

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE QUÍMICA DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



ANÁLISE ESTRUTURAL DE UM COMPLEXO MIOTOXINA-ANTIMIOTOXINA POR *CROSS-LINKING*, ESPECTROMETRIA DE MASSAS E BIOINFORMÁTICA

BARBARA DA SILVA SOARES

Rio de Janeiro Janeiro de 2018

ANÁLISE ESTRUTURAL DE UM COMPLEXO MIOTOXINA-ANTIMIOTOXINA POR *CROSS-LINKING*, ESPECTROMETRIA DE MASSAS E BIOINFORMÁTICA

BARBARA DA SILVA SOARES

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dra. Ana Gisele C. Neves-Ferreira Dr. Jonas Perales

Rio de Janeiro Janeiro de 2018



ANÁLISE ESTRUTURAL DE UM COMPLEXO MIOTOXINA-ANTIMIOTOXINA POR *CROSS-LINKING*, ESPECTROMETRIA DE MASSAS E BIOINFORMÁTICA

BARBARA DA SILVA SOARES

Orientadores: Dr^a. Ana Gisele C. Neves-Ferreira Dr. Jonas Perales

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada por:

Presidente, Dr^a. Ana Gisele C. Neves-Ferreira

Dr. Jonas Perales

Dr. Fábio Cesar Gozzo

Dr. Marcius Almeida

Dr. Gilberto Barbosa Domont

Rio de Janeiro Janeiro de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Soares, Barbara da Silva
Análise estrutural de um complexo miotoxina
antimiotoxina por cross-linking, espectrometria de
massas e bioinformática / Barbara da Silva Soares.

Rio de Janeiro, 2018.
132 f.

Orientadora: Ana Gisele Costa Neves-Ferreira.
Coorientador: Jonas Perales.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, 2018.
1. Didelphis aurita. 2. DM64. 3. Veneno de
serpentes. 4. Cross-linking. 5. Inibidores. I.
Neves-Ferreira, Ana Gisele Costa, orient. II.

Perales, Jonas, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes em minha vida que, com muito apoio e carinho, permitiram que este sonho se tornasse possível: Minha mãe Elisabete, pelo exemplo de vida; Minha avó Célia, pelo incentivo direto ou indireto; Minha tia Izabela, pelos conselhos e incentivo; Meu marido Elson, por estar sempre ao meu lado nos melhores e piores momentos da minha vida; Meu filhote Miguel, meu melhor presente.

AGRADECIMENTOS

- Quero agradecer primeiramente a minha mãe, Elisabete por todo carinho, apoio e incentivo que sempre me proporcionou e por ter me ajudado a cuidar do meu filho, ficando com ele para que eu pudesse desenvolver minha dissertação. Pelo exemplo de mulher, mãe e amiga, pelos ensinamentos morais que me fizeram ser quem sou hoje e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida. Por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava. Devo tudo a você minha mãe. Obrigada por me fazer chegar onde cheguei. Não tenho palavras para agradecer por tudo que tem feito por mim. Te amo mãe!
- A minha tia e madrinha, Izabela, que muitas vezes foi uma segunda mãe para mim. Por toda a ajuda e ensinamentos que me proporcionou. Por estar sempre presente em todas as vezes que precisei de um auxilio, por ter me proporcionado o prazer da leitura desde que eu era pequenina, por sempre me apoiar nessa caminhada e sempre acreditar que eu podia fazer a diferença. Obrigada pela paciência, pelo incentivo e pelo carinho.
- A minha avó, Célia de Sousa da Silva, por ter me criado e aguentado minhas peripécias quando era criança. Por estar ao meu lado.
- Ao meu eterno e grande amor, Elson, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades. Que ficou ao meu lado durante esses dois anos de mestrado, acreditando que eu podia chegar ao fim e me incentivando sempre a estudar e alcançar meus sonhos. Obrigada por ter entendido todas as vezes que não pude sair porque tinha que estudar ou escrever e pelo filho lindo que me deu. Obrigada por ter me ajudado tanto! Eu te amo e graças a você eu não desisti e consegui chegar aqui e agora sigo rumo ao meu doutorado!
- A meu filho Miguel por ter me ensinado a ser mais forte, a correr atrás de meus sonhos, a ser uma pessoa melhor!
- Aos meus orientadores: Ana Gisele C. Neves-Ferreira e Jonas Perales.
- Ao Dr. Perales, por ter me acolhido e me proporcionado a oportunidade de crescer e me desenvolver como cientista. Por ter me ensinado a como fazer as coisas certas no laboratório e pelo carinho que sempre teve comigo.
- A Dr. Ana Gisele C. Neves-Ferreira, pela compreensão quando engravidei e por ter acreditado que mesmo morando longe e com filho pequeno, eu era capaz de chegar onde cheguei. Obrigada pelas horas corrigindo minha dissertação, pelo carinho e ajuda de sempre. E obrigada por me ensinar a planejar e executar um bom experimento, por me fazer apaixonar ainda mais pela ciência. Sem seus ensinamentos não chegaria onde cheguei.
- A minha amiga querida Flávia, pelas caronas para o CEDERJ, pelas risadas e conversas que fizeram meus sábados muito mais divertidos. Obrigada por ser uma amiga verdadeira e que tanto me inspira.

- A Dra Surza Lúcia, por toda a ajuda na realização dos experimentos, por ter me ensinado a utilizar os equipamentos do laboratório, pelas conversas e conselhos. Obrigada por todo carinho que tens comigo!
- As técnicas do Laboratório de Toxinologia Joelma e Priscila, por toda a ajuda, amizade e carinho que me proporcionaram durante esses anos que fiz parte dessa maravilhosa equipe.
- Ao Dr. Francisco Gomes, pela ajuda com a parte de modelagem molecular, pelos conselhos, ensinamentos e paciência comigo durante essa etapa de minha vida. Sem sua ajuda esta disseração não seria possível.
- As minhas amigas Danielle Bertino Grimaldi e Viviane Tostes, pelos conselhos, conversas, ensinamentos e por fazerem parte de minha família. Obrigada por serem madrinhas tão especiais para meu pequeno Miguel. Vocês são mais do que especiais na minha vida!!
- A minha amiga Viviane Bastos, pela ajuda com experimentos, escrita, montagem de apresentação e tantas outras coisas. Você foi peça fundamental para que esta dissertação acontecesse.
- A todos os membros do laboratório, pela ajuda, ensinamentos e carinho. Amo fazer parte desta equipe
- Aos inúmeros amigos que fiz ao longo do meu mestrado, não só na UFRJ, mas por todo o Brasil que são muito importantes para mim.
- E aos meus gatinhos e cachorrinha, por me fazerem rir quando a tristeza me pegava, por me fazerem relaxar após tantos e tantos estresses. Simplesmente por existirem!
- A CAPES, pelo auxilio financeiro.

RESUMO

Análise estrutural de um complexo miotoxina-antimiotoxina por *cross-linking*, espectrometria de massas e bioinformática

Os venenos de serpentes do gênero Bothrops são conhecidos por induzirem importantes danos teciduais locais, como hemorragia e mionecrose. A glicoproteína DM64 isolada do soro do gambá sul-americano Didelphis aurita interage de forma não covalente com fosfolipases A2 (Lys49 e Asp49) presentes no veneno de Bothrops asper, inibindo seu efeito miotóxico. Esta proteína possui massa molecular de 64 kDa e 5 domínios tipo imunoglobulina (Ig). Este estudo teve como objetivo a caracterização estrutural do complexo inibidor-toxina através da associação das técnicas de cross-linking, espectrometria de massas de alta resolução e modelagem molecular. O complexo formado entre DM64 e a miotoxina II (Lys49) de Bothrops asper foi estabilizado utilizando duas abordagens complementares de cross-linking: 1) o agente homobifuncional BS³ (que reage com Lys, Ser e N-terminal); 2) a estratégia XPlex, nova abordagem de cross-linking direcionada a resíduos ácidos (Glu, Asp e Cterminal). Após a digestão enzimática dos produtos de reação cruzada e sua análise por espectrometria de massas de alta resolução no nLC-nESI QExactive Plus, os espectros de MS/MS foram submetidos ao software SIM-XL (http://patternlabforproteomics.org/simxl). Após filtragem automática e validação manual dos resultados, vários *links* de alta confiança (inter- e intra-proteínas) foram observados. Uma vez que o tamanho do braço espaçador do reagente de cross-linking e o comprimento das cadeias laterais dos pares de resíduos reativos são conhecidos, os limites de distância máxima entre seus carbonos beta puderam ser estimados. A maior parte dos intra-links observados na miotoxina II foram validados de forma eficiente em sua estrutura cristalográfica (código PDB 1CLP). As restrições de distância intra-DM64 foram utilizadas para modelagem molecular do inibidor: seus domínios foram modelados individualmente (servidor I-Tasser), seguido de docking molecular utilizando dados de cross-linking (servidor Rosetta). Esta abordagem híbrida foi fundamental para refinar o modelo molecular de DM64, possibilitando o melhor posicionamento relativo de seus domínios e a geração de uma estrutura globular mais condizente com os dados experimentais. Os dados de cross-linking proporcionaram um primeiro mapeamento da interação entre a DM64 e a miotoxina II, indicando o envolvimento importante do terceiro e quinto domínios da DM64 e da região C-terminal da toxina. Ainda que seja necessário refinar o modelo gerado com base nos dados de cross-linking através da integração com técnicas experimentais complementares, a estratégia adotada nesta dissertação nos possibilitou melhorar a compreensão acerca dos determinantes estruturais da interação entre a miotoxina II e a DM64.

ABSTRACT

Bothrops snake venoms are known to induce important local tissue damage, such as hemorrhage and myonecrosis. The glycoprotein DM64 isolated from the serum of the South American opossum Didelphis aurita binds non-covalently to Lys49 and Asp49 phospholipases A₂ from *Bothrops asper* venom, inhibiting their myotoxic effect. This protein has a molecular mass of 64 kDa and 5 immunoglobulin (Ig)-like domains. This study aimed to the structural characterization of the inhibitor-toxin complex using cross-linking, high resolution mass spectrometry and molecular modeling strategies. The complex made of DM64 and myotoxin II (Lys49) from Bothrops asper was stabilized using two complementary crosslinking approaches: 1) the homobifunctional cross-linking agent BS³ (which targets Lys, Ser and the N-terminus); 2) the XPlex strategy, a new cross-linking approach targeting acidic residues (Glu, Asp and C-terminus). Following the enzymatic digestion of the cross-linked products and their analysis by high resolution mass spectrometry using a nLC-nESI QExactive Plus, the MS/MS spectra were submitted to the SIM-XL software (http://patternlabforproteomics.org/simxl). After automatic filtering and manual validation, several high confidence links matching cross-linked peptides (both inter- and intra-proteins) were observed. Since the size of the spacer arm of the *cross-linking* reagent and the length of the side chain of the cross-linked residues are known, the maximum distance limits between their beta carbons could be estimated. Most intra-links of myotoxin II could be efficiently validated on the crystallographic structure of myotoxin II (PDB code 1CLP). Distance constraints observed within DM64 were used for the molecular modeling of DM64: the individual domains were individually modeled (I-Tasser software suite), followed by molecular docking using cross-linking data (Rosetta software suite). This hydrid strategy allowed us to generate a refined model of DM64, where the relative position of the domains was in better accordance with the experimental data. The cross-linking strategy provided a first understanding of the interaction between DM64 and myotoxin II, showing the important involvement of the third and fifth domains of DM64 and the C-terminus of the toxin. Although new complementary strategies are still needed to further refine the model sctructure of the inhibitor, the cross-linking technique has contributed to deepen our understanding of the structural determinants of the interaction between myotoxin II and DM64.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa da ocorrência de acidentes ofídicos no mundo e número de mortes associadas
Figura 2 - Incidência dos acidentes ofídicos no Brasil (Ano de 2015). Dados retirados do SINAN
Figura 3 –Principais efeitos dos venenos de serpentes em diferentes orgãos e tecidos corporais
Figura 4 - Especificidade de hidrólise de diferentes fosfolipases e hidrólise de fosfatidilcolina (PC) pela PLA2, liberando lisofosfatidilcolina (lisoPC) e ácido graxo (AG)9
Figura 5 – Exemplar de <i>Didelphis aurita</i>
Figura 6 - Alinhamento das sequências de a ₁ B-glicoproteína, DM43 e DM6432
Figura 7 - Crescimento anual do número de estruturas proteicas depositadas no Protein Data Bank (PDB)
Figura 8 - Representação esquemática da abordagem integrativa em Biologia Estrutural 36
Figura 9 - Estrutura molecular do suberato de dissuccinimidila (DSS) e do suberato de bis[sulfosuccinimidila](BS ³)
Figura 10 - Representação esquemática de um experimento típico de cross-linking com análise por espectrometria de massas
Figura 11 - Possíveis produtos da reação de cross-linking utilizando BS ³
Figura 12 - Estabilização do complexo entre a antitoxina DM64 e miotoxina II utilizando diferentes concentrações de BS ³
Figura 13 - Estabilização do complexo entre a antitoxina DM64 e miotoxina II utilizando BS ³
Figura 14 - Cromatografia exclusão molecular das amostras estabilizadas pelo ALC BS ³ 60
Figura 15 - Distribuição da frequência de aminoácidos em proteínas de acordo com o banco de dados UniProtKB/TrEMBL (UniProt, 2017)
Figura 16 - Sequência de aminoácidos da antitoxina DM64
Figura 17 - Estabilização do complexo entre a antitoxina DM64 e miotoxina II utilizando a metodologia XPlex
Figura 18 - Peptídeo de nove resíduos, mostrando a clivagem nas ligações peptídicas e os íons das séries b e y que são gerados preferencialmente.)
Figura 19 - Estrutura dos íons-diagnóstico de m/z 222,1; 239,2; 305,2

Figura 20 - Intra-links observados na estrutura de DM64 controle utilizando diferentes estratégias de hidrólise
Figura 21 - Sequência de aminoácidos da miotoxina II
Figura 22 - Espectros MS/MS de alta confiabilidade (excelente) e cobertura de sequência de cross-links intra-moleculares de miotoxina II em complexo com DM64 provenientes da reação com BS ³ (A) e XPlex-ZL (B)
Figura 23 - Intra-links observados na estrutura da miotoxina II em complexo com a DM64.71
Figura 24 - Sequência da miotoxina II renumerada para utilização em nosso trabalho72
Figura 25 - Estrutura Cristalográfica da Miotoxina II de Bothrops asper73
Figura 26 - Análise dos cross-links identificados na estrutura da miotoxina II
Figura 27 - Distribuição de Cargas na Superfície da Estrutura da Miotoxina II77
Figura 28 - Espectros MS/MS de alta confiabilidade (excelentes) e cobertura de sequência de cross-links intra-moleculares de DM64 controle provenientes da reação com BS ³ (A) e XPlex-ZL (B)
Figura 29 - Intra-links observados na estrutura de DM64 controle
Figura 30 - Intra-links encontrados na estrutura de DM64 controle com a união das duas metodologias empregadas (XPlex e BS ³)
Figura 31 - Espectros MS/MS de alta confiabilidade (excelentes) e cobertura de sequência de cross-links intra-moleculares de DM64 no complexo com miotoxina provenientes da reação com BS ³ (A) e XPlex-AC (B)
Figura 32 - Intra-links observados na estrutura de DM64 em complexo com miotoxina II 84
Figura 33 - Intra-links observados na estrutura de DM64 no complexo após a consolidação dos resultados das duas metodologias empregadas (XPlex e BS ³)
Figura 34 - Espectros MS/MS de alta confiabilidade (excelentes) e cobertura de sequência de cross-links inter-molecular entre DM64 e miotoxina II provenientes da reação com BS ³ (A) XPlex-ZL (B)
Figura 35 - Inter-links encontrados entre DM64 e miotoxina II
Figura 36 - Intra-links encontrados no complexo entre DM64 e miotoxina II com a união das duas metodologias empregadas (XPlex e BS ³)
Figura 37 - Mapa 2D do complexo miotoxina - DM64
Figura 38 - Análise da estrutura primária de DM64 e reconhecimento de domínios pelo PSI- Blast
Figura 39 - Modelagem Molecular de DM64 completa92

Figura 40 - Extensão de estruturação dos domínios mapeados na estrutura do DM64 modelados pelo algoritmo I-Tasser	os domínios de 98
Figura 41 - Conectividade entre Domínios para O Modelo 05262.	
Figura 42 - O Modelo 05262 Representa a estrutura de DM64	
Figura 43 - Interação DM64-MiotoxinaII.	
Figura 44 - Docking preliminar da interação entre DM64 e miotoxina II	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de acidentes ofídicos notificados nas diferentes regiões do Brasil de 2010a 2015. Fonte: SINAN / SVS / MS – dados atualizados em outubro de 2015
Tabela 2 - Detalhamento de todos os experimentos de cross-linking analisados nestadissertação
Tabela 3 - Distâncias máximas permitidas, calculada pelo software TOPOLINK, para cadaum dos resíduos envolvidos na reação de cross-linking. Em todos os casos, considerou-se adistância entre os átomos de carbono beta (CB-CB) dos resíduos.53
Tabela 4 - Códigos utilizado pelo software Topolink
Tabela 5 – Resumo do protocolo de docking global utilizado (exemplo do docking D5-D4) 55
Tabela 6 - Análise de distâncias euclidianas e topológicas realizadas pelos software Topolink. 74
Tabela 7 - Análise do software Topolink para os links obtidos pelo ALC BS ³ para a proteína DM64 alongada 93
Tabela 8 - Análise do software Topolink para os links obtidos pela metodologia XPlex-ACpara a proteína DM64 alongada
Tabela 9 - Análise do software Topolink para os links obtidos pela metodologia XPlex-ZLpara a proteína DM64 alongada
Tabela 10 - Comparação da validação dos cross-links entre os modelos de DM64 usando o I-Tasser (modelo estendido) e docking (modelo globular)101
Tabela 11 - Análise do software Topolink para os links obtidos pelo ACL BS ³ para a proteínaDM64 globular103
Tabela 12 - Análise do software Topolink para os links obtidos pela metodologia XPlex-ACpara a proteína DM64 globular
Tabela 13 - Análise do software Topolink para os links obtidos pela metodologia XPlex-ZLpara a proteína DM64 globular

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos	15
1.2 Características gerais dos venenos de serpentes e sintomatologia	18
1.3 Principais toxinas responsáveis pelos danos teciduais locais no envenenar botrópico	nento 20
1.3.1 Toxinas do tipo fosfolipase A ₂ e fosfolipase A ₂ -símile	22
1.4 Terapia Antiofídica	26
1.5 Inibidores naturais de veneno de serpentes	28
1.6 Modelos de caracterização estrutural de proteínas	32
1.7 Espectrometria de massas aplicada ao estudo estrutural de proteínas	36
1.8 Cross-linking associado à espectrometria de massas (XL-MS)	37
1.9 Predição de estrutura tridimensional de proteínas por métodos in sílico	43
2 JUSTIFICATIVA	46
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Antitoxina DM64 e miotoxina II	48
4.2 Reação de cross-linking utilizando o agente BS ³	48
4.3 Reação de cross-linking utilizando a estratégia XPlex	50
4.4 Desnaturação e hidrólise das proteínas com as endopeptidases Lys-C e tripsina	50
4.5 Identificação dos peptídeos ligados cruzadamente por espectrometria de massas	51
4.6 Interpretação e validação dos resultados de cross-linking	52
4.7 Predição da estrutura molecular de DM64	54
4.7.1 Predição inicial de estrutura	54
4.7.2 Modelagem molecular da proteína DM64	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Estabilização do complexo entre DM64 e miotoxina II por cross-linking utilizar ALC BS ³	ndo o 56
5.2 Estabilização do complexo entre DM64 e miotoxina II por cross-linking utilizar metodologia XPlex	ndo a 61
5.3 Análise dos espectros de fragmentação dos peptídeos modificados pelo I XPlex	3S ³ e 64
5.3.1 Análise dos espectros de Miotoxina II	69

5.3.2 Analise dos espectros e mapa de restrição de distancia de DM64 controle78
5.3.3 Análise dos espectros e mapas de restrição de distâncias de DM64 no complexo82
5.3.4 Análise dos espectros e mapas de restrição de distâncias da interação entre DM64 e miotoxina II
5.4 Modelagem molecular da antitoxina DM6489
5.4.1 Modelagem Molecular de DM64 completa
5.4.2 Modelagem Molecular DM64/Domínios97
5.5 Interação e docking de DM64 com miotoxina II106
6 CONCLUSÕES109
7 REFERÊNCIAS110

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia dos acidentes ofídicos

Os envenenamentos ofídicos constituem uma grave condição de saúde pública (Scheske *et al.*, 2015), afetando principalmente os membros inferiores de homens em idade produtiva, moradores de comunidades rurais da África, Ásia, América Latina e Nova Guiné (Gutierrez *et al.*, 2017; Bochner e Struchiner, 2003; Warrell, 2010; Who, 2007). Em função da espécie de serpente envolvida, da quantidade de veneno inoculado, do tempo decorrido até o socorro médico e da disponibilidade do soro antiofídico apropriado, os envenenamentos podem ocasionar desde danos teciduais à morte do acidentado, trazendo problemas socioeconômicos e psicológicos para as vítimas e suas famílias (Who, 2010; Gutierrez *et al.*, 2006).

Estima-se que cerca de 2,7 milhões de pessoas em todo o mundo sejam picadas por serpentes todos os anos; mais de 100.000 morrem e até 400.000 sofrem sequelas físicas (mionecrose e edema que, em casos mais graves, podem levar a amputações) e psicológicas (Figura 1) (Gutierrez *et al.*, 2017; Warrell, 2010; Who, 2007; Gutierrez *et al.*, 2010). Contudo, estes números, provenientes de notificações hospitalares e estatísticas de atendimento, são certamente subestimados, visto que a maior parte das vítimas de acidentes ofídicos mora em áreas rurais, onde existe uma grande dificuldade de acesso aos serviços de saúde, seja devido à distância dos hospitais que administram o tratamento, à infraestrutura deficiente ou à falta de médicos especializados para lidar com esse tipo de ocorrência (Williams *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2009; Bernade e Gomes, 2012; Harrison e Gutierrez, 2016).



Figura 1- Estimativa da ocorrência de acidentes ofídicos no mundo e número de mortes associadas. (Gutierrez et al., 2017). Observa-se o alto número de pessoas vítimas desses acidentes (cerca de 2,7 milhões de pessoas em todo o mundo), sendo que mais de 100.000 são vítimas fatais. O maior número de envenenamentos acomete continentes subdesenvolvidos e que possuem grandes áreas de agricultura, como Asia, África e Ámerica Latina. Lembrando que estes dados são subestimados, pois grande parte dos acidentes ofídicos não são notificados.

Apesar dos números alarmantes, os acidentes com serpentes peçonhentas recebem pouquíssima atenção dos órgãos de saúde e das indústrias farmacêuticas, o que acaba por desestimular o desenvolvimento de pesquisas nesta área (Gutierrez *et al.*, 2013). Desta forma, desde 2009 a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a incluir o envenenamento ofídico na lista de DNT (Doenças Tropicais Negligenciadas), sendo descrito como uma "Condição de Saúde Negligenciada" (Williams *et al.*, 2010). Esta medida objetiva garantir maior visibilidade e conscientização mundiais, de forma que políticas públicas possam ser tomadas para mitigar os graves problemas de saúde decorrentes destes acidentes (Who, 2010; Gutierrez *et al.*, 2010).

A maioria das mortes ocasionadas por acidentes ofídicos ocorre em países da Ásia e África, ainda que, na América do Sul, também represente um problema de grande relevância. Dos países da América do Sul, o Brasil é o que apresenta maior número de casos de envenenamento ofídico (cerca de 30 mil casos anualmente), sendo que as regiões Norte e Nordeste lideram as notificações (Tabela 1) (Nadur-Andrade *et al.*, 2012; Ministério-Da-Saúde, 2014). De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (SINAN, 2017), dentre as notificações cuja serpente responsável foi

identificada, 80% foram causadas pelo gênero *Bothrops* (Figura 2). Este gênero está distribuído por todo o território nacional e compreende aproximadamente 30 espécies. As mais conhecidas e que possuem maior importância médica são: *Bothrops atrox* (região Norte/Amazônica), *Bothrops erythromelas* (região Nordeste/Bahia), *Bothrops jararaca* (regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste), *Bothrops jararacussu* (regiões Sul e Sudeste), *Bothrops alternatus* (região Sul de Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul), *Bothrops neuwiedi* (regiões Sudeste e Centro-Oeste), *Bothrops leucurus* (Zona da Mata/Nordeste) e *Bothrops moojeni* (Cerrado do Brasil Central) (Neiva *et al.*, 2009; Kohlhoff *et al.*, 2012; Melgarejo, 2009).

Tabela 1 - Número de acidentes ofídicos notificados nas diferentes regiões do Brasil de 2010 a 2015. Fonte: SINAN / SVS / MS – dados atualizados em outubro de 2015.

Região / Ano	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
Norte	9.211	9.035	9.098	9.666	8.809	6.438	52.257
Nordeste	8.195	7.949	7.080	6.380	5.475	4.915	39.994
Centro-oeste	6.386	7.283	7.395	7.126	5.570	1.927	35.687
Sul	3.153	3.228	3.233	2.835	2.489	1.544	16.482
Sudeste	2.718	2.597	2.498	2.319	2.061	3.917	16.110
Brasil	29.663	30.092	29.304	28.326	24.404	18.741	160.530



Figura 2 - Incidência dos acidentes ofídicos no Brasil (Ano de 2015). Dados retirados do SINAN. Dentre as notificações de acidentes cuja serpente responsável foi identificada, 80% foram causadas pelo gênero *Bothrops* (distribuído por todo o território nacional, sendo as mais conhecidas: *Bothrops atrox, Bothrops jararacussu, Bothrops alternatus, Bothrops neuwiedi, Bothrops leucurus e Bothrops moojeni*), seguida pelos gêneros *Crotalus, Lachesis e Micrurus.*

1.2 Características gerais dos venenos de serpentes e sintomatologia

Para as serpentes, o veneno possui um papel fisiológico de extrema importância, iniciando e auxiliando na digestão e na dominação de presas capturadas, além de servir como mecanismo de defesa contra predadores e/ou agressores (Mackessy, 1993). Interessantemente, os venenos de serpentes são altamente diversificados, podendo sofrer variações em sua composição em função de filogenia, ontogenia, sazonalidade e distribuição geográfica (Chippaux *et al.*, 1991). Essa variabilidade é particularmente comum em serpentes do gênero *Bothrops*, pois as mesmas podem ser encontradas em uma ampla faixa de território, possuindo, assim, grande diversidade de habitats e morfologias (Carrasco *et al.*, 2012).

Venenos de serpentes possuem uma composição complexa de biomoléculas, incluindo enzimas, toxinas não enzimáticas, proteínas não tóxicas, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos e aminoácidos livres, além de íons sódio, cálcio e zinco. Eles podem ser inoculados na vítima subcutaneamente ou intramuscularmente, dependendo do tipo de dentição da serpente (Koh *et al.*, 2006).

A sintomatologia do envenenamento por serpentes é bastante diversificada (Figura 3) e está associada à presença e à quantidade relativa destas biomoléculas no veneno. Nos envenenamentos provocados por serpentes da família *Viperidae* (ex.: jararacas), por exemplo, ocorre um quadro hemorrágico característico, devido à grande quantidade de metalopeptidases presentes (Moura-Da-Silva *et al.*, 2007). Já na família *Elapidae* (ex.: corais), existe uma maior quantidade de neurotoxinas que induzem distúrbios neurológicos (Kini, 2003).

Os venenos viperídeos podem causar efeitos locais e sistêmicos. Os efeitos sistêmicos ocorrem por toxinas que são distribuídas pelo sistema linfático e vasos sanguíneos, atingindo outros órgãos e comprometendo processos vitais dos sistemas nervoso, locomotor e vascular, aumentando a permeabilidade de membranas celulares (Gutierrez *et al.*, 2017), além de causar coagulopatias, gengivorragias, hematúria, sangramentos em cicatrizes antigas, hemorragias intensas (contribuindo para a isquemia local e dificultando a regeneração tecidual), insuficiência renal (que pode ser atribuída à nefrotoxicidade direta do veneno, à hemólise, à miólise, à coagulação nos capilares dos glomérulos, à hipotensão, às reações de hipersensibilidade à toxina e/ou ao tratamento antiofídico) e choque. Os efeitos locais mais comuns incluem sangramento no local da picada, bolhas e equimoses, dor intensa, processo inflamatório agudo e necrose, que pode levar à amputação ou à disfunção do membro (Gutierrez *et al.*, 2017; Fox e Serrano, 2005).

Em algumas serpentes da subfamília *Crotalinae* (gênero *Crotalus* ou cascavéis Sul-Americanas), pode-se observar ainda flacidez muscular, mialgia, dentre outros (Gutierrez *et al.*, 2007). Este quadro é ocasionado por β -neurotoxinas com atuação pré-sináptica (fosfolipases A₂ neurotóxicas), que provocam a inibição da liberação da acetilcolina na junção neuromuscular, causando intensa paralisia e consequente insuficiência respiratória, que pode ser fatal (Doley *et al.*, 2009; Sanchez *et al.*, 1992). Já em acidentes envolvendo serpentes da família *Elapidae* (gênero *Micrurus* ou corais), os efeitos neurotóxicos são pós-sinápticos, mediados por α -neurotoxinas com ação tipo-curare, que se ligam especificamente à subunidade alfa do receptor colinérgico nicotínico, competindo com a acetilcolina pelo receptor e induzindo parada muscular e insuficiência respiratória (Atassi, 1991).

Os efeitos locais do envenenamento por serpentes envolvem toxinas que podem provocar danos musculares, resultando em sequelas permanentes, tais como amputações de membros e contraturas (*i. e.*, encurtamento permanente de articulações ou músculos, que levam a deformidades ou rigidez). O edema, característico destes acidentes, é causado pela ação direta de toxinas sobre os vasos e a liberação de mediadores endógenos, resultado da ação destas toxinas sobre mastócitos, cininogênio e fosfolipídeos. A mionecrose é produzida pela ação direta de miotoxinas sobre as fibras musculares esqueléticas ou como consequência indireta da ação de hemorraginas, que levam à isquemia por comprometimento da microvascularização do tecido muscular. A sensibilidade exacerbada à dor é consequência da liberação de mediadores inflamatórios (ex.: prostaglandinas, leucotrienos e bradicinina), que também podem contribuir para a injúria tecidual. Por fim, a hemorragia é causada por metalopeptidases que atuam sobre as células endoteliais e a lâmina basal dos capilares (Gutierrez *et al.*, 2017; Gutierrez *et al.*, 2003; Gutierrez e Lomonte, 1995).



Figura 3 – Principais efeitos dos venenos de serpentes em diferentes órgãos e tecidos corporais. Adaptado de Gutierrez *et al.* (2017). 3FTx: toxina de três-dedos; PLA₂: fosfolipases A₂; SVMP: metalopeptidase de veneno de serpentes e SVSP: serino-peptidase de veneno de serpentes.

1.3 Principais toxinas responsáveis pelos danos teciduais locais no envenenamento botrópico

O veneno botrópico (gênero *Bothrops*, subfamília *Crotalinae*) contém mais de 20 componentes diferentes, com 90-95% de seu peso seco sendo constituído por proteínas e peptídeos, com ênfase para metalopeptidases, serino-peptidases, fosfolipases A_2 e lectinas do tipo C / C-símile (Nicolau, 2012; Harvey, 2006). Este veneno pode induzir um quadro patológico bastante grave, que inclui efeitos locais e sistêmicos, no organismo do acidentado (Fox e Serrano, 2008).

As principais toxinas responsáveis pelos danos teciduais locais no envenenamento botrópico são as metalopeptidases e as miotoxinas com estrutura de fosfolipase A₂ (Calvete *et al.*, 2007; Calvete *et al.*, 2009; Gutierrez *et al.*, 2008; Lomonte *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2008).

As metalopeptidases de venenos de serpentes (SVMP, <u>Snake Venom</u> <u>MetalloProtease</u>) são enzimas proteolíticas, sintetizadas na forma de zimogênio, extremamente abundantes no veneno dos viperídeos. Estas enzimas estão envolvidas nos processos de degradação de fatores da cascata da coagulação sanguínea, necrose tecidual, inibição da agregação plaquetária, edema, degradação de componentes da matriz extracelular e hemorragia (Mora *et al.*, 2008; Markland e Swenson, 2013).

As SVMPs apresentam um átomo de zinco coordenado pelas cadeias laterais de três resíduos de histidina presentes na sequência de consenso H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H, (Fox e Serrano, 2008). Elas podem ser agrupadas em três classes denominadas PI, PII e PIII, de acordo com a sua organização em domínios. Estas, por sua vez, se dividem em subclasses, de acordo com a estrutura final gerada por modificações pós-traducionais (hidrólise) e/ou oligomerização (Fox e Serrano, 2005; Bjarnason e Fox, 1995).

A classe PI inclui as metalopeptidases com massa molecular em torno de 24 kDa, que apresentam pouca ou mesmo nenhuma atividade hemorrágica e possuem apenas o domínio metalopeptidase. Estas SVMPs sofrem um processamento proteolítico e passam de zimogênio para a sua forma madura e biologicamente ativa, através da clivagem do pró-domínio no N-terminal (Bjarnason e Fox, 1995; Portes-Junior *et al.*, 2014).

As SVMPs de classe PII apresentam o domínio metalopeptidase e o domínio Desintegrina e massa molecular que varia de 35 à 50 kDa. Após o processamento inicial, observado também nas PI, elas podem sofrer um processamento adicional, liberando o domínio desintegrina (Chen *et al.*, 2003). Este é responsável pelo bloqueio da função de receptores integrina que, frequentemente, reconhecem o tripeptídeo RGD, podendo levar, entre outros, à inibição da agregação plaquetára induzida por fibrinogênio (Gutierrez *et al.*, 2010). As PII foram subdivididas em PIIa que, ao sofrerem processamento na glândula venenífera, liberam um domínio desintegrina e um domínio metalopeptidase do tipo PI; as PIIb que, ao contrário das PIIa, não sofrem processamento adicional, mantendo os domínios unidos; as PIIc, que representam a forma dimérica das metalopeptidases PIIb; e as PIId e PIIe, que dão origem, respectivamente, às desintegrinas homodiméricas e heterodiméricas (Fox e Serrano, 2008).

Já a classe PIII inclui as hemorraginas de massa molecular entre 50 e 90 kDa, consideradas as mais potentes toxinas hemorrágicas, devido à presença dos domínios adicionais tipo desintegrina e rico em cisteína; este último parece propiciar a ligação da metalopeptidase a alvos celulares/substratos relevantes (ex.: membrana basal dos capilares), permitindo a manifestação mais efetiva de sua atividade proteolítica (Baldo *et al.*, 2010; Gutierrez e Rucavado, 2000; Moura-Da-Silva *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2010). Esta classe é subdividida em PIIIa, que apresenta os domínios metalopeptidase, tipo-desintegrina e rico em

cisteína unidos; as PIIIb, que inclui as SMVPs que sofrem processamento, separando o domínio catalítico dos domínios rico em cisteína e tipo desintegrina; as PIIIc, que incluem as SMVP PIII diméricas e, por fim, as PIIId, que incluem toxinas que apresentam 95 kDa de massa molecular, baixa atividade hemorrágica e domínios adicionais tipo lectina ligados à cadeia polipeptídica por pontes dissulfeto (Fox e Serrano, 2005; 2008). Na classe PIIIb encontra-se a jararagina, componente abundante do veneno de *Bothrops jararaca* e um dos principais responsáveis pela indução das hemorrágica também é capaz de processar a molécula precursora do fator de necrose tumoral α (TNF- α), citocina relacionada com a indução de dermonecrose no local do acidente (Clissa *et al.*, 2001; Escalante *et al.*, 2011). Na glândula de veneno, podemos encontrar ainda a jararagina C, produto da clivagem proteolítica da jararagina, que apresenta apenas os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína e que não possui atividade hemorrágica (Moura-Da-Silva *et al.*, 2003).

As fosfolipases A_2 presentes nos venenos estão associadas a inúmeros efeitos farmacológicos e/ou tóxicos, podendo provocar danos musculares agudos e reações inflamatórias locais, como formação de edema, influxo de leucócitos em tecidos e dor (Gutierrez e Lomonte, 2013; Teixeira *et al.*, 2003; Zelanis *et al.*, 2012).

As miotoxinas de venenos de serpentes podem ser classificadas em diferentes grupos:

1.3.1 Toxinas do tipo fosfolipase A₂ e fosfolipase A₂-símile

As fosfolipases podem ser classificadas em cinco grupos distintos, dependendo do local de hidrólise do substrato, denominados A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B (PLB), C (PLC) e D (PLD) (Figura 4). As PLB possuem especificidade equivalente à soma de A₁ e A₂ (Wang, 2001; Merkel *et al.*, 1999; Vance; e Vance, 2008).



Figura 4 - Especificidade de hidrólise de diferentes fosfolipases e hidrólise de fosfatidilcolina (PC) pela PLA₂, liberando lisofosfatidilcolina (lisoPC) e ácido graxo (AG). A seta indica o local de hidrólise Modificado de (Wang, 2001).

As fosfolipases A₂ são esterases que hidrolisam fosfoglicerídeos presentes nas membranas plasmáticas celulares na posição *sn*-2, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos (Figura 4) (Gutierrez e Lomonte, 2013; Wang, 2001; Dennis, 1994; Kudo e Murakami, 2002). Com a hidrólise dos fosfolipídeos, ocorre a geração de um grande número de mediadores próinflamatórios, como os derivados do ácido araquidônico (ex.: prostaglandinas, prostaciclinas, leucotrienos e tromboxanos) e o fator de ativação de plaquetas (Costa *et al.*, 2017; Dennis *et al.*, 2006).

Estas enzimas possuem sequência primária e estrutura tridimensional conservadas, com exceção do posicionamento de suas pontes dissulfeto e do comprimento dos *loops* (Costa *et al.*, 2017; Da Silva Giotto *et al.*, 1998; Renetseder *et al.*, 1985). Alguns estudos demonstram que, em doenças inflamatórias humanas, como artrite reumatoide, psoríase, rinite alérgica, pancreatite aguda, aterosclerose, entre outros, os níveis de PLA₂ se encontram aumentados (Costa *et al.*, 2017).

As fosfolipases A₂ são classificadas em 15 grupos, de cinco categorias principais, de acordo com sua massa molecular, sequência de aminoácidos, número de pontes dissulfeto e dependência de cálcio para a atividade enzimática. Os diferentes tipos são: PLA₂ secretadas (sPLA₂), citosólicas (cPLA₂), independentes de cálcio (iPLA₂), os fatores ativadores de plaquetas acil-hidrolases (PAF-AH) e as PLA₂ lisossômicas (Schaloske e Dennis, 2006). Um

novo grupo cálcio dependente denominado AdPLA (*adipose-specific phospholipase* A_2) foi descoberto em tecido adiposo e descrito como responsável por condições de obesidade (Duncan *et al.*, 2008).

As PLA₂ secretadas são proteínas relativamente pequenas (14 a 18 kDa), que podem apresentar de 6-8 ligações dissulfeto e necessitam do íon cálcio para atividade catalítica (com exceção de um subgrupo de mamífero / murino que possui alta massa molecular, de aproximadamente 55 kDa)(Costa *et al.*, 2017). Em serpentes do gênero *Bothrops*, dois tipos principais de sPLA₂ podem ser encontrados: 1) as PLA₂ cataliticamente ativas, que possuem resíduos conservados em seu sítio catalítico e no *loop* de ligação do cálcio, incluindo um ácido aspártico na posição 49 (PLA₂ D49), proporcionando alta atividade catalítica; 2) as variantes cataliticamente inativas, que apresentam baixa ou nenhuma atividade enzimática, ainda que preservem a atividade miotóxica (Gutierrez e Lomonte, 1995; 2013; Lomonte e Rangel, 2012; Ownby *et al.*, 1999). A variante cataliticamente inativa contendo lisina na posição 49 (PLA₂ K49) é a miotoxina mais frequentemente isolada do veneno de serpentes, mas também é possível encontrar substituições do ácido aspártico na posição 49 por resíduos de serina, arginina, glutamina ou asparagina (Bao *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 1998; Polgar *et al.*, 1996).

Nas miotoxinas D49, como a miotoxina I de Bothrops asper (Gutierrez et al., 1984), o íon cálcio (Ca^{2+}) é o cofator essencial para a atividade catalítica (Yu *et al.*, 1993). Ao interagir com a cadeia lateral do ácido aspártico da posição 49, permite o posicionamento ótimo do substrato no sítio catalítico. Adicionalmente, o íon cálcio estabiliza a carga negativa parcial do oxigênio da carbonila da ligação éster da posição sn-2 do substrato (Bonfim et al., 2006; Yang, 1994). Dessa forma, as D49 promovem perturbações nas membranas plasmáticas das células musculares (sarcolema) através da hidrólise de fosfolipídeos de membrana, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos. Estas modificações na membrana plasmática facilitam o influxo de cálcio nas células musculares, principalmente Ca2+, aumentando a concentração citosólica deste íon e, consequentemente, gerando: a) hipercontração dos miofilamentos; b) dano mitocondrial; c) ativação de peptidases dependentes de cálcio (ex.: calpaínas), que contribuem para a degradação de componentes do citoesqueleto; d) ativação de fosfolipases A2 citosólicas, que aumentam a intensidade da lesão das membranas da célula muscular e de suas organelas O resultado destes eventos é um grande dano celular irreversível, levando à morte das células (Gutierrez et al., 2017; Montecucco et al., 2008; Pungercar e Krizaj, 2007).

Nas miotoxinas K49, como a miotoxina II de B. asper utilizada nesta dissertação (Francis et al., 1991; Lomonte e Gutierrez, 1989), a coordenação do íon cálcio é impedida devido à substituição do ácido aspártico por uma lisina, já que a cadeia lateral deste resíduo passa a ocupar a posição do Ca^{2+} , inviabilizando a atividade catalítica (Lee *et al.*, 2001; Scott et al., 1992). Apesar de serem cataliticamente inativas, as PLA₂ K49 apresentam atividade miotóxica sobre as membranas. Esta atividade é atribuída à presença de uma região rica em aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos (peptídeo 115-129) em sua porção C-terminal (Lomonte et al., 2003; Ambrosio et al., 2005). Dessa forma, resíduos catiônicos da região Cterminal destas proteínas interagem com os fosfolipídeos negativamente carregados presentes na bicamada lipídica, desorganizando-a. Consequentemente, as células se tornam mais permeáveis à entrada de íons, principalmente Ca⁺², causando proteólise disseminada, devido à ação de calpaínas, hipercontração das fibras musculares, disfunção mitocondrial e efluxo de ATP e íons K⁺. Com o aumento da concentração destes componentes fora da célula, ocorre a estimulação da despolarização dos nervos periféricos, que resulta em dor intensa e ativação de inflamassomos, que contribuem para o estabelecimento da reação inflamatória (Gutierrez et al., 2017; Lomonte et al., 2003; Gutierrez e Ownby, 2003). Além disso, estas fibras musculares podem sofrer isquemia devido às alterações vasculares e ao aumento da pressão muscular, como consequência de hemorragia e edema (Gutierrez et al., 2009)

O músculo esquelético possui a capacidade de se regenerar e, para que isto ocorra, é necessário que o suprimento de sangue, ou seja, a microvascularização, esteja intacta, de forma que os detritos fagocíticos possam ser removidos. No veneno de viperídeos, devido à sinergia entre metalopeptidases e fosfolipases A₂, ocorre a hidrólise dos componentes-chave da membrana basal dos capilares, particularmente colágeno tipo IV, causando ruptura da microvasculatura. Dessa forma, forças hemodinâmicas que atuam na circulação causam a distensão destes vasos e a consequente ruptura da membrana celular, liberando o conteúdo intracelular (Escalante *et al.*, 2011). Com as fibras musculares, vascularização e nervos danificados, a regeneração dos músculos esqueléticos fica prejudicada, resultando em sequelas permanentes, podendo conduzir a amputações dos membros afetados (Gutierrez *et al.*, 2009; Hernandez *et al.*, 2011).

1.4 Terapia Antiofídica

Atualmente, o único tratamento preconizado nos casos de envenenamento ofídico é a terapia com soro hiperimune. Ela foi desenvolvida em 1894, por Albert Calmette e Césaire Phisalix & Gabriel Bertrand. Em 1896, o cientista brasileiro Vital Brazil fez uma contribuição fundamental nesta área, ao demonstrar que a especificidade do soro antiofídico guardava relação com o gênero da serpente (Chippaux e Goyffon, 1998). A soroterapia consiste na administração parenteral de uma solução de imunoglobulinas específicas [IgG íntegras ou seus fragmentos F(ab')₂ ou F(ab)], gerados pela digestão com pepsina ou papaína, respectivamente) purificadas a partir da imunização de animais domésticos de grande porte, principalmente equinos, com um pool de venenos de uma mesma espécie ou de diferentes espécies de serpentes de importância médica (soros mono- ou poliespecífico, respectivamente) (Scheske et al., 2015; Chippaux e Goyffon, 1998; Silva et al., 2013). Ainda que a soroterapia permaneça essencialmente a mesma atualmente, avanços tecnológicos foram incorporados aos protocolos de produção e controle de qualidade, de forma a garantir a segurança e a eficiência do tratamento (Girish e Kemparaju, 2011; Harrison et al., 2011). Dentre as principais preocupações estão: a redução das reações anafiláticas que ocorrem ao expor o sistema imunológico do acidentado às imunoglobulinas de cavalos e seus fragmentos, gerando imunocomplexos que podem piorar o quadro clínico da vítima (Gutierrez, 2012); e a eliminação de pirógenos no antissoro, melhorando a segurança da administração destes (Morais e Massaldi, 2009).

Para confecção do soro antiofídico, alguns critérios devem ser levados em consideração a fim de proporcionar a maior eficácia do mesmo: 1) delimitar a região geográfica em que o soro será utilizado; 2) identificar as espécies de serpente de maior relevância médica para a região em questão e; 3) analisar a variabilidade da composição proteica entre as espécies selecionadas (Gutierrez *et al.*, 2010).

O Brasil é autossuficiente na produção de soro antiofídico, sendo o Instituto Butantan (SP), o Instituto Vital Brazil (RJ), a Fundação Ezequiel Dias (MG) e o Centro de Produção de Pesquisa de Imunológicos (PR), os principais produtores (Ministério-Da-Saúde, 2001). Todavia, algumas espécies de importância médica no país não estão incluídas no *pool* de imunização, tais como a *Bothrops atrox*, principal espécie causadora de acidentes na região Amazônica (Calvete *et al.*, 2010). Segundo alguns estudos, a não inclusão do veneno de *B. atrox* na produção de antissoro se deve principalmente ao pedomorfismo (*i.e.*, retenção de caracteres juvenis em indivíduos adultos) deste, e às importantes variações intraespecíficas,

com características bioquímicas e perfis farmacológicos bastante distintos segundo a ontogenia (venenos de filhotes, juvenis e adultos) e a distribuição geográfica destas serpentes (Neiva *et al.*, 2009; Calvete *et al.*, 2011; Furtado *et al.*, 2010; Otero *et al.*, 1997; Segura *et al.*, 2010). Desta forma, há ainda bastante discussão a respeito da eficácia da soroterapia para o tratamento de envenenamentos causados por *B. atrox*.

De um modo geral, o tratamento antiofídico com soro hiperimune neutraliza bem os efeitos sistêmicos do envenenamento (ex.: hemorragia generalizada, coagulopatia, falência renal etc). Quanto à neutralização dos efeitos locais causados por alguns venenos (ex.: mionecrose, hemorragia local, edema), tais como os botrópicos, mesmo quando administrado rapidamente, o soro antiofídico é muito pouco eficaz. Esta limitação deve-se provavelmente ao comprometimento da microvasculatura do local atingido, em função da ação extremamente rápida das toxinas do veneno (Gutierrez *et al.*, 2006; Gutierrez *et al.*, 2007; Chippaux e Goyffon, 1998; Queiroz *et al.*, 2008). Estas toxinas provocam a liberação de mediadores inflamatórios que não são neutralizados pelo antissoro (Clissa *et al.*, 2006; Moura-Da-Silva *et al.*, 1996). Adicionalmente, a lesão microvascular compromete o acesso das imunoglobulinas ao local da picada (Battellino *et al.*, 2003). A fraca imunogenicidade de algumas toxinas de baixa massa molecular (ex.: fosfolipases A₂ e algumas metalopeptidases) em equinos é outro agravante que explica a dificuldade de se conseguir a neutralização da toxicidade tecidual local dos venenos (Who, 2010; Gutierrez *et al.*, 2007; Gutierrez e Ownby, 2003; Queiroz *et al.*, 2008; Battellino *et al.*, 2003).

Estratégias para aumentar a eficácia da soroterapia sobre os efeitos locais e minimizar os seus efeitos adversos, tais como a identificação dos componentes responsáveis pela toxicidade dos venenos e seu mecanismo de ação, assim como a pesquisa de moléculas capazes de neutralizar tais efeitos, vêm ganhando força. Neste contexto, o estudo de proteínas com atividade antiofídica isoladas do soro de animais naturalmente resistentes aos venenos é de grande interesse para o desenvolvimento de tratamentos que possam complementar a soroterapia, seja através de administração local ou sistêmica (Girish e Kemparaju, 2011; Harrison *et al.*, 2011).

1.5 Inibidores naturais de veneno de serpentes

A possibilidade da utilização terapêutica de inibidores específicos de SVMPs e de miotoxinas com estrutura de fosfolipases A_2 vem sendo aventada nos últimos anos. Estas são as principais toxinas responsáveis pela hemorragia e pela mionecrose local no envenenamento causado por serpentes da família *Viperidae* (Moura-Da-Silva *et al.*, 2007; Gutierrez e Lomonte, 2013).

Inibidores naturais de metalopeptidases de venenos de serpentes já foram isolados dos plasmas de serpentes (Valente *et al.*, 2001; Yamakawa Y e T., 1992) e de mamíferos (Catanese e Kress, 1992; Farah *et al.*, 1996; Jurgilas *et al.*, 2003; Neves-Ferreira *et al.*, 2000) e têm sido extensivamente caracterizados.

Vários inibidores de fosfolipases A₂ (PLI) de venenos de serpentes já foram descritos (Ohkura *et al.*, 1997). Os PLIα apresentam uma região homóloga aos domínios de reconhecimento de carboidratos de lectinas tipo C (cálcio-dependentes). Eles foram purificados do plasma/soro das serpentes *Trimeresurus flavoviridis* (Kogaki *et al.*, 1989), *Agkistrodon blomhoffi siniticus* (OHKUMURA *et al.*, 1993), *Atropoides nummifer* (AnMIP) (Quiros *et al.*, 2007), *Bothrops asper* (Lizano *et al.*, 1997), *Bothrops moojeni* (Soares *et al.*, 2003), *Bothrops alternatus* (BaltMIP) (Santos-Filho *et al.*, 2011) e *Cerrophidian goodmani* (Lizano *et al.*, 2000).

Os PLI β são glicoproteínas ácidas que possuem 33% de identidade de sequência com o domínio rico em leucina da α_2 -glicoproteína humana. Eles possuem efeito inibitório especificamente frente a PLA₂ básicas do veneno de crotalíneos (Neves-Ferreira *et al.*, 2010; Lizano *et al.*, 2003). Estes inibidores foram purificados de *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (OHKURA et al., 1997) e *Elaphe quadrivirgata* (Okumura *et al.*, 2002). Os PLI γ apresentam mais ampla distribuição entre os inibidores de PLA₂, possuem um padrão de resíduos de cisteína característico das proteínas que apresentam motivos *three-finger* encontrados em receptores do ativador de plasminogênio tipo uroquinase e em antígenos de superfície da superfamília Ly-6. Foram isolados do plasma/soro das serpentes das famílias *Elapidae* [*Naja naja kaouthia (Ohkura et al., 1994), Notechis ater (Hains e Broady, 2000), Notechis scutatus* (*Hains et al., 2001*) e *Oxyuranus scutellatus (Hains e Broady, 2000)*], *Viperidae* [*Crotalus durissus terrificus, Trimeresurus flavoviridis* (Nobuhisa *et al., 1997), Cerrrophidion* (*Bothrops*) godmani (Lizano *et al., 2000*)], *Hydrophidae (Laticauda semifasciata*) (Ohkura *et al., 1999*) e *Colubridae (Elaphe quadrivirgata*) (Okumura *et al., 2002*). De *Crotalus durissus terrificus*, o mesmo PLI foi isolado por dois grupos de modo independente: CNF (Crotalus Neutralising Factor) (Fortes-Dias et al., 1994) e CICS (Crotoxin Inhibitor from Crotalus Serum) (Perales et al., 1995).

Até o momento, apenas um inibidor de miotoxinas com estrutura de fosfolipases A₂ foi descrito em mamíferos, sendo isolado do soro do gambá Sul-Americano *Didelphis aurita* (Rocha *et al.*, 2002). Este inibidor foi denominado DM64 e constitui o foco deste trabalho. Suas características serão detalhadas mais adiante neste texto.

A resistência natural que alguns animais apresentam ao envenenamento ofídico pode ser atribuída a mutações na estrutura primária dos receptores das toxinas do veneno de alguns destes animais resistentes, impedindo a interação toxina-receptor (Bastos et al., 2016) e/ou à presença de fatores séricos que neutralizam algumas atividades tóxicas dos venenos (Neves-Ferreira *et al.*, 2010; Lizano *et al.*, 2003; Perales *et al.*, 2005; Perales *et al.*, 1986). Estes fatores séricos são proteínas que agem como aceptores solúveis, neutralizando as toxinas do veneno através da formação de complexos estáveis não-covalentes. Estas proteínas podem ser classificadas como inibidores de metalopeptidases de venenos de serpentes (SVMPI, <u>Snake Venom MetalloProtease Inhibitor</u>) ou inibidores de fosfolipases A₂ miotóxicas (PLI, <u>PhosphoLipase A₂ Inhibitor</u>) (Neves-Ferreira *et al.*, 2010)

Um exemplo de mamífero marsupial resistente ao envenenamento por serpentes é o *Didelphis aurita*, o gambá Sul-Americano (Figura 5), que se alimenta inclusive de serpentes peçonhentas (Voss e Jansa, 2012). Do plasma deste marsupial foram identificadas pelo menos duas proteínas séricas capazes de se ligar a metalopeptidases e miotoxinas, neutralizando-as e facilitando sua remoção do organismo do animal (Neves-Ferreira *et al.*, 2015). DM43 tem atividade anti-hemorrágica (Neves-Ferreira *et al.*, 2002) e DM64 tem atividade antimiotóxica (Rocha *et al.*, 2002).



Figura 5 - Exemplar de Didelphis aurita. Foto de faunaeflorauna.blogspot.

A proteína DM43 foi o primeiro SVMPI de mamífero a ser completamente sequenciado. DM43 é uma glicoproteína ácida de 291 resíduos de aminoácidos, apresenta três domínios tipo imunoglobulina e quatro sítios de N-glicosilação do tipo complexo (Neves-Ferreira et al., 2000; Neves-Ferreira et al., 2002; Leon et al., 2012). Com base em resultados de cromatografia de exclusão molecular e espalhamento dinâmico de luz (DLS, Dynamic Light Scattering) (NEVES-FERREIRA et al., 2002), DM43 era considerada homodimérica em solução, com subunidades de 43 kDa. Entretanto, recentemente, através de ultracentrifugação analítica (AUC, Analytical UltraCentrifugation), mostrou-se de maneira inequívoca a natureza monomérica da proteína em solução (manuscrito em preparação). DM43 mantém sua atividade inibitória em uma ampla faixa de pH e temperatura e apresenta atividades anti-hemorrágica, antiletal, anti-hiperalgésica e antiedematogênica.(Neves-Ferreira et al., 2000; Neves-Ferreira et al., 2010; Neves-Ferreira et al., 2002). DM43 também foi capaz de inibir as atividades fibrinogenolítica e caseinolítica do veneno de Bothrops jararaca, além de inibir a hidrólise de diversos outros substratos pelo veneno (ex.: colágeno IV, fibronectina, laminina). DM43 também possui atividade inibitória sobre a atividade proteolítica de SVMP isoladas (ex.: jararagina) e de metalopeptidases de matriz extracelular (MMPs 2, 3 e 9) de sobrenadantes de linhagens de fibroblastos (3T3) e de adenocarcinomas de mama (MCF7). Estes últimos resultados deram origem à patente intitulada "Uso de DM43 e seus fragmentos

como inibidor de metalopeptidases de matriz" (código BRPI0400284-9, depósito nacional em 05/11/03, concessão em 18/03/2004; código WO/2005/087252, depósito internacional em 18/03/05, concessão em 22/09/2005).

Uma característica interessante da proteína DM43 é que ela não é capaz de formar complexo com a jararagina-C, fragmento composto apenas pelos domínios tipodesintegrina e rico em cisteína derivados do processamento da SVMP hemorrágica jararagina isolada do veneno de *Bothrops jararaca*. Este resultado parece sugerir que a interação DM43toxina depende da presença do domínio catalítico da toxina (Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Neves-Ferreira *et al.*, 2010).

A antitoxina DM64 é uma glicoproteína ácida de 64 kDa, homóloga à alfa1Bglicoproteína humana e pertencente à superfamília gênica das imunoglobulinas. DM64 tem a capacidade de inibir a miotoxicidade *in vivo* e a citotoxidade *in vitro* das miotoxinas I (D49) e II (K49) isoladas do veneno de *Bothrops asper*, sem inibir a atividade enzimática da primeira. DM64 não interfere com a atividade hemorrágica e também não inibe a atividade proteolítica da jararagina (Rocha *et al.*, 2002). Este inibidor foi clonado e sua sequência de aminoácidos mostrou a existência de cinco domínios tipo-imunoglobulina, homólogos aos três domínios de DM43 (Rocha *et al.*, 2002) (Figura 6) e quatro sítios de glicosilação, sendo um no primeiro domínio, dois no segundo domínio e um no quarto domínio, determinados após a desglicosilação de peptídeos trípticos desta proteína pela enzima PNGase e sua subsequente análise por espectrometria de massas (Leon *et al.*, 2012).

Como descrito acima, as especificidades inibitórias de DM43 e DM64 são distintas e podem estar diretamente relacionadas com as suas estruturas proteicas. O alinhamento da sequência de alfa1B-glicoproteína com as sequências das antitoxinas DM43 e DM64 mostrou que DM64 possui 5 domínios tipo-imunoglobulina, assim como a alfa1B- glicoproteína. Por outro lado, DM43 alinha-se em seus 3 domínios N-terminais (Rocha *et al.*, 2002; Neves-Ferreira *et al.*, 2002; Trugilho, 2009). Estas proteínas apresentam 71% de identidade e 78% de similaridade entre suas sequências, sendo a principal diferença estrutural entre DM43 e DM64 os 2 domínios adicionais de DM64. Além disso, chama atenção um *gap* de quatro resíduos no terceiro domínio de DM64 (NEVES-FERREIRA et al., 2002; ROCHA et al., 2002) (Figura 6).

1° Do	mínio
DM43	LKAMDPTPPLWIKTESPSTPWT <mark>NVT</mark> LLCVATNTEELS <mark>F</mark> QVWKDGELLSTLPVVGLVGKFWLGPVTADNRGI <mark>V</mark> RCRILTSENDWTPLSAPVEVTGKEP
DM64	LLAMETTPRLWIETESPSTPWT <mark>NVT</mark> LQCVATNTEALS <mark>F</mark> QLWKDGELLSTLPPMGLVGKFSLGPVTDDNRGL <mark>V</mark> RCRILMFENTWTSPSEPVEVTGKEP
α1BG	AIFYETQPSLWAESESLLKPLA <mark>NVT</mark> LTCQA-HLETPD <mark>F</mark> QLFKNGVAQEPVHLDSPAIKHQF-LLTGDTQGR <mark>Y</mark> RCRSGL-STGWTQLSKLLELTGPKS
2° Do	mínio
DM43	LPAPSLHAEPGPWILPGLETKLHCRGMLLGMI <mark>F</mark> DLYQEGEQEPVKSSQTP-SAEATFIV <mark>NSTGNYS</mark> CLYRAPASAPSV <mark>NST</mark> PSETIHVVIPDF
DM64	LPAPLLRADPGPWILHGLETKLHCQGVLLGMIFDLYQEGEQEPVRSSHTP-GTEATFIV <mark>NNTGNYSC</mark> LYRAPAPASSVNSAPSETIHVVIPDL
α1BG	LPAPWLSMAPVSWITPGLKTTAVCRGVLRGVT <mark>E</mark> LLRREGDHEFLEVPEAQEDVEATFFVHQPG <mark>NYS</mark> CSYRTDGEGALSEPSATVTIEELAAPP
3° Do	mínio
DM43	$\label{eq:linear} LPKANFYILNDRDFRPGDIVTFSCWARFSEREYDLEFKLFKDGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGGKTSCRYRFRNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGFKTSCRYFFNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGFKTSCRYFFNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGFKTSCRYFFNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGFKTSCRYFFNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGFKTSCRYFFNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGFKTSCRYFFNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGFKTSCRYFFNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGFKTSCRYFFNGPPIWSEDSNVLELDLSTGGUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGFKTSCRYFFNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGFKTSCRYFFNGPPIWSEDSNVLELDLSTGQUETPVEVVPISDPMKVFFDLTAVGPKDGFKTSCRYFFNGPFNGFKTGGUETPVEVFFKTGGUETPVEVFFKTGGUETPVEVFFKTFFFTGFKTGFKTFFFTFFTFFFTFFTFFTFTFFTF$
DM64	LPKPDFHIYDNQVIRPGDSVTFGCWGRFSGLEFKLFKDGQEVFVPKQSSKDPKHIYFELTALGPEDGGKYSCRYRFRNGPPIWSEDSKQLELVLTTET
α1BG	PPVLMHHGESSQVLHPGNKVTLTCVAPLSGVDFQLRRGEKELLVPR-SSTSPDRIFFHLNAVALGDGGH <mark>Y</mark> TCRYRLHDNQNGWSGDSAPVELILSDET
4° Do	mínio
DM64	LAKPSLSVEPQETVISRGTKVTMRCQGAQPNVK <mark>F</mark> VLLKKGSPGHTLVLSSPESHVDFVLPNILSYDTG <mark>NFS</mark> CLYVQTEAPFAGSQRSEDVEIRVEGL
α1BG	LPAPEFSPEPESGRALRLRCLAPLEGAR <mark>F</mark> ALVREDRGGRRVHRFQSPAGTEALFELH <mark>NIS</mark> VADSAN <mark>MS</mark> CVYVDLKPPFGGSAPSERLELHVDGP
5° Do	mínio
DM64	LPKPTLHPVHP-VVAPGRDAILHCSGKIPNAH <mark>P</mark> QLFKDGEHEELEVSVLPIDDHAVNFLLKNINRQQGGK <mark>Y</mark> RCRYTTREDPILESEMSDPAELQVTGQ
a1BG	PPRPQLRATWSGAVLAGRDAVLRCEGPIPDVTELLREGETKAVKTVRTPGAAANLELIFVGPQHAGNVRCRYRSWVPHTFESELSDPVELLVAES

Figura 6 - Alinhamento das sequências de α1B-glicoproteína, DM43 e DM64. Destacados em vermelho estão os resíduos diferentes entre estas sequências. Em amarelo, estão assinalados os sítios de glicosilação experimentalmente determinados em DM43 e DM64; em cinza, os resíduos de cisteína que formam as pontes dissulfeto intra-domínio; em verde, os resíduos de fenilalanina e tirosina em posições conservadas, tipicamente encontrados em domínios tipo-imunoglobulina. Adaptado de Rocha et al. (2002).

1.6 Caracterização estrutural de proteínas

Avanços na compreensão molecular do fenômeno de resistência natural ao envenenamento por serpentes dependem não apenas da identificação dos inibidores proteicos envolvidos, mas também da caracterização de seus mecanismos de ação. Sabe-se que a função de uma proteína está intimamente ligada à estrutura terciária da mesma e, muitas vezes, sua interação com ligantes ou com outras proteínas e complexos proteicos leva à conformação ativa (Sieber e Marahiel, 2005). Entender a relação estrutura-função de proteínas/complexos proteicos, ou seja, a estequiometria da interação, estabilidade em solução, organização topológica, regiões de interação e conformação, é fundamental para a compreensão molecular de muitos processos biológicos (Benesch *et al.*, 2007).

A Biologia Estrutural surgiu na década de 1950, quando as primeiras estruturas cristalográficas de proteínas foram elucidadas por Max Perutz e Jonh Kendrew (Franklin e Gosling, 1953; Kendrew *et al.*, 1958; Perutz *et al.*, 1960; Watson e Crick, 1953); na década de 1980, a estrutura tridimensional de uma proteína foi determinada pela primeira vez utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) em solução (Wuthrich, 2001). Desde então, o entendimento molecular dos sistemas biológicos vem sendo cada vez mais detalhado. De acordo com o PDB (*Protein Data Bank*, www.pdb.org), existem aproximadamente 120 mil proteínas cujas estruturas tridimensionais foram elucidadas experimentalmente (Figura 7).



Figura 7 - Crescimento anual do número de estruturas proteicas depositadas no Protein Data Bank (PDB).(Adaptado de Protein Data Bank, 2017).

As principais técnicas utilizadas atualmente para determinação de estruturas são a cristalografia de raios-X (CRP)(Perrakis *et al.*, 1999), a ressonância magnética nuclear em solução (RMN)(Ketchem *et al.*, 1993) e a crio-eletromicroscopia (crio-EM)(Patwardhan e Lawson, 2016).

A cristalografia de raios-X é responsável por cerca de 90% das estruturas depositadas no PDB. A técnica é baseada no estudo do padrão de difração de um feixe de raios-X produzido por sua passagem por um cristal de proteína. O padrão de difração é convertido em um mapa de densidade eletrônica, onde o esqueleto carbônico da proteína será ajustado até que se obtenha a conformação final da proteína, ou seja, sua estrutura tridimensional. A técnica produz estruturas de altíssima qualidade e resolução. Entretanto, muitas proteínas são difíceis de cristalizar, já que a condição ideal de cristalização depende de inúmeros fatores, tais como: pH, força iônica, temperatura, natureza do solvente, grau de pureza, homogeneidade e concentração (Alberts *et al.*, 2007; Drenth, 1994). Mesmo quando se consegue o cristal da proteína, é possível que este não difrate o feixe de raios-X com resolução suficiente para se deduzir a estrutura tridimensional devido à heterogeneidade da fração proteica obtida.

A ressonância magnética nuclear (RMN) é responsável por cerca de 9% das estruturas encontradas no PDB. Esta técnica se baseia no fato de que os núcleos de átomos que possuem spin nuclear se orientam na presença de um campo magnético forte e esta orientação pode ser modificada pela absorção de energia. Esta energia é fornecida ao sistema através de pulsos de ondas de rádio (com tempo de duração na faixa de pico a milesegundo e potência fixa). O sinal de RMN é estudado quando os spins que tiveram sua orientação alterada com relação ao campo magnético do equipamento retornam à condição de equilíbrio, gerando um sinal de variação de intensidade no tempo, que será convertido para o domínio de frequência. Esta frequência depende da intensidade do campo magnético, do núcleo estudado e do microambiente estrutural da proteína em que o núcleo está inserido. Esta informação é extraída em diferentes tipos de experimentos que, em conjunto, fornecem restrições experimentais capazes de levar ao cálculo da estrutura tridimensional da proteína (Berg et al., 2002). A RMN de proteínas em solução é a única técnica capaz de determinar a estrutura e a dinâmica de movimentos da proteína (dinâmicas global e local) simultaneamente. Entretanto, a metodologia muda de acordo com a massa molecular da proteína, gerando limitações em diferentes etapas do processo. No geral, é necessário clonar e expressar heterologamente a proteína marcada com os isótopos de nitrogênio e carbono que possuem spin nuclear (para a RMN de proteínas, ¹⁵N e ¹³C), em concentrações na faixa de 600µM a 1mM, quando trabalhase com proteínas na faixa de 20 a 30 kDa. Acima desta faixa, é necessário substituir todos os núcleos de ¹H por deutério e utilizar metodologias diferenciadas de aquisição dos dados de RMN. Em alguns casos, é possível reduzir a proteína a seus domínios e estudá-los de forma isolada, juntando-os posteriormente para reconstruir a estrutura proteica completa (Alberts *et al.*, 2007).

A crio-EM tem obtido destaque nos últimos anos como uma nova ferramenta para elucidação da estrutura de grandes complexos de macromoléculas. Esta técnica permite a reconstrução tridimensional da estrutura da proteína a partir de um grande conjunto de imagens de microspia eletrônica de transmissão da proteína congelada sob diferentes técnicas (Frank, 2006). Apesar de ter sido considerada uma técnica de baixa/média resolução, novos avanços em crio-eletromicroscopia têm resultado em estruturas com resoluções menores que 4 Å (Patwardhan e Lawson, 2016). Uma limitação desta técnica é a massa molecular das proteínas que, no geral, precisa ser maior que 100 kDa. Em 2017, os cientistas Jacques Dubochet, Joachim Frank e Richard Henderson foram premiados com o Nobel de Química pelo desenvolvimento desta técnica.

Algumas proteínas e complexos proteicos não são passíveis de serem estudados por estas técnicas clássicas, sendo necessária a utilização de abordagens integrativas, baseadas em métodos bioquímicos e biofísicos, onde diversas técnicas de caracterização estrutural são utilizadas em conjunto, como por exemplo SAXS (espalhamento de raios-X a baixo ângulo), troca de hidrogênio/deutério (HDX), ligações cruzadas (*cross-linking*) acopladas à espectrometria de massas (estudado neste projeto), dentre outros (Figura 8), de forma a obter a maior quantidade de informações possíveis acerca das proteínas estudadas (Sali *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2013). Quando associadas à modelagem molecular, tais técnicas possibilitam a geração de modelos que apresentam uma grande riqueza de detalhes (*near-atomic resolution*)(Sinz *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015).


Figura 8 - Representação esquemática da abordagem integrativa em Biologia Estrutural. Figura extraída de http://carlomagno-group.org/integrative-methods

1.7 Espectrometria de massas aplicada ao estudo estrutural de proteínas

Desde o final da década de 1980, a espectrometria de massas vem sendo utilizada para molecular. sequenciamento/identificação, determinação de massa 0 а а caracterização/localização de modificações pós-traducionais e/ou a quantificação de peptídeos e proteínas (Altelaar et al., 2012; Chahrour et al., 2015; Cravatt et al., 2007; Domon e Gallien, 2015). A análise de biomoléculas sofreu grande impulso depois do desenvolvimento de métodos suaves de ionização, tais como o ESI (ionização por electrospray) e o MALDI (ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz)(Fenn et al., 1989; Karas e Hillenkamp, 1988). As fontes de ionização ESI ou MALDI podem ser hifenadas com diferentes tipos de analisadores de massas, tais como o quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), tempo de voo-tempo de voo (TOF-TOF), ion trap linear (LIT), ion trap-orbitrap (LTQ-Obitrap) e quadrupoloorbitrap (Q-Orbitrap) (Hu et al., 2005; Michalski et al., 2011). Outros componentes importantes dos espectrômetros de massas são os detectores de íons (ex.: eletromultiplicadores ou sistema de detecção de imagem de corrente) e os sistemas computadorizados para controlar automaticamente a aquisição de dados (Cañas et al., 2006).

Para a análise de amostras complexas em larga escala (proteômica *shotgun*), o mais comum atualmente é o fracionamento prévio dos peptídeos por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC)(Altelaar *et al.*, 2012; Larance e Lamond, 2015).

A espectrometria de massas é uma técnica analítica sensível, acurada, rápida, bastante flexível e altamente reprodutível, sendo bastante consolidada quando se trata de caracterizações envolvendo a estrutura primária de proteínas. Entretanto, o emprego desta técnica para a análise de estruturas terciárias e quaternárias ainda é pouco difundido (Zhang *et al.*, 2013; Borch *et al.*, 2005). Desde o início dos anos 2000, a utilização da abordagem integrativa, que consiste na utilização de diversas técnicas de caracterização estrutural complementares, vem se tornando mais popular. Uma das opções é a associação da estratégia de *cross-linking* (ligações cruzadas) com a espectrometria de massas, com o objetivo de se obter o maior número possível de restrições espaciais que ajudem na predição da estrutura tridimensional de proteínas e complexos proteicos (Sali *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2013).

1.8 Cross-linking associado à espectrometria de massas (XL-MS)

Os primeiros experimentos utilizando a técnica de *cross-linking* foram realizados para determinação do sítio ativo de enzimas e datam da década de 1920. Após 1950, a técnica passou a ser utilizada para estabilizar proteínas, imobilizá-las em suportes sólidos, acoplar duas ou mais proteínas e caracterizar interações proteína-proteína (Hermanson, 2008; Means e Feeney, 1990; Wong, 1991). Entretanto, quando passou a ser associada à espectrometria de massas, a estratégia de *cross-linking* ganhou espaço como importante ferramenta para análise da conformação tridimensional de proteínas e complexos proteicos (Sinz *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015).

O *cross-linking* é uma modificação química que resulta na ligação de duas espécies (proteínas, peptídeos, moléculas orgânicas etc.) por meio de interações covalentes, muitas vezes realizadas através da utilização de um agente de ligação cruzada (*ALC*), que permite a estabilização de estruturas quaternárias de proteínas, a determinação do tipo de enovelamento (Chen *et al.*, 2010; Dihazi e Sinz, 2003), o monitoramento de mudanças conformacionais após interação com um ligante (Carven e Stern, 2005; Huang e Kim, 2006), a determinação de limites de distância entre os resíduos de aminoácidos de uma mesma proteína ou de proteínas diferentes, a identificação de interações entre parceiros (El-Shafey *et al.*, 2006; Kitatsuji *et al.*,

2007; Rappsilber *et al.*, 2000) e o estudo estrutural de complexos proteicos (Leitner, 2016; Sinz, 2003).

Quando utilizada para proteínas ou complexos proteicos, as cadeias laterais dos dois resíduos de aminoácidos espacialmente próximos e que se localizam em uma região da proteína acessível ao solvente, são unidos pelos agentes de ligação cruzada, restringindo a dinâmica conformacional da proteína. Este *ALC* funciona como uma "régua" molecular espaçadora, que permite inferir distâncias entre as cadeias laterais destes resíduos em solução. Os *ALC* são compostos orgânicos constituídos por uma cadeia carbônica de tamanho variável e duas extremidades que podem reagir com grupos funcionais idênticos (homobifuncionais) ou diferentes (heterobifuncionais) (Sinz, 2006). Existe ainda uma terceira classe de *ALC* conhecida como *zero-length*, capaz de catalisar a ligação covalente entre grupamentos amino e carboxila espacialmente muito próximos (< 3 Å), sem a introdução de cadeias espaçadoras (Wong, 1991; Sinz, 2006). A escolha do *ALC* ideal depende não só de sua solubilidade, tamanho e geometria, mas também da frequência/distribuição espacial dos resíduos-alvo de aminoácidos em diferentes proteínas (Hermanson, 2008; Wong, 1991).

Dentre os agentes de ligação cruzada disponíveis no mercado atualmente, os mais utilizados são os ésteres derivados da N-hidroxisuccinimida (NHS) como, por exemplo, o DSS (suberato de disuccinimidila) e seus derivados solúveis sulfo-NHS, como o BS³ (suberato de bis[sulfosuccinimidila])(Figura 9). Estes *ALC*s são de fácil obtenção, apresentam bom rendimento de reação e geram produtos de ligação cruzada cujo padrão de fragmentação por MS/MS é bem conhecido. Além disto, têm como alvo principal o grupamento épsilon-amino de lisina, resíduo bastante frequente na maior parte das proteínas, localizado preferencialmente na superfície das mesmas, portanto mais exposto ao solvente (Staros, 1982; Leitner *et al.*, 2010).



Figura 9 - Estrutura molecular do suberato de dissuccinimidila (DSS) e do suberato de bis[sulfosuccinimidila](BS³). Adaptado de (Shi *et al.*, 2017).

Outros agentes de ligação cruzada menos utilizados são os trifuncionais, que possuem um terceiro grupamento funcional (ex.: biotina), permitindo a posterior purificação dos produtos de reação; os cliváveis, que podem ter a ligação cruzada desfeita, facilitando a identificação dos peptídeos; e os marcados isotopicamente, que funcionam como indicadores da presença do produto de *cross-linking*, aumentando as chances de identificação (Sinz, 2003; 2006; Merkley *et al.*, 2013).

A utilização do *cross-linking* associado à espectrometria de massas permite a identificação das espécies moleculares ligadas pelos *ALC*s e a consequente obtenção de informações estruturais desejadas visto que, sabendo o comprimento dos *ALC*s, é possível inferir os limites máximos de distância espacial entre os dois resíduos ligados.

Nestes experimentos, também chamados de XL-MS (Figura 10), normalmente emprega-se a estratégia *bottom-up*, onde a proteína (ou o complexo proteico) é estabilizada covalentemente a partir do uso de um *ALC* específico e submetida à digestão enzimática. Os peptídeos resultantes, ligados cruzadamente ou não, são identificados por espectrometria de massas. Sabendo-se o comprimento do *ALC* e a especificidade da reação, é possível inferir as restrições de distância máxima entre os resíduos de aminoácidos ligados cruzadamente. A partir desta informação, é possível construir um mapa das restrições de distância encontradas e utilizá-lo para selecionar modelos estruturais compatíveis com os dados experimentais.



Figura 10 - Representação esquemática de um experimento típico de *cross-linking* com análise por espectrometria de massas. Na técnica de *cross-linking*, o complexo proteico ou proteína de interesse é estabilizado covalentemente utilizando reagentes chamados agentes de ligação cruzada. Após a estabilização, a amostra sofre uma digestão enzimática (ex.: Lys-C e tripsina), seguida da análise por espectrometria de massas. Para triagem automática dos *cross-links* obtidos, utiliza-se um *software* específico (ex.: SIM-XL), seguido de validação manual dos espectros. Estes resultados geram um mapa de restrições de distância, que poderá ser usado para filtrar modelos estruturais ou guiar a análise de *docking* proteína-proteína (Adaptado de www.dalton.com.br).

Após a digestão enzimática, três tipos diferentes de produtos de *cross-linking* podem ser observados (Figura 11): *dead-ends*, observados quando somente uma extremidade do *ACL* reage com a proteína (a outra extremidade é hidrolisada e, portanto, pode servir para indicar regiões da proteína expostas ao solvente); *cross-links* intra-moleculares, quando ambas extremidades do *ACL* reagem com resíduos de aminoácidos presentes no mesmo peptídeo; e *cross-links* inter-moleculares, quando os resíduos ligados cruzadamente encontram-se em peptídeos distintos. Estes peptídeos podem ser de uma mesma proteína (sendo, portanto, sugestivos do enovelamento proteico) ou de proteínas diferentes (no caso de complexos proteicos). Neste último caso, os resíduos envolvidos na ligação cruzada serão indicativos da circunvizinhança da região de interação entre duas proteínas, já que os resíduos da interface de interação não são acessíveis ao solvente e, portanto, não reagem com os *ALC* (Sinz, 2014). Por convenção, o peptídeo com a cadeia mais longa é denominado alfa (α), enquanto que o menor é referido como beta (β).



Figura 11 - **Possíveis produtos da reação de** *cross-linking* **utilizando BS³.** As reações cruzadas estão representadas em vermelho.

A análise dos dados de *cross-linking* não é trivial, já que a reação é tipicamente subestequiométrica, ou seja, a maior parte dos peptídeos gerados após digestão enzimática não apresentará modificações (Sinz, 2006; Singh *et al.*, 2010). Estes peptídeos, conhecidos como lineares, não geram qualquer tipo de informação estrutural, contribuindo negativamente para aumentar o intervalo dinâmico das amostras. Uma alternativa é submeter as amostras a uma etapa anterior de enriquecimento utilizando cromatografias de troca catiônica forte (já que peptídeos modificados possuem maior estado de carga do que os peptídeos lineares)(Rinner *et al.*, 2008) ou exclusão molecular (já que os peptídeos modificados são maiores do que peptídeos lineares)(Leitner *et al.*, 2012). Adicionalmente, peptídeos com várias modificações ocorrendo de forma simultânea e fragmentos com diferentes estados de carga também podem ser detectados, aumentando consideravelmente o grau de complexidade das análises (Sinz, 2003).

Atualmente, a nanocromatografia líquida em coluna de fase reversa acoplada a um espectrômetro de massas do tipo Orbitrap, com fonte nanoeletrospray (nESI), é a melhor alternativa metodológica disponível para análise das amostras complexas de cross-linking. Isto porque estes analisadores de massas (ex.: QExactive Plus/HF, Orbitrap Fusion/Lumus) permitem a aquisição de dados de MS1 e MS2 em alta resolução, aumentando significativamente a confiabilidade dos resultados gerados (Zubarev e Makarov, 2013). No espectrômetro de massas, os peptídeos são inicialmente ionizados por protonação, mais frequentemente utilizando a técnica de *electrospray*, sendo posteriormente separados em fase gasosa de acordo com sua relação massa/carga (m/z) e detectados (ex.: sistema de imagem de corrente), gerando espectros de MS1 com grande exatidão de massa (erro ≤ 5 ppm). Em seguida, íons precursores selecionados a partir dos espectros MS1 são submetidos individualmente à colisão controlada com gás inerte (ex.: HCD ou Higher Energy Collisional Dissociation), induzindo a fragmentação preferencial das ligações peptídicas e a geração de um conjunto de íons cujas massas são analisadas no espectro de MS2. Duas séries complementares de íons-fragmento com número crescente de resíduos são geradas preferencialmente neste processo: série b, cujos íons-fragmento preservam o resíduo Nterminal do íon precursor; série y, que preserva o resíduo C-terminal do peptídeo precursor. Analisando as diferenças de massas entre os íons-fragmento sequenciais de uma mesma série, é possível inferir a sequência do peptídeo. Os íons-fragmentos sequenciais da série b fornecem a sequência do peptídeo na direção N-terminal -> C-terminal, enquanto que a sequência da série y é lida no sentido contrário (Seidler et al., 2010).

Em 2000, surgiram os primeiros *softwares* utilizados para identificação dos peptídeos modificados por ligação cruzada (Gotze *et al.*, 2012; Mcilwain *et al.*, 2010). Estes eram versões adaptadas de *softwares* de proteômica convencional e apresentavam baixa sensibilidade, além de possuírem uma interface de difícil compreensão, que não ajudava nas análises destes dados. Em 2014, nosso grupo de pesquisa colaborou no desenvolvimento do *software* SIM-XL, dedicado às análises de dados de *cross-linking*, com interface de visualização dos espectros de massas, além de uma série de filtros e ferramentas gráficas (ex.: 2D *map, heat map*) que facilitaram enormemente o processo de validação da grande quantidade de resultados gerados (Lima *et al.*, 2015). Nos último anos, outros *softwares* dedicados, apresentando uma interface mais amigável e com alta sensibilidade, também foram disponibilizados por outros grupos trabalhando na área (Belsare *et al.*, 2014; Sarpe *et al.*, 2016).

Apesar de todo o potencial da técnica de XL-MS, atualmente não há um consenso na literatura sobre como eles podem/devem ser utilizados para a elucidação da estrutura tridimensional de proteínas. Como mencionado anteriormente, devido às limitações que as técnicas clássicas de determinação de estrutura de proteínas apresentam e o alto custo operacional das mesmas, cada vez mais tem-se procurado o desenvolvimento de técnicas alternativas, como o XL-MS, que possam levar ao aumento do número de estruturas elucidadas via associação de técnicas computacionais de modelagem (métodos *in silico*) com dados de restrições de distâncias obtidos empiricamente.

1.9 Predição de estrutura tridimensional de proteínas por métodos in sílico

A maioria das estruturas tridimensionais de proteínas depositadas foram elucidadas com a utilização de técnicas experimentais, como a cristalografia de raios-X e a RMN. Entretanto, como discutido anteriormente, nem todas as proteínas são susceptíveis a tais metodologias. Desta forma, métodos computacionais (*in silico*) para determinação de estrutura constituem uma alternativa interessante (Gibas e Jambeck, 2001).

As primeiras técnicas para modelagem molecular *in silico* foram divididas em três grupos: modelagem comparativa, modelagem por predição de enovelamento (*threading*) e modelagem por predição *ab initio*, sendo a modelagem comparativa (ou por homologia) a técnica mais dependente de informações disponíveis em bancos de dados. Entretanto, a distinção entre tais técnicas não é trivial e, atualmente, utiliza-se a seguinte classificação mais ampla: a) métodos baseados em estruturas-molde ou *template-based modeling* (ex.: modelagem comparativa e *threading*); b) métodos independentes de estruturas-molde ou *template-free modeling* (ex.: predição por primeiros princípios ou *ab initio*) (Verli, 2014).

A modelagem comparativa é empregada para proteínas homólogas, ou seja, que possuem um ancestral comum, sendo evolutivamente relacionadas. Neste caso, é de se esperar que apresentem sequências e estruturas com certo grau de similaridade. A estratégia busca por sequências de proteínas semelhantes à sequência da proteína-alvo (cuja estrutura se pretende determinar) que estejam depositadas em bancos de dados de estruturas (ex.: PDB). Esta informação servirá de guia para predizer a estrutura tridimensional do homólogo desconhecido (Orengo *et al.*, 2003).

Proteínas que possuam semelhanças estruturais tendem a apresentar a mesma função biológica e, desta forma, podem ser agrupadas em famílias, em função da sua provável origem comum. De um modo geral, para cada proteína existem diversas proteínas semelhantes que podem ter suas estruturas utilizadas como moldes homólogos (Becker *et al.*, 2001). No entanto, algumas sequências de proteínas possuem alta similaridade (cerca de 75%), apesar de mostrarem estruturas tridimensionais significativamente diferentes, o que representa uma importante limitação da estratégia de modelagem por homologia (Kosloff e Kolodny, 2008).

O processo de modelagem comparativa tem início com a identificação de proteínas homólogas que possuam estrutura conhecida e que mostrem similaridade de sequência (preferencialmente > 40%) com a proteína alvo, para serem utilizadas como molde. Neste processo, utiliza-se frequentemente a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para alinhar a sequência de aminoácidos da proteína-alvo com sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados de estruturas (ex.: PDB), de forma a selecionar, com base na família e na função biológica da proteína de interesse, uma lista de candidatos à proteína-molde. Quando o alinhamento entre as sequências é baixo, pode ser necessário utilizar mais de uma sequência de proteína (Orengo *et al.*, 2003). Em seguida, tem-se a construção do modelo para a proteína-alvo e, por fim, a avaliação e o refinamento do modelo construído (Verli, 2014; Orengo *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2001; Fiser, 2010; Marti-Renom *et al.*, 2000; Modi *et al.*, 2016).

A homologia vem se mostrando uma estratégia de grande importância, auxiliando inclusive na compreensão da interação de complexos proteicos, sem que as estruturas individuais tenham sido elucidadas (Ogawa e Toyoshima, 2002). Apesar dos resultados significativos, ainda faz-se necessário o desenvolvimento de métodos mais eficientes para construção, alinhamento e refinamento de estruturas, a fim de evitar erros nessas fases e, consequentemente, a geração de modelos errôneos (Cavasotto e Phatak, 2009).

A técnica de predição de enovelamento ou *threading* também utiliza conhecimento *a priori* para predizer estruturas de proteínas (Jones *et al.*, 1992). Em geral, ela é empregada quando o grau de identidade de sequência entre a proteína-alvo e as sequências-molde depositadas no banco de dados é baixo (20-30%). Nesta abordagem, utiliza-se uma biblioteca de padrões de enovelamento para uma determinada sequência de aminoácidos, comparando-se trechos de sequências entre a proteína-alvo e proteínas-molde, com foco na conservação de estruturas secundárias (Shao *et al.*, 2011). Segmentos peptídicos presentes na biblioteca construída que possuam maior similaridade com a proteína-alvo serão escolhidos. Esta ação é repetida até que toda a sequência da proteína-alvo tenha sido completamente percorrida. Conforme novos trechos da proteína-alvo são formados, os modelos obtidos são avaliados até que se encontre o mais satisfatório. Os parâmetros que são levados em conta na construção do modelo incluem: 1) similaridade entre as sequências (proteína-alvo e proteína-alvo e proteínas-molde); 2)

ambiente da proteína-alvo (viabilidade, compatibilidade de regiões de estrutura secundária e global); 3) comparação da energia da estrutura da proteína-alvo com a energia das estruturasmolde existentes; 4) penalização das regiões de *gap*, onde não é possível o alinhamento com sequências das proteínas-alvo (Zaki e Bystroff, 2008).

Quando a proteína-alvo possui baixa ou nenhuma identidade com estruturas conhecidas, a opção é usar o método *ab initio*, que se baseia na sequência primária para predizer o estado nativo (ou um conjunto destes)(Anfinsen, 1973), localizado no mínimo global de energia livre (estado termodinamicamente mais estável) (Verli, 2014; Khoury *et al.*, 2014). A busca pelo mínimo global é custosa computacionalmente, já que os métodos de busca conformacional lidam com um conjunto de possibilidades conformacionais muito grande. O método *ab initio* é bastante complexo e difícil e está limitado a sequências mais curtas (< 100 resíduos)(Verli, 2014). Alguns algoritmos (ex.: ROSETTA e I-TASSER) utilizam métodos híbridos que englobam, além dos potenciais de interação, termos estatísticos derivados de proteínas com estruturas conhecidas, sendo denominados métodos semi-*ab initio* (Brasil *et al.*, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Vários inibidores de fosfolipases de veneno de serpentes foram clonados e caracterizados. Entretanto, os mecanismos moleculares e os determinantes estruturais envolvidos na resistência de serpentes e mamíferos aos efeitos tóxicos do envenenamento ofídico ainda não foram completamente elucidados. Há muitos anos, o Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz vem estudando proteínas presentes no soro do gambá Didelphis aurita que conferem a ele imunidade natural ao envenenamento ofídico. Entretanto, a relação estruturafunção destas proteínas antiofídicas ainda é amplamente ignorada. O grande desafio atualmente é correlacionar a função biológica à estrutura tridimensional de proteínas e complexos proteicos. Ainda que consideradas como padrão-ouro para caracterização estrutural de proteínas, técnicas como cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear possuem importantes limitações (ex.: tamanho da molécula e dificuldade de cristalização). Desta forma, abordagens híbridas associadas à espectrometria de massas vêm ganhando espaço e sendo cada vez mais utilizadas. Nesta dissertação, utilizaremos a espectrometria de massas em associação com a técnica de cross-linking para a caracterização estrutural da proteína antimiotóxica DM64, incluindo o mapeamento de suas regiões de interação com a miotoxina II (K-49) de Bothrops asper. Os resultados deverão subsidiar estudos biotecnológicos futuros, visando a utilização da DM64 como modelo (template) para o desenvolvimento de novas drogas especificamente desenhadas para minimizar os graves danos teciduais locais frequentemente observados nos acidentes com venenos viperídeos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar as bases estruturais da inibição da miotoxina II do veneno de *Bothrops asper* pela proteína antimiotóxica DM64 de *Didelphis aurita*

3.2 Objetivos Específicos

Estabilização do complexo não-covalente formado entre a DM64 e a miotoxina II (K49) isolada do veneno de *Bothrops asper* utilizando diferentes estratégias de *cross-linking* (BS³ ou XPlex), seguido de hidrólise enzimática e identificação dos peptídeos ligados cruzadamente por espectrometria de massas de alta resolução;

 Análise dos espectros de fragmentação (MS/MS) utilizando o *software* SIM-XL e verificação manual da qualidade dos espectros obtidos;

Validação dos *links* observados através da medida das distâncias (euclidiana e topológica) entre os carbonos beta dos resíduos envolvidos nos *cross-links* e utilização dos dados confiáveis em abordagens estruturais *in sílico* (modelagem molecular e *docking* molecular);

Geração de um modelo que represente a estrutura da antimiotoxina DM64, em consonância com os dados empíricos obtidos por *cross-linking*.

Análise da interação entre DM64 e miotoxina II com tese nos *inter-links* observados e nas estruturas disponíveis das proteínas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Antitoxina DM64 e miotoxina II

A miotoxina II (PLA₂ da classe K49) isolada do veneno de *Bothrops asper* foi doada pelo Dr. Bruno Lomonte, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. O soro de *Didelphis aurita* foi gentilmente cedido pelo Dr. Paulo Sergio D'Andrea, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, IOC-Fiocruz, Rio de Janeiro. Os gambás foram capturados e manipulados em consonância com a legislação vigente (Licença permanente para coleta de material zoológico IBAMA/SISBIO 13373-1, emitida em 19/11/2007 e Licença CEUA/Fiocruz LW-39/14, válida até 19/05/2018, respectivamente). A preparação homogênea da antitoxina DM64 do soro do gambá foi obtida como descrito previamente, utilizando cromatografias de troca aniônica em DEAE-Sephacel e afinidade em coluna Hitrap-NHS, contendo miotoxina I de *B. asper* imobilizada (Neves-Ferreira *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2002)

4.2 Reação de cross-linking utilizando o agente BS³

O inibidor DM64 foi dessalinizado utilizando uma coluna ZebaTM spin desalting (0,5)mL/ 7K MWCO), equilibrada com tampão HEPES 20 mM pH 7,5. A miotoxina II foi isolada do veneno de Bothrops asper utilizando cromatografia de fase reversa como último passo cromatográfico. Desta forma, a amostra liofilizada foi dissolvida diretamente no tampão HEPES, sem necessidade de dessalinização prévia. O conteúdo proteico das amostras foi estimado com base em seus coeficientes de extinção molar a 280 nm (Pace et al., 1995), utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fischer): miotoxina II, 21.275 M⁻¹ cm⁻¹ (1 mg/mL = 1,52 AU) e DM64, 57.005 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (1 mg/mL = 0,89 AU). DM64 (20 µg) foi incubada com miotoxina II (razões molares 1:1 ou 1:2, DM64:miotoxina) em tampão HEPES 20 mM pH 7,5, por 15 min, a 25°C e, em seguida, o complexo foi estabilizado covalentemente com o reagente de cross-linking BS³ (Thermo Scientific), por 90 min, utilizando um excesso de 20 x em peso sobre a quantidade de proteína (equivalente a 1:2800, proteína:BS³, mol/mol).Concentrações menores de BS³ também foram testadas (1:2000 mol/mol, 1:1000, 1:500 e 1:100). A reação foi interrompida pela adição de bicarbonato de amônio (q.s.p. 20 mM) e monitorada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 %T, tanto em condições nativas quanto desnaturantes (Laemmli, 1970), seguido de revelação com nitrato de prata. O

inibidor e a toxina também foram incubados separadamente com o agente de *cross-linking*, sendo utilizados como controles do experimento. O BS³ em excesso foi retirado das amostras, após a reação de *cross-linking*, por cromatografia de exclusão molecular utilizando-se uma coluna Superdex 200 HR (1 x 30 cm) (GE Healthcare) equilibrada com tampão HEPES 20 mM pH 7,5, eluída a 0,5 mL/ min e monitorada a 220 nm em um sistema Akta P*urifier*. As amostras estabilizadas covalentemente foram dessalinizadas utilizando microcolunas empacotadas com resina Poros R1 (Applied Biosystems) e secas na centrífuga a vácuo (*speed vac*). Antes da cromatografia, uma alíquota correspondendo a 10% do volume total de reação foi retirada para análise por eletroforese em condições nativas e desnaturantes. O experimento de *cross-linking* utilizando BS³ foi repetido pelo menos duas vezes, como detalhado na Tabela 2.

	AMOSTRA	# EXPERIMENTO (data)	ENZIMA	# RAW FILES	sNCE	COLUNA (µm bead)	TOTAL RAW FILES	Estequiometria (DM64:MTX-II)
BS ³	COMPLEXO	1 (07/07/2015)	Tripsina	5	30-40	1,9	17	1:2 mol/mol
		2 (14/07/2015)	Tripsina + AspN	8				1:2 mol/mol
		3 (05/08/2015)	Tripsina + LysC	4				1:1 mol/mol
	DM64 (controle)	1 (07/07/2015)	Tripsina	4			8	1:2 mol/mol
		3 (05/08/2015)	Tripsina + LysC	4				1:1 mol/mol
	MIOTOXINA (controle)	3 (05/08/2015)	Tripsina + LysC	4			4	1:1 mol/mol
	COMPLEXO	1 (07/2016)	Tripsina + LysC	5	28-33	1,9	- 18	1:1 mol/mol
xPLEX				5	30-40	1,9		
		2 (10/2016)		4	28-33	3		1:1 mol/mol
				4	30-40	3		
	DM64 (controle)	1 (07/2016)		12	28-33	1,9	- 27	1:1 mol/mol
				11	30-40			
		2 (10/2016)		2	28-33	3		1:1 mol/mol
				2	30-40			
	MIOTOXINA (controle)	1 (07/2016)		6	28-33	1,9	16	1:1 mol/mol
				6	30-40			
		role) 2 (10/2016)		2	28-33	3		1:1 mol/mol
				2	30-40			

Tabela 2 - Detalhamento de todos os experimentos de cross-linking analisados nesta dissertação

4.3 Reação de cross-linking utilizando a estratégia XPlex

Para os ensaios utilizando a estratégia de XPlex, as amostras de DM64 e miotoxina II foram preparadas e pré-incubadas como descrito acima, substituindo-se o tampão HEPES pelo tampão MOPS (ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico) 100 mM pH 6,5. Para a reação de cross-linking, utilizou-se o protocolo desenvolvido pela Dra. Mariana Fioramonte em sua tese de doutorado na UNICAMP (Fioramonte, 2016). Trata-se de uma estratégia que consiste na ativação de resíduos ácidos (Asp ou Glu), seguida da reação com uma diamina, levando à formação de ligações amida entre esta última e os resíduos ácidos ativados. Alternativamente, estes resíduos podem reagir diretamente com resíduos de Lys ou N-terminal (ou, eventualmente, Ser), sem a participação da diamina, gerando cross-links do tipo zero-length. À solução de proteína (q.s.p. 5-10 µM, no volume final de reação), foram adicionados os seguintes reagentes, previamente dissolvidos em MOPS e ajustados para pH 6,5: HOBt (Nhidroxibenzotriazol, excesso molar de 500 vezes em relação à proteína), diamina (1,6diaminohexano, excesso molar de 1000 vezes) e EDC [cloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3etilcarbodiimida, excesso molar de 2000 vezes]. A reação ocorreu por 2 horas, a 30°C, sob agitação. Após este período, a reação foi interrompida por precipitação com uma mistura de etanol/acetona gelada, por 12 horas, a 4 °C. Antes da precipitação, uma alíquota correspondendo a 10% do volume total de reação foi retirada para análise por eletroforese em condições nativas e desnaturantes (Laemmle, 1970). O experimento de cross-linking utilizando a estratégia XPLex foi repetido duas vezes, como detalhado na Tabela 2.

4.4 Desnaturação e hidrólise das proteínas com as endopeptidases Lys-C e tripsina

As amostras de *cross-linking* (complexo, DM64 e miotoxina II) provenientes das duas metodologias empregadas foram ressolubilizadas em 20 µL de bicarbonato de amônio 0,4 M contendo ureia 8 M. As amostras foram reduzidas por 3 horas, a 37°C, em 10 mM de ditiotreitol (DTT), seguido de alquilação em 25 mM de iodoacetamida (IAA) por 15 minutos à temperatura ambiente (protegido da luz) e, por último, um passo de *quenching* do excesso de IAA por DTT, por mais 15 minutos, ao abrigo da luz. Após diluição da ureia para 1 M, a digestão foi realizada com a adição de Lys-C (Wako), na proporção de 1:100(enzima:proteína, p/p), por 18-24 h, a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido fórmico (q.s.p.

1%), seguido da dessalinização das amostras utilizando micro colunas POROS R2 (Applied Biosystems), equilibradas em TFA 1% e lavadas com TFA 0,1% após adição da amostra. Os peptídeos foram eluídos da coluna com TFA 0,1 % em acetonitrila 70 % e secos no s*peed-vac*. Apenas para BS³, testamos inicialmente as hidrólises somente com tripsina ou com tripsina + Asp-N (1:50)(vide detalhes na Tabela 2).

4.5 Identificação dos peptídeos ligados cruzadamente por espectrometria de massas

A mistura de peptídeos descrita acima foi ressolubilizada em ácido fórmico 1%, seguido de misturação no vortex e incubação no banho ultrassom por 10 min. Após leitura da absorvância a 280 nm no nanodrop para estimativa do conteúdo de peptídeos (considerandose, para um caminho óptico de 1 cm, 1 unidade de absorvância equivalente a 1 µg/µL), as amostras (~ 1 µg) foram submetidas à nanocromatografia de fase reversa no cromatógrafo Ultimate 3000 (Dionex) acoplado à fonte de nanoelectrospray do espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-Orbitrap QExactive Plus. As amostras foram aplicadas inicialmente a 2 µL/min em uma pré-coluna de 2 cm de comprimento (diâmetro de 100 µm, partículas de 5 µm e poro 200 Å) e posteriormente fracionadas a 200 µL/min em coluna de 40 cm de comprimento (diâmetro de 75 µm, partículas de 1,9 µm ou 3 µm e poro 200 Å) equilibrada com solução A (0,1% de ácido fórmico em água). Todas as amostras foram analisadas pelo menos em duplicata técnica (vide detalhes na Tabela 2), utilizando um gradiente linear de 0-50% de solução B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila) em 162 minutos (0,3% B/min), seguido de gradiente até 80% de B em 4 minutos e eluição isocrática nesta condição por 2 minutos adicionais. A análise dos peptídeos foi feita no espectrômetro de massas Q-Exactive Plus (Thermo Scientific), operando no modo de aquisição dependente de dados, utilizando condições otimizadas para amostras de cross-linking. Os espectros de MS1 foram adquiridos em modo profile, com 70.000 de resolução (FWHM m/z 200), na faixa de m/z de 200-1800, automatic gain control (AGC) de 1 x 10⁶, maximum injection time (IT) de 100 ms. Os íonsprecursores mais intensos (até seis íons por espectro de varredura, com $z \ge 3$) foram selecionados para fragmentação por HCD, utilizando duas energias de colisão normalizadas em sequência (Stepped Normalized Collision Energy ou sNCE): 30-40 e/ou 28-33)(vide Tabela 2). Utilizamos janelas de isolamento de 3 e/ou 2 m/z (offset de 0,5 m/z) e exclusão dinâmica de 60 segundos. Os espectros de fragmentação foram adquiridos no modo centroide, com 35.000 de resolução, AGC de 5 x 10^5 , IT de 100 ms e a primeira massa fixada em m/z200.

4.6 Interpretação e validação dos resultados de *cross-linking*

A interpretação dos resultados de *cross-linking* foi feita automaticamente pelo *software Spectrum Identification Machine for Cross-linked Peptides* (SIM-XL, disponível em <u>http://patternlabforproteomics.org/sim-xl</u>), versão 1.3.1 (Lima *et al.*, 2015). Os parâmetros utilizados foram: \leq 3 clivagens perdidas, tolerância de 5 ppm para MS1 e MS2, modificação fixa em cisteína (carbamidometil) e banco de dados composto exclusivamente pelas seuqências FASTA das proteínas DM64 e miotoxina II. Após uma etapa inicial de filtragem automática dos dados, foi feita uma verificação manual da qualidade dos espectros dos *crosslinks* candidatos (para detalhes, ver Resultados e Discussão).

A validação dos *links* de alta confiança observados foi realizada pela medida das distâncias euclidiana (menor distância entre dois pontos, ignorando-se a eventual penetração em segmentos da estrutura proteica) e topológica (distância normalmente não linear, considerando apenas o caminho acessível ao solvente ou *"solvent accessible surface distance"*)(Kahraman *et al.*, 2011) entre átomos selecionados dos resíduos envolvidos na reação. Todas as medidas foram feitas pelo *software* Topolink (L. Martínez *et al.*, 2017).

Os dados produzidos pelo programa Topolink foram visualizados pelo *software* de visualização de estruturas tridimensionais VMD (*Visual Molecular Dynamics*) (Humphrey *et al.*, 1996). As restrições de distância violadas foram representadas por uma reta tracejada, colorida em vermelho, representando a distância euclidiana entre os dois pontos, medida em angstrons. As restrições validadas foram representadas por sua distância topológica, ou seja, pelo caminho encontrado pelo *software* Topolink entre os dois resíduos relacionados na superfície da proteína, representado pelo conjunto bastão/esfera colorido em verde.

Os limites de distância considerados na validação dos *cross-links* estão relacionadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Distâncias máximas permitidas, calculada pelo software TOPOLINK, para cada um dos resíduos envolvidos na reação de *cross-linking.* Em todos os casos, considerou-se a distância entre os átomos de carbono beta (CB-CB) dos resíduos.

Diamina (CB-CB)					
Resíduo1	Resíduo 2	Distância (Å)			
Glu	Glu	16.9			
Glu	Asp	15.6			
Asp	Asp	14.3			
	ZL (CB-CB)				
Resíduo1	Resíduo 2	Distância (Å)			
Asp	Lys	11,4			
Glu	Lys	12,7			
Glu	Ser	8,8			
Asp	Ser	7,5			
BS3 (CB-CB)					
Resíduo1	Resíduo 2	Distância (Å)			
Lys	Lys	22,1			
Lys	Ser	18,2			

O resultado final do *software* Topolink foi validado utilizando-se a codificação descrita na Tabela 4.

Tabela 4 -	Códigos	utilizado	pelo software	Topolink
------------	---------	-----------	---------------	----------

Código	Descrição
	Uma distância topológica válida foi encontrada e é consistente com
OK. FOUND	todas as observações.
	Uma distância topológica válida foi encontrada, entretanto é mais
OK: LONG	longa do que a extensão do linker. Porém, como o link não foi
	observado, o resultado é consistente com as observações.
OK. EUCI	A distância euclidiana ultrapassa o limite do linker. Porém, como o
OK: EUCL	link não foi observado, o resultado é consistente com as observações.
	Uma distância topológica válida não foi encontrada, mas a distância
OK: NOTFOUND	euclidiana é menor do que o comprimento do linker. Porém, como o
	<i>link</i> não foi observado, o resultado é consistente com as observações.
	Uma distância topológica foi encontrada menor que a extensão do
BAD: SHORT	linker. Como o link não foi observado, o resultado é não é consistente
	com as observações.
	Uma distância topológica foi encontrada e o <i>link</i> foi observado.
BAD: LONG	Entretanto, a distância é maior que o comprimento do <i>linker</i> . Portanto,
	o resultado não é consistente com as observações.
RAD. ELICI	O link foi observado, mas a distância euclidiana no modelo é muito
DAD. EUCL	longa para ser considerada.
	O link foi observado, a distância euclidiana está dentro dos limites,
DAD. NOTFOUND	mas uma distância topológica válida não foi encontrada.
BAD MISSING	O link não foi observado, mas deveria ter sido, dado que a distância
	topológica encontrada estava dentro do limite aceitável.

4.7 Predição da estrutura molecular de DM64

A modelagem molecular de DM64 foi realizada em colaboração com o Dr. Francisco Gomes-Neto, do Laboratório de Toxinologia, IOC/FIOCRUZ.

A sequência da proteína DM64 foi obtida no banco de dados UNIPROT (<u>http://www.uniprot.org</u>) sob número de acesso <u>Q8MIS3</u>. A sequência depositada contém uma região inicial referente ao peptídeo sinal. Neste trabalho, utilizamos apenas a sequência referente à proteína madura (resíduos 24 a 504), totalizando 481 resíduos de aminoácidos.

4.7.1 Predição inicial de estrutura

Utilizamos três diferentes algoritmos para analisar a sequência de aminoácidos de DM64 e fazer uma primeira predição de estrutura (organização em domínios, família) para DM64: PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997), o algoritmo Ginzu de predição de domínios do servidor Robetta (http://robetta.bakerlab.org) (Kim *et al.*, 2004) e o algoritmo de predição de estruturas automatizado I-Tasser (Yang e Zhang, 2015a) (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/).

4.7.2 Modelagem molecular da proteína DM64

Para a modelagem molecular de DM64, utilizamos duas abordagens: (i) modelagem molecular da proteína completa (contendo todos os domínios), utilizando três estratégias automáticas diferentes: Robetta, I-Tasser e Modeller (Aduldecha et al., 1991); (ii) modelagem molecular dos domínios tipo-imunoglobulina isolados de DM64 usando o I-Tasser. Os melhores modelos obtidos para os domínios isolados foram utilizados para realização da técnica de *docking* molecular usando dados de *cross-linking*. Os parâmetros utilizados foram aqueles adaptados pelo grupo do Ruedi Aebersold (Kahraman *et al.*, 2013) e o manual da suíte de aplicativos de modelagem molecular Rosetta, versão 2017.08.59291. Desta forma, os dados obtidos através da análise dos experimentos de *cross-linking* foram utilizados como restrições de distância entre os pares de átomos envolvidos. O potencial de restrição utilizado foi o BOUNDED. O limite superior de distância entre os pares de resíduos foi computado pelo programa Topolink. O limite inferior de distância entre os pares de resíduos foi computado como o tamanho máximo das cadeias

laterais envolvidas, sem considerar a inserção de cadeias espaçadoras. O protocolo de *docking* global utilizado está resumido na Tabela 5 que exemplifica o *docking* entre os domínios 5 e 4 de DM64.

-in:file:s D4-D5.pdb	Arquivo de coordenadas dos domínos
-nstruct 10000	Número de modelos/docking
-partners E_D	Move D em relação a E
-dock_pert 3 8	Perturbação translação e rotação
spin	Rotaciona o segundo parceiro de <i>docking</i> ao redor do centro
-spin	de massa do primeiro parceiro
-randomize1	Posição aleatória do primeiro parceiro de docking
-randomize2	Posição aleatória do segundo parceiro de docking
-ex1	Adição de rotâmeros de cadeia lateral
-ex2aro	Adição de rotâmeros de cadeia lateral
-constraints:cst_file d4- d5.cst	Arquivo com restrições de distâncias
-constraints:cst_weight 1	Peso das restrições de distância
no filters	Filtros do score docking desligado (energia total negativa,
-no_nners	energia de interação negativa e energia de restrições <=1)
-out:file:fullatom	Modelo gerado em modo contendo todos os átomos
-out:suffix _options	Sufixo adicionado ao nome dos modelos gerados
-out:path:all ./poses/	Sub-diretório de armazenamento

Tabela 5 – Resumo do protocolo de *docking* global utilizado (exemplo do docking D5-D4)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estabilização do complexo entre DM64 e miotoxina II por cross-linking utilizando o ALC BS^3

A técnica de *cross-linking* associada à espectrometria de massas é uma abordagem que vem sendo cada vez mais utilizada para auxiliar na predição de estruturas de proteínas e seus complexos. Nela, proteínas e/ou complexos proteicos são estabilizados por ligações covalentes através de agentes de *cross-linking*, sendo posteriormente analisados por MS/MS. As restrições espaciais determinadas empiricamente são integradas a estratégias de predição computacional, constituindo a chamada "modelagem híbrida ou integrativa" (Leitner *et al.*, 2016).

Comercialmente, existem diversos tipos de ALC's disponíveis. Os mais conhecidos e utilizados são os que apresentam grupamentos reativos frente a aminas primárias, sulfidrilas e ácidos carboxílicos (Back et al., 2003). Em nosso estudo, foi utilizado o agente BS³, que apresenta em suas extremidades o grupamento NHS reativo para o ɛ-amino da cadeia lateral de lisina e o grupamento N-terminal e, eventualmente, resíduos contendo hidroxila, principalmente serina (Madler et al., 2009). Este ALC possui as mesmas características do DSS (suberato de disuccinimidila), mais comumente utilizado, sendo solúvel em tampão aquoso, ao contrário do DSS, que necessita de solventes orgânicos. Os grupamentos reativos são separados por um braço espaçador, que consiste de uma cadeia carbônica com o comprimento de 11,4 Å que, somado ao comprimento das cadeias laterais com os quais ele reagiu, delimita a distância máxima possível entre os dois resíduos (Paramelle et al., 2013). Por exemplo, se o BS^3 reagir com duas lisinas, teremos os 11,4 Å do braço espaçador somados ao tamanho da cadeia lateral da lisina (6,4 Å), medido a partir do carbono-alfa do esqueleto carbônico, perfazendo a distância máxima de 24,2 Å. Entretanto, simulações de dinâmica molecular indicam que esta distância pode ser um pouco maior (de 26 até 30 Å), devido à flexibilidade proteica (i.e., movimentos locais e/ou globais da proteína, envolvendo tanto a cadeia principal, quanto as cadeias laterais)(Merkley et al., 2014). Desta forma, resíduos de aminoácidos que estejam na superfície da proteína ou do complexo proteico (portanto, acessíveis ao solvente), serão conectados de forma covalente pelos ALCs, fornecendo restrições de distância espacial que poderão guiar a predição de estruturas tridimensionais e/ou filtrar modelos estruturais que sejam compatíveis com os dados experimentais.

Para otimizar as condições experimentais da reação de *cross-linking*, o complexo formado entre a antitoxina DM64 e a miotoxina II foi estabilizado covalentemente pelo agente de ligação cruzada BS³ em diferentes concentrações e a eficiência da reação foi monitorada por eletroforese em gel de poliacrilamida, tanto em condições nativas (Figura 12A) quanto em condições desnaturantes e redutoras (Figura 12B). Esta otimização é de extrema importância para preservar a estrutura nativa da proteína estudada, evitando a indução de distorções estruturais, oligomerização artefatual, agregação ou precipitação (Merkley *et al.*, 2014).



Figura 12 - Estabilização do complexo entre a antitoxina DM64 e miotoxina II utilizando diferentes concentrações de BS³. A: Eletroforese em condições nativas e B: Eletroforese em condições desnaturantes e redutoras. Ambos os géis foram revelados por impregnação por prata. Raia 1: DM64 controle; 2: DM64 + BS³ 1:20 (p/p); 3: miotoxina II controle; 4: miotoxina II + BS³ 1:20 (p/p); 5: Complexo DM64 + miotoxina II estabilizado com BS³ 1:20 (p/p)[equivalente a 1:2800 (mol/ mol)]; 6: Complexo DM64 + miotoxina II estabilizado com BS³ 1:2000 (mol/mol); 7: Complexo DM64 + miotoxina II estabilizado com BS³ 1:1000 (mol/mol); 7: Complexo DM64 + miotoxina II estabilizado com BS³ 1:100 (mol/mol); 8: Complexo DM64 + miotoxina II estabilizado com BS³ 1:100 (mol/mol); MM, padrão de massa molecular (fosfolipase B: 94 kDa; albumina de soro bovino: 67 kDa; ovoalbumina : 43 kDa; anidrase carbônica: 30 kDa; inibidor tríptico de soja: 20 kDa e α-lactoalbumina: 14,4 kDa).

Ao submeter o complexo DM64-miotoxina II estabilizado com diferentes concentrações de BS³ à eletroforese em condições nativas, não observamos aumento da oligomerização/agregação nas maiores concentrações de *cross-linker* (Figura 12A). Com excessos molares de 2800 e 2000 de BS³, não houve diferenças significativas quanto ao padrão das bandas no gel de SDS-PAGE (número, intensidade relativa e mobilidade) (Figura 12B). Entretanto, a banda referente ao complexo estabilizado pelo BS³ na relação molar de

1:2800 (proteína:*cross-linker*) parece um pouco mais difusa do que as bandas referentes aos complexos estabilizados com concentrações menores de BS^3 , sugerindo a ocorrência de um número maior de *cross-links*. Nesta condição, as bandas referentes aos controles de DM64 e miotoxina praticamente desaparecem, dando origem à banda do complexo estabilizado. À medida que reduzimos a quantidade de BS^3 , observou-se um aumento progressivo da intensidade das bandas referentes à DM64 e à miotoxina não complexadas (Figura 12B).

Desta forma, o complexo formado entre a antitoxina DM64 e a miotoxina II foi estabilizado covalentemente pelo agente de ligação cruzada BS³ na concentração de 1:20 (p/p)(equivalente a 1:2800 mol/mol) para análises posteriores. Ao submeter a mistura de DM64 e miotoxina II à eletroforese em condições nativas (Figura 13A), visualizou-se, na raia 3, uma redução expressiva da intensidade da banda referente à DM64 controle (raia 1) e o aparecimento de uma nova banda principal (indicada com asterisco), de menor migração eletroforética, sugerindo que houve modificação significativa das características físicoquímicas de DM64. Quando o complexo foi estabilizado pelo BS³ (Figura 13A, raia 4), sua mobilidade eletroforética foi bastante acelerada, sendo ligeiramente menor do que o controle de DM64 tratado com BS³ (raia 2). Em géis nativos, a migração eletroforética sofre influência não só do tamanho/forma da proteína, mas também de sua carga líquida (Garfin, 1990). Isto explica o porquê de a banda referente ao controle de miotoxina II não aparecer no gel (Figura 13A, raia 5); no pH 6,8 do gel de empilhamento, a miotoxina II (pI 9 - 10) (Lomonte e Rangel, 2012) tem carga líquida positiva, não sendo capaz de entrar no gel e/ou migrar em direção ao anodo (*i.e.*, polo positivo). Por sua vez, o complexo não-estabilizado com BS³ (Figura 13A, raia 3) é capaz de entrar no gel, mas tem a mobilidade retardada quando comparado ao complexo estabilizado (Figura 13A, raia 4). No primeiro caso, o efeito de carga das lisinas da miotoxina é muito maior do que no segundo, quando grande parte das lisinas deve estar envolvida em ligações de cross-linking.



Figura 13 - Estabilização do complexo entre a antitoxina DM64 e miotoxina II utilizando BS³. A: Eletroforese em condições nativas e B: Eletroforese em condições desnaturantes e redutoras. Ambos os géis foram revelados por impregnação por prata. Raia 1: DM64 controle; 2: DM64 + XPlex; 3: Complexo DM64 + miotoxina II; 4: Complexo DM64 + miotoxina II estabilizado com XPlex. 5: miotoxina II controle; 6: miotoxina II + XPlex. Figura A: Eletroforese em condições nativas. O asterico indica o complexo não covalente formado entre a DM64 e a miotoxina II; Figura B: Eletroforese em condições desnaturantes e redutoras. A seta indica o complexo DM64 + miotoxina II estabilizado com XPlex. Ambos os géis foram corados por impregnação por prata.. MM, padrão de massa molecular (Fosfolipase B – 94KDa, Albumina de soro bovino – 67 KDa, Ovoalbumina – 43KDa, Anidrase carbônica – 30KDa, Inibidor tríptico de soja – 20KDa e α -lactoalbumina - 14,4KDa).

Em condições desnaturantes e redutoras (Figura 13B), a banda de miotoxina (raia 5) pode ser visualizada sem problemas, em função de sua carga líquida negativa resultante da saturação com o detergente aniônico SDS. Por outro lado, a banda do complexo inibidortoxina não é preservada nestas condições (raia 3), sendo possível apenas detectar as bandas referentes a DM64 (raia 1) e a miotoxina II (raia 5) isoladamente, indicando que a interação entre as duas proteínas é mantida por forças de natureza não covalente. Quando este mesmo complexo é estabilizado pelo BS³, verificamos a presença de uma nova banda de maior massa molecular (raia 4, indicado pela seta) e o desaparecimento das bandas referentes aos controles do inibidor ou toxina estabilizados por BS^3 (raias 2 e 6). Este resultado demonstra que o complexo, originalmente não covalente, foi estabilizado covalentemente pelo cross-linker. A aparência difusa e alargada das bandas referentes às proteínas estabilizadas pelo BS³ é esperada, sendo consequência da geração de uma população heterogênea de proteínas contendo cross-links em número e posição diferentes. No caso particular da miotoxina II (Figura 13B, raia 6), em função do grande número de lisinas presentes (19 Lys em 121 resíduos totais), parece ocorrer um excesso de reação, levando à oligomerização da proteína controle, que pode ser visualizada na forma de bandas pouco intensas com diferentes

mobilidades eletroforéticas. A análise das reações de *cross-linking* do complexo e do controle de DM64, por sua vez, não sugere a ocorrência agregação artefatual extensiva.

Após confirmação da eficiência da reação de *cross-linking* através da eletroforese, o complexo DM64 + miotoxina II, DM64 controle e miotoxina II controle estabilizados pelo BS³ foram submetidos à cromatografia de exclusão molecular para remoção do excesso de BS³ e dessalinização (Figura 14). No caso da miotoxina controle, não se conseguiu recuperar qualquer material após a reação com o BS³. Em seguida, as amostras estabilizadas com BS³ foram hidrolisadas com as seguintes combinações de enzima: tripsina, tripsina + Asp-N e/ou tripsina + Lys-C. Depois da clivagem e dessalinização dos peptídeos, estes foram analisados por espectrometria de massas do tipo nLC-nanoESI-HCD-MS/MS no espectrômetro de massas Orbitrap modelo Q-Exactive Plus.



Figura 14 - Cromatografia de exclusão molecular das amostras estabilizadas pelo ALC BS³. Os picos indicados pela seta vermelha foram coletados e hidrolisados por Lys-C + tripsina e posteriormente submetidos à espectrometria de massas.

5.2 Estabilização do complexo entre DM64 e miotoxina II por *cross-linking* utilizando a metodologia XPlex

Um dos principais objetivos deste trabalho é a utilização dos dados provenientes de *cross-linking* para guiar a predição da estrutura da antitoxina DM64; logo, para aumentarmos o número de espécies de ligação cruzada, facilitando o processo de modelagem, utilizamos uma nova metodologia de *cross-linking*, denominada XPlex.

A metodologia XPlex foi recentemente desenvolvida pela Dra. Mariana Fioramonte em sua tese de doutorado, sob orientação do prof. Fabio Gozzo (Fioramonte, 2016). Ela utiliza condições de reação brandas e que não induzem mudanças conformacionais na proteína e se divide em duas reações possíveis: a primeira consiste na ativação de ácidos carboxílicos das cadeias laterais de Asp ou Glu (e também do C-terminal da proteína), seguida da reação com uma diamina, levando à formação de ligações amida entre esta última e os resíduos ácidos ativados (XPlex-Ac). Alternativamente, resíduos ácidos ativados podem reagir diretamente com a cadeia lateral de resíduos de Lys ou N-terminal (ou, eventualmente, Ser), sem a participação da diamina, gerando *cross-links* do tipo *zero-length* (XPlex-ZL)(ou seja, sem cadeia espaçadora entre os resíduos ligados covalentemente).

Ao utilizar a metodologia XPlex, pode-se aumentar consideravelmente o número de espécies de ligação cruzada obtidas, devido à alta frequência dos resíduos de ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e serina na maior parte das proteínas (Figura 15).



Figura 15 - Distribuição da frequência de aminoácidos em proteínas de acordo com o banco de dados UniProtKB/TrEMBL (UniProt, 2017). No gráfico estão representadas 102.248.261 sequências de proteínas compreendendo 34.355.436.272 aminoácidos. Destacados em vermelho, os resíduos de aminoácidos reativos frente ao XPlex.

A Figura 16 ilustra a sequência da DM64. Observamos que, utilizando o agente BS³, temos um total de 59 resíduos de aminoácidos passíveis de reação cruzada (22 lisinas, 36 serinas e 1 resíduo N-terminal), correspondendo a cerca de 12% dos resíduos da proteína. Com a metodologia XPlex-Ac, temos mais 60 resíduos que podem reagir através de uma diamina (22 aspartatos, 37 glutamatos e 1 resíduo C-terminal). Considerando também a reação do tipo *zero-length* (XPlex-ZL), tem-se o total de 119 resíduos passíveis de reação, ou cerca de 25% do total. Como o número teórico de espécies de ligação cruzada aumenta com aproximadamente o quadrado do número de resíduos disponíveis para realização da reação (Fioramonte, 2016), espera-se que, ao dobrar este último número, tenhamos um aumento significativo de *cross-links* observados. Na prática, entretanto, os números podem ser bem menores, já que sofrem influência de diversos fatores, tais como a composição de ácidos aminados e sua distribuição na proteína, o grau de exposição dos resíduos-alvo ao solvente e sua reatividade intrínseca (Leitner *et al.*, 2014), além das variações de eficiência de ionização/fragmentação dos diferentes produtos de *cross-linking* (Paramelle *et al.*, 2013).

L A M E T T P R L W I E T E S P S T P W T N V T L Q C V A T N T E A L S F Q L W K D G E L L S T L P P M G L V G K F S L G P V T D D N R G L Y R C R I L M F E N T W T S P S E P V E V T G K E P L P A P L L R A D P G W I L H G L E T K L H C Q G V L L G M I F D L Y Q E G E Q E P V R S S H T P G T E A T F I V N N T G N Y S C L Y R A P A P A S S V N S A P S E T I H V V I P D L L P K P D F H I Y D N Q V I R P G D S V T F G C W G R F S G L E F L F K D G Q E V F V P K Q S S K D P K H I Y F E L T A L G P E D G G K Y S C R Y R F R N G P P I W S E D S Q L E L V L T T E T L A K P S L S V E P Q E T V I S R G T K V T M R C Q G A Q P N V K F V L L K K G S P G H T L V L S S P E S H V D F V L P N I L S Y D T G N F S C L Y V Q T E A P F A G S Q R S E D V E I R V E G L L P K P T L H P V H P V V A P G R D A I L H C S G K I P N A H F Q L F K D G E H E E L E V S V L P I D D H A V N F L L K N I N R Q Q G G K Y R C R Y T T

Figura 16 - Sequência de aminoácidos da antitoxina DM64. Destacados em verde: resíduos de serina; em amarelo: resíduos de lisina; em vermelho: resíduos de ácido aspártico e em azul: resíduos de ácido glutâmico.

Na metodologia XPlex, os ácidos carboxílicos do complexo DM64-miotoxina II, da DM64 controle e da miotoxina II controle foram ativados por HOBt e EDC na presença de diamina, incubando-se a mistura por 2 horas à 30 °C. Após este período, a reação foi interrompida, precipitando-se as proteínas com etanol/acetona. Da mesma forma que no *cross-linking* utilizando o *ALC* BS³, a eficiência da reação foi monitorada por eletroforese em condições nativas e em condições desnaturantes e redutoras (Figura 17).



Figura 17 - Estabilização do complexo entre a antitoxina DM64 e miotoxina II utilizando a metodologia XPlex. A: Eletroforese em condições nativas. O asterico indica o complexo não covalente formado entre a DM64 e a miotoxina II; B: Eletroforese em condições desnaturantes e redutoras. A seta indica o complexo DM64 + miotoxina II estabilizado com XPlex. Raia 1: DM64 controle; 2: DM64 + XPlex; 3: Complexo DM64 + miotoxina II; 4: Complexo DM64 + miotoxina II estabilizado com XPlex. Raia 1: estabilizado com XPlex. 5: miotoxina II controle; 6: miotoxina II + XPlex. Ambos os géis foram corados por impregnação por prata. MM, padrão de massa molecular (Fosfolipase B – 94KDa, Albumina de soro bovino – 67 KDa, Ovoalbumina – 43KDa, Anidrase carbônica – 30KDa, Inibidor tríptico de soja – 20KDa e α -lactoalbumina - 14,4KDa).

Ao submeter o complexo DM64-miotoxina II à eletroforese em condições nativas (Figura 17A), visualizamos, na raia 3, diminuição importante da banda referente à DM64 controle (raia 1) e o surgimento concomitante de uma nova banda de menor migração eletroforética (asterisco vermelho) sugerindo, mais uma vez, a formação de complexo entre estas duas proteínas. Na raia 4, observamos uma banda com a aparência difusa, de menor mobilidade eletroforética, referente ao complexo estabilizado covalentemente. Neste caso, como a reação envolve também as cadeias laterais de resíduos ácidos, o menor número de cargas negativas na superfície da proteína, somado ao efeito contrário exercido pela carga positiva das lisinas não modificadas, explicaria a redução da mobilidade eletroforética observada. Em ambos os casos, a formação de complexo foi confirmada após a identificação, por MS/MS, de peptídeos do inibidor e da toxina após digestão *in gel* da banda eletroforética correspondente. A miotoxina controle, como discutido anteriormente, não entra no gel nativo devido a sua grande basicidade.

Quando analisamos as mesmas amostras por eletroforese em condições desnaturantes e redutoras (Figura 17B), observamos duas bandas distintas na raia 3: uma correspondendo à DM64 e outra, à miotoxina. Mais uma vez, o resultado indica que o inibidor interage com a miotoxina por forças de natureza não covalente. Na raia 4, visualizamos a redução de

intensidade da banda de miotoxina e a intensificação da banda de menor mobilidade eletroforética (indicada pela seta). Diferentemente do BS³, a reação de *cross-linking* com xPlex não parece ser capaz de modificar a totalidade das moléculas de DM64 disponíveis. Por outro lado, o resultado das eletroforeses mostra que a oligomerização artefatual das amostras não parece ter ocorrido.

Posteriormente à comprovação da eficiência da reação, o complexo DM64-miotoxina e seus respectivos controles estabilizados pelo XPlex foram precipitados com etanol e acetona. Em seguida, submetemos as amostras à hidrólise por Lys-C + tripsina e posterior análise por espectrometria de massas do tipo nLC-nanoESI-HCD-MS/MS em espectrômetro Q-Exactive Plus.

A técnica de XPlex é inovadora e, portanto, a maioria dos *softwares* disponíveis para análise de *cross-linking* não é capaz de buscar as espécies geradas por esta metodologia. O *software* SIM-XL (Lima *et al.*, 2015), utilizado para os dados com o *ALC* BS³, vem sendo constantemente melhorado para possibilitar a identificação de peptídeos modificados pelo XPlex e foi utilizado nas nossas análises. Como veremos a seguir, as validações manuais dos espectros seguiram os mesmos critérios de classificação utilizados para os dados de BS³, com exceção dos íons-diagnóstico que, no caso do XPlex, ainda não foram reportados.

5.3 Análise dos espectros de fragmentação dos peptídeos modificados pelo BS³ e XPlex

Na fragmentação por HCD, peptídeos protonados (ex.: por *eletrospray*) são isolados e acelerados contra um gás inerte em uma câmara de colisão. Os íons-fragmento gerados são enviados para o C-trap, sendo posteriormente injetados no Orbitrap, onde suas relações massa/carga são determinadas. Após a colisão com o gás, parte da energia cinética é convertida em energia vibracional interna dos íons, levando-os à fragmentação preferencial nas ligações peptídicas. Esta fragmentação é promovida por um "próton-móvel", ou seja, há necessidade de um próton localizado no sítio de clivagem para que a ligação amida se torne mais suscetível (Chi *et al.*, 2010).

Em tese, a fragmentação dos precursores pode gerar íons a_n , b_n , c_n , x_n , y_n e z_n , sendo o par b/y mais frequente, já que as ligações peptídicas são mais lábeis (Figura 18). Os íons b são classificados como pertencentes a série N-terminal, pois preservam o aminoácido N-

terminal do peptídeo precursor. Já a série y, é classificada como C-terminal, por preservar o aminoácido C-terminal do precursor (Seidler *et al.*, 2010).



Figura 18 - Peptídeo de nove resíduos, mostrando a clivagem nas ligações peptídicas e os íons das séries b e y que são gerados preferencialmente. Extraido de (Cantú *et al.*, 2008).

A presença de pelo menos um íon-diagnóstico (m/z 222,1; 239,2 e 305,2) nos espectros de fragmentação de peptídeos modificados com BS³ facilita a identificação dos peptídeos ligados cruzadamente. Eles são formados pelo rearranjo da cadeia lateral de resíduos de lisina e da cadeia espaçadora do *cross-linker* (Figura 19). Felizmente, suas massas não coincidem com as massas esperadas de nenhum íon-fragmento das séries b ou y dos vinte aminoácidos naturais (Iglesias *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2011).



Figura 19 - Estrutura dos íons-diagnóstico de m/z 222,1; 239,2; 305,2. Extraído de Iglesias et al. (2010)

Na análise de espectros de *cross-linking* por DSS ou BS³, recomenda-se primeiramente verificar a presença dos íons-fragmento m/z 222,1 e 239,2 no espectro de fragmentação. Caso estes não sejam observados, podemos afirmar que não se trata de espécie modificada pelo *ALC*. Entretanto, se pelo menos um deles estiver presente, devemos verificar também a presença do íon-fragmento m/z 305,1. Se não o encontrarmos, provavelmente trata-

se de um espectro proveniente de um produto de *cross-linking* classificado como *dead-end*, onde o peptídeo se encontra ligado ao ALC (DSS ou BS³) por uma lisina apenas. Outras possibilidades são um *cross-link* entre uma lisina e o resíduo N-terminal ou outro resíduo (em ambos os casos, exceto lisina). Se o íon m/z 305.5 estiver presente, pode ser tratar-se de uma espécie intra-molecular ou inter-molecular onde o ALC, em ambos os casos, está ligado a duas lisinas (Santos *et al.*, 2011).

Quando os íons m/z 147,1 e 175,1, referentes ao y1 lisina e arginina, respectivamente. são encontrados em espectros de peptídeos modificados por DSS ou BS³, pode-se inferir que trata-se de uma ligação inter-molecular (dois resíduos C-terminais diferentes). Se apenas um destes íons for detectado, pode se tratar de um *link* intra-molecular (um único peptídeo) ou um *link* inter-molecular em que ambas as cadeias possuem o mesmo C-terminal; outra possibilidade seria um *link* inter-molecular em que um dos peptídeos é o C-terminal da proteína, desde que diferente de lisina (Iglesias *et al.*, 2010).

Os espectros MS2 provenientes da fragmentação dos peptídeos de DM64, miotoxina II e complexo foram analisados pelo software *Spectrum Identification Machine for Crosslinked Peptides* (SIM-XL) (Lima *et al.*, 2015). Este programa possui em seu algoritmo a possibilidade de busca por íons-diagnóstico nos espectros dos peptídeos modificados, facilitando e agilizando a detecção dos mesmos.

Após uma filtragem automática realizada pelo SIM-XL (score \geq 3, número de íons fragmento por cadeia \geq 3, erro ppm \leq 5, número de observações do espectro \geq 1), os *links* interproteínas (indicando a interação entre DM64 e miotoxina II) e intra-proteínas (indicando ligações cruzadas dentro da própria estrutura de DM64 ou miotoxina II) foram validados manualmente e classificados (*i.e.*, excelente, bom etc), levando-se em conta: 1) A presença de íons-diagnóstico indicativos da ocorrência da reação de *cross-linking* com BS³ (*m/z* 222.1, *m/z* 239.2, *m/z* 305.2); 2) A cobertura de sequência dos peptídeos modificados pelo *ALC*; 3) A relação sinal/ruído do espectro; 4) A anotação dos íons-fragmento mais intensos; 5) A possibilidade de localização inequívoca do *linker*; 6) O padrão de distribuição de erro de massa dos íons-fragmento observados. Apenas os espectros que apresentaram uma alta confiabilidade (classificados como excelentes e bons) nestes aspectos foram considerados para modelagem.

Inicialmente, avaliamos os resultados das diferentes estratégias de hidrólise usando a amostra de DM64 controle estabilizada com BS³ (Figura 20). Para este ensaio, utilizamos três enzimas diferentes: tripsina, tripsina + Lys-C e tripsina + Asp-N. Observamos que, quando a amostra foi hidrolisada pela associação das enzimas tripsina + LysC, obtivemos um maior número de *links* e, consequentemente, maior cobertura de sequência de DM64 (363 resíduos de 481 ou 75,5%). No caso de trispina + Asp-N, a cobertura foi de 48,8% (234 resíduos de 481), enquanto

que a hidrólise exclusivamente com tripsina gerou 63,4% de cobertura (305 resíduos de 481). É importante notar que a cobertura referida acima foi calculada pelo programa SIM-XL levando-se em conta exclusivamente os peptídeos modificados por *intra-* ou *inter-links*. Ou seja, peptídeos lineares (não-modificados) ou contendo apenas *dead-ends* não foram contabilizados. Observamos também um maior número de *links* entre os diferentes domínios de DM64, o que é extremamente importante para auxiliar no posicionamento dos domínios no *docking molecular*, diminuindo assim o espaço de busca. A mesma tendência foi observada quando analisamos os *links* entre DM64-miotoxina II. Para a miotoxina II no complexo, não obtivemos grandes diferenças de cobertura com as três estrátegias utilizadas (cobertura em torno de 80%).

A associação de tripsina + Lys-C aumenta a eficiência da clivagem em lisina, resíduo responsável pela maior proporção de clivagens perdidas com tripsina. Entre outras características, a Lys-C, ao contrário da tripsina, é ativa sobre resíduos de lisina seguidos de prolina. A hidrólise mais eficiente leva à diminuição do tamanho dos peptídeos, aumentando a probabilidade de detecção dos mesmos pelo espectrômetro de massas. Com base nestes resultados iniciais, decidimos prosseguir com os ensaios de *cross-linking* utilizando LysC + tripsina para hidrólise das proteínas.



Figura 20 - *Intra-links* observados na estrutura de DM64 controle utilizando diferentes estratégias de hidrólise. A) Hidrólise utilizando as enzimas Asp-N + tripsina B) Hidrólise utilizando a enzima tripsina e C) Hidrólise utilizando a associação de Lys-C + tripsina. Após filtragem automática dos espectros de *cross-linking* com o auxílio do *software* SIM-XL e validação manual segundo os critérios elencados anteriormente, criamos um mapa bidimensional (2D) indicando os *intra-links* (classificados como excelentese bons) encontrados na estrutura de DM64, utilizando o *ALC* BS³. Cada linha lilás representa um *cross-link* observado entre resíduos de lisina e/ou serina (BS³). A sequência da proteína está representada pelo retângulo colorido, usando a seguinte notação para os domínios *Ig-like* presentes na proteína. D1: laranja; D2: verde, D3: cinza; D4: azul; D5: roxo. As sequências consenso de N-glicosilação estão mostradas em rosa. As linhas vermelhas representam ligações (inter-proteína) entre peptídeos idênticos. Estes e todos os demais mapas bidimensionais da dissertação foram gerados pelo visualizador xiNET (crosslinkviewer.org/index.php).

5.3.1 Análise dos espectros de miotoxina II

Não observamos *intra-links* na miotoxina II controle utilizando o *ALC* BS³. Esta proteína apresenta um grande numero de lisinas (23% dos resísuos de aminoácidos) (Figura 21) em sua estrutura primária. Tal característica parece propiciar um excesso de reação, levando à formação de diversos oligômeros. Ao realizar a cromatografia de exclusão molecular para purificação das proteínas e retirada do excesso de BS³, não conseguimos recuperar quantidade suficiente destas amostras, possivelmente como consequência da sua agregação/precipitação.

Utilizando a metodologia XPlex-AC, não observamos *links* na miotoxina controle devido à presença de poucos resíduos ácidos em sua estrutura primária. Por outro lado, quando analisamos a miotoxina em complexo com a DM64, conseguimos observar diversos *links* utilizando as metodologias BS³ e XPlex-ZL. Estes resultados foram analisados na estrutura cristalográfica de miotoxina II, servindo como prova de conceito para validar nossa estratégia metodológica, principalmente os critérios de avaliação utilizados para atribuir confiabilidade aos espectros de fragmentação dos peptídeos ligados cruzadamente.

S L F E L G K M I L Q E T G K N P A K S Y G A Y G C N C G V L G R G K P K D A T D R C C Y V H K C C Y K K L T G C N P K K D R Y S Y S W K D K T I V C G E N N S C L K E L C E C D K A V A I C L R E N L N T Y N K K Y R Y Y L K P L C K K A D A C

Figura 21 - Sequência de aminoácidos da miotoxina II. Destacados em verde: resíduos de serina; em amarelo: resíduos de lisina; em vermelho: resíduos de ácido aspártico e em azul: resíduos de ácido glutâmico.

Desta forma, conseguimos identificar 18 *intra-links* de alta confiabilidade (classificados como excelentes ou bons) na estrutura da miotoxina II em complexo com a DM64, sendo 13 provenientes da reação com BS³ e 5 provenientes da reação XPlex ZL. A Figura 22 mostra exemplos de espectros de alta qualidade obtidos utilizando as estratégias de BS³ e XPlex, respectivamente. Na Figura 23 estão mostrados os mapas bidimensionais de restrições de distância obtidos com as duas metodologias.



Figura 22 - Espectros MS/MS de alta confiabilidade (excelente) e cobertura de sequência de *cross-links* intra-moleculares de miotoxina II em complexo com DM64 provenientes da reação com BS³ (A) e XPlex-ZL (B). Em ambos espectros, observa-se: a) boa relação sinal-ruído (painel I); b) alta cobertura de sequência (íons-fragmentos marcados e numerados por traços azuis e vermelhos) (painel II); c) ausência de dubiedades quanto ao posicionamento do *linker* (marcado por um traço negro) (painel II); d) presença dos íons-diagnóstico característicos da reação com BS³ (painel III); e) distribuição uniforme de erro na determinação da relação m/z dos íons-fragmento (painel I). Cada ponto indica um íon-fragmento identificado, enquanto que as linhas tracejadas indicam a margem de erro permitida (2 desvios-padrão) em relação à linha em negrito, que indica a tendência central de distribuição de erro.



Figura 23 - *Intra-links* observados na estrutura da miotoxina II em complexo com a DM64. Após filtragem automática dos espectros de *cross-linking* com o auxílio do *software* SIM-XL e validação manual segundo os critérios elencados anteriormente, criamos um mapa bidimensional (2D) indicando os *intra-links* (classificados como excelentes ou bons) observados utilizando a metodologia XPlex (ZL) (A) e o *ALC* BS³ (B). Cada linha lilás representa um *cross-link* observado entre resíduos reativos. A sequência da proteína está representada pelo retângulo rosa, com a numeação dos resíduos. A possibilidade de reação com os resíduos C- e N-terminal foi considerada nas buscas.
5.3.1.1 Validação dos cross-links utilizando a estrutura cristalina da miotoxina II.

Após a classificação manual dos espectros referentes aos *links* observados para miotoxina II, fizemos a validação destes na estrutura cristalográfica da proteína depositada no banco de dados *Protein data Bank* (PDB), sob o número de identificação 1CLP (Arni *et al.*, 1995). A miotoxina II de *Bothrops asper* é uma enzima da classe das hidrolases, constituída por 121 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 14 kDa (Figura 24). A estrutura cristalográfica contém na unidade assimétrica duas unidades da proteína, com resolução de 2.8 Å.

Estudos anteriores (Arni *et al.*, 1995; Arni e Ward, 1996) baseados em eletroforese em gel de poliacrilamida, indicavam que a miotoxina II de *Bothrops asper* é encontrada na forma dimérica em solução, apresentando subunidades idênticas de 14 kDa. Entretanto, recentemente, através de ultracentrifugação analítica (AUC, <u>Analytical UltraCentrifugation</u>), nosso grupo mostrou de maneira inequívoca que esta proteína é encontrada na forma de monômeros em solução (manuscrito em preparação). Desta forma, utilizamos apenas uma subunidade para validação dos *links*.

A estrutura depositada no PDB contém intervalos irregulares na numeração dos resíduos para que suas posições sejam comparáveis a regiões conservadas de outros membros da família de miotoxinas. Neste trabalho, renumeramos os resíduos de aminoácidos para refletirem a numeração contínua da sequência de aminoácidos depositada, em concordância com a análise realizada pelo programa SIM-XL.

>1CLP:A	A PDBID CH	AIN SEQUE	INCE		
	10	20	30	40	50
	.				
SLFELGE	KMILQETGKN	PAKSYGAY	GCNCGVLGRG	KPKDATDRCCY	ZV <mark>HK</mark> CC
YKKLTG(CNPKKDR <mark>y</mark> Sy	SWKDKTIVC	CGENNSCLKE	LCEC <mark>D</mark> KAVAIC	CLRENL
NTYN <mark>KKY</mark>	YRYYLKPLCK	KADAC			

Figura 24 - Sequência da miotoxina II renumerada para utilização em nosso trabalho. Em amarelo estão indicados os resíduos envolvidos na região do sítio ativo e, em vermelho, a lisina responsável pela impossibilidade de coordenação do átomo de cálcio, fundamental para a atividade catalítica desta classe de enzimas. A região responsável pela miotoxicidade está representada em azul.

A miotoxina II é estabilizada por sete ligações de dissulfeto: C26-C115, C28-C44, C43-C95, C49-C121, C50-C88, C57-C81 e C75-C86 (Lomonte e Rangel, 2012) e possui uma região catalítica constituída pelos resíduos Asp99, His48 e Lys49. O resíduo Asp99 estabelece

ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr52 e Tyr73, formando a chamada rede de interações catalíticas (Figura 25). Vale relembrar que a miotoxina II possui uma mutação em seu sítio catalítico, onde o ácido aspártico normalmente presente na posição 49 das PLA₂ miotóxicas é substituído por uma lisina. Tal fato impede a coordenação do átomo de cálcio, fundamental para a atividade catalítica desta classe de enzimas (Lee *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 1992). Entretanto, estas proteínas apresentam atividade miotóxica sobre membranas, atribuída à presença de uma região rica em aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos (peptídeo 115-129) em sua porção C-terminal (Lomonte *et al.*, 2003; Ambrosio *et al.*, 2005).



Figura 25 - Estrutura cristalográfica da miotoxina II de *Bothrops asper*. A estrutura é representada na forma de *cartoon* onde as hélices alfa são coloridas em azul, as fitas beta coloridas em amarelo, as voltas coloridas em ciano e as regiões em *Randon coil* são coloridas em branco. As ligações dissulfeto estão representadas na forma de bastões coloridas em amarelo. Os resíduos do sítio ativo estão representados por suas cadeias laterais e indicados pelas legendas His47, Tyr51, Tyr64 e Asp89. Os resíduos envolvidos em *crosslinks* estão representados por bastões finos e esferas coloridas em verde.

Os resíduos envolvidos nos *cross-links* intra-miotoxina foram tabelados e submetidos à análise pelo *software* Topolink, como mostrado na Tabela 6 abaixo. Utilizou-se como referência o carbono beta dos pares de resíduos dos *cross-links* e a estrutura cristalográfica da miotoxina II. O programa Topolink primeiramente calcula a distância euclidiana entre os dois resíduos envolvidos. Se esta distância estiver dentro do limite máximo estabelecido e os resíduos estiverem expostos na superfície da proteína, é iniciada a fase de busca por um caminho que interligue os dois resíduos (distância topológica). Em comparação com os carbonos alfa da cadeia principal, carbonos beta têm maior probabilidade de exposição ao solvente; além disto, por fazerem parte da cadeia lateral, têm a vantagem de imprimir maior grau de liberdade à medida.

1	2	3	4	3	0	/	0	9
ALC	Nome Residuo1	Número Resíduo1	Nome Resíduo2	Número Residuo2	Distância Euclidiana	Distância Topológica	DMAX	Resultado
BS3	LYS	7	LYS	69	13,859	16,042	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	7	LYS	71	14,262	17,12	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	7	LYS	105	22,18	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	15	LYS	37	17,748	>22.100	22,1	BAD:NOTFOUND
BS3	LYS	15	LYS	90	16,772	>22.100	22,1	BAD:NOTFOUND
BS3	LYS	15	LYS	105	10,478	11,33	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	19	LYS	37	17,469	>22.100	22,1	BAD:NOTFOUND
BS3	LYS	19	LYS	105	9,583	12,537	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	19	LYS	106	14,302	16,993	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	69	LYS	71	8,158	13,403	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	69	LYS	83	15,862	18,288	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	69	LYS	90	12,523	15,176	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	71	LYS	90	13,65	15,174	22,1	OK:FUND
ZL	GLU	12	LYS	19	15,941	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	12	LYS	71	9,416	9,864	12,7	OK:FOUND
ZL	LYS	53	GLU	84	8,274	8,304	12,7	OK:FOUND
ZL	LYS	71	GLU	84	23,198	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	71	GLU	98	14,67	>12.700	12,7	BAD:EUCL

Tabela 6 - Análise das distâncias euclidianas e topológicas realizadas pelos software Topolink.

Coluna 1: ALC, agente de ligação cruzada; Colunas 2 e 4: resíduos envolvidos na reação de *cross-linking*; Colunas 3 e 5: posição, na estrutura primária da proteína, dos resíduos envolvidos na reação de *cross-linking*; Coluna 6: distância, em linha reta, entre átomos de carbono beta dos pares de resíduos; Coluna 7: distância entre os mesmos dois resíduos, levando em consideração a superíície da proteína exposta ao solvente; Coluna 8: distância máxima permitida, levando em consideração o tamanho da cadeia espaçadora (apenas no caso do BS³) e as cadeias laterais dos resíduos envolvidos na reação de *cross-linking*; Coluna 9: validação dos *links* onde: a) OK:FOUND significa que as distâncias (euclidiana e topológica) do *link* foram validadas; b) BAD:EUCL: a distância euclidiana encontrada foi maior que a permitida; c) BAD:NOTFOUND: a distância euclidiana foi validada, mas a topológica não foi encontrada.

0

Analisando a tabela acima, observamos que o ALC BS³ teve 4/13 restrições não validadas, correspondendo a cerca de 30% do total identificado. O agente de *cross-linking* XPlex-ZL apresentou 3/5 restrições não validadas, representando 60% do total identificado. Entretanto, vale lembrar que as restrições de distância apresentadas na Tabela 6 foram validadas em uma estrutura cristalográfica (1CLP). Desta forma, a dinâmica molecular apresentada pela proteína em solução pode ser o provável motivo de alguns *links* não terem sido validados, ou seja, não apresentarem distâncias dentro do limite máximo permitido de acordo com o *ALC* utilizado e as cadeias laterais dos resíduos envolvidos na reação. Corroborando esta hipótese, observamos que os *links* não validados envolvem, de maneira recorrente, regiões de voltas e/ou *random coils*, que são mais flexíveis do que as regiões de estrutura secundária regular (hélice alfa e fita beta). Neste trabalho, utilizamos limites de distância bastante restritos, diferentemente do observado em outros trabalhos, que utilizam observação recorrente (Merkley *et al.*, 2014). Tudo isto considerado, temos grande confiança na qualidade dos dados de *cross-linking* gerados.

Na Figura 26, analisamos os cross-links identificados na estrutura da miotoxina II (1CLP) utilizando a mesma representação de cores da Figura 25. Os cross-links identificados foram representados na forma de um caminho que conecta os dois resíduos relacionados, ou seja, a distância topológica (linha de esferas colorida em verde). Os cross-links não validados foram representados pela distância euclidiana (linha reta) entre os dois resíduos relacionados, indicado pela linha tracejada colorida em vermelho (Figura 26A). Na Figura 26B, apresentamos a representação da superfície da miotoxina, evidenciando a distância topológica conectando os dois resíduos de aminoácidos em caminhos na parte externa da proteína. Na Figura 26C, apresentamos uma rotação de 180º da Figura 26B, detalhando os cross-links na face oposta da proteína. É importante ressaltar que só observamos links na região localizada acima do sítio catalítico e na face oposta ao mesmo. Analisando a figura da superfície eletrostática da miotoxina (Figura 27), percebemos uma nítida polarização dos resíduos carregados: resíduos básicos (Lys, Arg e His, em azul) estão mais concentrados na mesma face do sítio catalítico, enquanto que os poucos resíduos ácidos (Glu e Asp, em vermelho) estão distribuídos quase que exclusivamente na face oposta. Estes resultados parecem indicar que, no complexo com a DM64, o sítio catalítico da miotoxina II não deve estar exposto ao solvente. Se este fosse o caso, esperar-se-ia uma maior quantidade de intra-links nesta região, que é bastante rica em resíduos-alvo de BS³.



Figura 26 - Análise dos *cross-links* **identificados na estrutura da miotoxina II.** (A) A estrutura cristalográfica 1CLP foi representada seguindo o mesmo esquema descrito para a Figura 25. As distâncias topológicas identificadas foram representadas pela linha de esferas coloridas em verde. Os *cross-links* não validados foram representados por suas distâncias euclidianas (linha reta tracejada colorida em vermelho). Os resíduos de aminoácidos envolvidos nos *cross-links* estão indicados pelas legendas. (B) A superfície da miotoxina foi representada em branco, onde os *cross-links* validados estão indicados com a linha verde pontilhada de esferas, evidenciando o caminho computado entre os dois resíduos de aminoácidos. (C) Rotação de 180º da imagem do painel (B).





Figura 27 - Distribuição de cargas na superfície da estrutura da miotoxina II. Plot de superfície eletrostática da estrutura 1CLP: na esquerda, representamos a estrutura na forma *cartoon*. Os aminoácidos His48, Lys49 e Asp99 foram representados em bastões, localizando o sítio catalítico da miotoxina II. À direita, representamos a superfície da miotoxina II, colorida de acordo com a distribuição de cargas. Os resíduos carregados positivamente (Lys, Arg e His) e carregados negativamente (Asp e Glu) foram utilizados como pontos de referência. (B) rotação de -90° no eixo y. (C) Rotação de - 180° no eixo y.

5.3.2 Análise dos espectros e mapa de restrições de distância de DM64 controle

A compreensão do mecanismo de inibição da miotoxina II por DM64 envolve a análise da estrutura tridimensional destas proteínas no complexo de inibição. Contudo, a aplicação das técnicas clássicas de elucidação de estruturas não foi possível para DM64 devido a algumas limitações. Não conseguimos obter cristais de boa qualidade, provavelmente devido às glicosilações presentes em sua estrutura (em torno de 15%), que conferem heterogeneidade à proteína (Rocha *et al.*, 2002). Mesmo que cristais tivessem sido obtidos, com a aquisição de dados de difração de raios-X, a ausência de proteínas homólogas com estrutura cristalográfica resolvida e depositada em bancos de dados torna impossível a resolução estrutural utilizando o método de substituição molecular (Bastos *et al.*, 2016). Com relação à técnica de RNM, a proteína DM64 (64 kDa) e o complexo formado por DM64 e miotoxina II (78 kDa) apresentam massas moleculares que superam o limite aceitável para os protocolos padrão de RMN (Bastos *et al.*, 2016).

Sendo assim, utilizamos abordagens de modelagem molecular por homologia, associadas aos dados de *cross-linking* obtidos para DM64, para miotoxina II e para o complexo miotoxina II-DM64, que serviram como um filtro, de modo a facilitar a seleção de modelos estruturais mais compatíveis com os dados experimentais adquiridos.

Usando os mesmo critérios de confiabilidade utilizados nas análises de miotoxina (*i.e.*, apenas espectros classificados como bons ou excelentes), conseguimos identificar 28 *intra-links* na estrutura de DM64 controle utilizando o ALC BS³ e 67 *intra-links* utilizando a metodologia XPlex. A Figura 28 mostra espectros de alta qualidade obtidos utilizando o ALC BS³ e o XPlex. Na Figura 29, mostramos os mapas de restrições de distância obtidos com as duas metodologias.





Figura 28 - Espectros MS/MS de alta confiabilidade (excelentes) e cobertura de sequência de *cross-links* intra-moleculares de DM64 controle provenientes da reação com BS³ (A) e XPlex-ZL (B). Em ambos espectros, observa-se: a) boa relação sinal-ruído (painel I); b) alta cobertura de sequência (íons-fragmentos marcados e numerados por traços azuis e vermelhos) (painel II); c) ausência de dubiedades quanto ao posicionamento do *linker* (marcado por um traço negro) (painel II); d) presença dos íons-diagnóstico característicos da reação com BS³ (painel III); e) distribuição uniforme de erro na determinação da relação m/z dos íons-fragmento (painel I). Cada ponto indica um íon-fragmento identificado, enquanto que as linhas tracejadas indicam a margem de erro permitida (2 desvios-padrão) em relação à linha em negrito, que indica a tendência central de distribuição de erro.



Figura 29 - *Intra-links* observados na estrutura de DM64 controle. Após filtragem automática dos espectros de *cross-linking* com o auxílio do *software* SIM-XL e validação manual segundo os critérios elencados anteriormente, criamos um mapa bidimensional (2D) indicando os *intra-links* (classificados como excelentes ou bons) observados utilizando o *ALC* BS³ (A) e a metodologia XPlex (AC + ZL) (B). Cada linha lilás representa um *cross-link* observado entre resíduos de lisina e/ou serina (BS³), lisina e/ou serina com ácido aspártico e/ou ácido glutâmico (XPlex-ZL) ou ácido aspártico e/ou ácido glutâmico (XPlex-AC). A sequência da proteína está representada pelo retângulo rosa, com a numeação dos resíduos. As sequências consenso de N-glicosilação estão mostradas em rosa. Os resíduos C- e N-terminal foram considerados nas buscas.

A antitoxina DM64 possui cinco domínios tipo imunoglobulina. Segundo previsão do algoritmo PSI-Blast, os limites dos domínios são: domínio um (resíduos 1-98), domínio dois (101-188), domínio três (192-286), domínio quatro (290-383) e domínio cinco (387-481). Analisando os *intra-links* presentes na estrutura da DM64 obtidos pela reação com a ALC BS³ (Figura 29A) chama atenção a observação recorrente de *links* conectando domínios não sequenciais na estrutura primária (ex.: domínios 1-5, 1-3 e 3-5), sugerindo a proximidade espacial dos mesmos na proteína enovelada.

Ao analisar os mapas 2D de DM64 controle obtidos pela reação XPlex (Figura 29B), percebemos um aumento significativo de *intra-links* presentes na estrutura do inibidor. O padrão geral de *cross-links* se mantém em relação ao obtido com o BS³. O primeiro, terceiro e quinto domínios apresentam omaior número de ligações intra-dominio. Regiões do segundo e quarto domínios continuam não apresentando um número significativo de *cross-links* intra-domínio, umas das possibilidades é a existências dos sítios de glicosilação. Observa-se a formação de cross-links entre o N-terminal e regiões do quinto domínio e entre os domínios 1-2, 1-3, 1-5, 2-4, 2-5, 3-4, 3-5 e 4-5. Mais uma vez, os resultados de *cross-linking* sugerem que os domínios de DM64 estão espacialmente próximos uns dos outros.

Ao consolidar os dados obtidos pelas duas metodologias, conseguimos aumentar bastante o número de *links* observados na estrutura de DM64 controle (Figura 30).



Figura 30 - *Intra-links* encontrados na estrutura de DM64 controle após a união das duas metodologias empregadas (XPlex e BS³). Cada linha lilás representa um *cross-link* observado entre resíduos de lisina e/ou serina (BS³), ácido aspártico e/ou ácido glutâmico (XPlex-AC) e ácido aspártico e/ou ácido glutâmico e lisina e/ou serina (XPlex-ZL). A sequência da proteína está representada pelo retângulo colorido conforme os domínios *Ig-like* presentes na proteína. D1: laranja; D2: verde, D3: cinza; D4: azul; D5: roxo. As sequências consenso de N-glicosilação estão mostradas em rosa.

As regiões que apresentam menor número de *links* correspondem à localização dos sítios de glicosilação: no primeiro domínio, há uma glicosilação no resíduo 21, enquanto no segundo domínio temos glicosilações nos resíduos 154 e 158. Por fim, existe mais um sítio de glicosilção no quarto domínio (resíduo 358).

5.3.3 Análise dos espectros e mapas de restrição de distâncias de DM64 no complexo

Usando os mesmos critérios de confiabilidade citados anteriormente, conseguimos identificar 38 *intra-links* na estrutura de DM64 em complexo com a miotoxina II, utilizando o *ALC* BS³, e 72 *intra-links* utilizando a metodologia XPlex. A Figura 31 mostra dois espectros de alta qualidade obtidos utilizando o ALC BS³ e XPlex, respectivamente. Na Figura 32, mostramos os mapas de restrições de distância obtidos com duas as metodologias. Com a associação das duas técnicas, foi possivel aumentar o número de restrições de distâncias obtido (Figura 33).

Ao compararmos os mapas 2D consolidados de DM64 controle (Figura 30) e DM64 no complexo (Figura 33), não percebemos mudanças importantes no padrão geral de ligações cruzadas. Apesar da perda de alguns *links* no mapa 2D de DM64 no complexo, as interações entre os domínios (sequenciais ou não) se mantêm, indicando, mais uma vez, a proximidade espacial dos domínios de DM64. Como o número de replicatas (biológicas e técnicas) e a combinação de enzimas utilizadas nas duas amostras não foram exatamente iguais (vide Tabela 2), não se pode sugerir a ocorrência de mudanças conformacionais importantes como consequência da complexação do inibidor com a toxina, tomando por base apenas as diferenças no número e na localização dos *links* observados.





Figura 31 - Espectros MS/MS de alta confiabilidade (excelentes) e cobertura de sequência de *cross-links* intra-moleculares de DM64 no complexo com miotoxina provenientes da reação com BS³ (A) e XPlex-AC (B). Em ambos espectros, observa-se: a) boa relação sinal-ruído (painel I); b) alta cobertura de sequência (fons-fragmentos marcados e numerados por traços azuis e vermelhos) (painel II); c) ausência de dubiedades quanto ao posicionamento do *linker* (marcado por um traço negro) (painel II); d) presença dos íons-diagnóstico característicos da reação com BS³ (painel III); e) distribuição uniforme de erro na determinação da relação m/z dos íons-fragmento (painel I). Cada ponto indica um íon-fragmento identificado, enquanto que as linhas tracejadas indicam a margem de erro permitida (2 desvios-padrão) em relação à linha em negrito, que indica a tendência central de distribuição de erro.



Figura 32 - *Intra-links* observados na estrutura de DM64 em complexo com miotoxina II. Após filtragem automática dos espectros de *cross-linking* com o auxílio do *software* SIM-XL e validação manual segundo os critérios elencados anteriormente, criamos um mapa bidimensional (2D) indicando os *intra-links* (classificados como excelentes ou bons) encontrados na estrutura de DM64 controle, utilizando a metodologia Xplex (AC + ZL) (A) e o ALC BS³ (B). Cada linha lilás representa um *cross-link* observado entre resíduos reativos. A sequência da proteína está representada pelo retângulo colorido, usando a seguinte notação para os domínios Ig-like presentes na proteína. D1: laranja; D2: verde, D3: cinza; D4: azul; D5: roxo. As sequências consenso de N-glicosilação estão mostradas em rosa.



Figura 33 - *Intra-links* observados na estrutura de DM64 no complexo após a consolidação dos resultados das duas metodologias empregadas (XPlex e BS³). Cada linha lilás representa um *cross-link* observado entre resíduos de lisina e/ou serina (BS³), ácido aspártico e/ou ácido glutâmico (XPlex-AC) e ácido aspártico e/ou ácido glutâmico e lisina e/ou serina (XPlex-ZL). A sequência da proteína está representada pelo retângulo colorido, usando a seguinte notação para os domínios Ig-like presentes na proteína. D1: laranja; D2: verde, D3: cinza; D4: azul; D5: roxo. As sequências consenso de N-glicosilação estão mostradas em rosa.

5.3.4 Análise dos espectros e mapas de restrição de distâncias da interação entre DM64 e miotoxina II

Em relação à análise da interação entre miotoxina II e DM64, conseguimos identificar 22 *inter-links* de alta confiança utilizando o ALC BS³ e 40 *intra-links* utilizando a metodologia XPlex. A Figura 34 mostra exemplos de dois espectros de alta qualidade obtidos utilizando o ALC BS³ e XPlex, respectivamente, segundo os critérios de classificação utilizados. Na Figura 35 mostramos os mapas de restrições de distância obtidos com as duas metodologias.





Figura 34 - Espectros MS/MS de alta confiabilidade (excelentes) e cobertura de sequência de *cross-links* inter-molecular entre DM64 e miotoxina II provenientes da reação com BS³ (A) XPlex-ZL (B). Em ambos espectros, observa-se: a) boa relação sinal-ruído (painel I); b) alta cobertura de sequência (íons-fragmentos marcados e numerados por traços azuis e vermelhos) (painel II); c) ausência de dubiedades quanto ao posicionamento do *linker* (marcado por um traço negro) (painel II); d) presença dos íons-diagnóstico característicos da reação com BS³ (painel III); e) distribuição uniforme de erro na determinação da relação m/z dos íons-fragmento (painel I). Cada ponto indica um íon-fragmento identificado, enquanto que as linhas tracejadas indicam a margem de erro permitida (2 desvios-padrão) em relação à linha em negrito, que indica a tendência central de distribuição de erro.



Figura 35 - *Inter-links* **encontrados entre DM64 e miotoxina II.** Após filtragem automática dos espectros de *cross-linking* com o auxílio do *software* SIM-XL e validação manual segundo os critérios elencados anteriormente, criamos um mapa bidimensional (2D) indicando os *intra-links* (classificados como excelentes ou bons) encontrados na estrutura de DM64 controle, utilizando a metodologia XPlex (AC + ZL) (A) e o ALC BS³ (B). Cada linha verde representa um *cross-link* observado entre resíduos reativos. A sequência da proteína está representada pelo retângulo colorido conforme os domínios *Ig-like* presentes na proteína. D1: laranja; D2: verde, D3: cinza; D4: azul; D5: roxo. Os sítios de glicosilação estão representados em rosa.

Após a consolidação dos resultados das duas estratégias de *cross-linking* utilizadas (Figura 36), identificamos no mapa 2D o envolvimento preferencial de três regiões de DM64: a) segunda metade do D1/primeira metade do D2; b) região central do D3; c) toda a extensão do D5. No D4, observamos *links* apenas envolvendo as regiões limítrofes com D3 e D5. Vários destes *links* interagem com a porção C-terminal da miotoxina II, principal região responsável pela miotoxicidade da mesma (Dos Santos *et al.*, 2009). Em concordância com estes resultados, dados prévios obtidos por Rocha *et al.* (2002), mostraram que peptídeos do terceiro e quinto domínios de DM64 (obtidos após clivagem da proteína reduzida e alquilada com a endopeptidase Lys-C) foram capazes de interagir com a miotoxina II imobilizada em coluna de afinidade HiTrap-NHS.



Figura 36 - *Inter-links* encontrados no complexo entre DM64 e miotoxina II após a união das duas metodologias empregadas (XPlex e BS³). Cada linha verde representa um *cross-link* observado entre resíduos de lisina e/ou serina (BS³) e ácido aspártico e/ou ácido glutâmico (XPlex-AC). A sequência de DM64 está representada pelo retângulo colorido conforme os domínios Ig-like presentes na proteína. D1: laranja; D2: verde, D3: cinza; D4: azul; D5: roxo. Os sítios de glicosilação estão representados em rosa. A sequencia de miotoxina II está representada por um retângulo rosa claro.



Figura 37 - Mapa 2D do complexo miotoxina - DM64. Os *cross-links* intra-proteína estão representados por linhas lilás, enquanto que as ligações cruzadas entre proteínas são mostradas em verde. A sequência de DM64 está representada pelo retângulo colorido, usando a seguinte notação para os domínios *Ig-like* presentes: D1: laranja; D2: verde; D3: cinza; D4: azul; D5: roxo. As sequências consenso de N-glicosilação estão mostradas em rosa. A sequência da miotoxina II está representada por um retângulo rosa claro.

A Figura 37 mostra todos os *intra-links* e *inter-links* observados no complexo entre DM64 e miotoxina II, após a consolidação das duas metodologias utilizadas (XPlex e BS³). A associação das duas técnicas fornece um maior número de restrições de distâncias, o que deverá facilitar o posicionamento espacial dos domínios de DM64 na modelagem molecular e

sua aproximação/atracamento com a toxina (*docking* molecular). As coberturas de sequência de DM64 e miotoxina, após a união das metodologias, foram de 77.5% e 95%, respectivamente. No cálculo do percentual de cobertura, o *software* SIM-XL levou em conta apenas os peptídeos modificados por *intra-* ou *inter-links*, desconsiderando os peptídeos não-modificados ou contendo apenas *dead-ends*.

5.4 Modelagem molecular da antitoxina DM64

Os dados de *cross-linking* obtidos anteriormente foram utilizados na predição da estrutura de DM64. Para isto, utilizamos abordagens de modelagem molecular por homologia, associadas às restrições de distância de *cross-linking*. Estas últimas serviram como filtro, de modo a facilitar a seleção de modelos estruturais mais compatíveis com os dados experimentais observados.

5.4.1 Modelagem molecular de DM64 completa

Inicialmente, fizemos a predição da estrutura secundária de DM64 utilizando quatro algoritmos diferentes: PSI-Blast, HHSearch, Ginzu:Domain Prediction e GenTHREADER. Todos eles sugeriram que a proteína DM64 apresenta cinco domínios tipo-imunoglobulina (tipo-Ig), em consonância com estudos anteriores (ROCHA et al., 2002). Neste trabalho, mostraremos apenas os resultados obtidos pelo algoritmo PSI-BLAST. Na Figura 38, observase a distribuição de domínios tipo-Ig, que possuem, em média, de 80 a 100 resíduos de extensão.



Figura 38 - Análise de domínios de DM64 e reconhecimento de domínios pelo PSI-Blast. Representação esquemática da distribuição de domínios ao longo da sequência de DM64. A primeira linha corresponde à sequência de aminoácidos de DM64, com a respectiva numeração de resíduos; a segunda linha mostra os *hits* específicos; a terceira linha mostra *hits* não-específicos; a quarta linha indica a superfamília de proteínas detectada.

Com relação à busca por modelos homólogos, utilizamos três estratégias automáticas diferentes: Robetta, I-Tasser e Modeller. Todos os algoritmos retornaram o mesmo enovelamento global. Neste trabalho, apresentaremos apenas o resultado do servidor automatizado de modelagem molecular I-Tasser.

O Servidor I-Tasser (Zhang, 2008) (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) utiliza uma abordagem iterativa extremamente robusta, que tem apresentado excelentes resultados nos testes comparativos do CASP (*Critical Assessment of protein Structure Prediction*)(http://predictioncenter.org/). Primeiramente, o algoritmo utiliza nove diferentes estratégias de busca, que produzem, cada um, os 10 melhores alinhamentos entre DM64 e as possíveis estruturas experimentais candidatas a molde, totalizando 90 alinhamentos. Estes então passam por análises e são ranqueados, produzindo uma lista dos 10 melhores alinhamentos gerais. O melhor *score* de alinhamento é utilizado no passo de modelagem molecular. No final desta etapa, o algoritmo clusteriza os modelos produzidos e apresenta como resultado os *clusters* mais representativos (conjunto de modelos). O *cluster* de modelos com melhores *scores* é então submetido a uma comparação *fold/fold* contra o banco de dados do PDB, retornando os 10 análogos estruturais, anotando função e, no caso de enzimas, sugerindo substratos (Yang e Zhang, 2015a; Roy *et al.*, 2010; Yang e Zhang, 2015b).

Para DM64, o algoritmo identificou como melhor candidato a molde a estrutura cristalográfica 3B43 intitulada "*I-band fragment I65-I70 from titin*" (Von Castelmur, E. et al., 2008). Esta proteína é composta por seis domínios tipo-Ig, apresentando um formato alongado que parece fundamental para a manutenção das caraterísticas de flexibilidade e elasticidade da titina e seu envolvimento na contração muscular.

Realizamos a modelagem molecular de DM64 utilizando a cadeia A da estrutura cristalográfica 3B43, que produziu o modelo apresentado na Figura 38A. Para a etapa de validação do modelo obtido, utilizamos as tabelas que reúnem as informações dos resíduos que reagiram com os ALC BS³ e XPlex, cujas restrições de distância foram calculadas pelo *software* Topolink (L. Martínez *et al.*, 2017). Na modelagem de DM64, utilizamos apenas os dados de *intra-links* obtidos para a proteína controle (*i.e.*, não complexada com a miotoxina).

Nas Tabelas 7, 8 e 9, relacionamos os resíduos envolvidos, as distâncias euclidiana e topológica (quando calculada) e o resultado final da análise para cada par de resíduos envolvidos nos *cross-links*, de acordo com a metodologia utilizada (BS³ ou XPlex). Analisando a tabela com as restrições de distâncias provenientes da utilização do ACL BS³ (Tabela 7), conseguimos validar apenas 5 *links* dos 28 *links* observados com alta confiança (~

18%). Usando os dados de XPlex-AC (Tabela 8), apenas 6 dos 22 *links* foram validados (~ 27%). Com relação aos dados de XPlex-ZL (Tabela 9), apenas 7 de 45 links foram validados (~15%). Os *cross-links* validados foram representados por sua distância topológica (representação esfera/bastão colorida em verde)(Figura 39A) e os não validados foram representados pela distância euclidiana entre os dois resíduos, marcada pela reta tracejada colorida em vermelho (Figura 39B). Desta forma, concluímos que a maioria dos *cross-links* observados experimentalmente apresentaram distância superior à máxima permitida, calculada pelo *software* Topolink, indicando que o modelo produzido não corresponde à estrutura da molécula nativa e funcional.

Com a observação dos *cross-links* no modelo obtido, pudemos visualizar que alguns *cross-links* validados (linhas verdes) interligam os domínios 5 e 4. Com relação à visualização dos *links* não validados, é possível sugerir que os domínios tipo-Ig de DM64 estão mais próximos uns dos outros, ou seja, DM64 aparenta possuir uma estrutura mais próxima de algo globular.



Figura 39 - Modelagem Molecular de DM64 completa. O modelo é representado em cartoon, onde os domínios seguem o seguinte esquema de cores: D1 (rosa), D2 (verde), D4 (ciano), D4 (azul) e D5 (vermelho). Em (A), os resíduos envolvidos em cross-links estão representados por seus carbonos alfa e beta na forma de esfera/bastão verdes. Os cross-links validados foram representados pelas distâncias topológicas indicadas por linhas feitas de esferas verdes. Em (B), adicionamos as distâncias euclidianas dos cross-links não validados no modelo (representadas pela linha reta tracejada colorida em vermelho).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ACL	Nome Residuo1	Domínio	Número Resíduo1	Nome Resíduo 2	Domínio	Número Residuo2	Distância Euclidiana	Distância Topológica	DMAX	Resultado
BS3	LEU	1	2	LYS	1	58	29,799	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	LEU	1	2	SER	1	85	25,574	>13.000	13	BAD:EUCL
BS3	LEU	1	2	LYS	2	118	75,866	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	LEU	1	2	LYS	3	192	88,201	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	LEU	1	2	LYS	3	242	102,758	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	LEU	1	2	LYS	3	258	97,614	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	LEU	1	2	LYS	4	387	136,909	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	SER	1	85	LYS	5	444	169,242	>18.200	18,2	BAD:EUCL
BS3	SER	1	85	LYS	5	453	157,371	>18.200	18,2	BAD:EUCL
BS3	LYS	1	95	LYS	5	444	158,988	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	3	258	LYS	3	277	15,177	19,239	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	3	258	LYS	4	320	28,416	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	SER	3	276	LYS	4	290	37,3	>18.200	18,2	BAD:EUCL
BS3	SER	3	276	LYS	5	410	83,503	>18.200	18,2	BAD:EUCL
BS3	LYS	3	277	LYS	5	410	81,264	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	3	277	LYS	5	453	98,447	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	4	290	LYS	4	307	32,439	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	4	307	LYS	5	387	21,07	21,728	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	4	307	LYS	5	410	22,673	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	4	307	LYS	5	444	48,092	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	4	325	SER	5	408	33,503	>18.200	18,2	BAD:EUCL
BS3	LYS	4	325	LYS	5	410	26,054	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	SER	4	374	LYS	5	387	38,11	>18.200	18,2	BAD:EUCL
BS3	LYS	5	387	SER	5	408	10,666	17,107	18,2	OK:FOUND
BS3	LYS	5	387	LYS	5	410	7,144	8,393	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	5	387	LYS	5	444	29,323	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	5	387	LYS	5	453	19,123	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	5	444	LYS	5	453	18,287	20,501	22,1	OK:FOUND

Tabela 7 - Análise do *software* Topolink para os links obtidos pelo ALC BS³ no modelo alongado da proteína DM64.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ACL	Nome Residuo 1	Domínio	Número Resíduo 1	Nome Resíduo 2	Domínio	Número Residuo 2	Distância Euclidiana	Distância Topológic a	DMA X	Resultado
AC	GLU	1	5	GLU	2	137	82,891	>16.900	16,9	BAD:EUCL
AC	GLU	1	5	GLU	2	139	78,744	>16.900	16,9	BAD:EUCL
AC	ASP	1	66	GLU	2	135	45,612	>15.600	15,6	BAD:EUCL
AC	ASP	1	66	GLU	2	137	44,38	>15.600	15,6	BAD:EUCL
AC	ASP	1	66	GLU	2	139	39,567	>15.600	15,6	BAD:EUCL
AC	ASP	1	67	GLU	4	296	105,559	>15.600	15,6	BAD:EUCL
AC	GLU	1	80	GLU	4	296	120,551	>16.900	16,9	BAD:EUCL
AC	GLU	1	80	GLU	5	428	164,113	>16.900	16,9	BAD:EUCL
AC	ASP	2	131	GLU	5	428	145,284	>15.600	15,6	BAD:EUCL
AC	GLU	2	135	GLU	2	139	9,884	11,88	16,9	OK:FOUND
AC	GLU	2	137	GLU	2	139	6,686	7,531	16,9	OK:FOUND
AC	GLU	2	137	GLU	4	296	93,748	>16.900	16,9	BAD:EUCL
AC	GLU	2	139	GLU	4	296	91,123	>16.900	16,9	BAD:EUCL
AC	ASP	2	188	ASP	3	199	30,694	>14.300	14,3	BAD:EUCL
AC	ASP	3	199	GLU	3	247	13,314	>15.600	15,6	BAD:EUCL
AC	ASP	3	227	GLU	3	254	9,448	9,855	15,6	OK:FOUND
AC	GLU	4	299	GLU	3	382	14,708	>16.900	16,9	BAD: NOTFOUND
AC	GLU	4	378	GLU	4	382	12,69	13,88	16,9	OK:FOUND
AC	GLU	4	378	ASP	5	463	20,103	>15.600	15,6	BAD:EUCL
AC	GLU	4	382	ASP	5	463	8,355	8,404	15,6	OK:FOUND
AC	GLU	4	382	GLU	5	467	20,446	>16.900	16,9	BAD:EUCL
AC	GLU	5	426	GLU	5	428	5,387	5,785	16,9	OK:FOUND

Tabela 8 - Análise do *software* Topolink para os *links* obtidos pela metodologia *XPlex-AC* no modelo alongado da proteína DM64

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ACL	Nome Residuo 1	Domínio	Número Resíduo 1	Nome Resíduo 2	Domínio	Número Residuo 2	Distância Euclidiana	Distância Topológica	DMAX	Resultado
ZL	GLU	1	5	LYS	5	420	156,909	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	1	5	LYS	5	444	167,714	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	ASP	1	43	LYS	5	387	140,415	>11.400	11,4	BAD:EUCL
ZL	GLU	1	45	LYS	5	387	135,226	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	1	58	GLU	1	96	25,309	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	ASP	1	66	LYS	1	95	11,865	>11.400	11,4	BAD:EUCL
ZL	GLU	1	80	LYS	1	95	39,579	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	1	80	LYS	3	226	101,7	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	1	80	LYS	3	235	111,14	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	1	80	LYS	4	307	119,837	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	1	80	LYS	5	387	138,955	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	SER	1	87	GLU	1	96	26,44	>8.800	8,8	BAD:EUCL
ZL	LYS	1	95	GLU	1	96	5,53	7,8	12,7	OK:FOUND
ZL	LYS	1	95	GLU	4	296	105,758	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	1	96	LYS	5	387	136,039	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	2	116	LYS	2	118	7,004	7,251	12,7	OK:FOUND
ZL	LYS	3	192	GLU	3	274	11,07	11,442	12,7	OK:FOUND
ZL	ASP	3	199	LYS	5	453	91,437	>11.400	11,4	BAD:EUCL
ZL	LYS	3	226	GLU	3	254	9,208	9,249	12,7	OK:FOUND
ZL	LYS	3	226	ASP	3	255	7,93	8,199	11,4	OK:FOUND
ZL	ASP	3	227	LYS	3	258	6,062	6,794	11,4	OK:FOUND
ZL	LYS	3	235	GLU	3	247	9,459	13,504	12,7	BAD:LONG
ZL	LYS	3	235	GLU	4	296	35,216	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	3	239	GLU	5	428	92,849	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	ASP	3	240	LYS	3	242	6,325	6,772	11,4	OK:FOUND
ZL	LYS	3	242	GLU	5	428	101,481	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	ASP	3	255	LYS	4	307	45,779	>11.400	11,4	BAD:EUCL
ZL	GLU	3	280	LYS	4	290	26,849	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	3	286	SER	4	292	14,542	>8.800	8,8	BAD:EUCL
ZL	LYS	4	290	GLU	4	375	16,684	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	4	290	ASP	4	376	18,24	>11.400	11,4	BAD:EUCL
ZL	GLU	4	296	LYS	4	307	20,647	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	4	296	LYS	5	387	36,094	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	4	299	LYS	5	387	27,761	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	4	299	SER	5	408	33,303	>8.800	8,8	BAD:EUCL
ZL	LYS	4	307	GLU	4	382	14,657	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	4	307	GLU	5	462	13,8	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	4	325	GLU	4	382	17,35	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	4	325	GLU	5	428	48,444	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	4	375	LYS	5	387	34,007	>12.700	12,7	BAD:EUCL

Tabela 9 - Análise do *software* Topolink para os links obtidos pela metodologia XPlex-ZL no modelo alongado da proteína DM64 alongada.

ZL	GLU	4	378	LYS	5	387	26,332	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	5	387	ASP	5	472	10,649	>11.400	11,4	BAD:NOTF OUND
ZL	ASP	5	402	LYS	5	444	5,415	6,047	11,4	OK:FOUND
ZL	LYS	5	420	GLU	5	428	13,315	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	5	428	SER	5	430	6,298	>8.800	8,8	BAD:NOTF OUND

Desde a publicação do primeiro trabalho descrevendo a identificação, purificação e análise físico-química e bioquímica de DM64, nenhuma estrutura experimental foi depositada no banco de dados do PDB com identidade sequencial do maior que 40% (Bastos *et al.*, 2016; Rost, 1999). Isto sugere que esta classe de proteínas não é bem explorada pelos métodos tradicionais de determinação de estrutura de proteínas. Ademais, os resultados obtidos pela técnica de *cross-linking* [a maioria das restrições de distância obtidas entre domínios (linhas vermelhas) não puderam ser validados no modelo escolhido], indicam que não existe uma proteína molde que contemple o real enovelamento da proteína DM64.

Um dos fatores primordiais para a modelagem molecular está relacionada à qualidade do alinhamento entre as sequências da proteína alvo (DM64) e dos candidatos a molde encontrados nas diferentes abordagens (Fiser, 2010; Cavasotto e Phatak, 2009; Bastos *et al.*, 2016). Desta forma, resolvemos modelar os domínios isoladamente e realizar a estratégia de *docking* entre eles, através da suíte de aplicativos ROSETTA *docking*, utilizando as restrições de distância obtidas pela técnica de *cross-linking* para construir o enovelamento global da proteína.

5.4.2 Modelagem molecular DM64/Domínios

Quando existe uma baixa identidade entre o *folding* encontrado e a sequência da proteína alvo, a estratégia *sequence-to-structure* é indicada como uma alternativa. Esta técnica busca por elementos de estrutura secundária conservados e compartilhados com a sequência da proteína alvo. Desta forma, pode-se obter modelos que apresentam estrutura secundária e função biológica conservadas, mesmo que a identidade sequencial seja baixa (Yang *et al.*, 2015).

Para a modelagem molecular dos domínios de DM64, utilizamos o servidor I-Tasser (Yang e Zhang, 2015a) (<u>http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/</u>), que possui uma vasta série de algoritmos baseados na estratégia citada acima (Yang e Zhang, 2015a; Roy *et al.*, 2010).

Primeiramente, realizamos a análise de detecção de domínios conforme descrito na Figura 40 e, para facilitar o enovelamento, aumentamos a extensão dos mesmos em direção às regiões de conexão entre estes domínios. Depois desta etapa, as sequências foram submetidas individualmente ao servidor automático I-Tasser.

De acordo com o I-Tasser, os domínios D1, D2 e D3 retornaram como melhor estrutura molde a estrutura cristalográfica 5EIQ intitulada *Human OSCAR ligand-binding domain* (Zhou *et al.*, 2016), com resolução de 2.01Å, depositada em 2015 no banco de dados do PDB. Os domínios D4 e D5 retornaram como melhor estrutura molde a estrutura cristalográfica 4LLA intitulada *Crystal structure of D3D4 domain of the LILRB2 molecule* (Nam *et al.*, 2013), com resolução de 2.5Å, depositada em 2013. Em ambos os casos, as moléculas têm funções relacionadas ao sistema imune.

Em seguida, os domínios modelados foram reduzidos à região mínima estruturada (sem as extensões) e utilizados em protocolos de *docking* sequenciais (Figura 41).

>DM64 1-481
LLAMETTPRLWIETESPSTPWTNVTLQCVATNTEALSFQLWKDGELLSTLPPMGLVGKFSLGPVTDDNRG
<mark>LYRCRILMFENTWTSPSEPVEVT</mark> GKEPLP <mark>APLLRADPGPWILHGLETKLHCQGVLLGMIFDLYQEGEQEP</mark>
VRSSHTPGTEATFIVNNTGNYSCLYRAPAPASSVNSAPSETIHVV <mark>IPDLLP</mark> KPDFHIYDNQVIRPGDSVT
FGCWGRFSGLEFKLFKDGQEVFVPKQSSKDPKHIYFELTALGPEDGGKYSCRYRFRNGPPIWSEDSKQLE
LVLTTETLAKPSLSVEPQETVISRGTKVTMRCQGAQPNVKFVLLKKGSPGHTLVLSSPESHVDFVLPNIL
<mark>SYDTGNFSCLYVQTEAPFAGSQRSEDVEIRV</mark> EGLLPKPTLHPVHPVVAPGR <mark>DAILHCSGKIPNAHFQLFK</mark>
DGEHEELEVSVLPIDDHAVNFLLKNINROOGGKYRCRYTTREDPILESEMSDPAELOVTGO

Figura 40 - Extensão de estruturação dos domínios mapeados na estrutura dos domínios de DM64 modelados pelo algoritmo I-Tasser. Os domínios foram coloridos de acordo com o esquema de cores utilizados no modelo completo de DM64: D1 colorido em rosa (1-96), D2 colorido em verde (101-188), D3 colorido em ciano (192 a 284), D4 colorido em azul (290 a 383) e D5 colorido em vermelho (387 a 481).

O *docking* molecular envolve a busca por maneiras possíveis que duas moléculas podem interagir, através de duas etapas: um algoritmo de busca conformacional, que envolve a translação, rotação e conformação da molécula e uma função que ranqueia as prováveis posições espaciais para uma determinada molécula (Rognan, 2011).

O *docking* dos domínios de DM64 teve sua ordem definida pela quantidade de informações experimentais obtidas nos dados de *cross-linking* e nos resultados experimentais prévios do grupo. Ao todo, fizemos quatro etapas de simulações de *docking* na seguinte ordem: (i) <u>D4</u>-D5, (ii) <u>D3</u>-D4D5, (iii) <u>D2</u>-D3D4D5 e (iv) <u>D1</u>-D2D3D4D5. A cada etapa, calcularam-se 10 mil modelos, que foram analisados pelo *software* Topolink e classificados de acordo com o número de restrições de distância violadas (Tabelas 7, 8 e 9). Para os passos de *docking* subsequentes, selecionou-se o representante com o menor número de violações e de menor energia, desde que todos sítios de glicosilação permanecessem expostos ao solvente.

Ao final do processo, obtivemos a estrutura mostrada na Figura 41C, que representa uma das possíveis conformações de DM64. Na Figura 41A apresentamos D3-D4D5 e representamos as conectividades entre o C-terminal e N-terminal de cada domínio pela linha verde tracejada. Nas Figuras 41B e 41C, representamos sequencialmente a inclusão dos domínios D2 e D1.



Figura 41 - Conectividade entre domínios para o Modelo 05262. O esquema de cores segue em concordância com as demais figuras: (D5 vermelho, D4 azul, D3 ciano, D2 verde e D1 rosa) e conforme o indicado pelas legendas. (A) Conectividades entre os domínios D5-D4-D3 é indicada pela linha verde tracejada. Os resíduos limítrofes de cada domínio estão indicados pelo carbono CA representado pela esfera de van der Waals e colorido de acordo com o domínio. (B) Sobreposição do domínio D2 (verde) se conectando ao resíduo Lys192 do domínio D3. (C) Domínio D1 localizado atrás do domínio D2.

Como mencionado anteriormente, a proteína DM64 apresenta quatro sítios de Nglicosilação em sua estrutura. Estes constituem uma importante fonte de restrição das possíveis conformações de DM64 em solução, visto que estas glicosilações devem estar expostas ao solvente. A conformação de DM64 gerada pelo *docking* guiado pelos *cross-links* gerada condiz com o esperado, ou seja, apresenta os sítios de glicosilações expostos, como ilustrado na Figura 42.



Figura 42 - O Modelo 05262 Representa a estrutura de DM64. O esquema de cores segue em concordância com as demais figuras: (D5 vermelho, D4 azul, D3 ciano, D2 verde) e conforme o indicado pelas legendas. (A) O domínio D1 é representado em *cartoon* rosa e mostra o grupo de modelos contendo 11 violações. (B) Representação do domínio D1 em superfície, apresentando o resíduo Asn160 exposto



Figura 43 - O Modelo 05262 Representa a estrutura de DM64. O esquema de cores segue em concordância com as demais figuras: (D5 vermelho, D4 azul, D3 ciano, D2 verde) e conforme o indicado pelas legendas. (A) Visão geral do modelo indicando os resíduos que participam de crosslinks. (B) A representação das distâncias topológicas dos crosslinks validados no modelo (representação em esfera/bastão) e (C) a sobreposição dos crosslinks não validados representados por suas distâncias euclidianas (reta tracejada em vermelho).

Na Figura 43A representamos os resíduos de aminoácidos envolvidos nas restrições de distância encontradas. Os *cross-links* validados foram representados por sua distância topológica (representação esfera/bastão colorida em verde) (Figura 43B) e os não validados foram representados pela distância euclidiana entre os dois resíduos, marcada pela reta tracejada colorida em vermelho (Figura 43C).

A comparação do número de violações obtidos no modelo estendido (Figura 39, gerado pelo I-Tasser) e no modelo globular #05262 (Figura 43, gerado por *docking*) de DM64 está resumida na Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação da validação dos *cross-links* entre os modelos de DM64 usando o I-Tasser (modelo estendido) e *docking* (modelo globular)

ACL/#Rest	I-Tasser	% Validado	Docking	% Validado
BS3 (28)	5	17,86	11	39,29
AC (22)	6	27,27	13	59,09
ZL (45)	7	15,5	14	31,11

O modelo globular possibilitou um aumento expressivo do número de *cross-links* validados (Figura 43B) em comparação com o modelo estendido, refletindo uma aproximação maior da conformação da proteína que existe em solução. Entretanto, ainda observamos um grande número de *links* não validados. Pelo menos dois fatores poderiam justificar esta observação. Possivelmente o principal problema é a quantidade limitada (em termos de número e localização) de *links* observados. Desta forma, o número de restrições de distância gerado ainda é insuficiente para definir a posição relativa dos domínios de maneira inequívoca (*i.e.*, sem ambiguidades). Outro fator complicador pode ser atribuído à dinâmica molecular da proteína em solução, que leva à existência de um conjunto (*ensemble*) de conformações possíveis. Desta forma, ao analisarmos o conjunto de *cross-links* amostrados em solução contra um modelo estático, é muito pouco provável que a totalidade dos *links* possa ser validada simultaneamente.

A modelagem molecular é uma técnica que nos permite levantar uma hipótese biológica (o modelo) e verificar se ela se adequa aos dados experimentais sobre a proteína (quer seja em seu estado livre ou complexado). Em tese, para melhorar a qualidade do modelo gerado com base em dados de *cross-linking*, seria importante, além de aumentar o número de *cross-links*, atribuir dados quantitativos às observações. Por exemplo, ao comparar diferentes replicatas biológicas analisadas sob as mesmas condições experimentais, qual seria o conjunto

de *links* mais representativo em termos de reprodutibilidade (ou seja, mais recorrentes em todas as replicatas) ? Dentre todos os *links* observados, quais teriam maior abundância relativa (ou seja, quais os precursores com os maiores valores de *extracted ion chromatogram*) ? Estas opções estão sendo desenvolvidas atualmente na forma de novos módulos do *software* SIM-XL e deverão estar disponíveis para utilização pela comunidade de usuários em breve.

Outra estratégia importante para aperfeiçoar os modelos gerados é a integração de dados experimentais utilizando técnicas complementares. Neste sentido, nosso grupo na Fiocruz vem investindo em duas frentes principais: a) Experimentos de troca hidrogênio-deutério; b) Experimentos de espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS). Através da técnica de HDX é possível obter informações sobre as superfícies de interação entre duas moléculas, através das taxas de incorporação de deutério observadas para a proteína isolada, para o ligante isolado e para o complexo formado entre a proteína e seu ligante, e a dinâmica estrutural e acessibilidade ao solvente de cada hidrogênio amídico localizado no *backbone* proteico (Gallagher e Hudgens, 2016). A pela técnica de SAXS ou espalhamento de raios-X a baixo ângulo, é um método que possibilita a caracterização da conformação geral de proteínas que possuem diferentes formas e tamanhos em solução, de modo a gerar um dado com uma resolução entre 50 e 10 Å. Desta maneira, é possível determinar paramêtros físicos da proteína, como raio de giração, máxima dimensão, volume e superfície, permitindo a elucidação do envelope molecular da proteína em solução (Feigin e Svergun, 1987; Putnam *et al.*, 2007).

ACL	Nome Residuo1	Número Resíduo1	Nome Resíduo2	Número Residuo2	Distância Euclidiana	Distância Topológica	DMAX	Resultado
BS3	LEU	2	LYS	58	22,725	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	LEU	2	SER	85	7,959	10,427	13	OK:FOUND
BS3	LEU	2	LYS	118	35,064	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	LEU	2	LYS	192	43,062	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	LEU	2	LYS	242	43,568	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	LEU	2	LYS	258	48,381	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	LEU	2	LYS	387	20,546	>16.900	16,9	BAD:EUCL
BS3	SER	85	LYS	444	34,785	>18.200	18,2	BAD:EUCL
BS3	SER	85	LYS	453	18,052	18,083	18,2	OK:FOUND
BS3	LYS	95	LYS	444	51,608	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	258	LYS	277	9,933	12,672	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	258	LYS	320	20,297	20,833	22,1	OK:FOUND
BS3	SER	276	LYS	290	17,813	>18.200	18,2	BAD:EUCL
BS3	SER	276	LYS	410	12,808	13,875	18,2	OK:FOUND
BS3	LYS	277	LYS	410	10,559	12,371	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	277	LYS	453	34,02	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	290	LYS	307	25,591	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	307	LYS	387	16,738	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	307	LYS	410	20,639	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	307	LYS	444	42,08	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	325	SER	408	15,317	16,355	18,2	OK:FOUND
BS3	LYS	325	LYS	410	8,137	8,518	22,1	OK:FOUND
BS3	SER	374	LYS	387	26,598	>18.200	18,2	BAD:EUCL
BS3	LYS	387	SER	408	10,307	12,495	18,2	OK:FOUND
BS3	LYS	387	LYS	410	11,525	12,738	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	387	LYS	444	25,37	>22.100	22,1	BAD:EUCL
BS3	LYS	387	LYS	453	14,5	18,283	22,1	OK:FOUND
BS3	LYS	444	LYS	453	18,353	>22.100	22,1	BAD:EUCL

Tabela 11 - Análise do software Topolink para os links obtidos pelo ACL BS³ no modelo globular da proteína DM64.

ACL	Nome Residuo1	Número Resíduo1	Nome Resíduo2	Número Residuo2	Distância Euclidiana	Distância Topológica	DMAX	Resultado
AC	GLU	5	GLU	137	34,251	>16.900	16,9	BAD:EUCL
AC	GLU	5	GLU	139	37,678	>16.900	16,9	BAD:EUCL
AC	ASP	66	GLU	135	10,909	>15.600	15,6	BAD:NOTFOUND
AC	ASP	66	GLU	137	8,329	12,043	15,6	OK:FOUND
AC	ASP	66	GLU	139	6,937	9,66	15,6	OK:FOUND
AC	ASP	67	GLU	296	13,217	13,219	15,6	OK:FOUND
AC	GLU	80	GLU	296	40,08	>16.900	16,9	BAD:EUCL
AC	GLU	80	GLU	428	30,165	>16.900	16,9	BAD:EUCL
AC	ASP	131	GLU	428	42,834	>15.600	15,6	BAD:EUCL
AC	GLU	135	GLU	139	10,765	>16.900	16,9	BAD:NOTFOUND
AC	GLU	137	GLU	139	5,122	5,473	16,9	OK:FOUND
AC	GLU	137	GLU	296	12,77	16,038	16,9	OK:FOUND
AC	GLU	139	GLU	296	14,291	15,006	16,9	OK:FOUND
AC	ASP	188	ASP	199	24,728	>14.300	14,3	BAD:EUCL
AC	ASP	199	GLU	247	11,487	12,102	15,6	OK:FOUND
AC	ASP	227	GLU	254	13,032	14,176	15,6	OK:FOUND
AC	GLU	299	GLU	382	13,869	18,061	16,9	BAD:LONG
AC	GLU	378	GLU	382	11,446	15,14	16,9	OK:FOUND
AC	GLU	378	ASP	463	14,082	14,095	15,6	OK:FOUND
AC	GLU	382	ASP	463	12,095	13,148	15,6	OK:FOUND
AC	GLU	382	GLU	467	12,598	13,165	16,9	OK:FOUND
AC	GLU	426	GLU	428	7,579	9,269	16,9	OK:FOUND

Tabela 12 - Análise do *software* Topolink para os *links* obtidos pela metodologia XPlex-AC no modelo globular da proteína DM64.

ACL	Nome Residuo1	Número Resíduo1	Nome Resíduo2	Número Residuo2	Distância Euclidiana	Distância Topológica	DMAX	Resultado
ZL	GLU	5	LYS	420	24,95	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	5	LYS	444	37,659	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	ASP	43	LYS	387	15,016	>11.400	11,4	BAD:EUCL
ZL	GLU	45	LYS	387	14,162	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	58	GLU	96	27,076	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	ASP	66	LYS	95	7,322	8,594	11,4	OK:FOUND
ZL	GLU	80	LYS	95	40,634	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	80	LYS	226	58,824	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	80	LYS	235	60,656	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	80	LYS	307	34,549	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	80	LYS	387	28,615	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	SER	87	GLU	96	27,789	>8.800	8,8	BAD:EUCL
ZL	LYS	95	GLU	96	5,147	6,82	12,7	OK:FOUND
ZL	LYS	95	GLU	296	22,704	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	96	LYS	387	29,361	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	116	LYS	118	6,968	7,246	12,7	OK:FOUND
ZL	LYS	192	GLU	274	3,893	4,367	12,7	OK:FOUND
ZL	ASP	199	LYS	453	37,892	>11.400	11,4	BAD:EUCL
ZL	LYS	226	GLU	254	10,086	10,315	12,7	OK:FOUND
ZL	LYS	226	ASP	255	7,271	7,505	11,4	OK:FOUND
ZL	ASP	227	LYS	258	3,815	3,925	11,4	OK:FOUND
ZL	LYS	235	GLU	247	9,38	9,603	12,7	OK:FOUND
ZL	LYS	235	GLU	296	41,192	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	239	GLU	428	37,448	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	ASP	240	LYS	242	7,383	8,238	11,4	OK:FOUND
ZL	LYS	242	GLU	428	28,474	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	ASP	255	LYS	307	41,495	>11.400	11,4	BAD:EUCL
ZL	GLU	280	LYS	290	15,698	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	286	SER	292	36,217	>8.800	8,8	BAD:EUCL
ZL	LYS	290	GLU	375	7,216	7,833	12,7	OK:FOUND
ZL	LYS	290	ASP	376	10,834	12,402	11,4	BAD:LONG
ZL	GLU	296	LYS	307	9,345	9,93	12,7	OK:FOUND
ZL	GLU	296	LYS	387	23,599	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	299	LYS	387	23,959	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	299	SER	408	29,878	>8.800	8,8	BAD:EUCL
ZL	LYS	307	GLU	382	15,376	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	307	GLU	462	25,476	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	325	GLU	382	17,685	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	325	GLU	428	27,846	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	GLU	375	LYS	387	27,607	>12.700	12,7	BAD:EUCL

Tabela 13 - Análise do software Topolink para os links obtidos pela metodologia XPlex-ZL no modelo globular da proteína DM64.

ZL	GLU	378	LYS	387	19,714	>12.700	12,7	BAD:EUCL
ZL	LYS	387	ASP	472	6,789	7,051	11,4	OK:FOUND
ZL	ASP	402	LYS	444	6,054	6,749	11,4	OK:FOUND
ZL	LYS	420	GLU	428	10,936	13,776	12,7	BAD:LONG
ZL	GLU	428	SER	430	6,627	7,383	8,8	OK:FOUND

5.5 Interação e docking de DM64 com miotoxina II

A Figura 44 representa a interação entre a proteína DM64 e a miotoxina II. As linhas vermelhas mostram os *cross-links* observados pelas duas metodologias de *cross-linking* utilizadas (BS³ e XPlex). De maneira interessante, os *inter-links* estão concentrados em uma única face da toxina, deixando a outra região exposta ao solvente. Justamente nesta região, observamos os *intra-links* na estrutura da miotoxina II (Figura 25).



Figura 44 - Interação DM64-miotoxinaII. A proteína DM64 é representada seguindo o mesmo esquema de cores anteriormente utilizado, sendo os domínios identificados pelas legendas. A miotoxina II é representada na forma *cartoon* colorido em laranja, onde as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio catalítico da enzima foram representados em bastões. Os *inter-links* observados utilizando as abordagens de BS³ e XPlex estão representados por linhas tracejadas vermelhas.



Figura 45 - Docking preliminar da interação entre DM64 e miotoxina II. A proteína DM64 é representada seguindo o mesmo esquema de cores anteriormente utilizado, sendo os domínios identificados pelas legendas. A miotoxina II é representada na forma cartoon colorido em laranja, onde as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio catalítico da enzima foram representados em bastões.

A Figura 45 indica que a DM64 interage com a miotoxina II principalmente pela face que envolve o C-terminal da toxina. A simulação de *docking* guiada pelos *inter-links* observados experimentalmente mostra que esta região da miotoxina se aproxima dos domínios 3 e 5, nos permitindo um primeira visão/sugestão da forma pela qual as duas proteínas interagem.

Apesar de ainda existir um grande número de restrições de distância violadas nos modelos gerados, a modelagem guiada por *cross-linking* permitiu-nos concluir que a proteína DM64 não apresenta estrutura alongada. O modelo gerado através do *docking* molecular dos domínios isolados parece condizer melhor com a estrutura da proteína DM64 nativa.

A técnica de *cross-linking* já se mostrou capaz de guiar a modelagem de uma proteína pequena de maneira satisfatória (Jesus, 2016)(Jesus, 2016). No caso de DM64 (proteína grande, com vários domínios e glicosilada), a técnica de *cross-linking* não conseguiu gerar um modelo final definitivo, sendo necessário que outras abordagens integrativas (ex.: HDX e
SAXS) sejam utilizadas para aprimorar o modelo proposto. Ainda que não tenhamos esgotado o problema, os dados gerados nesta dissertação certamente nos permitiram entender mais sobre a interação da proteína DM64 com a miotoxina II.

6 CONCLUSÕES

A união de duas metodologias de *cross-linking* (BS³ e XPlex) propiciou um aumento significativo do número de restrições de distâncias obtidas para o complexo DM64-miotoxina II

A maior parte dos *intra-links* de miotoxina II foram validados de forma eficiente na estrutura cristalográfica da miotoxina II

Os *intra-links* de DM64 foram fundamentais para refinar o modelo molecular de DM64, possibilitando o melhor posicionamento relativo dos domínios e a geração de uma estrutura mais condizente com os dados experimentais

Os dados de *cross-linking* proporcionaram um primeiro mapeamento da interação entre a DM64 e a miotoxina II, indicando o envolvimento importante do terceiro e quinto domínios da DM64 e da região C-terminal da toxina.

Ainda que seja necessário refinar o modelo gerado com base nos dados de *cross-linking* através da integração com técnicas experimentais complementares, a estratégia adotada nesta dissertação nos possibilitou melhorar a compreensão acerca dos determinantes estruturais da interação entre a miotoxina II e a DM64.

7 REFERÊNCIAS

SHI, J. M. et al. Bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS3) crosslinking analysis of the behavior of amyloid-beta peptide in solution and in phospholipid membranes. **PLoS One,** v. 12, n. 3, p. e0173871, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

IGLESIAS, A. H.; SANTOS, L. F. A.; C., G. F. Identification of Cross-Linked Peptides by High-Resolution Precursor Ion Scan. **Anal. Chem.**, v. 82, p. 909-916, 2010.

CANTÚ, M. D. et al. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quimica Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.

GUTIERREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming. **Nat Rev Dis Primers,** v. 3, p. 17079, Oct 5 2017. ISSN 2056-676X (Electronic) 2056-676X (Linking).

SCHESKE, L.; RUITENBERG, J.; BISSUMBHAR, B. Needs and availability of snake antivenoms: relevance and application of international guidelines. **Int J Health Policy Manag,** v. 4, n. 7, p. 447-57, Apr 04 2015. ISSN 2322-5939 (Electronic) 2322-5939 (Linking).

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

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77-88, Jan 2 2010. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).

WHO. Rabies and Envenomings: a neglected public health issue. **Report of a COnsultative Meeting**, 2007.

_____. Guidelines for the Production, Control and Regulation of snake antivenom Imunoglobulins., 2010.

GUTIERREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med,** v. 3, n. 6, p. e150, Jun 2006. ISSN 1549-1676 (Electronic) 1549-1277 (Linking).

GUTIERREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223-35, Dec 15 2010. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking).

WILLIAMS, D. et al. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. Lancet, v. 375, n. 9708, p. 89-91, Jan 2 2010. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).

HARRISON, R. A. et al. Snake envenoming: a disease of poverty. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 3, n. 12, p. e569, 2009. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking).

BERNADE, P. S.; GOMES, J. O. Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre, Brasil. Acta Amazonica, v. 42, n. 1, 2012.

HARRISON, R. A.; GUTIERREZ, J. M. Priority Actions and Progress to Substantially and Sustainably Reduce the Mortality, Morbidity and Socioeconomic Burden of Tropical Snakebite. **Toxins (Basel),** v. 8, n. 12, Nov 24 2016. ISSN 2072-6651 (Electronic) 2072-6651 (Linking).

GUTIERREZ, J. M. et al. The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: the way forward. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 7, n. 6, p. e2162, 2013. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking).

NADUR-ANDRADE, N. et al. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by Bothrops moojeni venom. **Lasers Med Sci,** v. 27, n. 1, p. 65-70, Jan 2012. ISSN 1435-604X (Electronic) 0268-8921 (Linking).

MINISTÉRIO-DA-SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Fundação** Nacional de Saúde, 2014.

NEIVA, M. et al. Transcriptome analysis of the Amazonian viper Bothrops atrox venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**, v. 53, n. 4, p. 427-36, Mar 15 2009. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking).

KOHLHOFF, M. et al. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers Bothrops atrox, B. barnetti and B. pictus. **J Proteomics**, v. 75, n. 7, p. 2181-95, Apr 3 2012. ISSN 1876-7737 (Electronic) 1874-3919 (Linking).

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.;FRANÇA, F. O. S., *et al* (Ed.). Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2. São Paulo: Ed. Sarvier, 2009. p.42-70.

MACKESSY, S. P. Fibrinogenolytic proteases from the venoms of juvenile and adult northern Pacific rattlesnakes (Crotalus viridis oreganus). **Comp Biochem Physiol B**, v. 106, n. 1, p. 181-9, Sep 1993. ISSN 0305-0491 (Print) 0305-0491 (Linking).

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-303, 1991. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

CARRASCO, P. A. et al. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pit vipers (Serpentes, Viperidae). In: Z, S. (Ed.), 2012. p.109-24.

KOH, D. C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 24, p. 3030-41, Dec 2006. ISSN 1420-682X (Print) 1420-682X (Linking).

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr Pharm Des,** v. 13, n. 28, p. 2893-905, 2007. ISSN 1873-4286 (Electronic) 1381-6128 (Linking).

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon,** v. 42, n. 8, p. 827-40, Dec 15 2003. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon,** v. 45, n. 8, p. 969-85, Jun 15 2005. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

GUTIERREZ, J. M. et al. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Curr Pharm Des,** v. 13, n. 28, p. 2935-50, 2007. ISSN 1873-4286 (Electronic) 1381-6128 (Linking).

DOLEY, R.; ZHOU, X.; KINI, R. M. **Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes.** Florida: CRC Press, 2009.

SANCHEZ, E. F. et al. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon,** v. 30, n. 1, p. 95-103, Jan 1992. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

ATASSI, M. Z. Postsynaptic-Neurotoxin-Acetylcholine Receptor Interaction and the Binding. New York:: Marcel Dekker 1991.

GUTIERREZ, J. M.; LEON, G.; LOMONTE, B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. **Clin Pharmacokinet,** v. 42, n. 8, p. 721-41, 2003. ISSN 0312-5963 (Print) 0312-5963 (Linking).

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-24, Nov 1995. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

NICOLAU, C. A. Aplicação da tecnologia OFFGEL para determinação do proteopeptidoma do veneno de *Bothrops jararaca:* uma nova abordagem em venômica de

serpentes Rio de Janeiro. 2012. (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

HARVEY, A. L. Snake Venom Peptides. Burlington: Academic Press., 2006.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J**, v. 275, n. 12, p. 3016-30, Jun 2008. ISSN 1742-464X (Print) 1742-464X (Linking).

CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **J Mass Spectrom**, v. 42, n. 11, p. 1405-14, Nov 2007. ISSN 1076-5174 (Print) 1076-5174 (Linking).

CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Lett,** v. 583, n. 11, p. 1736-43, Jun 05 2009. ISSN 1873-3468 (Electronic) 0014-5793 (Linking).

GUTIERREZ, J. M. et al. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. **Toxicon,** v. 51, n. 1, p. 80-92, Jan 2008. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon,** v. 42, n. 8, p. 885-901, Dec 15 2003. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

MORA, J. et al. Effects of Bothrops asper snake venom on lymphatic vessels: insights into a hidden aspect of envenomation. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p. e318, 2008. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking).

MARKLAND, F. S., JR.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3-18, Feb 2013. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking).

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. **Methods Enzymol**, v. 248, p. 345-68, 1995. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879 (Linking).

PORTES-JUNIOR, J. A. et al. Unraveling the processing and activation of snake venom metalloproteinases. **J Proteome Res,** v. 13, n. 7, p. 3338-48, Jul 3 2014. ISSN 1535-3907 (Electronic) 1535-3893 (Linking).

CHEN, R. Q. et al. A new protein structure of P-II class snake venom metalloproteinases: it comprises metalloproteinase and disintegrin domains. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 310, n. 1, p. 182-7, Oct 10 2003. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking).

BALDO, C. et al. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. PLoS Negl Trop Dis, v. 4, n. 6, p. e727, 2010. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking).

GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-50, Sep-Oct 2000. ISSN 0300-9084 (Print) 0300-9084 (Linking).

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Arch Biochem Biophys,** v. 409, n. 2, p. 395-401, Jan 15 2003. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861 (Linking).

OLIVEIRA, A. K. et al. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. **Thromb Haemost,** v. 104, n. 3, p. 485-97, Sep 2010. ISSN 2567-689X (Electronic) 0340-6245 (Linking).

LAING, G. D. et al. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **Eur J Immunol,** v. 33, n. 12, p. 3458-63, Dec 2003. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking).

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 987-96, Jun 15 2005. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

CLISSA, P. B. et al. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1567-73, Oct 2001. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

ESCALANTE, T. et al. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **J Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1781-94, Aug 24 2011. ISSN 1876-7737 (Electronic) 1874-3919 (Linking).

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, v. 62, p. 27-39, Feb 2013. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking).

TEIXEIRA, C. F. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon,** v. 42, n. 8, p. 947-62, Dec 15 2003. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

ZELANIS, A. et al. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult Bothrops jararaca snake venoms. **PLoS Negl Trop Dis,** v. 6, n. 3, p. e1554, 2012. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking).

WANG, X. Plant Phospholipase. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol., v. 52, p. 211-231, 2001.

MERKEL, O. et al. Characterization and function in vivo of two novel phospholipases B/lysophospholipases from Saccharomyces cerevisiae. **J Biol Chem**, v. 274, n. 40, p. 28121-7, Oct 1 1999. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking).

VANCE;, J. E.; VANCE, D. E. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Elsevier, 2008.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **J Biol Chem,** v. 269, n. 18, p. 13057-60, May 06 1994. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking).

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A2 enzymes. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68-69, p. 3-58, Aug 2002. ISSN 1098-8823 (Print) 1098-8823 (Linking).

COSTA, S. K. P.; CAMARGO, E. A.; ANTUNES, E. Inflammatory Action of Secretory Phospholipases A2 from Snake Venoms. In: LOURDES J. CRUZ, S. L. (Ed.). **Toxins and Drug Discovery**: Springer Netherlands, 2017. p.35-52.

DENNIS, E. S.; HELLIWELL, C. A.; PEACOCK, W. J. Vernalization: spring into flowering. **Dev Cell,** v. 11, n. 1, p. 1-2, Jul 2006. ISSN 1534-5807 (Print) 1534-5807 (Linking).

DA SILVA GIOTTO, M. T. et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue. **Proteins,** v. 30, n. 4, p. 442-54, Mar 01 1998. ISSN 0887-3585 (Print) 0887-3585 (Linking).

RENETSEDER, R. et al. A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and Crotalus atrox venom. **J Biol Chem**, v. 260, n. 21, p. 11627-34, Sep 25 1985. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking).

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-59, Nov 2006. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking).

DUNCAN, R. E. et al. Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA). **J Biol Chem,** v. 283, n. 37, p. 25428-36, Sep 12 2008. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking).

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A(2) to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 520-30, Sep 15 2012. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking).

OWNBY, C. L. et al. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, v. 37, n. 3, p. 411-45, Mar 1999. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

BAO, Y. et al. Purification, characterization and gene cloning of a novel phospholipase A2 from the venom of Agkistrodon blomhoffii ussurensis. **Int J Biochem Cell Biol,** v. 37, n. 3, p. 558-65, Mar 2005. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725 (Linking).

MURAKAMI, M. T. et al. 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**, v. 51, n. 5, p. 723-35, Apr 2008. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

PAN, H. et al. Diversity of cDNAs encoding phospholipase A2 from Agkistrodon halys pallas venom, and its expression in E. coli. **Toxicon**, v. 36, n. 8, p. 1155-63, Aug 1998. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

POLGAR, J. et al. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A2: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A2, ecarpholin S, from the venom of Echis carinatus sochureki (saw-scaled viper). **Biochem J**, v. 319 (Pt 3), p. 961-8, Nov 01 1996. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking).

GUTIERREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Isolation of a myotoxin from Bothrops asper venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, v. 22, n. 1, p. 115-28, 1984. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

YU, B. Z.; BERG, O. G.; JAIN, M. K. The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, v. 32, n. 25, p. 6485-92, Jun 29 1993. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking).

BONFIM, V. L. et al. Cytotoxic action in myoblasts and myotubes (C2C12) and enzymatic characterization of a new phospholipase A2 isoform (Bj-V) from Bothrops jararacussu venom. **Protein Pept Lett,** v. 13, n. 7, p. 707-13, 2006. ISSN 0929-8665 (Print) 0929-8665 (Linking).

YANG, C. C. Structure-function relationship of phospholipase A2 from snake venoms. . **J.Toxicol.**, v. 13, p. 125-177, 1994.

MONTECUCCO, C.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell Mol Life Sci,** v. 65, n. 18, p. 2897-912, Sep 2008. ISSN 1420-682X (Print) 1420-682X (Linking).

PUNGERCAR, J.; KRIZAJ, I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2. **Toxicon**, v. 50, n. 7, p. 871-92, Dec 1 2007. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

FRANCIS, B. et al. Myotoxin II from Bothrops asper (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A2. Arch Biochem Biophys, v. 284, n. 2, p. 352-9, Feb 1 1991. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861 (Linking).

LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake Bothrops asper (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, n. 7, p. 725-33, 1989. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

LEE, W. H. et al. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A2--a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 28-36, Jan 09 2001. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking).

SCOTT, D. L. et al. Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A2 from the venom of Agkistridon piscivorus piscivorus. **J Biol Chem**, v. 267, n. 31, p. 22645-57, Nov 05 1992. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking).

AMBROSIO, A. L. et al. A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A2 activity based on ligand-induced conformational change. **J Biol Chem,** v. 280, n. 8, p. 7326-35, Feb 25 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking).

GUTIERREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915-31, Dec 15 2003. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

GUTIERREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by Bothrops asper snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958-75, Dec 1 2009. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking).

HERNANDEZ, R. et al. Poor regenerative outcome after skeletal muscle necrosis induced by Bothrops asper venom: alterations in microvasculature and nerves. **PLoS One,** v. 6, n. 5, p. e19834, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking).

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, n. 6, p. 823-46, Jun 1998. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

SILVA, A. S. T. et al. Soros e Vacinas. Instituto Butantan, v. 2, n. São Paulo, 2013.

GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. Overlooked issues of snakebite management: time for strategic approach. **Curr Top Med Chem,** v. 11, n. 20, p. 2494-508, 2011. ISSN 1873-4294 (Electronic) 1568-0266 (Linking).

HARRISON, R. A. et al. Research strategies to improve snakebite treatment: challenges and progress. **J Proteomics,** v. 74, n. 9, p. 1768-80, Aug 24 2011. ISSN 1876-7737 (Electronic) 1874-3919 (Linking).

GUTIERREZ, J. M. **Snakebite Envenoming: A Public Health Perspective.** Disponível em: <u>http://www.intechopen.com/books/public-health-methodology-environmental-and-systems-issues/snakebite-envenoming-a-public-health-perspective</u>. 2012.

MORAIS, V. M.; MASSALDI, H. Snake Antivenoms: Adverse Reactions and Production Technology. Journal of Venomous Animals Including Tropical Diseases, v. 15, n. 1, p. 2-18, 2009.

MINISTÉRIO-DA-SAÚDE. Manua de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. **Fundação Nacional de Saúde**, n. Brasilia, 2001.

CALVETE, J. J. et al. Antivenomic assessment of the immunological reactivity of EchiTAb-Plus-ICP, an antivenom for the treatment of snakebite envenoming in sub-Saharan Africa. **Am J Trop Med Hyg,** v. 82, n. 6, p. 1194-201, Jun 2010. ISSN 1476-1645 (Electronic) 0002-9637 (Linking).

CALVETE, J. J. et al. Snake population venomics and antivenomics of Bothrops atrox: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **J Proteomics,** v. 74, n. 4, p. 510-27, Apr 1 2011. ISSN 1876-7737 (Electronic) 1874-3919 (Linking).

FURTADO, M. F. D. et al. Antigenic cross-reactivity and immnunogenicity of Bothrops venoms from snakes of the amazon region. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 881-887, 2010.

OTERO, R. et al. Neutralizing capacity of a new monovalent anti-Bothrops atrox antivenom: comparison with two commercial antivenoms. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 3, p. 375-9, Mar 1997. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking).

SEGURA, A. et al. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms. **Toxicon,** v. 56, n. 6, p. 980-9, Nov 2010. ISSN 1879-3150 (Electronic)

0041-0101 (Linking).

QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842-51, Dec 15 2008. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

CLISSA, P. B. et al. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 591-6, Apr 2006. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 9, p. 2000-5, Sep 1996. ISSN 0014-2980 (Print) 0014-2980 (Linking).

BATTELLINO, C. et al. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by Bothrops jararaca snake venom. **Toxicon**, v. 41, n. 5, p. 583-93, Apr 2003. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

VALENTE, R. H. et al. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. **Eur J Biochem,** v. 268, n. 10, p. 3042-52, May 2001. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956 (Linking).

YAMAKAWA Y; T., O.-S. Primary structure of the antihemorrhagic factor in serum of the Japanese Habu: a snake venom metalloproteinase inhibitor with a doubleheaded cystatin domain. **J Biochem.**, v. 112(5), p. 583-589, 1992.

CATANESE, J. J.; KRESS, L. F. Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human alpha 1B-glycoprotein. **Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 410-8, Jan 21 1992. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking).

FARAH, M. F. et al. Isolation of protein factors from opossum (Didelphis albiventris) serum which protect against Bothrops jararaca venom. **Toxicon**, v. 34, n. 9, p. 1067-71, Sep 1996. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

JURGILAS, P. B. et al. PO41, a snake venom metalloproteinase inhibitor isolated from Philander opossum serum. **Toxicon**, v. 42, n. 6, p. 621-8, Nov 2003. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

NEVES-FERREIRA, A. G. C. et al. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from Didelphis marsupialis serum. **Biochim Biophys Acta**, v. 1474, n. 3, p. 309-20, May 01 2000. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking).

OHKURA, N. et al. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A2 inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, Agkistrodon blomhoffii siniticus. **Biochem J,** v. 325 (Pt 2), p. 527-31, Jul 15 1997. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking).

KOGAKI, H. et al. Isolation and fundamental properties of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of Trimeresurus flavoviridis. **J Biochem,** v. 106, n. 6, p. 966-71, Dec 1989. ISSN 0021-924X (Print) 0021-924X (Linking).

QUIROS, S. et al. Isolation, characterization and molecular cloning of AnMIP, a new alphatype phospholipase A2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake Atropoides nummifer (Viperidae: Crotalinae). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 146, n. 1, p. 60-8, Jan 2007. ISSN 1096-4959 (Print) 1096-4959 (Linking).

LIZANO, S. et al. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake Bothrops asper. **Biochem J**, v. 326 (Pt 3), p. 853-9, Sep 15 1997. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking).

SOARES, A. M. et al. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A2 myotoxin inhibitor protein from Bothrops moojeni snake plasma. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 302, n. 2, p. 193-200, Mar 7 2003. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking).

SANTOS-FILHO, N. A. et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a myotoxin inhibitor from Bothrops alternatus snake plasma. **Biochimie,** v. 93, n. 3, p. 583-92, Mar 2011. ISSN 1638-6183 (Electronic) 0300-9084 (Linking).

LIZANO, S. et al. Two phospholipase A2 inhibitors from the plasma of Cerrophidion (Bothrops) godmani which selectively inhibit two different group-II phospholipase A2 myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. **Biochem J,** v. 346 Pt 3, p. 631-9, Mar 15 2000. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking).

NEVES-FERREIRA, A. G. C. et al. Natural inhibitors: innate immunity to snake venoms. CRC Press, 2010.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon,** v. 42, n. 8, p. 963-77, Dec 15 2003. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

OKUMURA, K. et al. Identification of beta-type phospholipase A(2) inhibitor in a nonvenomous snake, Elaphe quadrivirgata. **Arch Biochem Biophys,** v. 408, n. 1, p. 124-30, Dec 1 2002. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861 (Linking).

OHKURA, N. et al. Isolation and characterization of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of the Thailand cobra Naja naja kaouthia. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 200, n. 2, p. 784-8, Apr 29 1994. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking).

HAINS, P. G.; BROADY, K. W. Purification and inhibitory profile of phospholipase A2 inhibitors from Australian elapid sera. **Biochem J,** v. 346 Pt 1, p. 139-46, Feb 15 2000. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking).

HAINS, P. G. et al. Sequencing and two-dimensional structure prediction of a phospholipase A(2) inhibitor from the serum of the common tiger snake (Notechis scutatus). **J Mol Biol**, v. 312, n. 4, p. 875-84, Sep 28 2001. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking).

NOBUHISA, I. et al. Characterization and evolution of a gene encoding a Trimeresurus flavoviridis serum protein that inhibits basic phospholipase A2 isozymes in the snake's venom. **Eur J Biochem,** v. 249, n. 3, p. 838-45, Nov 1 1997. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956 (Linking).

OHKURA, N. et al. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of the sea krait, Laticauda semifasciata. **J Biochem,** v. 125, n. 2, p. 375-82, Feb 1999. ISSN 0021-924X (Print) 0021-924X (Linking).

FORTES-DIAS, C. L. et al. A phospholipase A2 inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (Crotalus durissus terrificus). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. **J Biol Chem,** v. 269, n. 22, p. 15646-51, Jun 3 1994. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking).

PERALES, J. et al. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from Crotalus durissus terrificus serum. **Eur J Biochem,** v. 227, n. 1-2, p. 19-26, Jan 15 1995. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956 (Linking).

ROCHA, S. L. et al. Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from Didelphis marsupialis serum. **The FEBS Journal**, v. 269, n. 24, p. 6052-6062, 2002.

PERALES, J. et al. Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1013-20, Jun 15 2005. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

PERALES, J.; MUNOZ, R.; MOUSSATCHE, H. Isolation and partial characterization of a protein fraction from the opossum (Didelphis marsupialis) serum, with protecting property against the Bothrops jararaca snake venom. **An Acad Bras Cienc,** v. 58, n. 1, p. 155-62, 1986. ISSN 0001-3765 (Print) 0001-3765 (Linking).

VOSS, R. S.; JANSA, S. A. Snake-venom resistance as a mammalian trophic adaptation: lessons from didelphid marsupials. **Biol Rev Camb Philos Soc,** v. 87, n. 4, p. 822-37, Nov 2012. ISSN 1469-185X (Electronic) 0006-3231 (Linking).

NEVES-FERREIRA, A. G. C. et al. Natural Inhibitors of Snake Venom Metallopeptidases. Springer, 2015.

NEVES-FERREIRA, A. G. C. et al. Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from Didelphis marsupialis serum. **J Biol Chem,** v. 277, n. 15, p. 13129-37, Apr 12 2002. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking).

LEON, I. R. et al. Using mass spectrometry to explore the neglected glycan moieties of the antiophidic proteins DM43 and DM64. **Proteomics,** v. 12, n. 17, p. 2753-65, Aug 2012. ISSN 1615-9861 (Electronic) 1615-9853 (Linking).

TRUGILHO, M. R. O. **Estudo da relação estrutura/função da proteína antiofídica DM43.** 2009. (Doutorado). Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

SIEBER, S. A.; MARAHIEL, M. A. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. **Chem Rev,** v. 105, n. 2, p. 715-38, Feb 2005. ISSN 0009-2665 (Print) 0009-2665 (Linking).

BENESCH, J. L. et al. Protein complexes in the gas phase: technology for structural genomics and proteomics. **Chem. Rev.,** v. 107, n. 8, p. 3544-67, Aug 2007. ISSN 0009-2665 (Print).

FRANKLIN, R. E.; GOSLING, R. G. Molecular configuration in sodium thymonucleate. **Nature,** v. 171, n. 4356, p. 740-1, Apr 25 1953. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

KENDREW, J. C. et al. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. **Nature,** v. 181, n. 4610, p. 662-6, Mar 08 1958. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

PERUTZ, M. F. et al. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-A. resolution, obtained by X-ray analysis. **Nature**, v. 185, n. 4711, p. 416-22, Feb 13 1960. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-8, Apr 25 1953. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

WUTHRICH, K. The way to NMR structures of proteins. **Nat Struct Biol**, v. 8, n. 11, p. 923-5, Nov 2001. ISSN 1072-8368 (Print) 1072-8368 (Linking).

PERRAKIS, A.; MORRIS, R.; LAMZIN, V. S. Automated protein model building combined with iterative structure refinement. **Nat Struct Biol,** v. 6, n. 5, p. 458-63, May 1999. ISSN 1072-8368 (Print) 1072-8368 (Linking).

KETCHEM, R. R.; HU, W.; CROSS, T. A. High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR. **Science**, v. 261, n. 5127, p. 1457-60, Sep 10 1993. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

PATWARDHAN, A.; LAWSON, C. L. Databases and Archiving for CryoEM. **Methods Enzymol**, v. 579, p. 393-412, 2016. ISSN 1557-7988 (Electronic) 0076-6879 (Linking).

ALBERTS, B. et al. Fundamentos da biologia celular. Artmed Editora, 2007.

DRENTH, J. Principles of protein X-ray crystallography. Springer, 1994.

BERG, J.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. **Biochemistry 5th ed.** W. H. Freeman 2002. 894

FRANK, J. **Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies :** visualization of biological molecules in their native state. 2 nd. Oxford: Oxford Scholarship Online, 2006.

SALI, A. et al. From words to literature in structural proteomics. **Nature,** v. 422, n. 6928, p. 216-25, Mar 13 2003. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

WARD, A. B.; SALI, A.; WILSON, I. A. Biochemistry. Integrative structural biology. **Science,** v. 339, n. 6122, p. 913-5, Feb 22 2013. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking).

SINZ, A. et al. Chemical cross-linking and native mass spectrometry: A fruitful combination for structural biology. **Protein Sci**, v. 24, n. 8, p. 1193-209, Aug 2015. ISSN 1469-896X (Electronic) 0961-8368 (Linking).

CHEN, F. et al. Applying mass spectrometry to study non-covalent biomolecule complexes. **Mass Spectrom Rev**, May 6 2015. ISSN 1098-2787 (Electronic) 0277-7037 (Linking).

ALTELAAR, A. F. M.; MUNOZ, J.; HECK, A. J. R. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. . **Nat. Rev. Genet.,** v. 14, p. 35-48, 2012.

CHAHROUR, O.; COBICE, D.; MALONE, J. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. **J Pharm Biomed Anal**, v. 113, p. 2-20, Sep 10 2015. ISSN 1873-264X (Electronic)

0731-7085 (Linking).

CRAVATT, B. F.; SIMON, G. M.; YATES, J. R., 3RD. The biological impact of massspectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 450, n. 7172, p. 991-1000, Dec 13 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking).

DOMON, B.; GALLIEN, S. Recent advances in targeted proteomics for clinical applications. **Proteomics Clin Appl,** v. 9, n. 3-4, p. 423-31, Apr 2015. ISSN 1862-8354 (Electronic) 1862-8346 (Linking).

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science,** v. 246, n. 4926, p. 64-71, Oct 06 1989. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Anal Chem,** v. 60, n. 20, p. 2299-301, Oct 15 1988. ISSN 0003-2700 (Print) 0003-2700 (Linking).

HU, Q. et al. The Orbitrap: a new mass spectrometer. **J Mass Spectrom,** v. 40, n. 4, p. 430-43, Apr 2005. ISSN 1076-5174 (Print) 1076-5174 (Linking).

MICHALSKI, A. et al. Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a highperformance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 9, p. M111 011015, Sep 2011. ISSN 1535-9484 (Electronic) 1535-9476 (Linking).

CAÑAS, B. et al. Mass spectrometry technologies for proteomics. **Brief Funct Genomic Proteomic**, v. 4, n. 4, p. 295-320, Feb 2006. ISSN 1473-9550 (Print).

LARANCE, M.; LAMOND, A. I. Multidimensional proteomics for cell biology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 16, n. 5, p. 269-80, May 2015. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking).

ZHANG, Y. et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chem Rev,** v. 113, n. 4, p. 2343-94, Apr 10 2013. ISSN 1520-6890 (Electronic) 0009-2665 (Linking).

BORCH, J.; JORGENSEN, T.; ROEPSTORFF, P. Mass spectrometric analysis of protein interactions. **Curr Opin Chem Biol**, v. 9, n. 5, p. 509-516, 2005. ISSN 13675931.

HERMANSON, G. T. Bioconjugate Techniques. second. Elsevier, 2008.

MEANS, G. E.; FEENEY, R. E. Chemical modifications of proteins: history and applications. **Bioconjug Chem,** v. 1, n. 1, p. 2-12, Jan-Feb 1990. ISSN 1043-1802 (Print) 1043-1802 (Linking).

WONG, S. S. Chemistry of protein conjugation and cross-linking. In: (Ed.): CRC press, 1991. p.340. ISBN 9780849358869 - CAT#5886.

CHEN, Z. A. et al. Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by crosslinking and mass spectrometry. **EMBO J**, v. 29, n. 4, p. 717-26, Feb 17 2010. ISSN 1460-2075 (Electronic) 0261-4189 (Linking).

DIHAZI, G. H.; SINZ, A. Mapping low-resolution three-dimensional protein structures using chemical cross-linking and Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom,** v. 17, n. 17, p. 2005-14, 2003. ISSN 0951-4198 (Print) 0951-4198 (Linking).

CARVEN, G. J.; STERN, L. J. Probing the ligand-induced conformational change in HLA-DR1 by selective chemical modification and mass spectrometric mapping. **Biochemistry**, v. 44, n. 42, p. 13625-37, Oct 25 2005. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking).

HUANG, B. X.; KIM, H. Y. Interdomain conformational changes in Akt activation revealed by chemical cross-linking and tandem mass spectrometry. **Mol Cell Proteomics**, v. 5, n. 6, p. 1045-53, Jun 2006. ISSN 1535-9476 (Print) 1535-9476 (Linking).

EL-SHAFEY, A. et al. "Zero-length" cross-linking in solid state as an approach for analysis of protein-protein interactions. **Protein Sci**, v. 15, n. 3, p. 429-40, Mar 2006. ISSN 0961-8368 (Print)

0961-8368 (Linking).

KITATSUJI, C. et al. Molecular basis of guanine nucleotide dissociation inhibitor activity of human neuroglobin by chemical cross-linking and mass spectrometry. **J Mol Biol,** v. 368, n. 1, p. 150-60, Apr 20 2007. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking).

RAPPSILBER, J. et al. A generic strategy to analyze the spatial organization of multi-protein complexes by cross-linking and mass spectrometry. **Anal Chem**, v. 72, n. 2, p. 267-75, Jan 15 2000. ISSN 0003-2700 (Print) 0003-2700 (Linking).

LEITNER, A. Cross-linking and other structural proteomics techniques: how chemistry is enabling mass spectrometry applications in structural biology. . **Chem Sci,** v. 7, p. 4792-4803, 2016.

SINZ, A. Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. **J Mass Spectrom,** v. 38, n. 12, p. 1225-37, Dec 2003. ISSN 1076-5174 (Print) 1076-5174 (Linking).

_____. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. **Mass Spectrom Rev,** v. 25, n. 4, p. 663-82, Jul-Aug 2006. ISSN 0277-7037 (Print)

0277-7037 (Linking).

STAROS, J. V. N-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis (N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers. **Biochemistry**, v. 21, p. 3950-3955, 1982.

LEITNER, A. et al. Probing native protein structures by chemical cross-linking, mass spectrometry, and bioinformatics. **Mol Cell Proteomics,** v. 9, n. 8, p. 1634-49, Aug 2010. ISSN 1535-9484 (Electronic) 1535-9476 (Linking).

MERKLEY, E. D.; CORT, J. R.; ADKINS, J. N. Cross-linking and mass spectrometry methodologies to facilitate structural biology: finding a path through the maze. **J Struct Funct Genomics**, v. 14, n. 3, p. 77-90, Sep 2013. ISSN 1570-0267 (Electronic) 1345-711X (Linking).

SINZ, A. The advancement of chemical cross-linking and mass spectrometry for structural proteomics: from single proteins to protein interaction networks. **Expert Rev Proteomics**, v. 11, n. 6, p. 733-43, Dec 2014. ISSN 1744-8387 (Electronic) 1478-9450 (Linking).

SINGH, P.; PANCHAUD, A.; GOODLETT, D. R. Chemical cross-linking and mass spectrometry as a low-resolution protein structure determination technique. **Anal. Chem.,** v. 82, p. 2636-2642, 2010.

RINNER, O. et al. Identification of cross-linked peptides from large sequence databases. **Nat Methods**, v. 5, n. 4, p. 315-8, Apr 2008. ISSN 1548-7105 (Electronic) 1548-7091 (Linking).

LEITNER, A. et al. Expanding the chemical cross-linking toolbox by the use of multiple proteases and enrichment by size exclusion chromatography. **Mol Cell Proteomics**, v. 11, n. 3, p. M111 014126, Mar 2012. ISSN 1535-9484 (Electronic) 1535-9476 (Linking).

ZUBAREV, R. A.; MAKAROV, A. Orbitrap mass spectrometry. **Anal Chem,** v. 85, n. 11, p. 5288-96, Jun 4 2013. ISSN 1520-6882 (Electronic) 0003-2700 (Linking).

SEIDLER, J. et al. De novo sequencing of peptides by MS/MS. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 634-49, Feb 2010. ISSN 1615-9861 (Electronic) 1615-9853 (Linking).

GOTZE, M. et al. StavroX--a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. **J Am Soc Mass Spectrom,** v. 23, n. 1, p. 76-87, Jan 2012. ISSN 1879-1123 (Electronic) 1044-0305 (Linking).

MCILWAIN, S. et al. Detecting cross-linked peptides by searching against a database of cross-linked peptide pairs. **J Proteome Res**, v. 9, n. 5, p. 2488-95, May 07 2010. ISSN 1535-3907 (Electronic)

1535-3893 (Linking).

LIMA, D. B. et al. SIM-XL: A powerful and user-friendly tool for peptide cross-linking analysis. **J Proteomics**, v. 129, p. 51-55, Nov 03 2015. ISSN 1876-7737 (Electronic) 1874-3919 (Linking).

BELSARE, K. D. et al. P-LinK: A method for generating multicomponent cytochrome P450 fusions with variable linker length. **Biotechniques,** v. 57, n. 1, p. 13-20, Jul 2014. ISSN 1940-9818 (Electronic) 0736-6205 (Linking).

SARPE, V. et al. High Sensitivity Crosslink Detection Coupled With Integrative Structure Modeling in the Mass Spec Studio. **Mol Cell Proteomics,** v. 15, n. 9, p. 3071-80, Sep 2016. ISSN 1535-9484 (Electronic) 1535-9476 (Linking).

GIBAS, C.; JAMBECK, P. Developing bioinformatics computer skills. O'Reilly & Associates, Inc., 2001.

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à flexibilidade molecular.** 1 ed. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2014.

ORENGO, C.; JONES, D.; THORNTON, J. Bioinformatics: Genes, protein and computers. **BIOS Scientific Publisher**, 2003.

BECKER, O. M. et al. Computational biochemistry and biophysics. CRC, 2001.

KOSLOFF, M.; KOLODNY, R. Sequence-similar, structure-dissimilar protein pairs in the PDB. **Proteins,** v. 71, n. 2, p. 891-902, May 01 2008. ISSN 1097-0134 (Electronic) 0887-3585 (Linking).

FISER, A. Template-based protein structure modeling. **Methods Mol Biol,** v. 673, p. 73-94, 2010. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking).

MARTI-RENOM, M. A. et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu Rev Biophys Biomol Struct,** v. 29, p. 291-325, 2000. ISSN 1056-8700 (Print) 1056-8700 (Linking).

MODI, V. et al. Assessment of template-based modeling of protein structure in CASP11. **Proteins,** v. 84 Suppl 1, p. 200-20, Sep 2016. ISSN 1097-0134 (Electronic) 0887-3585 (Linking).

OGAWA, H.; TOYOSHIMA, C. Homology modeling of the cation binding sites of Na+K+-ATPase. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 99, n. 25, p. 15977-82, Dec 10 2002. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). CAVASOTTO, C. N.; PHATAK, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Drug Discov Today,** v. 14, n. 13-14, p. 676-83, Jul 2009. ISSN 1878-5832 (Electronic) 1359-6446 (Linking).

JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. A new approach to protein fold recognition. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 86-9, Jul 02 1992. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

SHAO, M. et al. Incorporating Ab Initio energy into threading approaches for protein structure prediction. **BMC Bioinformatics,** v. 12 Suppl 1, p. S54, Feb 15 2011. ISSN 1471-2105 (Electronic) 1471-2105 (Linking).

ZAKI, M. J.; BYSTROFF, C. Protein structure prediction. Preface. **Methods Mol Biol,** v. 413, p. v-vii, 2008. ISSN 1064-3745 (Print) 1064-3745 (Linking).

ANFINSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, v. 181, n. 4096, p. 223-30, Jul 20 1973. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

KHOURY, G. A. et al. Protein folding and de novo protein design for biotechnological applications. **Trends Biotechnol**, v. 32, n. 2, p. 99-109, Feb 2014. ISSN 1879-3096 (Electronic) 0167-7799 (Linking).

BRASIL, C. R. S.; DELBEM, A. C. B.; DA SILVA, F. L. B. Multiobjective evolutionary algorithm with many tables for purely ab initio protein structures predition. **Journal of Computational Chemistry**, v. 34, n. 20, p. 1719-1734, 2013.

PACE, C. N. et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Sci**, v. 4, n. 11, p. 2411-23, Nov 1995. ISSN 0961-8368 (Print) 0961-8368 (Linking).

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

FIORAMONTE, M. **Proteômica Estrutural por Ligação Cruzada Acoplada a Espectrometria de Massas: Desenvolvimentos, Estudos Fundamentais e Aplicações.** 2016. 93 (Doutorado). Instituto de Quimica, Unicamp

KAHRAMAN, A.; MALMSTROM, L.; AEBERSOLD, R. Xwalk: computing and visualizing distances in cross-linking experiments. **Bioinformatics**, v. 27, n. 15, p. 2163-4, Aug 1 2011. ISSN 1367-4811 (Electronic) 1367-4803 (Linking).

L. MARTÍNEZ; A. FERRARI; GOZZO., F. C. **TopoLink: A package to evaluate structural models using chemical crosslinking distance constraints.** . Campinas, SP, Brazil: Institute of Chemistry, University of Campinas. 2017.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **J Mol Graph**, v. 14, n. 1, p. 33-8, 27-8, Feb 1996. ISSN 0263-7855 (Print) 0263-7855 (Linking).

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-402, Sep 1 1997. ISSN 0305-1048 (Print) 0305-1048 (Linking).

KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. **Nucleic Acids Res,** v. 32, n. Web Server issue, p. W526-31, Jul 1 2004. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking).

YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Res,** v. 43, n. W1, p. W174-81, Jul 1 2015a. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking).

LEITNER, A. et al. Crosslinking and Mass Spectrometry: An Integrated Technology to Understand the Structure and Function of Molecular Machines. **Trends Biochem Sci,** v. 41, n. 1, p. 20-32, Jan 2016. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004 (Linking).

BACK, J. W. et al. Chemical cross-linking and mass spectrometry for protein structural modeling. **J Mol Biol**, v. 331, n. 2, p. 303-13, Aug 08 2003. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking).

MADLER, S. et al. Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities. **J Mass Spectrom,** v. 44, n. 5, p. 694-706, May 2009. ISSN 1096-9888 (Electronic) 1076-5174 (Linking).

PARAMELLE, D. et al. Chemical cross-linkers for protein structure studies by mass spectrometry. **Proteomics**, v. 13, n. 3-4, p. 438-56, Feb 2013. ISSN 1615-9861 (Electronic) 1615-9853 (Linking).

MERKLEY, E. D. et al. Distance restraints from crosslinking mass spectrometry: mining a molecular dynamics simulation database to evaluate lysine-lysine distances. **Protein Sci**, v. 23, n. 6, p. 747-59, Jun 2014. ISSN 1469-896X (Electronic) 0961-8368 (Linking).

GARFIN, D. E. One-dimensional gel electrophoresis. **Methods Enzymol,** v. 182, p. 425-41, 1990. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879 (Linking).

LEITNER, A. et al. Chemical cross-linking/mass spectrometry targeting acidic residues in proteins and protein complexes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 26, p. 9455-60, Jul 1 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking).

CHI, H. et al. pNovo: de novo peptide sequencing and identification using HCD spectra. **J Proteome Res,** v. 9, n. 5, p. 2713-24, May 7 2010. ISSN 1535-3907 (Electronic) 1535-3893 (Linking).

SANTOS, L. F. A.; IGLESIAS, A. H.; GOZZO, F. C. Fragmentation features of intermolecular cross-linked peptides using N-hydroxysuccinimide esters by MALDI- and ESI-MS/MS for use in structural proteomics. **Journal Mass Spectrometry**, v. 46, p. 742-750, 2011.

ARNI, R. K. et al. Structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from Bothrops asper venom. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, v. 51, n. Pt 3, p. 311-7, May 1 1995. ISSN 0907-4449 (Print) 0907-4449 (Linking).

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2--a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-41, Aug 1996. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking).

BASTOS, V. A. et al. Natural Inhibitors of Snake Venom Metalloendopeptidases: History and Current Challenges. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 9, Aug 26 2016. ISSN 2072-6651 (Electronic) 2072-6651 (Linking).

DOS SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A(2) from Bothrops genus reveal their myotoxic site. **J Struct Biol**, v. 167, n. 2, p. 106-16, Aug 2009. ISSN 1095-8657 (Electronic) 1047-8477 (Linking).

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 40, Jan 23 2008. ISSN 1471-2105 (Electronic) 1471-2105 (Linking).

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nat Protoc,** v. 5, n. 4, p. 725-38, Apr 2010. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking).

YANG, J.; ZHANG, Y. Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. **Curr Protoc Bioinformatics,** v. 52, p. 5 8 1-15, Dec 17 2015b. ISSN 1934-340X (Electronic) 1934-3396 (Linking).

ROST, B. Twilight zone of protein sequence alignments. **Protein Eng,** v. 12, n. 2, p. 85-94, Feb 1999. ISSN 0269-2139 (Print) 0269-2139 (Linking).

YANG, J. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nat Methods**, v. 12, n. 1, p. 7-8, Jan 2015. ISSN 1548-7105 (Electronic) 1548-7091 (Linking).

ZHOU, L. et al. Structural basis for collagen recognition by the immune receptor OSCAR. **Blood,** v. 127, n. 5, p. 529-37, Feb 4 2016. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking).

NAM, G. et al. Crystal structures of the two membrane-proximal Ig-like domains (D3D4) of LILRB1/B2: alternative models for their involvement in peptide-HLA binding. **Protein Cell**, v. 4, n. 10, p. 761-70, Oct 2013. ISSN 1674-8018 (Electronic) 1674-800X (Linking).

ROGNAN, D. Docking methods for virtual screening: principles and recent advances. **Virtual** screening, p. 153-176, 2011.

GALLAGHER, E. S.; HUDGENS, J. W. Mapping Protein-Ligand Interactions with Proteolytic Fragmentation, Hydrogen/Deuterium Exchange-Mass Spectrometry. **Methods Enzymol**, v. 566, p. 357-404, 2016. ISSN 1557-7988 (Electronic) 0076-6879 (Linking).

FEIGIN, L. A.; SVERGUN, D. I. Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering. New York: : Plenum Press, 1987.

PUTNAM, C. D. et al. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. **Q Rev Biophys**, v. 40, n. 3, p. 191-285, Aug 2007. ISSN 0033-5835 (Print) 0033-5835 (Linking).

JESUS, H. C. R. D. Estudos estruturais de policetídeos sintases guiados por ligação cruzada acoplada a espectrometria de massas. 2016. (Doutorado). Instituto de Química, UNICAMP, Campinas.