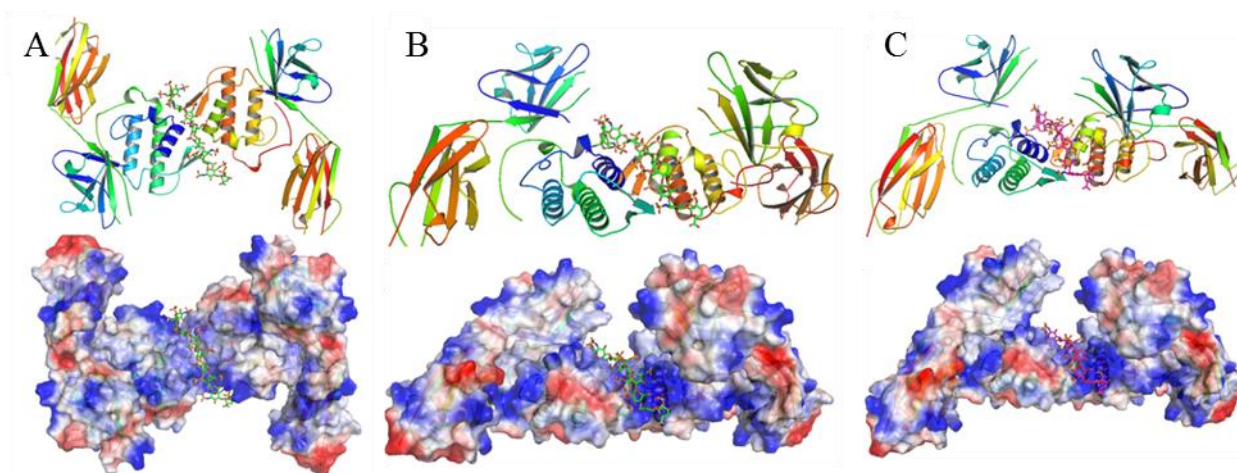


Ruller e colaboradores (2005) fizeram um achado importante para o estudo da miotoxidade em BthTX-I ao estudarem a tríade Glu12/Trp77/Lys80: a BthTX-I a conformação dimérica não é necessária para a expressão da miotoxidade. O mesmo foi confirmado por Angulo et al. (2005) ao forçarem a miotoxinas à conformação monomérica através da diminuição do pH. Diante disto, é possível pensar que as proteínas podem atuar na forma monomérica ou então que elas devem se unir de alguma forma à satisfazer sua conformação final para a execução da sua atividade. Partindo do princípio que as miotoxinas devem favorecer a dimerização dos receptores VEGFRs, elas precisam se organizar em dímero, assim como os VEGFs, para que cada região C-terminal ligue-se em um monômero de VEGFR e garanta sua dimerização. Por outro lado, ao perceber que a heparina é um regulador da sinalização em VEGFRs e, de acordo com nossos achados, a heparina atua como um catalizador da dimerização das miotoxinas, uma vez que os seus sítios se complementam na forma dimérica. Dessa forma, não se faz necessário que as miotoxinas se organizem em dímeros, uma vez que os monômeros podem ser atraídos pela heparina e esta favorecer sua dimerização. Estes resultados podem explicar, por exemplo, por que a miotoxina de *B. godmani* mantém sua miotoxidade mesmo sendo monomérica (ARNI et al., 1999). É curioso que, apesar dela se comportar na forma monomérica, os três resíduos abordados por

Ruller et. al (2005) estão presentes na proteína e não garantem sua dimerização, fazendo-se necessário mais estudos tanto para os resíduos responsáveis pela interface dimérica quanto para a miotoxina de *B. godmani*.

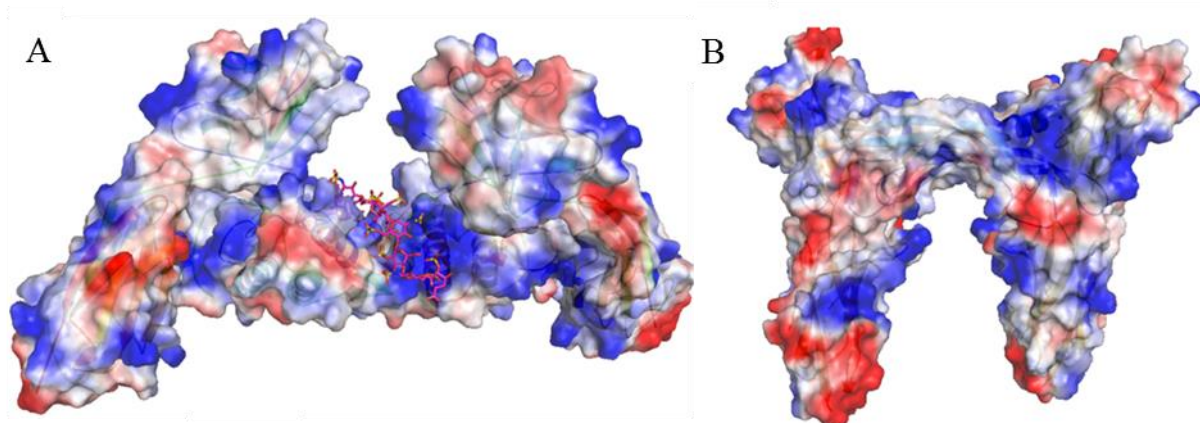
Baseado na literatura e nos resultados encontrados, nosso trabalho propõe que as miotoxinas ligam-se aos receptores VEGFR-II por meio de sua cauda C-terminal e numa energia satisfatória para os programas utilizados. Sendo um dímero, é capaz de estabilizar dois monômeros do receptor e aproximá-los de modo que eles sofram autofosforilação e desencadeie uma cascata sinalizadora intracelular. Assim como os VEGFs, a miotoxina possui uma região com alta afinidade a heparina, apontada como a região KKYRY e intermolecular (auxiliada pela Hélice I e resíduo Lys7), que estimula a dimerização da miotoxina, bem como pode ser importante na modulação do sinal. Vale salientar que tais estudos são teóricos e experimentos devem ser realizados para confirmar nossa hipótese, através do estudo das vias downstream dos receptores VEGFR-II, especialmente a via p38, como foi demonstrada sua importância por Moreira et al. (2013). A partir dessas informações, juntamente com os resultados obtidos no presente trabalho, foram gerados três modelos, os quais são muito próximos estruturalmente e de mesma finalidade (FIGURA 59).

FIGURA 59. Representação da interação VEGFR-II e miotoxina. Modelos gerados a partir dos resultados obtidos com o HEX 6.3 (A) e Molegro Virtual Docker de Scores -136 e -235 (B e C). Na parte superior as estruturas são apresentadas e inferior por superfície eletrostática. Heparinas localizadas nas regiões intermoleculares das miotoxinas e são representadas em verde. Imagem gerada pelo Pymol.



A título de ilustração, o modelo apresentado acima é muito similar ao cristal encontrado por Leppänen et al. (2010), o que fortalece ainda mais nosso modelo. A comparação entre tais modelos pode ser observado na Figura 60.

FIGURA 60. Representação eletrostática da interação VEGFR-II com miotoxina (A) e VEGFR-II com VEGF (B). Imagem gerada pelo Pymol.



6.4 OS SÍTIOS MIOTÓXICOS E CITOTÓXICOS SÃO DISTINTOS, PORÉM SOBREPOSTOS

Nosso trabalho propõe que os sítios de citotoxicidade e miotoxicidade são compostos por domínios diferentes. Os domínios importantes para a citotoxicidade são formados por um sítio não-específico de reconhecimento a cargas aniônicas, localizado próximo à cavidade hidrofóbica, numa porção da Hélice II e do loop elapídico, formado pelos resíduos Arg33, His48, Lys49, Lys52 e Lys60, responsáveis pelo acoplamento da miotoxina à membrana/micela; pela saliência hidrofóbica, formada pelos resíduos Leu111, Pro113 e Phe114; e pelo sítio KKYRY, que, juntamente com resíduos próximos à saliência hidrofóbica (Lys37, Lys116 e Lys117) atuam de forma secundária na separação da membrana. Já o sítio de miotoxicidade é composto por um domínio de reconhecimento a heparina, formado pelo sítio KKYRY e região intermolecular, onde apresenta os resíduos Lys7, Gln11, Lys15, Asn16, Lys19, Ser20, Trp69, Lys105 e Arg108; e um domínio de reconhecimento ao receptor VEGFR-II, formado pela cauda C-terminal, onde é possível destacar a saliência hidrofóbica e os resíduos Lys37 e Lys117. É importante destacar que as características dos resíduos aqui apresentados encontram-se fortemente conservados entre as miotoxinas, como pôde ser

observado nas análises de sequências (APÊNDICE –A). Dessa forma, estes dois sítios, apesar de serem diferentes, são sobrepostos, como vimos na participação do pescoço hidrofóbico nas duas atividades, por exemplo. Essa distinção entre sítios é suportada por diferentes estudos, detalhados a seguir.

Lomonte e colaboradores (1994b) estudaram os efeitos farmacológicos da miotoxina II de *B. asper* através da sua inibição. Um dos testes realizados tratou de inibir ou clivar polissacarídeos saturados de superfície celular e foi observado que a citotoxicidade não foi alterada, mas a miotoxicidade sim. Este trabalho está de acordo com nossos dois modelos até então propostos, além de comprovar que os efeitos miotóxicos e citotóxicos atuam por vias diferentes. É surpreendente como a heparina se faz importante apenas para a realização apenas da atividade miotóxica e nosso trabalho explica de forma satisfatória os aspectos estruturais dessa interação.

Estudos de mutagênese realizados por Stábeli et al. (2006) demonstraram que os resíduos são importantes para a miotoxicidade e citotoxicidade em intensidades diferentes. O resíduo Met8, bem como a Hélice I, se mostra mais importante para a miotoxicidade. Por outro lado, os resíduos de lisina, apesar de diminuírem ambos os efeitos, a citotoxicidade é a mais prejudicada. Novamente, nosso trabalho está de acordo com esses achados, uma vez que, como mostrado, a Hélice I tem participação fundamental na estabilização da heparina e então realização da miotoxicidade, como vemos na Figura 43. Por outro lado, a densidade de resíduos catiônicos é essencial para o reconhecimento não-específico de fosfolipídios carregados negativamente, etapa primordial no modelo de citotoxicidade apresentado na Figura 51.

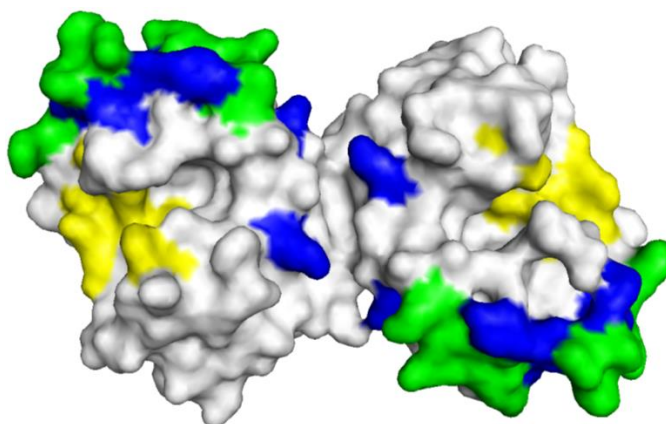
Ainda sobre estudos de mutagênese, Chioato et al. (2002) demonstraram que os resíduos Lys115, Lys116 e Phe125 são importantes para a citotoxicidade, já os resíduos Tyr117 e Arg118 são importantes para a miotoxicidade. Por outro lado, o resíduo Lys122 apresenta-se importante para ambos os efeitos, corroborado também por Ward et al. (2002). Ao analisar a estrutura 3MLM, que apresenta os resíduos enumerados dez aminoácidos a menos, podemos perceber que os resíduos Lys115 (correspondendo ao Lys105) e Lys116 (correspondendo ao Lys106) estão voltados mais para fora da proteína que os resíduos Tyr117 (correspondendo ao Tyr107) e Arg118 (correspondendo ao Arg108) e isto pode explicar sua maior relevância para a citotoxicidade, que precisa desses resíduos para desestabilizar membranas após a penetração da saliência hidrofóbica. Por outro lado, os resíduos Tyr107 e

Arg108 participam na estabilização do sítio KKYRY e regiões próximas. Já o resíduo Phe125 (correspondente ao Phe114), faz parte da ‘saliência’ hidrofóbica, como observado nas Figuras 44 e 47.

O resíduo Tyr107 é importante na estabilização do loop de cálcio através de interações com o resíduo Tyr24, por meio de suas cadeias laterais, bem como a estabilização da própria cauda C-terminal o qual pertence, através da interação com as cadeias principais dos resíduos Lys105 e Arg108. Além disso, o resíduo Arg108 participa da estabilização da pequena α -hélice que compõe o sítio catiônico desta região, através da interação de sua cadeia lateral com os resíduos Lys19, Ser20 e Tyr103. Dessa forma, alterações nestes resíduos podem favorecer o desmantelamento desse sítio e alterar consideravelmente a superfície de reconhecimento com heparina e também com seu receptor, através da cauda C-terminal (FIGURA 58). Já o resíduo Lys122 (correspondendo ao Lys112) permite não só a polarização da cauda C-terminal e loop de cálcio – importante para a citotoxicidade – mas também a estabilização da cauda – importante para o reconhecimento com o receptor VEGFR-II. Fortalecendo estes achados, tais resíduos encontram-se conservados ao longo das miotoxinas e, como exemplo do resíduo Tyr24, até mesmo nas fosfolipases ativas (APÊNDICE-A).

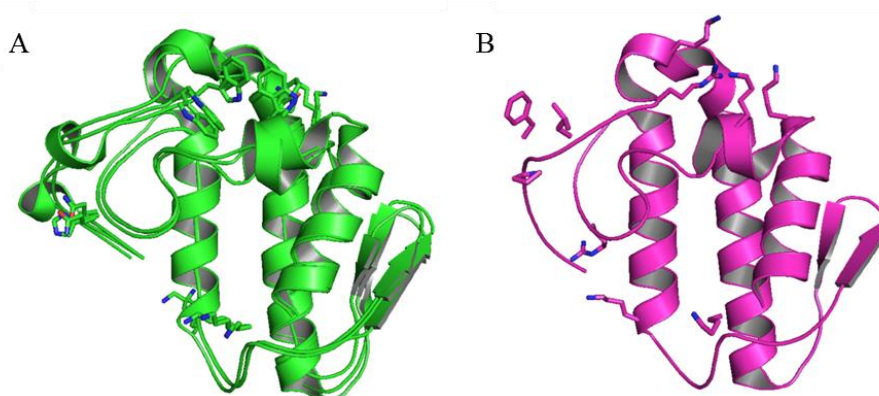
Ruller et al. (2005) dissociaram a BthTX-I em monômeros por meio de mutações nos resíduos essenciais para a estabilização dimérica e observaram que a conformação dimérica é importante apenas para os eventos citotóxicos, enquanto que a miotoxidade pode ser executada em conformação monomérica. Como vimos em ambos os modelos apresentados, a conformação dimérica é importante para a citotoxicidade, pois ela permite que a miotoxina atue como uma fechadura, aumentando seu poder penetrante em membranas. Por outro lado, a miotoxidade pode ser executada na forma monomérica, pois a heparina garante que os monômeros unam-se através da interação com os sítios KKYRY de ambos os monômeros. Dessa forma, a distinção entre tais sítios se mostram evidentes, porém, ao observar a participação desses resíduos, podemos observar que alguns deles são restritos a seus sítios, já outros são compartilhados e, portanto, sobrepostos (FIGURA 61).

FIGURA 61. Representação superficial da miotoxina BN IV. Representação do sítio citotóxico (amarelo), miotóxico (azul) e a sobreposição destes (verde). Imagem gerada pelo Pymol.



Com o intuito de fortalecer ainda a importância dos sítios essenciais para a miotoxicidade e citotoxicidade das proteínas miotóxicas, foram realizadas observações estruturais e de sequência de resíduos de aminoácidos e foi observado que, de fato, tais sítios são restritos às proteínas miotóxicas do Grupo II (APÊNDICE-A). A diferença mais marcante entre essas proteínas é a densidade elétrica na região próxima à cavidade hidrofóbica o qual o resíduo Arg33 está próximo, pois em miotoxinas há uma boa densidade catiônica; já em fosfolipases ativas esta região é substituída por outros resíduos de caráter negativo ou polar e, por isso, muitas vezes são chamadas de fosfolipases ácidas. Outra característica diferente entre essas proteínas e o sítio KKYRY, consideravelmente catiônico em miotoxinas, mas em fosfolipases ativas essa característica é destruída graças aos resíduos Trp20 e Trp108, que alteram drasticamente o sítio de catiônico para hidrofóbico, o que impossibilita – ou diminui – sua interação com poliânions (FIGURA 62).

FIGURA 62. Representação das cadeias laterais correspondentes entre (A) PLA₂ e (B) miotoxina de *B. neuwiedi* demonstrando as diferenças estruturais entre elas. Imagem gerada pelo Pymol.



Além de estabelecer a diferença entre tais sítios, nosso trabalho propõe que a expressão dos efeitos farmacológicos da citotoxicidade e miotoxicidade é dada por meios moleculares diferentes. Se por um lado a citotoxicidade é expressa por meio da perturbação de membranas através do “Mecanismo do Abraço”, a miotoxicidade é expressa através de uma cascata de sinalização realizada após a interação da miotoxina com o VEGFR-II, onde destacamos a principal ativação da via p38. Além disso, a interação VEGFR-II/Miotoxina é modulada por co-receptores heparinados através da sua interação com o sítio de reconhecimento a heparina localizado na região intermolecular da miotoxina. Essa distinção pode ser melhor observada na Figura 63.

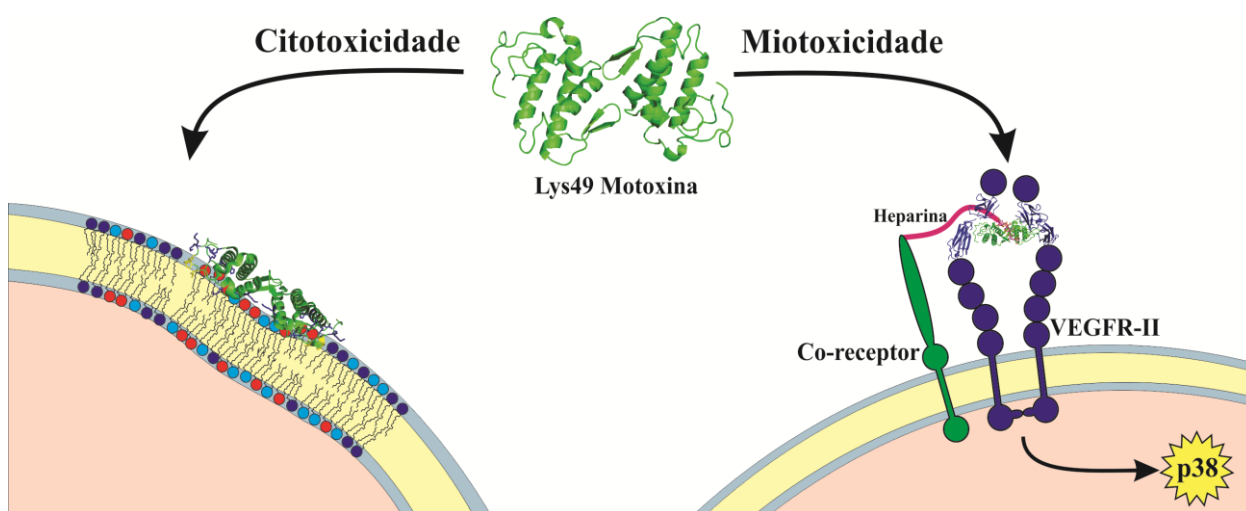


FIGURA 63. Representação esquemática das duas vias moleculares de expressão dos efeitos farmacológicos de citotoxicidade e miotoxicidade das miotoxinas Lys49.

6.5 IMPORTÂNCIA DO DÍMERO CONVENCIONAL

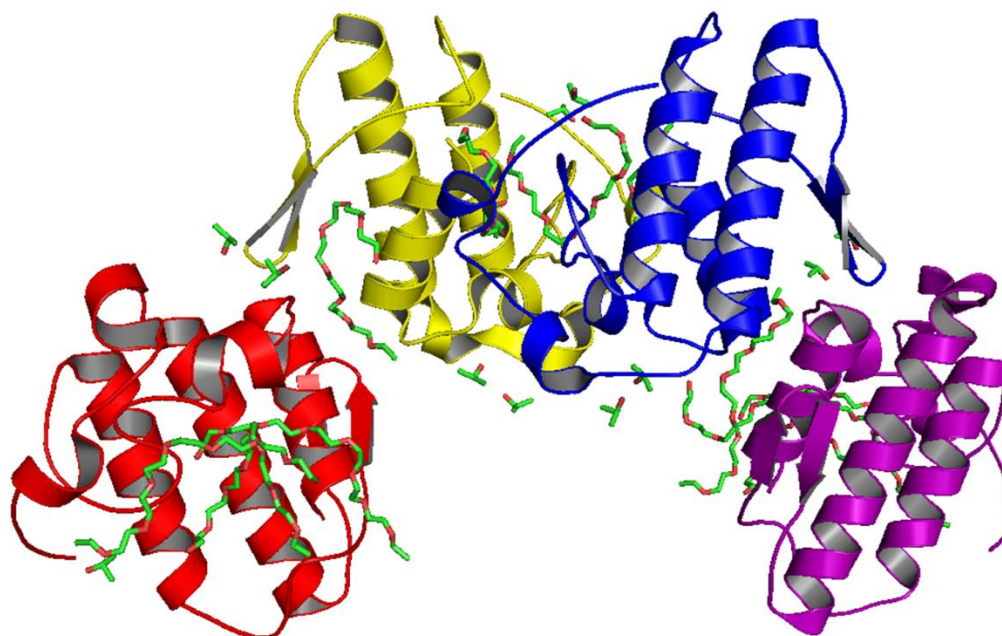
Os modelos apresentados neste trabalho trazem uma nova abordagem de como as miotoxinas Lys49 de serpentes do Grupo II atuam na execução de suas atividades farmacológicas, notadamente citotóxicas e miotóxicas. Contudo, a explicação dos efeitos farmacológicos tem sido feita por outro modelo proposto recentemente, chamado de Dímero Alternativo. Abaixo, algumas considerações sobre este modelo em comparação com o nosso trabalho.

A partir da cristalização da miotoxina II de *B. asper* com a droga anti-tripanosomal Suramina, uma molécula sintética formada por vários anéis carbônicos altamente sulfatados

(PDB: 1Y4L), foi proposto um modelo de desestabilização de membranas, baseado numa nova conformação dimérica (MURAKAMI et al., 2005). Além da suramina, moléculas de PEG também foram cristalizadas. Este trabalho propôs um novo mecanismo estrutural de ação das proteínas miotóxicas do Grupo II e foi o responsável pela proposta de uma nova conformação estrutural dessas proteínas, o Dímero alternativo, importante para o desenvolvimento do novo mecanismo de perturbação de membranas, onde dois importantes estudos devem ser lembrados. Santos, Soares e Fontes (2009) propuseram o mecanismo de desestabilização de membranas através da conformação de um sítio altamente catiônico formado pelos resíduos Lys20, Lys105 e Arg108, responsáveis por reconhecer os fosfolipídios negativos das membranas e desestabilizá-los, facilitando sua atração para o sítio hidrofóbico, formado pelas duas cavidades hidrofóbicas de cada monômero. Fernandes et al. (2013) aprimorou este mecanismo acrescentando a necessidade de um ativador da estrutura do dímero alternativo, feita por um ácido graxo livre ou liberado por PLA₂s cataliticamente ativas, além de dar importância para a saliência hidrofóbica da cauda C-terminal das proteínas miotóxicas, apontando como um agente ativo na penetração perturbação de membranas, seguida da atração dos fosfolipídios para a cavidade hidrofóbica.

Comparado ao modelo do presente estudo, todas as regiões candidatas como sítios de citotoxicidade são compartilhadas, porém interpretadas de forma diferente. Como argumenta Delatorre et al. (2011), as conformações convencional e alternativa são igualmente prováveis de ocorrerem, assim como as duas podem ser observadas em estudos cristalográficos, dependendo da forma de como o monômero simétrico é gerado. Além do mais, Ullah et al. (2012) sugeriram que as condições de cristalização podem interferir na simetria destas moléculas, facilitando que possam ser resolvidas no modelo do dímero alternativo. Um exemplo dessa situação pode ser observado no cristal de MjTX-I encontrado por Salvador et al. (2013). Dada a complexidade encontrada entre dois monômeros de dímeros diferentes, a seleção da unidade repetitiva os selecionaram. Contudo, ao gerar seus simétricos, é notado que se trata de dois dímeros convencionais muito próximos. Além do mais, as moléculas de PEG 4000 presentes nele favorecem os achados no presente trabalho, por interferirem não só o sítio não-específico à cargas aniônicas, mas também a região intermolecular (FIGURA 64).

FIGURA 64. Representação das moléculas simétricas mais próximas do cristal de BjTX-I complexado a moléculas de PEG 4000 (SALVADOR et al., 2013). O Dímero alternativo é formado pelos monômeros amarelo e azul, já o dímero convencional é formado pelos monômeros vermelho e amarelo, ou azul e roxo.



A despeito disso, o modelo do Dímero alternativo propõe que ambos os efeitos citotóxicos e miotóxicos são causados pela desestabilização de biomembranas e não há separação de tais sítios, diferentemente como propomos no presente trabalho. Como já observado, a conformação dimérica não é importante para os efeitos miotóxicos, porém os efeitos citotóxicos são fortemente reduzidos (RULLER et al., 2005) e, de acordo com o modelo do dímero alternativo, é necessário que o dímero seja mantido para que seja possível a internalização da saliência hidrofóbica na bicamada. Outro ponto controverso deste modelo do Dímero alternativo é a necessidade de que um ácido graxo livre penetre a molécula para formar o dímero ativo e, posteriormente, como sugere o modelo, este mesmo sítio deva ser ocupado pelo fosfolipídio de membrana. Além disso, não há uma caracterização molecular de como provavelmente pode acontecer essa competição entre tais moléculas.

Estudos cristalográficos se apresentam como uma ótima fonte de estudo e caracterização de sítios, contudo, os cristais apresentam uma etapa específica da interação entre as moléculas e isto pode confundir pesquisadores em estudos que envolvem várias etapas de interações. Acreditamos que as diferentes estruturas cristalográficas contendo moléculas anfífilas constituem uma interação direta com as miotoxinas e confirmam a

importância dos seus sítios através do seu bloqueio estérico. Entretanto, devemos pensar que o ambiente cristalizado não necessariamente corresponde ao ambiente inicial da interação dessas proteínas com as membranas. O ambiente de interação inicial constitui um meio hidrofílico e a primeira interação gerada entre as proteínas e membranas são realizadas pelas cabeças polares dos fosfolipídios e não por caudas ou moléculas hidrofóbicas, como sugere o modelo do Dímero Alternativo. As diversas moléculas anfifílicas que inibem a atividade de miotoxinas não são facilitadoras, mas sim bloqueadoras destas moléculas e constituem uma etapa fixa de inibição destas proteínas por competirem com o mesmo sítio de reconhecimento das cabeças polares das membranas (FIGURA 51).

Este panorama apresentado é considerado no nosso trabalho, porém uma possível limitação pode estar no modelo de miotoxidade. Como podemos notar na Figura 59, a cavidade hidrofóbica não tem participação no processo de miotoxidade – apenas a cauda C-terminal e região intermolecular – e é notável que a esta cavidade tem influência em tal atividade, como estruturas cristalográficas podem mostrar (DELATORRE et al., 2011; MURAKAMI et al., 2005). Contudo, argumentamos que, apesar dessa região não participar ativamente na miotoxidade, ela é capaz de interferir indiretamente em tais sítios por dois meios: (i) perturbação da polarização do resíduo Lys112 (LEE et al., 2001), o que desestrutura a saliência hidrofóbica da cauda C-terminal, importante na interação com o receptor VEGFR-II (FIGURA 47); e (ii) perturbação da estabilização do sítio KKYRY através da alteração das interações que envolvem os resíduos Tyr21 e Tyr103 por meio de modificações no tamanho da cavidade (WARD et al., 1998).

7. CONCLUSÕES

As análises de sequência entre miotoxinas e fosfolipases A_2 demonstraram que estes grupos apresentam características estruturais distintas e específicas, notadamente iônicas;

Os resíduos catiônicos são de grande importância para a expressão dos efeitos farmacológicos das miotoxinas Lys49 de serpentes Viperidae (Grupo IIA);

As miotoxinas Lys49 de serpentes Viperidae apresentam um de reconhecimento não-específico de cargas aniônicas, formado essencialmente por resíduos catiônicos conservados;

As miotoxinas Lys49 apresentam uma saliência hidrofóbica C-terminal voltada para o meio aquoso importante na penetração de membranas e, portanto, fundamentais para a realização dos efeitos citotóxicos;

O estabelecimento do sítio não-específico a cargas aniônicas e da saliência hidrofóbica permitiu a formulação do modelo hipotético chamado de “Mecanismo do Abraço”;

As miotoxinas Lys49 apresentam um domínio de reconhecimento a heparina, formado por densidades catiônicas encontrada em cada monômero do dímero conectadas pela região intermolecular;

A conformação dimérica é necessária para a execução da citotoxicidade e miotoxicidade. Entretanto, a dissociação dimérica pode ser suprimida com a participação de co-receptores do receptor VEGFR-II;

A Hélice I das miotoxinas Lys49 é importante para os efeitos farmacológicos, enfaticamente miotóxicos;

A cauda C-terminal das miotoxinas Lys49 se mostrou importantes no reconhecimento do receptor VEGFR-II;

As miotoxinas Lys49, bem como sua cauda C-terminal, apresentam características anfifílicas consideradas importantes para seu efeito bactericida;

Os efeitos citotóxicos e miotóxicos são formados por domínios diferentes, porém sobrepostos.

8. REFERÊNCIAS

- ABE, A.; SHAYMAN, J. A. (1998). Purification and characterization of 1-O-acylceramide synthase: A novel phospholipase A₂ with transacylase activity. **Journal of Biological Chemistry** 273(14): 8467-8474.
- ALOY, P.; PICHAUD, M.; RUSSELL, R. B. (2005). Protein complexes: structure prediction challenges for the 21st century. **Current Opinion in Structural Biology** 15(1): 15-22.
- AMBROSIO, A. L.; NONATO, M. C.; ARAÚJO, H. S. S.; ARNI, R.; WARD, R.; J.; OWNBY, C. L.; SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C. (2005). A molecular mechanism for Lys⁴⁹-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **Journal of Biological Chemistry** 280(8): 7326-7335.
- ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; SOARES A. M.; CHO, W.; LOMONTE, B. (2005). Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. **Toxicon** 46(3): 291-296.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. (2005) Differential susceptibility of C2C12 myoblasts and myotubes to group II phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms. **Cell Biochemistry and Function** 23(5): 307-313.
- ANGULO, Y.; OLAMENDI-PORTUGAL, T.; ALAPE-GIRÓN, A.; POSSANI, L. D.; LOMONTE, B. (2002). Structural characterization and phylogenetic relationships of myotoxin II from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a Lys49 phospholipase A₂ homologue. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 34(10): 1268-1278.
- ARAGÃO, E. A.; CHIOATO, L. WARD, R.J. (2008). Permeabilization of *E. coli* K12 inner and outer membranes by bothropstoxin-I, A Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon** 51(4): 538-546.
- ARAUJO, H. S. S.; WHITE, S. P.; OWNBY, C. L. (1996). cDNA cloning and sequence analysis of a Lysine-49 phospholipase A₂ myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 326(1): 21-30.
- ARMUGAM, A.; GONG, N.; LI, X.; SIEW, P. Y.; CHAI, S. C.; NAIR, R.; JEYASEELAN, K. (2004). Group IB phospholipase A₂ from *Pseudonaja textilis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 421(1): 10-20.
- ARNI R. K.; WARD R.J.; GUTIERREZ J. M.; TULINSKY, A. (1995). Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. **Acta Crystallographica Section D** 51(3): 311-317.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. (1996). Phospholipase A₂ – A structural review. **Toxicon** 34(8): 827-841.
- ARNI, R.K., FONTES, M.R., BARBERATO, C., GUTIERREZ, J.M., DIAZ, C., WARD, R.J. (1999). Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 366(2): 177-182.

- ASHIKARI-HADA, S.; HABUCHI, H.; KARIYA, Y.; KIMATA, K. (2005). Heparin regulates vascular endothelial growth factor₁₆₅-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells: comparison of the effects of heparin and modified heparins. **Journal of Biological Chemistry** 280(36): 31508-31515.
- AUGERT, A.; PAYRÉ, C.; LAUNOIT, Y.; GIL, J.; LAMBEAU, G.; BERNARD, D. (2009). The M-type receptor PLA₂R regulates senescence through the p53 pathway. **EMBO reports** 10(3): 271–277.
- BAHNSON, B. J. (2005). Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A₂: insight from the anion-assisted dimer. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 433(1): 96–106.
- BALSINDE, J. (2002). Roles of various phospholipases A₂ in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodeling. **Biochemical Journal** 364(3): 695-702.
- BALSINDE, J.; PÉREZ, R.; BALBOA, M. A. (2006). Calcium-independent phospholipase A₂ and apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta** 1761(11): 1344-1350.
- BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; HAVT, A.; TOYAMA, D. O.; EVANGELISTA, J. S. A.M.; FERREIRA, D. P. P.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. (2005). Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon** 46(4): 376-386.
- BENVENISTE, J.; CHIGNARD, M.; COUEDIC, J.P. L.; VARGAFTIG, B.B. (1982). Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF-acether) II. Involvement of phospholipase a₂ in the formation of PAF-acether and lyso-paf-acether from rabbit platelets. **Thrombosis Research** 25(5): 375-385.
- BERNSTEIN FC, KOETZLE TF, WILLIAMS GJ, MEYER EF JR, BRICE MD, RODGERS JR, KENNARD O, SHIMANOUCHI T, TASUMI M. (1977). The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **J Mol. Biol.** 25;112(3):535-42.
- BORTELO-BUGS, R. K.; BUGS, M. R.; NETO, A. A.; WARD, R. J. (2007). A micelle nucleation model for the interaction of dodecyl sulphate with Lys49–phospholipases A₂. **Biophysical Chemistry** 125(1): 213-220.
- BORTELO-BUGS, R. K.; NETO, A. A.; WARD, R. J. (2004). Activation of Ca²⁺-independent membrane-damaging activity in Lys49–phospholipase A₂ promoted by amphiphilic molecules. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 322(2): 364-372.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816 p.
- BUSTILLO, M. E.; FISCHER, a. l.; LABOUYER, M. A.; KLAIPS, J. A.; WEBB, A. C.; ELMORE, D. E. (2014). Modular analysis of hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide consisting of membrane translocating and membrane permeabilizing fragments. **Biochimica et Biophysica Acta** 1838(9): 2228–2233.
- CAGLAYAN, E.; VANTLER, M.; LEPPÄNEN, O.; GERHARDT, F.; MUSTAFOV, L.; FREYHAUS, H.; KAPPERT, K.; ODENTHAL, M.; ZIMMERMANN, W. H.; TALLQUIST,

- M. D.; ROSENKRANZ, S. (2011). Disruption of platelet-derived growth factor-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C γ 1 activity abolishes vascular smooth muscle cell proliferation and migration and attenuates neointima formation in vivo. **Journal of the American College of Cardiology** 57(25): 2527-2538.
- CAVAZZINI, D.; MESCHI, F.; CORSINI, R.; BOLCHI, A.; ROSSI, G. L.; EINSLE, O.; OTTONELLO, S. (2013). Autoproteolytic activation of a symbiosis-regulated truffle phospholipase A $_2$. **Journal of Biological Chemistry** 288(3): 1533-1547.
- CHEN, K.; KAO, P.; LIN, S.; CHANG, L. (2007). The mechanism of cytotoxicity by *Naja naja atra* cardiotoxin 3 is physically distant from its membrane-damaging effect. **Toxicon** 50(6): 816-824.
- CHIOATO, L.; ARAGÃO, E. A.; FERREIRA, T. L.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H.; WARD, R. J. (2007). Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A $_2$ by scanning alanine mutagenesis. **Biochimica et Biophysica Acta** 1768(5): 1247-1257.
- CHIOATO, L.; OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SÁ, J. M.; WARD, R. J. (2002). Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys⁴⁹-phospholipase A $_2$. **Biochemical Journal** 366(3): 971-976.
- CHIOU Y.; LIN, S.; CHANG, L. (2010). Lipid domain formation modulates activities of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon** 56(8): 1362-1371.
- CHOI, I.; SUN-KIM.; KIM, Y.; KO, H.; IM, S.; KIM, J.; YOU, H.; LEE, Y.; LEE, J.; PARK, Y.; LEE, H. (2005). TNF- α induces the late-phase airway hyperresponsiveness and airway inflammation through cytosolic phospholipase A $_2$ activation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 116(3): 537-543.
- CHRISTERSON, U.; KEITA, A. V.; SÖDERHOLM, J. D.; GUSTAFSON-SVÄRD, C. (2009). Potential role of protease-activated receptor-2-stimulated activation of cytosolic phospholipase A2 in intestinal myofibroblast proliferation: Implications for stricture formation in Crohn's disease. **Journal of Crohn's and Colitis** 3(1): 15-24.
- CHUMAN, Y.; NOBUHISA, I.; OGAWA, T.; DESHIMARU, M.; CHIJIWA, T.; TAN, N.; FUKUMAKI, Y.; SHIMOHIGASHI, Y.; DUCANCEL, F.; BOULAIN, J.; MÉNEZ, A.; OHNO, M. (2000). Regional and accelerated molecular evolution in group I snake venom gland phospholipase A2 isozymes. **Toxicon** 38(3): 449-462.
- CINTRA-FRANCISCHIELLI, M.; CACCIN, P.; CHIAVEGATO, A.; PIZZO, P.; CARMIGNOTO, G.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C. (2010a). Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **PNAS** 107(32): 14140-14145.
- CINTRA-FRANCISCHIELLI, M.; PIZZO, P.; ÂNGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C.; LOMONTE, B. (2010b). The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca²⁺ influx in C2C12 myotubes. **Toxicon** 55(2-3): 590-596.
- CONLON, J. M.; ATTOUB, S.; ARAFAT, H.; MECHKARSKA, M.; CASEWELL, N. R.; HARRISON, R. A.; CALVETE, J. J. (2013). Cytotoxic activities of [Ser⁴⁹]phospholipase A $_2$ from the venom of the saw-scaled vipers *Echis ocellatus*, *Echis pyramidum leakeyi*, *Echis carinatus sochureki*, and *Echis coloratus*. **Toxicon** 71: 96-104.

ČOPIČ, A.; VUČEMILO, N.; GUBENŠEKAND, F.; KRÍŽAJ, I. (1999). Identification and purification of a novel receptor for secretory phospholipase A₂ in porcine cerebral cortex. **Journal of Biological Chemistry** 274(37): 26315-26320.

CORRÊA, L. C.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CINTRA, A. C. O.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. (2008). Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity: Insights into Ca²⁺-independent catalytic mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta** 1784(4): 591-599.

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

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

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

DECOSTER, M. A. (2003). Group III secreted phospholipase A₂ causes apoptosis in rat primary cortical neuronal cultures. **Brain Research** 988 (1-2):20-28.

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

DELATORRE, P., ROCHA, B.A., SANTI-GADELHA, T., GADELHA, C.A., TOYAMA, M.H., CAVADA, B.S. (2011). Crystal structure of Bn IV in complex with myristic acid: a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. **Biochimie** 93(3): 513-518.

DETOPOULOU, P.; NOMIKOSA, T.; FRAGOPOULOU, E.; STAMATAKIS, G.; PANAGIOTAKOSA, D. B.; ANTONOPOULOU, S. (2012). PAF and its metabolic enzymes in healthy volunteers: Interrelations and correlations with basic characteristics. **Prostaglandins & other Lipid Mediators** 97(1-2): 43-49.

DIAZ, B. L.; SATAKE, Y.; KIKAWADA, E.; BALESTRIERI, B.; ARM, J. P. (2006). Group V secretory phospholipase A₂ amplifies the induction of cyclooxygenase 2 and delayed prostaglandin D2 generation in mouse bone marrow culture-derived mast cells in a strain-dependent manner. **Biochimica et Biophysica Acta** 1761(12): 1489–1497.

DÍAZ-OREIRO, C.; GUTIÉRREZ, J. M. (1997). Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: Effects on enzymatic and pharmacological properties. **Toxicon** 35(2): 241-252.

DIEZ, G. R.; CAMPOS, S. S.; GIUSTO, N.M.; SALVADOR, G.A. (2013). Specific roles for Group V secretory PLA₂ in retinal iron-induced oxidative stress. Implications for age-related macular degeneration. **Experimental Eye Research** 113: 172-181.

DIVCHEV, D.; SCHIEFFER, B. (2008). The secretory phospholipase A₂ group IIA: a missing link between inflammation, activated renin-angiotensin system, and atherogenesis? **Vascular Health and Risk Management** 4(3): 597-604.

DORANDEU, F.; HESTERS, R.; GIRARD, F.; FOUR, E.; FOQUIN, F.; BON, C.; LALLEMENT, G.; FAURE, G. (2002). Inhibition of crotoxin phospholipase A₂ activity by manoalide associated with inactivation of crotoxin toxicity and dissociation of the heterodimeric neurotoxic complex. **Biochemical Pharmacology** 63(4): 755-761.

DUNCAN, R. E.; SARKADI-NAGY, E.; JAWORSKI, K.; AHMADIAN, M.; SUL, H. S. (2008). Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A₂ (AdPLA). **Journal of Biological Chemistry** 283(37): 25428-25436.

DUNLOP, M.; CLARK, S. (1995). Glucose-induced phosphorylation and activation of a high molecular weight cytosolic phospholipase A₂ in neonatal rat pancreatic islets. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 27(11): 1191-1199.

EDWARDS, S. H.; THOMPSON, D.; BAKER, S. F.; WOOD, S. P.; WILTON, D. C. (2002). The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A₂ at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. **Biochemistry** 41(52): 15468-15476.

EMSLEY P, LOHKAMP B, SCOTT W, COWTAN K. (2010). Features and Development of Coot. **Acta Crystallographica Section D** 66(4): 486-501.

FERGUSON A. D.; KÖDDING J.; WALKER G.; BÖS C.; COULTON J.W.; DIEDERICHS K.; BRAUN V.; WELTE, W. (2001). Active transport of an antibiotic rifamycin derivative by the outer-membrane protein FhuA. **Structure** 9(8): 707-716.

FERGUSON, J. F.; HINKLE, C. C.; MEHTA, N. N.; BAGHERI, R.; DEROHANNESSIAN, S. L.; SHAH, R.; MUCKSAVAGE, M. I.; BRADFIELD, J. P.; HAKONARSON, H.; WANG, X.; MASTER, S. R.; RADER, S. J.; LI, M.; REILLY, M. P. (2012). Translational Studies of Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ in Inflammation and Atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology** 59(8): 764-772.

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

FERREIRA, T. L.; RULLER, R.; CHIOATO, L.; WARD, R. J. (2008). Insights on calcium-independent phospholipid membrane damage by Lys49-PLA₂ using tryptophan scanning mutagenesis of bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie** 90(9): 1397-1406.

FIGUEIREDO, M. B.; GENTA, F. A.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. (2008). Lipid mediators and vector infection: *Trypanosoma rangeli* inhibits *Rhodnius prolixus* hemocyte phagocytosis by modulation of phospholipase A₂ and PAF-acetylhydrolase activities. **Journal of Insect Physiology** 54(12): 1528-1537.

FONSECA-MALDONADO, R.; FERREIRA, T. L.; WARD, R. J. (2012). The bactericidal effect of human secreted group IID phospholipase A₂ results from both hydrolytic and non-hydrolytic activities. **Biochimie** 94(6):1437-1440.

FUJIMI, T.; TSUCHIYA, T.; TAMIYA, T. (2002). A comparative analysis of invaded sequence from group IA phospholipase A₂ genes provides evidence about the divergence period of genes groups and snake families. **Toxicon** 40(7): 873-884.

FUJISAWA, D.; YAMAZAKI, Y.; LOMONTE, B.; MORITA, T. (2008). Catalytically inactive phospholipase A₂ homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via a C-terminal loop region. **Biochemical Journal** 411(3): 515-522.

FULY, A. L.; SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; GUIMARÃES, J. A. (2004). Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie** 86(9-10): 731-739.

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

GABB, H. A.; JACKSON, R. M.; STERNBERG, M. J. E. (1997). Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. **Journal of Molecular Biology** 272(1): 106-120.

GALLACCI, M.; CAVALCANTE, W. L. G. (2010). Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologues. **Toxicon** 55(1): 1-11.

GALLACCI, M.; OLIVEIRA, M.; PAI-SILVA, M. D.; CAVALCANTE, W. L. G.; SPENCER, P. J. (2006). Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. **Experimental and Toxicologic Pathology** 57(3): 239-245.

GAO, R.; KINI, R. M.; LI, G.; LUO, R.; SELVANAYAGAM, Z. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. (2001). Purification and properties of three new phospholipase A₂ isoenzymes from *Micropechis ikaheka* venom. **Biochimica et Biophysica Acta** 1545(1-2): 30-40.

GELB, M. H.; VALENTIN, E.; GHOMASHCHI, F.; LAZDUNSKI, M.; LAMBEAU, G. (2000). Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A₂. **Journal of Biologic Chemistry** 275(51): 39823-39826.

GIBBONS, E.; PICKETT, K. R.; STREETER, M. C.; WARCUP, A. O.; NELSON, J.; JUDD, A. M.; BELL, J. D. (2013). Molecular details of membrane fluidity changes during apoptosis and relationship to phospholipase A₂ activity. **Biochimica et Biophysica Acta** 1828(2): 887-895.

GIOTTO, M. T. S.; GARRATT, R. C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y. P.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; AZEVEDO JR, W. F.; ARNI, R. K.; WARD, R. J. (1998). Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics** 30(4): 442-454.

GRÜNEWALD, F. S.; PROTA, A. E.; GIESE, A.; BALLMER-HOFER, K. (2010). Structure-function analysis of VEGFR receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. **Biochimica et Biophysica Acta** 1804(3): 567-580.

GU, L., ZHANG, H., SONG, S., ZHOU, Y., LIN, Z. (2002). Structure of an acidic phospholipase A₂ from the venom of *Deinagkistrodon acutus*. **Acta Crystallographica Section D** 58(1): 104-110.

GUPTA, R.; SRIVASTAVA, S. (2014). Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. **Food Microbiology** 42: 1-7.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. (1984). Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon** 22(1): 115-128.

HARIPRASAD, G.; KUMAR, M.; SRINIVASAN, A.; KAUR, P.; SINGH, T. P.; JITHESH, O. (2011). Structural analysis of a group III Glu62-phospholipase A₂ from the scorpion, *Mesobuthus tamulus*: Targeting and reversible inhibition by native peptides. **International Journal of Biological Macromolecules** 48(3): 423-431.

HASTINGS, A. D.; HERBERT, S. P.; GAWLER, D.; WALKER, J. H. (2009). Association with actin mediates the EGTA-resistant binding of cytosolic phospholipase A₂-α to the plasma membrane of activated platelets. **Cell Biology International** 33(1): 83-91.

HERNÁNDEZ, M.; BAYÓN, Y.; CRESPO, M. S.; NIETO, M. L. (1999) Signaling mechanisms involved in the activation of arachidonic acid metabolism in human astrocytoma cells by tumor necrosis factor-α: phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ and transactivation of cyclooxygenase-2. **Journal of Neurochemistry** 73(4):1641-1649.

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

HOOKS, S. B.; CUMMINGS, B. S. (2008). Role of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in cell growth and signaling. **Biochemical Pharmacology** 76(9): 1059-1067.

Hu, J.; TIAN, G.; ZHANG, N. (2011). Cytosolic Phospholipase A₂ and Its Role in Cancer. **Clinical Oncology Cancer Research** 8(2): 71-76.

HUNG, J.; HSU, Y.; NI, W.; TSAI, Y.; YANG, C.; KUO, P.; HUANG, M. (2010). Oxidative and endoplasmic reticulum stress signaling are involved in dehydrocostuslactone-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. **Lung Cancer** 68(3): 355-365.

ICHINOHE, M.; NAKAMURA, Y.; SAI, K.; NAKAHARA, M.; YAMAGUCHI, H.; FUKAMI, K. (2007). Lack of phospholipase C-δ1 induces skin inflammation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 356(4): 912-918

JAN, V. M.; GUILLEMIN, I.; ROBBE-VINCENT, A.; CHOUMET, V. (2007). Phospholipase A₂ diversity and polymorphism in European viper venoms: Paradoxical molecular evolution in Viperinae. **Toxicon** 50(8): 1140-1161.

JINSI, A.; PARADISE, J.; DETH, R. C. (1996). A tyrosine kinase regulates α-adrenoceptor-stimulated contraction and phospholipase D activation in the rat aorta. **European Journal of Pharmacology** 302(1-3): 183-190.

- KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; SILVA, H. J. (2008). The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PloS Medicine** 5(11): 1591-1604.
- KHAN, S.; GOR, J.; MULLOY, B.; PERKINS, S. J. (2010). Semi-Rigid solution structures of heparin by constrained X-ray scattering modelling: New insight into heparin-protein complexes. **Journal of Molecular Biology** 395(3): 504-521.
- KIM, H. J.; KIM, K. S.; KIM, S. H.; BAEK, S.; KIM, H. Y.; LEE, C.; KIM, J. (2009). Induction of Cellular Senescence by Secretory Phospholipase A₂ in Human Dermal Fibroblasts through an ROS-Mediated p53 Pathway. **J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.** 64A(3): 351-362.
- KINI, R. M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon** 42(8): 827-840.
- KÖHLER, G. A.; BRENOT, A.; HAAS-STAPLETON, E.; AGABIAN, N.; DEVA, R.; NIGAM, S. (2006). Phospholipase A₂ and Phospholipase B Activities in Fungi. **Biochimica et Biophysica Acta** 1761(11): 1391-1399.
- KOLKO, M.; KIILGAARD, J.F.; WANG, J.; POULSEN, K.A.; ANDREASEN, J.R.; COUR, M.; NISSEN, M.H.; HEEGAARD, S.; BAZAN, N.G.; PRAUSE, J.U. (2009). Calcium-independent phospholipase A₂ regulates retinal pigment epithelium proliferation and may be important in the pathogenesis of retinal diseases. **Experimental Eye Research** 89(3): 383-391.
- KOROTAEVA, A.; SAMOILOVA, H.; PAVLUNINA, T.; PANASENKOB, O. M. (2013). Halogenated phospholipids regulate secretory phospholipase A₂ group IIA activity. **Chemistry and Physics of Lipids** 167-168: 51-56.
- KÖTTER, K.; KLEIN, J. (1999). Adrenergic modulation of astroglial phospholipase D activity and cell proliferation. **Brain Research** 830(1): 138-145.
- LÄHDESMÄKI, K.; ÖÖRNI, K.; ALANNE-KINNUNEN, M.; JAUHIAINEN, M.; HURT-CAMEJO, E.; KOVANEN, P. T. (2012). Acidity and lipolysis by group V secreted phospholipase A₂ strongly increase the binding of apoB-100-containing lipoproteins to human aortic proteoglycans. **Biochimica et Biophysica Acta** 1821(2): 257-267.
- LAMBEAU, G.; SCHMID-ALLIANA, A.; LAZDUNSKI, M.; BARHANIN, J. (1990). Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A₂ in skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry** 265(16): 9526-9532.
- LANKISCH, T. O.; NOZU, F.; OWYANG, C.; TSUNODA, T. (1999). High-affinity cholecystinin type A receptor/cytosolic phospholipase A₂ pathways mediate Ca²⁺ oscillations via a positive feedback regulation by calmodulin kinase in pancreatic acini. **European Journal of cell biology** 78(9): 632-41.
- LEE, H. Y.; KIM, M.; PARK, K. S.; SHIN, E. H.; BAE, Y. (2005). Group IB secretory phospholipase A₂ stimulates leukotriene B₄ production by a unique mechanism in human neutrophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 334(2): 500-508.

LEE, T.; HENG, C.; SEPAROVIC, F.; AGUILAR, M. (2014). Comparison of reversible membrane destabilisation induced by antimicrobial peptides derived from Australian frogs. **Biochimica et Biophysica Acta** 1838(9): 2205-2215.

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

LEITE, R. S.; PINHEIRO, G. H. D.; FERNANDES, M. N.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. (2006). The effect of the myotoxic Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom on Na⁺/K⁺-ATPase activity of toad bladders. **Toxicology in Vitro** 20(8): 1478-1480.

LEPPÄNEN, V.; PROTA, A. E.; JELTSCH, M.; ANISIMOV, A.; KALKKINEN, N.; STRADIN, T.; LANKINEN, H.; GOLDMAN, A.; BALLMER-HOFER, K.; ALITALO, K. (2010). Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. **PNAS** 107(6): 2425-2430.

LI, Y.; YU, B.; ZHU, H.; JAIN, M. K.; TSAI, M. (1994). Phospholipase A₂ engineering. structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. **Biochemistry** 33(49): 14714-14722.

LIO, Y.; DENNIS, E. A. (1998). Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of Group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂. **Biochimica et Biophysica Acta** 1392(2-3): 320-332.

LIU C.; KUO, P.; CHEN, J.; CHEN, S.; CHANG, C.; TSENG, C.; TZENG, M.; LO, T. (1992). Primary Structure of an Inactive Mutant of Phospholipase A₂ in the Venom of *Bungarus fasciatus* (Banded krait). **Journal of Biochemistry** 112(5): 707-713.

LIU, C.; CHEN, J.; CHANG, C.; CHEN, S., TENG, C.; TSAI, I. (1991). The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A₂ homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1077(3): 362-370.

LIU, Q., HUANG, Q.Q., TENG, M.K., WEEKS, C.M., JELSCH, C., ZHANG, R.G., NIU, L.W. (2003). The crystal structure of a novel, inactive, lysine 49 PLA₂ from *Agkistrodon acutus* venom: an ultrahigh resolution, AB initio structure determination. *Journal of Biological Chemistry* 278(42): 41400-41408.

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

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. (1989). A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon** 27(7): 725-733.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MACCARANA, M. (1994a). Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom: Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **Journal of Biological Chemistry** 269(47): 29867-29873.

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

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; BAGGE, U.; HANSON, L. Å. (1994b). Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparin sulfate family. **Biochemical Pharmacology** 47(9): 1509-1518.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. (1994). Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon** 32(11): 1359-1369.

MACHIAH, D. K.; GOWDA, T. V. (2006). Purification of a post-synaptic neurotoxic phospholipase A₂ from *Naja naja* venom and its inhibition by a glycoprotein from *Withania somnifera*. **Biochimie** 88(6): 701-710.

MACKENZIE, L. S.; LYMN, J. S.; HUGHES, A. D. (2013). Linking phospholipase C isoforms with differentiation function in human vascular smooth muscle cells. **Biochimica et Biophysica Acta** 1833(12): 3006–3012.

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

MAGRO, A.J., TAKEDA, A.A., SOARES, A.M., FONTES, M.R. (2005). Structure of BthA-I complexed with p-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. **Acta Crystallographica Section D** 61(12): 1670-1677.

MAHMUT, A.; BOULANGER, M.; HUSSEINI, D. E.; FOURNIER, D.; BOUCHAREB, R.; DESPRÉS, J.; PIBAROT, P.; BOSSÉ, Y.; MATHIEU, P. (2014). Elevated expression of lipoprotein-associated phospholipase A₂ in calcific aortic valve disease implications for valve mineralization. **Journal of the American College of Cardiology** 63(5): 460-469.

MALAVIYA, R.; ANSELL, J.; HALL, L.; FAHMY, M.; ARGENTIERI, R. L.; OLINI JR, G. C.; PEREIRA, D. W.; SUR, R.; CAVENDER, D. (2006). Targeting cytosolic phospholipase A₂ by arachidonyl trifluoromethyl ketone prevents chronic inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology** 539(3): 195-204.

MANSFELD, J. (2009). Plant phospholipases A₂: perspectives on biotechnological applications. **Biotechnology Letters** 31(9): 1373-1380.

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

MARCHI, B.; BURLANDO, B.; MOOREC, M.N.; VIARENGO, A. (2004). Mercury- and copper-induced lysosomal membrane destabilization depends on [Ca²⁺]_i dependent phospholipase A₂ activation. **Aquatic Toxicology** 66(2): 197-204.

MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; SANTOS-FILHO, N. A.; MENALDO, D. L.; PEREIRA, L. L. S.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; SILVA, S. L.; ANTUNES, L. M. G.;

SOARES, A. M. (2013). Genotoxic effect of *Bothrops* snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon** 65: 9-14.

MARIA, L.; VIND, J.; OXENBØLL, K. M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. (2007). Phospholipases and their industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** 74(2): 290–300.

MCINTOSH, J. M.; GHOMASHCHI, F.; GELB, M. H.; DOOLEY, D. J.; STOEHR, S.; GIORDANI, A. B.; NAISBITT, S. R.; OLIVEIRA, B. M. (1995). Conodipine-M, a Novel Phospholipase A₂ Isolated from the Venom of the Marine Snail *Conus magus*. **Journal of Biological Chemistry** 270(8): 3518-3526.

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

MELO, P. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SUAREZ-KURTZ, G. (1993). Antagonismo f the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothroptoxin by polyanions. **Toxicon** 31(3): 285-291.

MENSCHIKOWSKI, M.; HAGELGANS, A.; HEMPEL, U.; LATTKE, P.; ISMAILOV, I.; SIEGERT, G. (2008). On interaction of activated protein C with human aortic smooth muscle cells attenuating the secretory group IIA phospholipase A₂ expression. **Thrombosis Research** 122(1): 69–76.

MITSUISHI, M.; MASUDA, S.; KUDO, I.; MURAKAMI, M. (2007). Human group III phospholipase A₂ suppresses adenovirus infection into host cells. Evidence that group III, V and X phospholipase A₂s act on distinct cellular phospholipid molecular species. **Biochimica et Biophysica Acta** 1771(11): 1389–1396.

MIURA, K.; HUBBARD, W. C.; MACGLASHAN JR, D. W. (1998). Phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ by IL-3 is associated with increased free arachidonic acid generation and leukotriene C₄ release in human basophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 102(3): 512-520.

MORA, R.; MALDONADO, A.; VALVERDE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. (2006). Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologue on a lymphoblastoid cell line. **Toxicon** 47(1): 75-86.

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

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

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

MURAKAMI, M. T.; ARRUDA, E. Z.; MELO, P. A.; MARTINEZ, A. B.; CALIL-ELIÁS, S.; TOMAZ, M. A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; ARNI, R. K. (2005). Inhibition of

Myotoxic Activity of *Bothrops asper* Myotoxin II by the Anti-trypanosomal Drug Suramin. **J. Mol. Biol.** 350: 416–426.

MURAKAMI, M. T.; KUCH, U.; BETZEL, C.; MEBS, D.; ARNI, R. (2008). Crystal structure of a novel myotoxic Arg49 phospholipase A₂ homolog (zhaoermiatoxin) from *Zhaoermia mangshanensis* snake venom: Insights into Arg49 coordination and the role of Lys122 in the polarization of the C-terminus. **Toxicon** 51(5): 723-735.

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

MURAKAMI, M.T., MELO, C.C., ANGULO, Y., LOMONTE, B., ARNI, R.K. (2006). Structure of myotoxin II, a catalytically inactive Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Atropoides nummifer* venom. **Acta Crystallographica Section F** 62(5): 423-426.

NAHED, R. A.; ESCOFFIER, J.; REVEL, C.; JEAMMET, L.; PAYRÉ, C.; RAY, P. F.; HENNEBICQ, S.; LAMBEAU, G.; ARNOULT, C. (2014). The effect of group X secreted phospholipase A₂ on fertilization outcome is specific and not mimicked by other secreted phospholipases A₂ or progesterone. **Biochimie** 99:88-95.

NETO, H. C. C. F.; STAFFORINI, D. M.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. (2005). Regulating inflammation through the anti-inflammatory enzyme platelet-activating factor-acetylhydrolase. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 100(1): 83-91.

NEVALAINEN, T. J.; MORGADO, I.; CARDOSO, J. C. R. (2013). Identification of novel phospholipase A₂ group IX members in metazoans. **Biochimie** 95(8): 1534-1543.

NICOTERA P.; ROSSI, A. D. (1994). Nuclear Ca²⁺: physiological regulation and role in apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry** 135(1): 89-98.

NOMIKOS, M.; YU, Y.; ELGMATI, K.; THEODORIDOU, M.; CAMPBELL, K.; VASSILAKOPOULOU, V.; ZIKOS, C.; LIVANIOU, E.; AMSO, N.; NOUNESIS, G.; SWANN, K.; LAI, F. A. (2013). Phospholipase Cζ rescues failed oocyte activation in a prototypic of male factor infertility. **Fertility and Sterility** 99(1): 76-85.

NOMURA, R.; YANAGIHARA, M.; SATO, H.; MATSUMOTO, K.; TASHIMA, K.; HORIE, S.; CHEN, S.; FUJINO, H.; UENO, K.; MURAYAMA, T. (2013). Bee venom phospholipase A₂-induced phasic contractions in mouse rectum: Independent roles of eicosanoid and gap junction proteins and their loss in experimental colitis. **European journal of Pharmacology** 718(1-3): 314-322.

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

NÚÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. (2004). Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Toxicon** 44(1): 91-101.

- OGAWA, T.; KITAJIMA, M.; NAKASHIMA, K.; SAKAKI, Y.; OHNO, M. (1995). Molecular Evolution of Group II Phospholipases A₂. **Journal of Molecular Evolution** 41(6):867-877.
- OGUIURA, N.; CAMARGO, M.E.; SILVA, A.R.P.; HORTONA, D.S.P.Q. (2000). Quantification of crotamine, a small basic myotoxin, in South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by enzyme-linked immunosorbent assay with parallel-lines analysis. **Toxicon** 38(3): 443-448.
- OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. (2003). Molecular evolution of myotoxic phospholipases A₂ from snake venom. **Toxicon** 42(8): 841-854.
- OLIVEIRA, A. H. C.; FERREIRA, T. L.; WARD, R. J. (2009). Reduced pH induces an inactive non-native conformation of the monomeric bothropstoxin-I (Lys49-PLA₂). **Toxicon** 54(3): 373-378.
- OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. M. (2009). Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom. **Toxicon** 53(5): 560-569.
- OLSON, E. D.; NELSON, J.; GRIFFITH, K.; NGUYEN, T.; STREETER, M.; WILSON-ASHWORTH, H.; GELB, M.; JUDD, A. M.; BELL, J. D. (2010). Kinetic Evaluation of Cell Membrane Hydrolysis during Apoptosis by Human Isoforms of Secretory Phospholipase A₂. **The Journal of Biological Chemistry** 285(14): 10993–11002.
- OWNBY, C. L.; ARAUJO, H. S. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. (1999). Lysine 49 phospholipase A₂ protein. **Toxicon** 37(3): 411-445.
- PÁ RAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. (1998). Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom – Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **European Journal of Biochemistry** 253(2): 452-461.
- PAN, Y. H.; EPSTEIN, T. M.; JAIN, M. K.; BAHNSON, B. J. (2001). Five coplanar anion binding sites on one face of phospholipase A₂: relationship to interface binding. **Biochemistry** 40(3): 609-617.
- PAPAREDDY, P.; KALLE, M.; SINGH, S.; MÖRGELIN, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. (2014). An antimicrobial helix A-derived peptide of heparin cofactor II blocks endotoxin responses *in vivo*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1838(5): 1225-1234.
- PATRÃO-NETO, F. C.; TOMAZ, M. A.; STRAUCH, M. A.; MONTEIRO-MACHADO, M.; ROCHA-JUNIOR, J. R. S.; BORGES, P. A.; CALIL-ELIAS, S.; MELO, P. A. (2013). Dexamethasone antagonizes the *in vivo* myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. **Toxicon** 69: 55-64.
- PERCHUC, A. M.; MENIN, L.; FAVREAU, P.; BÜHLER, B.; BULET, P.; SCHÖNI, R.; WILMER, M.; ERNST, B.; STÖCKLIN, R. (2010). Isolation and characterization of two new Lys49 PLA₂s with heparin neutralizing properties from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon** 55(6): 1080-1092.

PHILLIPPE M.; SWEET, L. M.; ENGLE D. (2007). The role of phospholipase C γ 1 tyrosine phosphorylation during phasic myometrial contractions. **American Journal of Obstetrics & Gynecology** 196(2): 179.e1-179.e7.

PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; STAFFORINI, D. M.; MCINTYRE, T. M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annual Review of Biochemistry** 69: 419-445

PRIJATELJ, P.; CHARNAY, M.; IVANOVSKI, G.; JENKO, Z.; PUNGERČAR, J.; KRIŽAJ, I.; FAURE, G. (2006a). The C-terminal and beta-wing regions of ammodytoxin A, a neurotoxic phospholipase A₂ from *Vipera ammodytes ammodytes*, are critical for binding to factor Xa and for anticoagulant effect. **Biochimie** 88(1): 69-76.

PRIJATELJ, P.; VARDJAN, N.; ROWAN, E. G.; KRIŽAJ, I.; PUNGERČAR, J. (2006b). Binding to the high-affinity M-type receptor for secreted phospholipases A₂ is not obligatory for the presynaptic neurotoxicity of ammodytoxin A. **Biochimie** 88(10): 1425-1433.

QUACH, N. D.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. (2014). Secretory phospholipase A₂ enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.05.022

RANDAZZO-MOURA, P.; PONCE-SOTO, L. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. (2008). Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A₂ homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Protein Journal** 27(6): 355-362.

REN, G.; TAKANO, T.; PAPILLON, J.; CYBULSKY, A. V. (2010). Cytosolic phospholipase A₂- α enhances induction of endoplasmic reticulum stress. **Biochimica et Biophysica Acta** 1803(4): 468-481.

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

RITCHIE, D. (2008). Recent progress and future directions in protein-protein docking. **Current Protein and Peptide Science** 9(1): 1-15.

ROJAS, E.; SARAVIA, P.; ANGULO, Y.; ARCE, V.; LOMONTE, B. CHÁVEZ, J. J.; VELÁSQUEZ, R.; THELESTAM, M.; GUTIÉRREZ, J. M. (2001). Venom of the crotaline snake *Atropoides nummifer* (jumping viper) from Guatemala and Honduras: comparative toxicological characterization, isolation of a myotoxic phospholipase A₂ homologue and neutralization by two antivenoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 129(2): 151-162.

ROSA, A. O.; RAPOPORT, S. I. (2009). Intracellular- and extracellular-derived Ca²⁺ influence phospholipase A₂-mediated fatty acid release from brain phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta** 1791(8): 697-705.

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

ROSKOSKI JR, R. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 62(3): 179-213.

ROUAULT, M.; BOLLINGER, J. G.; LAZDUNSKI, M.; GELB, M. H.; LAMBEAU, G. (2003). Novel mammalian group XII secreted phospholipase A₂ lacking enzymatic activity. **Biochemistry** 42(39): 11494-11503.

RUCH, C.; SKINIOTIS, G.; STEINMETZ, M. O.; WALZ, T.; BALLMER-HOFER, K. (2007). Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. **Nature Structural & Molecular Biology** 14(3): 249-250.

RULLER, R.; ARAGÃO, E. A.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T. L.; OLIVEIRA, A. H. C.; SÀ, J. M.; WARD, R. J. (2005). A predominant role for hydrogen bonding in the stability of the homodimer of bothropstoxin-I, A lysine 49-phospholipase A₂. **Biochimie** 87(11): 993-1003.

RULLER, R.; FERREIRA, T. L.; OLIVEIRA, A. H. C.; WARD, R. J. (2003). Chemical denaturation of a homodimeric lysine-49 phospholipase A₂: a stable dimer interface and a native monomeric intermediate. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 411(1): 112-120.

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

SALVADOR, G.H., CAVALCANTE, W.L., DOS SANTOS, J.I., GALLACCI, M., SOARES, A.M., FONTES, M.R. (2013). Structural and functional studies with mytoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like. **Toxicon** 72: 52-63.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; BOW, H.; PUSPHARAJ, P. N.; CHOW, V. T. K. (2010). Identification and characterization of a phospholipase A₂ from the venom of the Saw-scaled viper: Novel bactericidal and membrane damaging activities. **Biochimie** 92(12): 1854-1866.

SANTOS, J. I.; CARDOSO, F. F.; SOARES, A. M.; SILVA, M. P.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. (2011b). Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: New insights into Lys49-PLA₂ inhibition. **PLoS One** 6(12): e28521.

SANTOS, J. I.; CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; BORGES, R. J.; FERNANDES, C. A. H.; PIZZO, P.; CINTRA, A. C. O.; BRAZ, A. S. K.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. (2011a). Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. **Proteins** 79(1): 61-78.

SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. (2009). Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **Journal of Structural Biology** 167(2): 106-116.

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.N.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. (2008). A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon** 52(8): 908-917.

- 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.; MAMEDED, C. C. N.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. (2008). A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon** 52(8): 908-917.
- SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. (2006). The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta** 1761(11): 1246–1259.
- SCHLEICHER, S. M.; MORETTI, L.; VARKI, V.; LU, B. (2010). Progress in the unraveling of the endoplasmic reticulum stress/autophagy pathway and cancer: Implications for future therapeutic approaches. **Drug Resistance Updates** 13(3): 79-86.
- SCOTT, D. L.; ACHARI, A.; VIDAL, J. C.; SIGLER, P. B. (1992). Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistridon piscivorus piscivorus*. **Journal of Biological Chemistry** 267(31): 22645-22657.
- SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.; SIGLER, P. B. (1990). Interfacial Catalysis: The Mechanism of Phospholipase A₂. **Science** 250(4987): 1541-1546.
- SEASHOLS, S. J.; OLIVARES, A. C.; GIL, G.; BARBOUR, S. E. (2004). Regulation of group VIA phospholipase A₂ expression by sterol availability. **Biochimica et Biophysica Acta** 1684(1-3): 29-37.
- SEDÓ, C. A.; DUBARRÁN, R. R.; GIL, M. V.; URIONDO, H.; PAPIER, S.; NODAR, F. (2011). Reduced amounts of phospholipase c zeta (PLC zeta) in patients with repeated low fertilization rate. **Fertility and Sterility** 96(3): S158.
- SEO, H.; JANG, B.; JUNG, Y.; LEE, E.; KIM, H.; JEON, J.; KIM, J.; LEE, I.; KIM, M.; PARK, K. (2014). Phospholipase D1 decreases type I collagen levels in hepatic stellate cells via induction of autophagy. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 449(1): 38-43.
- SHAYMAN, J. A.; KELLY, R.; KOLLMEYER, J.; HE, Y.; ABE, A. (2011). Group XV phospholipase A₂, a lysosomal phospholipase A₂. **Progress in Lipid Research** 50(1): 1-13.
- SIEBER, M.; BOSCH, B.; HANKE, W.; LIMA, V. M. L. (2014). Membrane-modifying properties of crotamine, a small peptide-toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta** 1840(3): 945-950.
- SIM, S.; CHOI, J.; MIN, D. S.; RHIE, D.; YOON, S. H.; HAHN, S. J.; KIM, C.; KIM, M.; JO, Y. (2001). The involvement of phospholipase A in ethanol-induced gastric 2 muscle contraction. **European Journal of Pharmacology** 413(2-3): 281-285.
- SIX, D. A.; DENNIS, E. A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta** 1488(1-2): 1-19.
- STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. (2006). *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** 142(3-4): 371–381.

SUGIYAMA, M.; OHTANI, K.; IZUHARA, M.; KOIKE, T.; SUZUKI, K.; IMAMURA, S.; MISAKI, H. (2002). A novel prokaryotic phospholipase A₂: characterization, gene cloning, and solution structure. **Journal of Biological Chemistry** 277(22): 20051-20058.

TESSLER, S.; ROCKWELL, P.; KICKLIN, D.; COHEN, T.; LEVI, B.; WITTE, L.; LEMISCHKA, I. R.; NEUFELD, G. (1994). Heparin modulates the interaction of VEGF₁₆₅ with soluble and cell associated *flk-1* receptors. **Journal of Biological Chemistry** 269(17): 12456-12461.

THOMAS, S.; SHARMA, N.; GOLDEN, E. B.; CHO, H.; AGARWAL, P.; GAFFNEY, K. J.; PETASIS, N. A.; CHEN, T. C.; HOFMAN, F. M.; LOUIE, S. G.; SCHÖNTHAL, A. H. (2012). Preferential killing of triple-negative breast cancer cells in vitro and in vivo when pharmacological aggravators of endoplasmic reticulum stress are combined with autophagy inhibitors. **Cancer Letters** 325(1): 63-71.

THOMSEN R., CHRISTENSEN, M. H. (2006) MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking. **J Med Chem** 49(11): 3315-3332.

TSAI, S.; CHEN, Y.; CHEN, L.; WANG, Y.; TSAI, I. (2007). Binding of a venom Lys-49 phospholipase A₂ to LPS and suppression of its effects on mouse macrophages. **Toxicon** 50(7): 914-922.

TURCO, E. B. R.; JACKSON, F. R.; DECOSTER, M. A.; KOLKO, M.; BAZAN, N. G. (2002) Glutamate signalling and secretory phospholipase A₂ modulate the release of arachidonic acid from neuronal membranes. **Journal of Neuroscience Research** 68(5): 558-567.

ULLAH, A., SOUZA, T.A., BETZEL, C., MURAKAMI, M.T., ARNI, R.K. (2012). Crystallographic portrayal of different conformational states of a Lys49 phospholipase A₂ homologue: insights into structural determinants for myotoxicity and dimeric configuration. **International Journal of Biological Macromolecules** 51(3): 209-214.

UOZUMI, N.; SHIMIZU, T. (2002). Roles for cytosolic phospholipase A₂ α as revealed by gene-targeted mice. **Prostaglandins & other Lipid Mediators** 68-69: 59-69.

VAN DEN BERGH, C. J.; SLOTBOOM, A. J.; VERHEIJ, H. M.; DE HAAS, G. H. (1988). The role of aspartic acid-49 in the active site of phospholipase A₂: A site-specific mutagenesis study of porcine pancreatic phospholipase A₂ and the rationale of the enzymatic activity of [lysine⁴⁹]phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. **European Journal of Biochemistry** 176(2): 353-357.

VILLALOBOS, J. C.; MORA, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; ANGULO, Y. (2007). Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. **Toxicology in Vitro** 21(8): 1382-1389.

VILLANUEVA, E. B.; LITTLE, J. P.; LAMBEAU, G.; KLEGERIS, A. (2012). Secreted phospholipase A₂ group IIA is a neurotoxin released by stimulated human glial cells. **Molecular and Cellular Neuroscience** 49(4): 430-438.

WANG, J.; SUN, SUN, L.; HU, J.; LI, Y.; ZHANG, G. (2006). Effects of phospholipase A₂ on the lysosomal ion permeability and osmotic sensitivity. **Chemistry and Physics of Lipids** 144(2): 117-126.

- WANG, X.; HUANG, C.; YU, G.; WANG, J.; WANG, R.; LI, Y.; WU, Q. (2013). Expression of group IIA phospholipase A₂ is an independent predictor of favorable outcome for patients with gastric cancer. **Human Pathology** 44(10): 2020–2027.
- WARD, R. J.; ALVES, A. R.; NETO, J. R.; ARNI, R. K.; CASARI, G. (1998). A SequenceSpace analysis of Lys49 phospholipases A₂: clues towards identification of residues involved in a novel mechanism of membrane damage and in myotoxicity. **Protein Engineering** 11(4): 285–294.
- WARD, R. J.; CHIOATO, L.; OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SÁ, J. M. (2002). Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochemical Journal** 362(1): 89–96.
- WATANABE, L.; SOARES, A. M.; WARD, R. J.; FONTES, M. R. M.; ARNI, R. K. (2005). Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. **Biochimie** 87(2): 161–167.
- WEI, J.; WEI, X.; CHEN, Q.; HUANG, T.; QIAO, L.; WANG, W.; XIONG, Y.; HE, S. (2006). N49 phospholipase A₂, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A₂. **Biochimica et Biophysica Acta** 1760(3): 462–471.
- XU, S., GU, L., JIANG, T., ZHOU, Y., LIN, Z. (2003). Structures of cadmium-binding acidic phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 1.9 Å resolution. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 300(2): 271–277.
- YAGAMI, T.; YAMAMOTO, Y.; KOHMA, H.; NAKAMURA, T.; TAKASU, N.; OKAMURA, N. (2013). L-type voltage-dependent calcium channel is involved in the snake venom group IA secretory phospholipase A₂-induced neuronal apoptosis. **NeuroToxicology** 35: 146–153.
- YAMAZAKI, Y.; MATSUNAGA, Y.; NAKANO, Y.; MORITA, T. (2005). Identification of vascular endothelial growth factor receptor-binding protein in the venom of eastern cottonmouth: A new role of snake venom myotoxic lys⁴⁹-phospholipase A₂. **Journal of Biological Chemistry** 280(34): 29989–29992.
- YU, B.; APITZ-CASTRO, R. J.; JAIN, M. K.; BERG, O. G. (2007). Role of 57–72 loop in the allosteric action of bile salts on pancreatic IB phospholipase A₂: Regulation of fat and cholesterol homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta** 1768(10): 2478–2490.
- YU, B.; ROGERS, J.; NICOL, G. R.; THEOPOLD, K. H.; SESHADRI, K.; VISHWESHWARA, S.; JAIN, M. K. (1998). Catalytic significance of the specificity of divalent cations as K_S^* and k_{cat}^* cofactors for secreted phospholipase A₂. **Biochemistry** 37(36): 12576–12587.
- ZÁDORI, Z.; SZELEI, J.; LACOSTE, M.; LI, Y.; GARIÉPY, S.; RAYMOND, P.; ALLAIRE, M.; NABI, I. R.; TIJSSEN, P. (2001). A viral phospholipase A₂ is required for parvovirus infectivity. **Developmental Cell** 1(2): 291–302.

APÊNDICE–A: Análise das sequências de aminoácidos de miotoxinas Lys49 e fosfolipases A₂. Colunas representam cada proteína estudada e linhas representam suas sequências divididas em dezenas e enumeradas a cada vinte resíduos. Resíduos ou segmentos deletados são representados por um hífen. Resíduos não conservados estão destacados em salmão e abaixo das proteínas é mostrado grau de conservação para os resíduos mais frequentes.

