

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

MARCELO MONTENEGRO RABELLO

Comparação metodológica de abordagens *in silico* no estudo de moléculas antiofídicas através de sua ação em toxinas isoladas de venenos de serpentes

Recife

2012

MARCELO MONTENEGRO RABELLO

Comparação metodológica de abordagens *in silico* no estudo de moléculas antiofídicas através de sua ação em toxinas isoladas de venenos de serpentes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaldini Hernandes

Recife

2012

Rabello, Marcelo Montenegro

Comparação metodológica de abordagens *in silico* no estudo de moléculas antiofídicas através de sua ação em toxinas isoladas de venenos de serpentes/ Marcelo Montenegro Rabello– Recife: O Autor, 2012.

132 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcelo Zaldini Hernandes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui bibliografia, apêndices e anexos

**1. Serpentes- veneno 2. Biologia molecular 3. Bioinformática I.
Título.**

615.942

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-126

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Professor Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Professor Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Professora Dra. Ângela Maria Isidro Farias

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Professora Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Professora Dra. Suely Lins Galdino

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Professor Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: RABELLO, Marcelo Montenegro

Título: Comparação metodológica de abordagens *in silico* no estudo de moléculas antiofídicas, através da sua ação em toxinas isoladas de venenos de serpentes

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof(a). Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof(a). Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

Prof(a). Dr.

Instituição:

Assinatura: _____

RESUMO

RABELLO, M. M.; Comparação metodológica de abordagens *in silico* no estudo de moléculas antiofídicas, através da sua ação em toxinas isoladas de venenos de serpentes. 2012. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Este projeto pode ser resumido como uma comparação metodológica de abordagens *in silico*, mais precisamente de *docking* molecular. Foram utilizadas como alvos biológicos as fosfolipases A₂ (PLA₂), sendo estas um grupo de toxinas presentes abundantemente em venenos de serpentes. Foram utilizadas, como ligantes (potenciais inibidores), um total de 103 moléculas conhecidas na literatura. Um banco de dados com os ligantes e alvos foi construído, agregando-se informações sobre a atividade biológica e também suas respectivas estruturas tridimensionais. Os programas AUTODOCK, AUTODOCK VINA, GOLD, DOCK, SURFLEX e PLANTS foram utilizados para gerar os resultados de *docking*. O programa BINANA foi utilizado na análise das interações intermoleculares presentes nos complexos ligante-receptor, obtidos como resultados dos cálculos. Os dados gerados foram analisados com métodos multivariados, como por exemplo, a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Hierárquica de Clusters (HCA). Resíduos de aminoácidos, importantes para a estabilidade do complexo ligante-receptor, também foram identificados através de uma análise detalhada dos melhores resultados. Adicionalmente, foi reportado um artigo publicado, envolvendo PLA₂s, com foco especial na molécula Quercetina como inibidor dos efeitos de veneno de serpente. Foi possível identificar os programas que apresentaram menor demanda computacional na análise comparativa de seus tempos de processamento, o que pode vir a ser muito útil em futuros estudos de *docking*, até mesmo com um número ainda maior de ligantes e alvos que podem ser submetidos ao procedimento de *docking* molecular, no intuito de aumentar o banco de dados de inibidores potenciais de PLA₂s. As abordagens analíticas multivariadas utilizadas foram capazes de revelar aspectos interessantes sobre as semelhanças e diferenças entre os resultados de *docking* obtidos. Com a aplicação destas análises, pôde-se estabelecer uma metodologia de análise para a interpretação dos resultados nas escalas visual, numérica e gráfica, através, respectivamente, da geração das imagens para visualização molecular, das análises estatísticas (multivariadas) e da elaboração dos gráficos provenientes destas análises. Este estudo foi importante para aumentar a base de conhecimento do nosso grupo de pesquisa, e da comunidade científica como um todo, a respeito dos cálculos de modelagem molecular que envolvem os métodos de *docking*, e certamente serão úteis em estudos futuros com PLA₂s ou outros alvos farmacológicos.

Palavras-chave: Antiofídico. Docking. Comparação. Modelagem Molecular.

ABSTRACT

RABELLO, M. M.; Methodological comparison of *in silico* approaches on antiophidics molecules, through its action on toxins isolated from snake venoms. 2012. Dissertation (Master). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

This project can be summarized as a methodological comparison of *in silico* approaches, more precisely between docking methods. Several phospholipase A₂ (PLA₂), a group of toxins abundantly present in snake venoms, were used as targets. A total number of 103 molecules were used for the definition of the ligands. It was built a database with all these ligands, adding information about their activity and also their three-dimensional structures. The programs AUTODOCK, AUTODOCK VINA, GOLD, DOCK, SURFLEX and PLANTS were used in docking calculations. The program BINANA was used to analyze the intermolecular interactions present in the ligand-receptor complexes obtained as poses from docking results. The data generated by BINANA was statistically analyzed by applying multivariate analysis methods, such as principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA). Important aminoacids residues for the stability of the complex ligand-receptor were identified through a detailed analysis of the best results. Additionally, an article was reported, involving PLA₂s, with special focus on the Quercetin molecule as an inhibitor of snake venom. In a comparative analysis of the docking calculation's time, it was possible to identify the programs that present low computational demands. This performance analysis can be very useful in future studies of docking, even with a much larger number of ligands and targets, increasing the database of potential PLA₂s inhibitors. By applying these tests, we could establish a methodological analysis for the results interpretation on visual, numerical and graphic scales, means, respectively by the generation of images for molecular visualization, statistical analysis (multivariate) and graphing from these tests. This study was important to increase the knowledge of our research group and also of the scientific community, about the molecular modeling calculations that involves docking methods, and will certainly be useful in future studies with PLA₂ or other pharmacological targets.

Keywords: Antiophidic. Docking. Comparison. Molecular Modelling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação de uma sPLA₂, em destaque os principais elementos estruturais.

Figura 2: Ilustração de *docking*. Em verde o receptor, em marrom o ligante. Demonstrando a formação do complexo.

Figura 3: Representação esquemática do modelo de “chave e fechadura” proposto por Emil Fischer. Adaptado de <http://tubs.sa.utoronto.ca/newpage/topics/pandp.html>

Figura 4: Estrutura cristalográfica da cadeia A da PLA₂ Bothropstoxin-I (código PDB: 2H8I), com o seu ligante co-cristalizado (polietileno glicol) em destaque.

Figura 5: Interpretação esquemática do algoritmo genético implementado no programa GOLD.

Figura 6: Fluxograma geral dos cálculos e análises realizadas.

Figura 7: Estruturas da molécula Aplyolide A. a) Estrutura extraída do artigo que cita sua atividade (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura extraída do banco de dados ChemSpider.

Figura 8: Estruturas da molécula Cabenegrina A-2. a) Estrutura do isômero R; b) Estrutura do isômero S.

Figura 9: Estruturas da molécula Caulerpenyne. a) Estrutura com o grupo O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o grupo O-(C=O)-CH₃, extraída do PubChem.

Figura 10: Estruturas da molécula Dendrillolide A. a) Molécula extraída do artigo sobre produtos naturais marinhos, com grupamento metila na posição em questão (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura extraída do banco de dados PubChem, com o substituinte O-(C=O)-CH₃. c) Estrutura extraída do artigo de Potts, 2009, com uma hidroxila da posição em questão.

Figura 11: Estruturas da molécula Gracilin A. a) Estrutura com o substituinte O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o grupo O-(C=O)-CH₃. Extraída do ChemSpider.

Figura 12: Estruturas da molécula Ilimaquinona. a) Estrutura extraída do artigo(FOLMER et al., 2010). b) Estrutura extraída do PubChem.

Figura 13: Estruturas da molécula Luffolide. a) Estrutura com o grupo O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o grupo O-(C=O)-CH₃, extraída do PubChem.

Figura 14: Estruturas da molécula Norrisolide. a) Estrutura com o substituinte O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o substituinte O-(C=O)-CH₃, extraída do ChemSpider.

Figura 15: Estruturas da molécula Palauolide. a) Estrutura extraída do artigo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010); b) Estrutura extraída do PubChem.

Figura 16: Estrutura da molécula Palauolol. a) Estrutura extraída do artigo sobre produtos marinhos naturais (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura extraída do PubChem.

Figura 17: Estruturas da molécula Palinurin. a) Estrutura com um CH₂ a menos, extraída do artigo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura extraída do ChemSpider, com um CH₂ a mais na estrutura.

Figura 18: Estruturas da molécula Petrosaspongiolide M. a) Estrutura extraída do artigo sobre produtos naturais marinhos(FOLMER et al., 2010), com uma instauração no anel de cinco membros. b) Estrutura extraída do PubChem.

Figura 19: Estruturas da molécula Rhipocephalin. a) Estrutura com o substituinte O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o grupo O-(C=O)-CH₃. Extraída do PubChem.

Figura 20: Estruturas da molécula Spongidine B. a) Estrutura com o grupo O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o substituinte O-(C=O)-CH₃. Extraída do PubChem.

Figura 21: Estrutura da molécula Scalaradial. a) Estrutura extraída do artigo sobre produtos marinhos naturais (FOLMER et al., 2010) com o substituinte CH₃-C=O. b) Estrutura extraída do PubChem, com o grupo H-C=O.

Figura 22: O gráfico de scores relativos de todos os ligantes em todos os alvos, normalizados pelo valor de mínimo. Desta forma, o valor unitário é o mínimo score de cada programa.

Figura 23: O gráfico dos mesmos valores de scores relativos, porém logaritimizadas (em base 10), para proporcionar uma visualização diferente dos dados.

Figura 24: Gráfico de scores relativos de todos os ligantes em todos os alvos, normalizados pelo valor de máximo. Desta forma, o valor unitário é o máximo score de cada programa.

Figura 25: Estrutura do alvo 1GMZ_A no modelo ribbon, em verde. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 26: Estrutura do alvo 1QLL_A no modelo ribbon, em verde escuro. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 27: Estrutura do alvo 1XXS_A no modelo ribbon, em azul. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 28: Estrutura do alvo 2H8I_A no modelo ribbon, em azul claro. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 29: Estrutura do alvo 2OK9_A no modelo ribbon, em roxo. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 30: Estrutura do alvo 2OQD_A no modelo ribbon, em magenta. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 31: Estrutura do alvo 2Q2J_A no modelo ribbon, em cinza. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 32: Estrutura do alvo 2QOG_B no modelo ribbon, em laranja. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 33: Estrutura do alvo 2QOG_B_Ca no modelo ribbon, em laranja. O átomo de cálcio está representado por uma esfera na cor verde. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 34: Estrutura do alvo 2QOG_B_Ca_HOH188 no modelo ribbon, em laranja. O átomo de cálcio está representado pela maior esfera na cor verde e o átomo de oxigênio da molécula de água pela esfera menor. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 35: Estrutura do alvo 3I03 no modelo ribbon, em amarelo. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 36: Estrutura do alvo 3MLM_A no modelo ribbon, em ciano. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa

PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

Figura 37: Alinhamento das estruturas das PLA₂s (alvos). Em verde o alvo 1GMZ_A, em verde escuro o alvo 1QLL_A, em Azul o alvo 1XXS_A, em azul claro o alvo 2H8I_A, em roxo o alvo 2OK9, em magenta o alvo 2OQD_A, em cinza o alvo 2Q2J_A, em laranja o alvo 2QOG_B, em amarelo o alvo 3I03 e em ciano o alvo 3MLM.

Figura 38: Alinhamento múltiplo de sequências das PLA₂s utilizadas como alvos nos cálculos de *docking*.

Figura 39: Gráfico de tempo relativo entre os programas de *docking* para cada alvo utilizado.

Figura 40: Valores de score (Kcal/mol) para os resultados de *docking*, obtidos com o programa AUTODOCK, para as duas estruturas da molécula Petrosaspongiolide M. Uma estrutura foi obtida a partir do PubChem e outra do artigo sobre produtos marinhos naturais (Marine).

Figura 41: Resultados de *docking* da molécula Petrosaspongiolide M no alvo 2QOG_Ca obtido pelo programa AUTODOCK. Em ciano a estrutura extraída do PubChem com uma insaturação no anel de 5 membros e em verde a estrutura sem a insaturação, extraída do arquivo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010). A estrutura com a insaturação obteve uma energia de -3,96 kcal/mol enquanto a outra obteve uma energia de 1,05 kcal/mol.

Figura 42: Estrutura tridimensional do complexo formado pelo *docking* realizado com o programa SURFLEX, para a molécula cinarina e o alvo 3MLM_A. Em destaque a ligação de hidrogênio intermolecular. Imagem gerada com o programa VMD (HUMPHREY et al., 1996).

Figura 43: Estrutura tridimensional do complexo formado pelo *docking* realizado com o programa SURFLEX, para a molécula Cinarina e o alvo 3MLM_A. Em destaque os contatos hidrofóbicos intermoleculares. Imagem gerada com o programa VMD (HUMPHREY et al., 1996).

Figura 44: Estrutura tridimensional do complexo formado pelo *docking* realizado com o programa SURFLEX, para a molécula Cinarina e o alvo 3MLM_A. Em destaque a interação pi-pi intermolecular entre os anéis aromáticos paralelos. Imagem gerada com o programa VMD (HUMPHREY et al., 1996).

Figura 45: Dendograma obtido a partir da Análise Hierárquica de Clusters (HCA) para as interações HB (ligação de hidrogênio). Programas: DOCK (DO), GOLD (GO), Vina (VI), AUTODOCK (AD), SURFLEX (SU) e PLANTS (PL).

Figura 46: Dendograma obtido a partir da Análise Hierárquica de Clusters (HCA) para as interações HC (contatos hidrofóbicos). Programas: DOCK (DO), GOLD (GO), Vina (VI), AUTODOCK (AD), SURFLEX (SU) e PLANTS (PL).

Figura 47: Dispersão de valores, em angstroms (Å), para as coordenadas (X,Y,Z) dos átomos da Quercetina, obtidas com os programas DOCK (DO), GOLD (GO) e PLANTS (PL), para os diferentes alvos. Em cima os valores para a coordenada Z, no meio X e na parte de baixo Y.

Figura 48: A) Estrutura da molécula de Quercetina com os números de cada átomo destacados. B) Dispersão transposta de valores para as coordenadas (X,Y,Z) dos átomos (legenda do eixo horizontal) da Quercetina, obtidas com os programas DOCK, GOLD e PLANTS, para os diferentes alvos. As cores dos pontos representam cada resultado de *docking*, em um dos três programa, e em um dos doze alvos.

Figura 49: Dendograma da HCA realizada sobre os valores das coordenadas (X,Y,Z) dos átomos da molécula Quercetina, obtidas com os programas DOCK (DO), GOLD (GO) e PLANTS (PL), para todos os doze alvos.

Figura 50: Gráfico de *scores* da PCA realizada sobre os valores das coordenadas (X,Y,Z) dos átomos da molécula Quercetina, obtidas com os programas DOCK (DO), GOLD (GO) e PLANTS (PL), para todos os doze alvos. O eixo horizontal representa a primeira componente principal (PC1) e o vertical, a segunda componente principal (PC2). Em destaque, utilizando 4 cores diferentes, estão representados os 4 resultados de *docking* (4 poses) que são encontrados nos pontos apontados no gráfico de *scores*, para efeito de comparação visual (molecular) e comparação numérica (PC1 e PC2).

Figura 51: Histograma com a frequência dos 5 melhores ligantes entre os 50 melhores resultados, para cada programa.

Figura 52: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa AUTODOCK, foi obtido no cálculo entre o alvo 2QOG B Ca HOH188 e o ligante Ácido Aristolóquico 1. É possível observar o poliedro de coordenação do átomo de Ca^{2+} e as ligações de hidrogênio de 3,2 Å e 2,9 Å com o resíduo LYS61 e com a molécula de água 188, respectivamente. Assim como os contatos hidrofóbicos com o resíduo PHE6.

Figura 53: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa VINA, obtido no cálculo entre o alvo 1XXS e o ligante Wedelolactona Análogo A. É possível observar as ligação de hidrogênio de 3,4 Å com o resíduo de aminoácido ALA19 e com o resíduo HIS48 de 3,0 Å. Assim como contatos hidrofóbicos com o resíduo LEU3.

Figura 54: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa GOLD, obtido no cálculo entre o alvo 2QOG B e o ligante Suramina. Ligações de hidrogênio de 3,1Å, 3,4 Å, 2,5 Å, 3,5 Å e 2,8 Å, com ASN7, CYS58, THR60, LYS61 e TRP62, respectivamente.

Figura 55: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa DOCK, obtido no cálculo entre o alvo 2H8I e o ligante Suramina. É possível observar a ligação de hidrogênio de 3,1 Å com o resíduo de aminoácido ARG34. Assim como os contatos hidrofóbicos com os resíduos LEU3, LEU6 e TYR52.

Figura 56: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa SURFLEX, obtido no cálculo entre o alvo 1XXS e o ligante *Variabilin*. É possível observar as ligações de hidrogênio de 3,0 Å e 3,4 Å com os resíduos de aminoácido GLY23 e VAL31, respectivamente. Assim como os contatos hidrofóbicos com os resíduos LEU6, ILE10 e LEU97.

Figura 57: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa PLANTS, obtido no cálculo entre o alvo 2QOG B Ca e o ligante Primetina. É possível observar as ligações de hidrogênio de 3,6 Å, 3,2 Å e 3,1 Å com os resíduos de aminoácido ASN7, GLY30 e LYS61, respectivamente. Assim como os contatos hidrofóbicos com os resíduos PHE6, ILE10 e LEU97.

Figura 58: Melhor solução de *docking* para a Quercetina (modelo stick) e resíduos importantes para a interação no alvo Crotoxina B, além do íon Ca^{2+} e o oxigênio pertencente a molécula de água 188. Ligações de hidrogênio (distância em Å) mostradas como linhas, não envolvendo o íon Ca^{2+} . Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhorar a visualização, e as linhas ligadas ao íon Ca^{2+} representam o seu poliedro de coordenação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alvos selecionados para o estudo de *docking* molecular.

Tabela 2: Ligantes selecionados para o estudo de *docking* molecular.

Tabela 3: Tabela com os ligantes selecionados como melhor resultado para cada programa.

Tabela 4: Tempos totais em segundos para cada programa.

Tabela 5: Tabela com os melhores resultados selecionados para cada programa.

Tabela 6: Ligações de hidrogênio do complexo obtido no cálculo de *docking* entre o alvo *Crotoxin B* sem o átomo de Ca^{2+} e sem a molécula de água. Realizado com o programa GOLD.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

(LP)PLA ₂	Fosfolipase A ₂ associada a lipoproteína
ACO	Otimização em colônias de formigas
AD	AUTODOCK
BthTX-I	Bothropstoxin-I
BthTX-II	Bothropstoxin-II
cPLA ₂	Fosfolipase A ₂ citosólica
DO	DOCK
GA	Algoritmo genético
GO	GOLD
HB	Ligações de hidrogênio
HC	Contatos hidrofóbicos
iPLA ₂	Fosfolipase A ₂ independente de cálcio
kDa	Kilo Dalton
LGA	Algoritmo genético lamarckiano
MMAS	Sistema de formigas de máximos e mínimos
MMHDA	methoxylated fatty acid 7-methoxy-9-methylhexadeca-4,8-dienoic
PAF	Fator de ativação plaquetaria
PL	PLANTS
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
PrTX-I	Piratoxin-I
PrTX-II	Piratoxin-II
PrTX-III	Piratoxin-III
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
sPLA ₂	Fosfolipase A ₂ secretadas
SU	SURFLEX
TRP	Aminoácido Triptofano
UFPE	Universidade Federal da Pernambuco
VI	AUTODOCK VINA
VMD	Visual Molecular Dynamics

SUMÁRIO:

1 INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 FOSFOLIPASES A₂ (PLA₂)	23
2.2 INIBIDORES DE FOSFOLIPASES A₂	27
2.3 MODELAGEM MOLECULAR	30
2.3.1 DOCKING	30
2.3.2 METODOLOGIAS DE BUSCA CONFORMACIONAL	34
2.4 MÉTODOS DE COMPARAÇÃO	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 BANCO DE DADOS	39
4.2 PROGRAMAS/METODOLOGIAS	43
4.2.1 GOLD	44
4.2.2 AUTODOCK	47
4.2.3 AUTODOCK VINA	48
4.2.4 DOCK	49
4.2.5 SURFLEX	49
4.2.6 PLANTS	50
4.3 MAQUINAS UTILIZADAS NOS CÁLCULOS	51
4.4 EXECUÇÃO DOS PROGRAMAS	51
4.4.1 AUTODOCK	52
4.4.2 AUTODOCK VINA (VINA)	53
4.4.3 DOCK	53
4.4.4 PLANTS	54
4.4.5 GOLD	54
4.4.6 SURFLEX	55
4.5 COMPARAÇÃO METODOLÓGICA	55
4.5.1 ANÁLISE HIERÁRQUICA DE CLUSTERS	56
4.6 ANÁLISE GLOBAL DOS MELHORES RESULTADOS DE CADA PROGRAMA	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
5.1 BANCO DE DADOS	58
5.1.1 DIVERGÊNCIA ENTRE AS ESTRUTURAS DAS MOLÉCULAS	58
5.2 PRINCIPAIS RESULTADOS DE DOCKING PARA AS MOLÉCULAS (LIGANTES) DO BANCO DE DADOS	66
5.3 RESULTADOS DE COMPARAÇÃO DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES PRESENTES NOS COMPLEXOS LIGANTE-ALVO	81
5.4 RESULTADOS DE ANÁLISES MULTIVARIADAS SOBRE OS MÚLTIPLOS RESULTADOS DE DOCKING REALIZADOS	84
5.4.1 ANÁLISE MULTIVARIADA DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES QUANTIFICADAS COM O PROGRAMA BINANA	84

5.4.2 ANÁLISE MULTIVARIADA DAS POSIÇÕES DE <i>DOCKING</i> (POSES) OBTIDAS PARA A MOLÉCULA QUERCETINA	85
5.5 ANÁLISE GLOBAL DOS MELHORES RESULTADOS DE <i>DOCKING</i>	90
5.5.1 AUTODOCK	92
5.5.2 AUTODOCK VINA	93
5.5.3 GOLD	93
5.5.4 DOCK	95
5.5.5 SURFLEX	96
5.5.6 PLANTS	97
5.6 TRABALHOS PUBLICADOS EM REVISTA	99
5.6.1 QUERCETIN AS AN INHIBITOR OF SNAKE VENOM SECRETORY PHOSPHOLIPASE A ₂ .	99
6 CONCLUSÕES	101
7 PERSPECTIVAS	102
8 REFERÊNCIAS	103
9 APÊNDICES	116
10 ANEXOS	132

1 INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO

O termo *in silico* segue a tendência dos termos *in vitro* e *in vivo* e faz referência ao chip de silício dos computadores, sendo amplamente empregado na literatura de química medicinal para designar a utilização de métodos computacionais para a realização de estudos de modelagem molecular, principalmente voltados para sistemas de interesse biológico.

A importância de estudos *in silico* já vem sendo percebida pela comunidade científica e pela grande indústria farmacêutica (“big pharma”). Estima-se que o uso destas metodologias pode reduzir os custos e o tempo de desenvolvimento de um novo fármaco em até 50% (GELDENHUYS et al., 2006).

Isto ocorre porque muitas vezes o número de moléculas que precisam ser sintetizadas e testadas experimentalmente passa a ser drasticamente reduzido por conta da alta preditividade e confiabilidade dos métodos computacionais (*in silico*), abreviando assim o tempo de desenvolvimento de um novo fármaco. Já no meio acadêmico, os métodos *in silico* também representam uma grande ajuda aos grupos experimentais, pois muitas vezes dispensam a síntese cara e demorada de algumas moléculas que não apresentariam atividades biológicas satisfatórias, segundo os modelos preditivos *in silico*.

Dentre os métodos *in silico* disponíveis, as técnicas de *docking* (*virtual screening*) são muito frequentes em trabalhos de química medicinal. Os métodos de *docking* são baseados no conhecimento prévio da estrutura tridimensional do alvo biológico (normalmente uma proteína ou enzima), que é utilizada para elucidar as possíveis interações intermoleculares entre os ligantes (fármacos em potencial) e o sítio ativo destes alvos biológicos, relacionados a uma fisiopatologia em questão.

O uso de produtos naturais contra os efeitos de picadas de serpentes tem sido reconhecido há muito tempo, mas somente nos últimos 20 anos esse uso recebeu uma atenção científica mais concentrada (MORS et al., 2000; MELO, M. M. et al., 2007). A aplicação de preparações de plantas medicinais com atividade antiofídica pode ser útil no tratamento primário de vítimas de acidentes com serpentes. Particularmente importante em áreas onde o soro anti-veneno não está prontamente disponível (PITHAYANUKUL et al., 2005).

Serpentes venenosas que pertencem ao gênero *Bothrops* (Jararacas) são muito comuns no Brasil, especialmente nas regiões de Cerrado, e respondem por cerca de 88% dos acidentes registrados no país, segundo o Instituto Butantã. O envenenamento por estas cobras resulta em uma mionecrose aguda que pode evoluir para uma perda permanente de tecido, amputação e até mesmo a morte.

As principais moléculas envolvidas nos efeitos locais tóxicos destes venenos (edema, hemorragias e mionecroses) são toxinas de caráter enzimático, como isoenzimas fosfolipase A₂ do grupo II, serino proteases, metalloproteases Zn²⁺-dependentes e L-aminoácido oxidases (LAO), e proteínas sem ação enzimática, como lectinas tipo C, miotoxinas, desintegrinas, inibidores “Kunitz-like”, fatores de crescimento e proteínas secretórias ricas em cisteína (ESPINO-SOLIS et al., 2009).

O veneno de *B. jararacussu*, por exemplo, apresenta uma alta atividade miotóxica. As principais miotoxinas encontradas neste veneno são a BthTX-I, fosfolipase LYS-49 cataliticamente inativa, e a BthTX-II ASP-49, com baixa atividade catalítica, que são capazes de induzir mionecrose, hemorragia, edema, hipotensão e inibição da agregação plaquetária por mecanismos pouco conhecidos (TAKEDA, A. A S. et al., 2004).

Já a fosfolipase A₂ (PLA₂), isolada a partir do veneno da serpente *Echis carinatus sochureki*, pertence ao subgrupo das fosfolipases A₂ SER-49, foram caracterizadas como tendo baixa atividade enzimática, porém com potentes atividades miotóxicas, sendo assim um alvo muito importante para estudo (ZHOU et al., 2008).

Além dos efeitos prejudiciais dos venenos de serpentes, substâncias extraídas de venenos ofídicos também serviram de protótipo para obtenção de uma classe de agentes terapêuticos anti-hipertensivos, os inibidores de enzima conversora de angiotensina (Captopril). Diversas toxinas extraídas de venenos de serpentes estão sendo utilizadas analiticamente em estudos laboratoriais de hemostasia (MARSH; WILLIAMS, 2005).

O processo inflamatório é controlado por um conjunto de substâncias chamadas de mediadores químicos. Mediadores químicos endógenos consistem em aminas vasoativas, citocinas, bradicininas, fibrina, componentes do complemento, eicosanoides, fator de ativação plaquetária (PAF), óxido nítrico e neuropeptídeos. Eicosanoides que incluem as prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos, são produtos da metabolização do ácido araquidônico pelas ciclooxigenases (COX) e lipooxigenases (LOX). Apesar dos grandes esforços investidos no desenvolvimento de drogas capazes de suprimir a conversão do ácido araquidônico em eicosanoides pro-inflamatórios, o resultado não obteve o sucesso esperado. A falta de especificidade pelas enzimas COX e LOX resultou em efeitos colaterais indesejáveis, responsável pelo fracasso do conceito. Como alternativa, uma nova linha de pesquisa na descoberta de drogas anti-inflamatórias foi aberta, e teve início a busca por inibidores de PLA₂ (FOLMER et al., 2010).

Neste sentido, o presente trabalho tem o objetivo de contribuir com a definição de estratégias *in silico* que podem ser usadas para a definição e otimização de inibidores mais potentes de PLA₂. Cabe ressaltar, que deste ponto em diante, os nomes das moléculas, principalmente dos ligantes (potenciais inibidores), que aparecerem no texto em formatação itálica, dizem respeito os nomes originais na língua inglesa, para evitar possíveis enganos com as traduções destes nomes. Os nomes de moléculas que aparecerem sem formatação itálica correspondem a tradução para o português.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

PLA₂s são enzimas lipolíticas encontradas em quase todos os tipos celulares. Elas catalisam a hidrólise de glicerofosfolipídios na ligação acil sn-2, liberando um lisofosfolipídio e um ácido araquidônico. A liberação desses ácidos pode ter a função de reserva energética e precursores de eicosanoides, potentes mediadores da inflamação. Por outro lado os lisofosfolipídios estão envolvidos na sinalização celular e na remodelagem dos fosfolipídios, conseqüentemente perturbando a membrana (SANTOS, DOS et al., 2011).

Quinze tipos diferentes de PLA₂s foram caracterizadas, e agrupadas em quatro famílias distintas: PLA₂s secretadas (sPLA₂s), PLA₂s citosólicas (cPLA₂s), PLA₂s associada a lipoproteína ((LP)PLA₂s) e PLA₂s independentes de cálcio (iPLA₂s) (FOLMER et al., 2010).

As sPLA₂s são geralmente encontradas nos venenos de serpentes, escorpiões e abelhas. Também podem ser secretadas pelo pâncreas e outras células de mamíferos. As sPLA₂s encontradas em peçonhas foram classificadas em quatro grupos, baseado em sua estrutura primária (VALENTIN; LAMBEAU, 2000).

Foram primeiramente encontradas em venenos de serpentes e classificadas nos grupos I e II, de acordo com seus padrões de ligações dissulfeto e comprimento de alguns loops. As serpentes da família *elapidae* foram classificadas no grupo I, enquanto as sPLA₂s das serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* fazem parte do grupo II (MARCHI-SALVADOR et al., 2008). Uma sPLA₂ de peçonha de abelha foi o primeiro membro identificado do grupo III. Em seguida foram identificados em outros invertebrados como em venenos de água-viva e escorpião. Membros do grupo III também foram encontrados em lagartos, indicando a presença também em vertebrados. Um sPLA₂ única, chamada de Conodipina-M, foi isolada a partir do veneno do molusco *Conus magus*, que possui características que compõem o grupo IX (VALENTIN; LAMBEAU, 2000).

Apesar das sPLA₂s derivadas de peçonhas mostrarem um alto grau de conservação estrutural com as sPLA₂s excretadas de mamíferos, as sPLA₂s de peçonhas de serpentes apresentam atividades biológicas bastante diversificadas, podendo uma determinada PLA₂ apresentar múltiplos efeitos biológicos (CHIOATO; WARD, RICHARD J, 2003). Elas possuem baixo peso molecular (14 kDa), são dependentes do íon Ca²⁺ para catálise e são caracterizadas por possuir um resíduo de aminoácido de histidina no sítio catalítico.

O mecanismo de ação das sPLA₂s envolve um ataque nucleofílico na ligação acil sn-2 dos fosfolipídios (FOLMER et al., 2010). Enquanto o papel das sPLA₂s permanece pouco compreendido, tem sido sugerido que a ação das sPLA₂s induzem um aumento na concentração das cPLA₂s, dependentes da liberação dos eicosanoides. Atuando em sinergia com outros mediadores pro-inflamatórios (YEDGAR, S et al., 2000). Elas são estruturalmente diferentes das PLA₂s do grupo IV, pertencentes a família das cPLA₂s.

As cPLA₂s são enzimas de 85 kDa, dependentes de átomo de cálcio para sua ativação, possuem resíduos de serina e de ácido aspártico no seu sítio catalítico. As cPLA₂s são as únicas PLA₂s com especificidade para o ácido araquidônico na posição sn-2, são ativadas por estimulações extracelulares,

patógenos, dano tecidual ou estresse químico ou físico. A concentração de cálcio citosólico, necessária para ativação das cPLA₂s resulta da quebra de fosfolipídios em inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), seguido pela ligação do IP₃ aos canais de cálcio no retículo endoplasmático (YEDGAR, SAUL et al., 2006).

Devido ao seu papel central mediando a geração de eicosanoides e PAFs e portanto mediando a inflamação, as cPLA₂s foram reconhecidas como alvos bastante atrativos para o descobrimento de novos fármacos. Algumas indústrias farmacêuticas como a Pfizer iniciaram o desenvolvimento de candidatos promissores a drogas com ação específica contra as cPLA₂s (FOLMER et al., 2010).

As PLA₂s também podem mediar a carcinogênese liberando os lisofosfolipídios, que podem induzir o crescimento celular através do seu metabolismo ao ácido lisofosfatídico. Inibidores de PLA₂s são alvos atraentes contra o câncer, já que teoricamente diminuem a formação do ácido araquidônico e, conseqüentemente, do ácido lisofosfatídico (CUMMINGS, 2007).

A expressão e a atividade das PLA₂s são aumentadas em diversos casos de cânceres (YAMASHITA, S. OGAWA; et al., 1994), incluindo o câncer de mama (YAMASHITA, S. YAMASHITA, J. et al., 1994; YAMASHITA, S. OGAWA; et al., 1994), pancreático (KIYOHARA et al., 1993), próstata (KALLAJOKI et al., 1998; JIANG et al., 2002), fígado (YING et al., 1994) e pele (YAMASHITA, S. YAMASHITA, J. et al., 1994). Também foi relatado uma maior expressão de cPLA₂s no câncer de colo retal. Embora o papel das cPLA₂s em modelos animais tenha apresentado resultado controverso (NIKNAMI et al., 2009).

Diferente das cPLA₂s, as (Lp)PLA₂s, ou PAF-acetil-hidrolases (PAF-HAs), receberam esse nome devido a sua habilidade de quebrar o grupo acetilado do PAF na posição sn-2. Também possuem propriedades anti-inflamatórias, uma vez que são capazes de degradar as moléculas de PAF. Contudo as (Lp)PLA₂s tornaram-se também um alvo importante na descoberta de novos inibidores de PLA₂s, já que foram reconhecidas como um fator de risco positivo nas doenças cardíacas coronarianas (BURKE; DENNIS, E. A, 2009).

Já as iPLA₂, possuem implicações na via de sinalização de caráter complexo e ainda pouco se sabe sobre essas implicações. Desempenham um papel na formação dos ossos, apoptose, liberação de insulina, desenvolvimento do esperma e regeneração de axônios (FOLMER et al., 2010).

Em todas as estruturas do grupo mais bem caracterizado das sPLA₂s, grupo II, é comum a existência de sete pontes dissulfeto e a conservação dos elementos estruturais principais, como pode ser observado na figura 1. Composição da estrutura:

- Alfa-hélice N-terminal (resíduos 2-13);
- “Loop” de ligação do átomo de Ca²⁺;
- Duas alfa-hélices antiparalelas (resíduos 40-53 e 90-108);
- Folha-beta (resíduos 75-84);
- “Loop” C-Terminal (resíduos 109-133).

Alguns resíduos que compõem o sítio catalítico (HIS48, TYR52 e ASP99) são completamente conservados nas sPLA₂s, pertencentes ao gênero Bothrops. Entretanto, no sítio de ligação do íon Ca²⁺, como ASN28, LEU32 e ASP49 é possível encontrar substituições importantes em ASP49-PLA₂s (SOARES, A M; GIGLIO, J R, 2003).

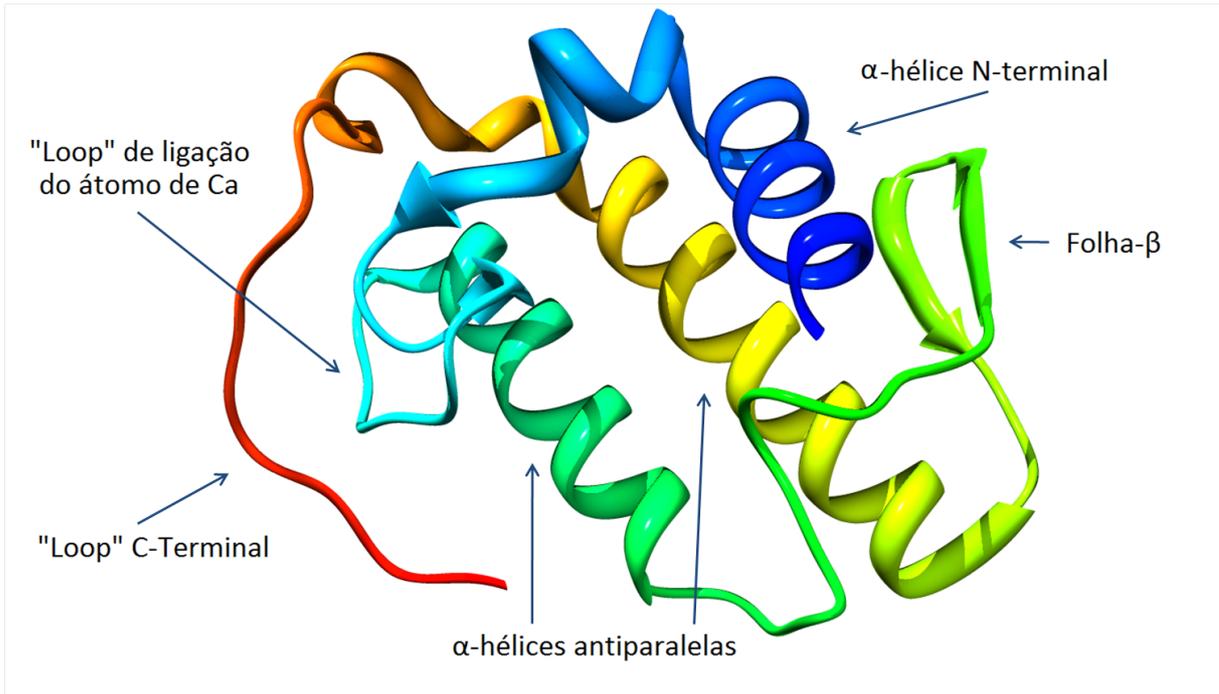


Figura 1: Representação de uma sPLA₂, em destaque os principais elementos estruturais.

Em venenos de serpentes da família *Viperidae*, existe um importante subgrupo de PLA₂s, as LYS49-PLA₂s. Essas proteínas possuem substituição, de um resíduo ASP por um de LYS que dificulta a ligação do íon Ca²⁺, cofator essencial para a atividade catalítica das PLA₂s, na incapacidade de promover a hidrólise do fosfolípido. No entanto, essa perda da atividade catalítica na LYS49-PLA₂s seja talvez mais enigmática, uma vez que ambos LYS49-PLA₂s e ASP49-PLA₂s tem seus resíduos importantes para desempenhar a função catalítica conservados. Apesar da inatividade catalítica, as LYS49-PLA₂s desempenham um importante papel nos acidentes ofídicos, induzindo uma drástica mionecrose local, por um mecanismo independente da presença do íon Ca²⁺ que não é completamente compreendido (MARCHI-SALVADOR et al., 2009).

A Crotoxina (Crotoxin) uma PLA₂, é a principal proteína presente no veneno da serpente cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*), foi a primeira toxina animal purificada e cristalizada. É um complexo molecular heterodímero, relacionada a importantes efeitos do envenenamento, como distúrbio neurológicos, miotoxicidade e insuficiência renal (MARCHI-SALVADOR et al., 2008). As duas subunidades que compõem essa toxina são:

- Molécula ácida, não tóxica e sem propriedade enzimática (Crotoxina A, CA ou Crotapotina);
- Molécula tóxica, ASP49-PLA₂ básica (Crotoxina B, CB e Cdt PLA₂).

O mecanismo bioquímico dos constituintes da Crotoxina constituem um exemplo de potencialização molecular, uma vez que a subunidade ácida, não tóxica dificulta a formação de interações não específicas entre a Asp49-PLA₂ básica e seus substratos. Consequentemente, a Crotoxina se liga a receptores específicos presentes nas terminações nervosas pré-sinápticas, e possivelmente em

sarcoplasmas e outras membranas plasmáticas. Após a ligação entre a Crotoxina e seus alvos moleculares, o complexo se dissocia, induzindo efeitos neurotóxicos, citotóxicos e miotóxicos potentes (MARCHI-SALVADOR et al., 2008).

O mecanismo de ação das miotoxinas, incluindo as mutantes naturais LYS49-PLA₂s, ARG49-PLA₂s, GLN49-PLA₂s, ASN49-PLA₂s, SER49-PLA₂s, e algumas ASP49-PLA₂s, são de grande interesse científico, uma vez que são capazes de causar danos nas fibras musculares rapidamente, logo depois de uma picada de serpente, e assim como outras proteínas e peptídeos, podem provocar uma incapacidade e perda permanente de tecido (GUTIÉRREZ, J M et al., 2006). Ensaio para neutralizar essas toxinas de forma eficiente ainda não alcançaram resultados definitivos até os dias de hoje, apesar de muitos estudos terem sido realizados nos últimos anos (LOMONTE et al., 2009; SANTOS, DOS et al., 2011).

O subgrupo de homólogos de LYS49-PLA₂s, é o mais estudado e melhor caracterizado entre as PLA₂s. São conhecidas por serem miotóxicas apesar de não possuírem atividade enzimática. Esse fato foi inicialmente atribuído a substituição natural do resíduo de aminoácido ASP pelo resíduo LYS na posição 49, presente nessas PLA₂s. Mais recentemente outras peculiaridades demonstraram também estar envolvidas na perda da atividade catalítica. Estudos envolvendo peptídeos sintéticos e mutações sítio-dirigidas sugerem a região C-terminal dessas proteínas como sítio responsável pela atividade miotóxica das LYS49-PLA₂s (MARCHI-SALVADOR et al., 2009; SANTOS, DOS et al., 2011).

A substituição dos resíduos de ARG e LYS por ALA na região 117-122 da toxina botrópica I (BthTX-I) resultou em uma redução significativa da atividade miotóxica (CHIOATO et al., 2002). Lomonte et al propuseram que a ação da LYS49-PLA₂ origina-se da interação dos resíduos C-terminal positivos com os fosfolipídios aniônicos de membrana (LOMONTE et al., 2003). Recentemente após uma revisão de muitas estruturas cristalográficas de LYS49-PLA₂s dos Santos e colaboradores concluíram que os resíduos LYS20, LYS115 e ARG118 provavelmente constituem o sítio miotóxico das LYS49-PLA₂ botrópicas (SANTOS, DOS et al., 2009, 2011).

Outras miotoxinas, fora desse grupo bem caracterizado, requerem estudos funcionais e estruturais mais aprofundados. Um dos subgrupos incluem as ASP49-PLA₂s miotóxicas, toxina brotrópica II (BthTX-II) e piratoxina III (PrTX-III), proteínas que são capazes de induzir dano muscular, mas apresentam atividade catalítica muito baixa (GUTIÉRREZ, J.M. et al., 1991; TOYAMA, M H et al., 1999). Essas toxinas parecem ser uma exceção entre as clássicas ASP49-PLA₂s, uma vez que apresentam um potencial reduzido, mesmo conservando os resíduos da rede catalítica (SANTOS, DOS et al., 2011).

BthTX-II, uma toxina ASP49-PLA₂ básica da *B. Jararacussu*, é também conhecida pelos seus efeitos edematogênicos e hemolíticos, e por sua capacidade de induzir agregação plaquetária e secreção através de múltiplas vias de transdução de sinais. Os resíduos entre THR112 e PRO121 da BrthTX-II são assumidos como responsáveis pela atividade miotóxica (SANTOS, DOS et al., 2011).

A manutenção da arquitetura do loop de ligação do átomo de cálcio, seu sítio de ligação, é essencial para a atividade catalítica das PLA₂s dos venenos de serpente. Os resíduos dessa região TYR28, GLY30 e GLY32, junto com ASP49 são responsáveis pela formação do poliedro de coordenação do íon Ca²⁺ (SCOTT et al., 1990; ARNI, R.K; WARD, R.J, 1996).

Estudos estruturais recentes da BthTX-II mostraram uma distorção no loop de ligação do átomo de cálcio na proteína quando comparado a ASP49-PLA₂s clássica. Também foi observada essa distorção analisando a estrutura cristalográfica

da PrTX-III, sugerindo que essas toxinas pudessem ser cataliticamente inativas (RIGDEN et al., 2003; CORRÊA et al., 2008; SANTOS, DOS et al., 2011).

2.2 Inibidores de Fosfolipases A₂

Durante a soroterapia, a neutralização dos efeitos tóxicos sistêmicos dos venenos é normalmente alcançada, mas a neutralização do dano tecidual local raramente ocorre (CARDOSO et al., 2003). Além disso, a demora no atendimento aos pacientes que sofrem acidentes ofídicos, mesmo com a soroterapia, pode agravar o quadro clínico, com evolução para a insuficiência renal aguda (HAVT et al., 2001). Sendo assim, a pesquisa por novos inibidores de venenos, sejam eles sintéticos ou naturais, que sejam capazes de complementar a soroterapia, principalmente na neutralização dos danos teciduais locais, é necessária e de grande importância para a saúde pública (SILVA, DA et al., 2004).

A presença das PLA₂s em serpentes peçonhentas, sem a presença dos efeitos tóxicos, desperta a curiosidade para alguma substância que a proteja contra os efeitos tóxicos. Em 1976 foi possível caracterizar um série de proteínas séricas globulares, com função de neutralizar os efeitos tóxicos e enzimáticos das PLA₂s de serpentes (KIHARA, 1976). A resistência aos efeitos tóxicos das PLA₂s vem sendo associada a presença destas proteínas neutralizantes (FAURE, 2000).

A Crotapotina, enzima isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, é um exemplo. Capaz de inibir edema na pata de camundongo e a atividade miotóxica induzidos por PLA₂s de três espécies distintas, *B. jararacussu*, *B. pirajai* e *B. moojeni* (CECCHINI, A. L. et al., 2004).

Também existem relatos na literatura de outros animais, providos de uma imunidade natural contra venenos e também de organismos, principalmente marinhos, com compostos dotados de atividade anti-fosfolipásica. A maioria dos casos nos estudos com animais, mostram que a presença de proteínas no sangue é capaz de oferecer uma resistência aos venenos de serpentes. Um exemplo é a presença, no soro de marsupiais *Didelphis marsupialis*, *D. albiventris* e *Philander opossum*, de fatores capazes de inibir o efeito miotóxico e hemorrágico induzidos pelo veneno das serpentes botrópicas (LIZANO et al., 2003).

Os organismos marinhos, tais como corais, águas-vivas, estrelas do mar, anêmonas e lesmas marinhas, desenvolveram potentes inibidores de PLA₂s, o que não pode ser considerado uma surpresa, devido a grande necessidade de se defender em seu ambiente natural (FOLMER et al., 2010). Os inibidores de PLA₂ de origem marinha pertencem de uma forma geral a classe terpenos. Possuem a fórmula geral (C₅H₈)_n. Podem ser classificados de acordo com o valor do n: n=1 hemiterpenos; n=2 monoterpenos; n=3 sesquiterpenos; n=4 diterpenos; n=5 sesterpenos; triterpenos n=6 e tetraterpenos n=8.

Um sesquiterpeno que merece destaque é a Bolinaquinona, isolada da esponja *Dysidea sp.*, mostrou inibir a atividade enzimática de sPLA₂s com IC₅₀ de 100nM, embora muito potente não é um inibidor seletivo contra sPLA₂s. Ela também afeta as cPLA₂s (MONTI et al., 2009). Os sesterpenos possuem um excelente potencial como compostos anti-inflamatórios. O sesterpeno *Manoalide*, que foi isolado pela primeira vez na década de 80 a partir de uma esponja *Luffariella variabilis* por Scheuer et al (SILVA, E. D. DE; SCHEUER, 1980), se tornou o primeiro produto natural marinho com atividade anti-PLA₂ e ainda é muito investigado até os dias atuais. Suas propriedades inibitórias, do *Manoalide*, foram descobertas em meados dos anos 80 (LOMBARDO; DENNIS, E. A., 1985; GLASER; JACOBS,

1986). O que confirmou que a atividade anti-PLA₂ era responsável por efeitos anti-inflamatórios constatados anteriormente (FOLMER et al., 2010).

Também como a Bolinaquinona, o *Manoalide* é um inibidor inespecífico de PLA₂s. O *Manoalide* inibe sPLA₂ humana (IC₅₀= 1,7 μM), sPLA₂ de veneno de serpentes (IC₅₀=0,03μM) e cPLA₂ (IC₅₀= 10μM). Manoalide foi licenciado pela Allergan Pharmeceuticals e alcançou a fase dois dos ensaios clínicos como uma droga antipsoriática tópica, embora seu desenvolvimento tenha sido descontinuado devido a um problema na formulação (HAEFNER, 2003). Muitos análogos do *Manoalide* foram isolados de esponjas pertencentes ao gênero *Luffariella*, assim como de outras esponjas também. A maioria dos análogos incluem *Secomanoalide*, *Luffariellolide*, *Luffariellins A e B* e *Luffolide* (POTTS et al., 1992).

Vários artigos de revisão sobre plantas medicinais e terapias alternativas foram publicados. Um grande número deles, provenientes de diversas partes do planeta, menciona plantas com conhecida atividade de neutralização das ações de venenos ofídicos, dentre este, somente alguns poucos atribuem a atividade a substâncias químicas identificadas, e um número menor ainda deles propõe um mecanismo de ação para esses compostos (PEREIRA, N. A. et al., 1994; MORS et al., 2000).

Diversas plantas contendo pterocarpanos têm seu uso descrito em diversas culturas ao redor do mundo como antídotos orais contra venenos de serpentes e aranhas (JIMÉNEZ-GONZÁLEZ et al., 2007). No Brasil, o “Específico Pessoa”, uma preparação fitoterápica vendida na amazônia para os trabalhadores rurais, que a tomam antes de entrar na mata, serviu de base para os trabalhos de Nakagawa e colaboradores (1982), que isolaram deste fitoterápico dois novos pterocarpanos prelinados, as Cabenegrinas A-I e A-II.

Estes compostos apresentaram atividade antiofídica contra o veneno de *Bothrops atrox* (jararaca-do-norte) em doses de 2,8 e 2,0 mg.kg⁻¹. No entanto, os pesquisadores não puderam identificar a planta usada na fabricação do Específico (NAKAGAWA, MASASHI et al., 1982; SILVA, G. L. D. et al., 1997; MILITÃO et al., 2007). Por outro lado, foram isolados do extrato etanólico das raízes de *Harpalyce brasiliensis* Benth., conhecida popularmente como “raiz-de-cobra”, vários pterocarpanos, dentre eles, as Cabenegrinas A-I e A-II (SILVA, G. L. D. et al., 1997), sugerindo a *H. brasiliensis* como sendo uma das espécies utilizadas na preparação do remédio “Específico Pessoa” (MILITÃO et al., 2007).

Desta forma, a alta atividade dos pterocarpanos em toxinas miotóxicas com atividade fosfolipásica e proteolítica, principais responsáveis pelo dano tecidual local, torna o estudo destas moléculas bastante interessante, na tentativa de obter compostos protótipos (“lead compounds”), capazes de inibir uma vasta gama de toxinas isoladas de diferentes venenos de serpentes (SILVA, A J M DA et al., 2004).

Em 2005 foram relatadas atividades anti-inflamatórias antimiotóxicas do extrato de *Cordia verbenacea* e do princípio ativo, um composto fenólico, o Ácido Rosmarínico. Essa atividade foi relatada contra os efeitos induzidos pelo veneno da serpente *B. jararacussu* e pelas suas principais PLA₂s (TICLI et al., 2005).

Estudos apontam a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antidepressivo e supressora, como os principais efeitos do ácido rosmarínico (MAKINO et al., 2002; TAKEDA, H. et al., 2002; CERVELLATI et al., 2002). Existem relatos que indicam que a biossíntese do Ácido Rosmarínico envolve os aminoácidos aromáticos TYR e PHE como precursores (SHETTY, 1997).

Na classe dos triterpenoides, dois triterpenos extraídos de *Betula alba*, apresentaram atividade anti-PLA₂. Esses dois compostos, Betulina e o Ácido

Betulínico, foram submetidos a um estudo de *docking* e foi possível observar uma interação favorável com o sítio ativo da PLA₂, justificado pelo valor de *score* encontrado (BERNARD et al., 2001).

Alguns cumestanos isolados de *Eclipta prostrata*, como Wedelolactona, e Cumestrol e alguns de seus derivados sintéticos estão entre os compostos mais ativos. Da Silva e colaboradores conseguiram antagonizar a liberação de creatina quinase no músculo esquelético, administrando individualmente cinco análogos de Wedelolactona na concentração de 30µM. Induzida pelo veneno da serpente *B. jararacussu* (DA SILVA, et al., 2001).

Flavonoides tem demonstrado capacidade de inibir PLA₂s, a Quercetina, Apigenina, Canferol, Luteolina e alguns glicosídeos da Quercetina, como a Rutina, Quercitrina e Isoquercitrina, são encontrados com certa frequência em plantas com atividade antiofídica (MORS et al., 2000). Lindahl e Tagesson em 1997 descreveram os efeitos inibitórios dos flavonoides em algumas PLA₂s de algumas espécies de serpentes, em particular o composto Rutina, salientando a proximidade e coplanaridade do grupo hidroxil-fenólico do átomo de carbono 5 e grupo carbonil pirônico para a atividade (LINDAHL, M; TAGESSON, C, 1997).

A maioria dos estudos químicos realizados com a espécie *Aristolochia*, mostra a produção de compostos nitrogenados peculiares, ácidos aristolóquicos e aristolactamas, sendo o Ácido Aristolóquico o mais abundante. O Ácido Aristolóquico é capaz de inibir as atividades enzimáticas de uma PLA₂ encontrada no veneno da serpente *Vipera russelli* assim que chega ao sítio ativo, mas falha ao inibir outras atividades da enzima (VISHWANATH; GOWDA, 1987). Os estudos de Vishwanath et al sugerem que o Ácido Aristolóquico forma um complexo 1:1 com a PLA₂, atuando como um inibidor enzimático não competitivo (MORS et al., 2000).

Em um teste comparativo realizado na literatura (LINDAHL, M; TAGESSON, C, 1993), avaliando a influência da Quercetina, Clopromazina, Ácido Aristolóquico e Indometacina sob uma fosfolipase A₂ do grupo II, obtida a partir do veneno da *Vipera russelli*, observou-se que a Quercetina e a Clopromazina foram capazes de inibir a atividade da PLA₂ em concentrações menores (< 100µM), enquanto o Ácido Aristolóquico e a Indometacina foram capazes de inibir apenas em concentrações mais altas (> 100µM).

Existe um grande número de moléculas com atividades antiofídicas, com relatos de sua estrutura química na literatura. Um banco de dados, chamado Plant-antivenom (<http://gbi.fmrp.usp.br/plantantivenom/>), reuni valiosas informações sobre alvos antiofídicos e plantas com atividade anti-veneno. Apesar dos avanços na área de toxilogia, ainda existe uma dificuldade na obtenção das estruturas químicas desses inibidores, uma vez que não foi encontrado um banco de dados especializado em estruturas de moléculas com atividade anti-veneno. Nos bancos de dados especializados em estruturas de moléculas como o PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) é possível encontrar a estrutura desses compostos. Mas como não é reportada a sua atividade antiveneno fica difícil fazer uma busca por essas moléculas, tornando essa busca uma tarefa árdua.

2.3 Modelagem Molecular

A modelagem molecular é uma ferramenta de notável importância, na descoberta de novos fármacos, assim como também na otimização de um fármaco já existente. Esse patamar só pode ser alcançado devido a grande evolução tecnológica na área da computação, que em termos de hardware, possibilita a execução de cálculos mais robustos e de software, com programas e metodologias capazes de reproduzir resultados mais próximos dos obtidos biologicamente (RODRIGUES, C. R., 2001).

Ao realizar o estudo de modelagem molecular é possível lançar mão de diversas metodologias para modelar o sistema de interesse. Dentre essas metodologias as de mecânica molecular, mecânica quântica, dinâmica molecular ou ainda de um estudo de *docking*, estão entre as mais empregadas nos estudos *in silico*.

Mecânica molecular é um método usado para calcular estruturas, energias e algumas propriedades de moléculas, onde são utilizados campos de força baseados nos movimentos dos núcleos. Os elétrons não são considerados explicitamente, mas uma vez que as posições dos núcleos são conhecidas é assumido que eles encontraram uma distribuição ótima. Dessa forma admite-se que a mecânica molecular trata a molécula como uma coleção de esferas representando os núcleos, conectadas por molas, representando as ligações. A dinâmica molecular é uma extensão da mecânica molecular, onde o comportamento dinâmico dos sistemas moleculares é simulado através da integração numérica das equações do movimento (RODRIGUES, C. R., 2001).

Os métodos de mecânica quântica utilizam abordagens de maior precisão, mas também de maior demanda computacional. Estão divididos em *ab initio* e semi-empíricos. Os métodos *ab initio* resolvem a equação de Schrödinger associada a um Hamiltoniano molecular, enquanto os métodos semi-empíricos têm boa parte dos seus parâmetros ajustados a dados experimentais. Essa parametrização aumenta de forma significativa a velocidade dos cálculos (RODRIGUES, C. R., 2001).

2.3.1 Docking

O termo *docking* é proveniente do termo da língua inglesa que significa atracar, ancorar ou acoplar, fazendo alusão ao fato das moléculas estudadas (ligantes) serem “ancoradas” nas imediações do sítio ativo do alvo biológico, assim como se um barco estivesse se atracando a um cais de porto.

O *docking* determina se há interação entre estas duas moléculas (ligante e alvo) no intuito de elucidar as razões moleculares responsáveis pela potência farmacológica destes ligantes ou fármacos em potencial. O procedimento de *docking* busca pela orientação que maximiza essas interações intermoleculares, minimizando a energia total do sistema. Assim, o ligante e a proteína formam um complexo por complementaridade estrutural e por estabilização energética (RAREY et al., 1996), ilustrado na figura 2.

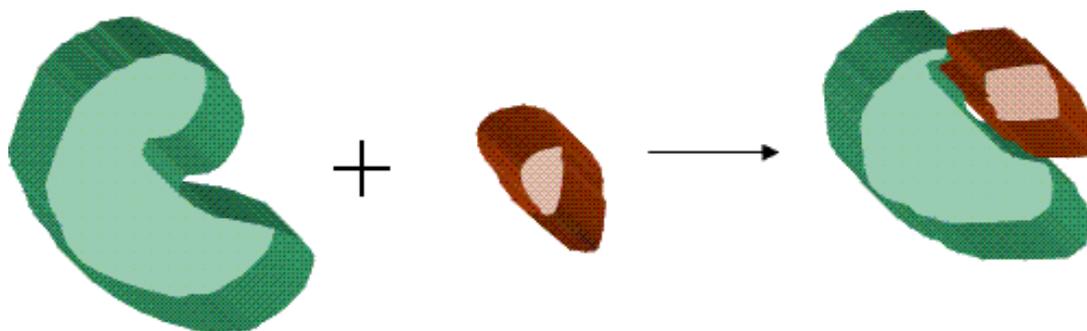


Figura 2: Ilustração de *docking*. Em verde o receptor, em marrom o ligante. Demonstrando a formação do complexo.

Apesar do *docking* ser um método genérico, que funciona tanto com proteínas, quanto com ácidos nucleicos (DNA e RNA), nos fixaremos na discussão dos alvos proteicos, por serem mais comuns e objeto principal de nosso estudo.

As proteínas são compostas por cadeias de aminoácidos que formam ligações peptídicas entre si. Elas possuem uma organização espacial de sua cadeia de resíduos de aminoácidos ou estrutura primária, formando estruturas secundárias (como α -hélice ou folha- β , por exemplo), terciárias (estrutura tridimensional no espaço cartesiano) e até quaternárias (arranjos espaciais entre monômeros, formando dímeros, trímeros, etc.). Esse arranjo espacial é o resultado de forças estabilizadoras entre os aminoácidos, principalmente ligações de hidrogênio, que conferem à proteína o seu enovelamento (*fold*ing) no espaço tridimensional. O local ou região da proteína onde o substrato natural ou o fármaco se liga é denominado sítio ativo e representa a região mais importante para o *docking*.

Para uma interação bem sucedida, a forma do ligante deve se ajustar à da cavidade ou sítio ativo da proteína (sistema “chave e fechadura” – ver Figura 3) e deve ocorrer a maximização das interações intermoleculares de forma geral, como a maximização das ligações de hidrogênio e das interações hidrofóbicas. O ligante pode atuar tanto como agonista, quando ativa a função da proteína em determinado organismo vivo, quanto como antagonista, quando inibe a função da proteína ou enzima.

Na Figura 3, a chave (denominada ligante), pode ser, por exemplo, o substrato natural de uma determinada enzima (receptor), enquanto o arame (denominado agonista) pode ser interpretado como uma molécula semelhante ao ligante (chave), que faz com que a enzima desempenhe o mesmo papel neste organismo vivo. Já o galho de árvore (denominado antagonista), está representando uma molécula que se liga ao sítio ativo do receptor, impedindo que o substrato natural (chave) ou um agonista (arame) possa se encaixar nesta proteína, fazendo com que a atividade enzimática seja inibida (RAREY et al., 1996).



Figura 3: Representação esquemática do modelo de “chave e fechadura” proposto por Emil Fischer.

Adaptado de <http://tubs.sa.utoronto.ca/newpage/topics/pandp.html>

Existem algumas visões diferentes na realização de *docking*. Enquanto no ambiente acadêmico se prioriza a utilização de métodos de *docking* de alta precisão e se estuda, tipicamente, no máximo algumas dezenas de moléculas ou ligantes por projeto, na grande indústria farmacêutica (*big pharma*) se priorizam métodos de alta velocidade, capazes de estudar milhões de compostos candidatos, porém, obviamente, comprometendo os níveis de precisão numérica.

Os métodos de *docking* se desenvolveram bastante nas últimas décadas, entretanto ainda podem ser melhorados. Uma característica importante no *docking* é que é necessário possuir a estrutura tridimensional do alvo biológico (proteína ou enzima) para viabilizar a sua realização. Assim, normalmente, a estrutura tridimensional da proteína é determinada experimentalmente por cristalografia (normalmente usando difração de Raios-X), mas esses dados ainda não são disponíveis para muitas proteínas cujas estruturas primárias e secundárias já são conhecidas atualmente. Nesses casos, quando a estrutura experimental por difração de Raios-X ainda não está disponível para a proteína (alvo) em questão, pode-se tentar gerar a estrutura da proteína usando a técnica de modelagem por homologia (BAKER; SALI, 2001) ou modelagem comparativa, utilizando-se uma outra proteína semelhante (homóloga), com estrutura tridimensional experimentalmente já determinada e conhecida.

O banco de dados *RCSB Protein data Bank* (PDB) (<http://www.pdb.org>) é o maior e mais confiável banco de dados de estruturas de proteínas (em sua maioria) e ácidos nucleicos, totalizando cerca de 79.000 depósitos. Considerando-se que destes, aproximadamente 73.000 estruturas são de proteínas, tem-se à disposição um bom repositório com informações de partida para a realização de um procedimento de *docking*. A Figura 4 abaixo exemplifica uma estrutura de proteína, uma PLA₂, extraída do banco de dados PDB.

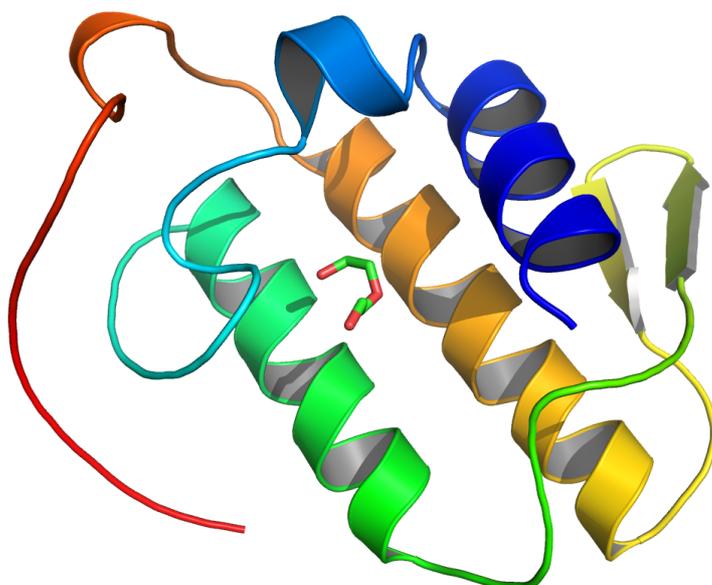


Figura 4: Estrutura cristalográfica da cadeia A da PLA₂ Bothropstoxin-I (código PDB: 2H8I), com o seu ligante co-cristalizado (polietileno glicol) em destaque.

Outra questão importante que precede a realização de um cálculo de *docking* é o conhecimento do sítio ativo da proteína. Essa determinação é geralmente realizada com a co-cristalização de um ligante (substrato natural ou fármaco comercial) na proteína seguida da determinação da posição experimental desse ligante por cristalografia. Assim, em geral considera-se o volume em torno do ligante co-cristalizado como sendo a região do sítio ativo da proteína. Quando o sítio ativo não é previamente conhecido, procedimento de *docking* é denominado de *blind docking*, ou *docking* às cegas, sem uma determinação exata do sítio ativo daquele alvo biológico. Para superar esse problema, muitos programas de *docking* possuem métodos de detecção de cavidade para determinar o sítio ativo, que normalmente é representado por uma cavidade (JONES et al., 1997; MORRIS et al., 1998).

Uma questão adicional nos procedimentos de *docking* é o fato deles considerarem a proteína rígida durante o cálculo, mesmo sabendo-se que elas possuem vários graus de liberdade conformacionais importantes, como por exemplo, os grupos laterais dos resíduos de aminoácido, ou mesmo a conformação da própria cadeia principal da proteína. Esta questão tem sido abordada atualmente por alguns programas que consideram estes graus de liberdade do receptor durante os cálculos de *docking*, para aprimorar os resultados desta técnica que têm mimetizado de maneira cada vez mais precisa o processo farmacodinâmico da interação de um fármaco com o sítio ativo de seu alvo biológico (MORRIS et al., 2009).

Entretanto, apesar destas questões levantadas aqui, os programas atuais vêm demonstrando capacidade suficiente para fornecer resultados bastante confiáveis. Elucidando as interações intermoleculares entre ligantes(fármacos) e receptores biológicos e, além disso, essas dificuldades tendem a ser superadas pelo rápido desenvolvimento dos métodos e dos computadores.

O sucesso de um programa de *docking* depende de três fatores: a representação do sistema (estrutura do ligante e do receptor), o algoritmo de procura conformacional (por exemplo, algoritmo genético ou baseado em fragmentos) e a função de pontuação (*score*, pontuação relativa para o ordenamento das soluções de *docking*), que muitas vezes representa a energia de interação de uma solução de *docking* (*pose*) para o complexo ligante-proteína.

A função de *score*, *fitness* ou pontuação indica quantitativamente a estabilidade do complexo proteína-ligante obtido a partir de uma solução de *docking*. Para se determinar o *score* de um complexo, os programas utilizam um campo de força (formalismo matemático e parâmetros implementados internamente nos programas de *docking*) muito parecido com os utilizados em métodos de mecânica molecular (mecânica clássica), normalmente constituído por uma equação de energia potencial de interação e parâmetros correspondentes (ALLEN; TILDESLEY, 1987). A equação de energia potencial é composta por um termo intramolecular que mede a estabilidade relativa da proteína e do ligante individualmente e outro termo intermolecular que mede a interação entre a proteína e o ligante. Alguns termos do potencial de interação intramolecular são o estiramento de ligação, a deformação angular e a rotação interna, cada um com uma equação correspondente. Já o potencial de interação intermolecular (U^{inter}) é composto em geral por interações de Van der Waals e eletrostáticas.

Em geral, os programas usam um formalismo matemático especial, representado através de um termo adicional, na função de *score*, para considerar as ligações de hidrogênio, devido a sua grande importância para os fenômenos biológicos. Uma ligação de hidrogênio típica é mais forte que as forças de Van der Waals, porém mais fraca que ligações covalentes ou iônicas.

Desta forma, os programas atuais de *docking* vêm sendo usados com segurança para fornecer resultados bastante confiáveis no que diz respeito ao repertório de problemas em química medicinal. Dentre os diversos programas de *docking* existentes atualmente, podemos citar, como exemplos, o GOLD (comercial e baseado em algoritmo genético) (JONES et al., 1997), FlexX (comercial e com algoritmo baseado em fragmentos) (RAREY et al., 1996), AUTODOCK (gratuito para o meio acadêmico e baseado em algoritmo genético) (MORRIS et al., 1998).

Estes programas, e outros não listados aqui, vem sendo amplamente utilizados tanto no meio acadêmico quanto na iniciativa privada (indústria farmacêutica, por exemplo) e têm sofrido avanços significativos ao longo dos últimos anos. No próximo tópico, será feita uma breve descrição dos métodos envolvidos neste programas.

2.3.2 Metodologias de Busca Conformacional

O método de procura conformacional usando o algoritmo genético (JONES et al., 1997) é aplicado também em outras áreas como biogenética, ciência da computação, engenharia, economia, química, matemática e física. Consiste numa técnica de procura usada em computação para encontrar soluções para problemas de otimização (JONES et al., 1995).

A origem do nome se deve ao fato dele pertencer a uma classe de “algoritmos de evolução” que usam técnicas inspiradas em hereditariedade, como mutação, seleção e *crossover*. Tem a vantagem de que a população de candidatos à solução de um problema evolui para soluções melhores. Neste procedimento, é designado um *score* para cada conformação do ligante (possível solução de *docking*) e assim as conformações são ordenadas (ranqueadas) e as conformações mais “adaptadas ao ambiente” sobrevivem (são selecionadas para as próximas etapas do cálculo) (JONES et al., 1995).

Desta forma, o programa faz uma procura no espaço conformacional definido para o *docking*, onde esse espaço representa as possíveis orientações e conformações do ligante complexado à proteína. O algoritmo genético obtém novas

posições para o ligante que são sucessivamente mais e mais prováveis de representarem interações intermoleculares favoráveis com a proteína (JONES et al., 1995).

A terminologia usada, por exemplo, no algoritmo genético do programa GOLD é representada a seguir: (i) gene: critérios geométricos como distâncias e ângulos; (ii) cromossomo: conformação do ligante (indivíduo da população); (iii) migração: operador genético que realiza a migração de um cromossomo; (iv) mutação: operador genético que altera o valor de um gene aleatoriamente (randomicamente); (v) *crossover* ou recombinação: operador genético que troca genes entre dois cromossomos (JONES et al., 1995).

Na busca feita no espaço conformacional pelo programa GOLD, cada cromossomo é definido por uma translação (posição do centro de massa do ligante no espaço tridimensional), orientação (coordenadas esféricas) e graus de liberdade internos (rotação dos ângulos diédricos de ligações livres). Uma interpretação esquemática simples do algoritmo genético implementado no programa GOLD está representado na Figura 5.

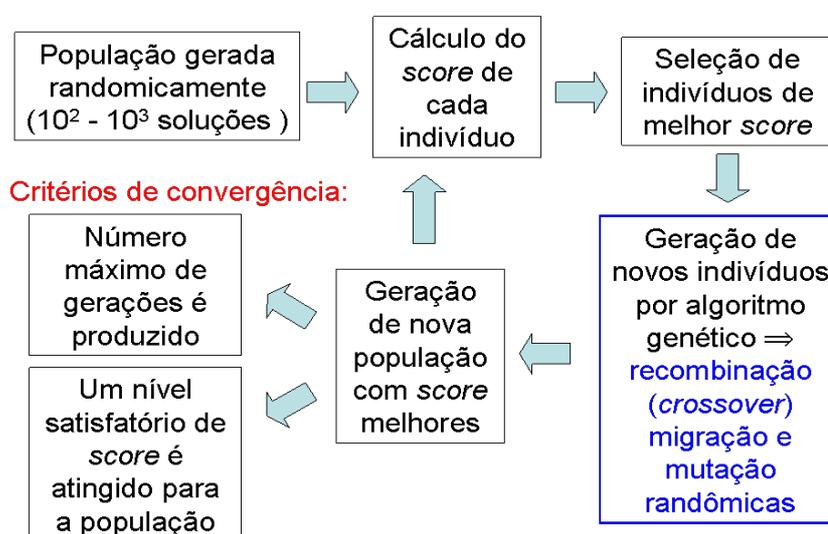


Figura 5: Interpretação esquemática do algoritmo genético implementado no Programa GOLD.

O AUTODOCK também se baseia em algoritmo genético, usando as operações de *crossover* e mutação, mas o combina com um método de minimização de energia baseado em procura local. Sua função de *score* é baseada no campo de força AMBER, enquanto o GOLD usa um campo de força próprio, por exemplo. É importante ressaltar que as versões mais recentes do GOLD e do AUTODOCK são dotadas de um grande diferencial, que consiste em levar em conta os graus de liberdade dos grupos laterais dos resíduos de aminoácido do sítio ativo durante a realização do procedimento de *docking* (MORRIS et al., 1998).

Em contrapartida aos métodos baseados em algoritmo genético, o método de procura conformacional baseado em fragmentos (RAREY et al., 1996), é um método determinístico (de causa e efeito, ou seja, o estado ou etapa posterior é determinado pelo anterior). Ele funciona através da divisão do ligante em fragmentos (grupos funcionais, tipicamente), fazendo o *docking* dos fragmentos e, em seguida, a junção desses fragmentos para reconstituir o ligante intacto no final (RAREY et al., 1996).

No FlexX, a decisão de como separar os grupos funcionais importantes do ligante é interna e automática. Inicialmente, o programa escolhe um fragmento de base que contém as interações predominantes com a proteína. O fragmento de base é posicionado no sítio ativo independentemente do resto do ligante e é alinhado para otimizar o número de interações favoráveis tipo ligação de hidrogênio e hidrofóbicas. Então, o fragmento de base é considerado rígido e três sítios do fragmento são mapeados em três sítios do receptor. As sobreposições são removidas e a energia é calculada.

O ligante é construído por incremento, onde cada novo fragmento é adicionado em todas as possíveis posições e conformações. O ligante é mantido flexível através dos graus de liberdade torcionais (rotações de ligações, principalmente). As sobreposições intra e intermoleculares são removidas e as posições geradas são colocadas num ordenamento (*ranking*), das quais as melhores soluções são sujeitas a um protocolo de agrupamento (*cluster*). A melhor solução de *docking* no ranking de cada cluster é usada na próxima interação (RAREY et al., 1996).

Esse processo é repetido até um ligante completo ser construído, e depois é atribuída uma pontuação (*score*) às estruturas finais através de um campo de força. Os programas que usam esse método de procura conformacional, como o FlexX, são bastante rápidos quando comparados aos programas que usam outros métodos, como os baseados em algoritmo genético (RAREY et al., 1996).

2.4 Métodos de Comparação

Existe um grande número de programas de *docking* com algoritmos distintos de procura conformacional e com diferentes formas de calcular a função de *score* e nem sempre é uma tarefa muito fácil escolher qual usar para cada caso de estudo. Para testar a eficiência de um método computacional, pode-se sempre comparar seus resultados com valores experimentais de atividade ou potência biológicas, por exemplo.

Assim, para testar um programa de *docking*, pode-se realizar o re-*docking* de um ligante co-cristalizado e/ou o *cross-docking*. O re-*docking* significa realizar o *docking* para o ligante co-cristalizado da proteína e comparar o resultado com a sua posição cristalográfica original no sítio ativo. Já o termo *cross-docking* significa realizar um *docking* cruzado entre um ligante e outros alvos que não sejam a estrutura original de onde ele foi extraído.

Uma outra opção para avaliar a metodologia, seria observar a relação entre o *score* obtido pelo programa com o resultado de *binding* em enzima isolada. O *binding* é uma medida experimental de afinidade de ligação, com foco principalmente nas interações entre proteínas e ligantes candidatos a fármacos (LIU, T. et al., 2007). É também importante analisar a demanda computacional gerada por cada programa. Estes procedimentos normalmente norteiam a seleção dos modelos de *docking*, pois fornecem argumentos quantitativos para a escolha de um determinado programa e de seus parâmetros internos de ajuste (*setup*) para o cálculo.

As formas de comparação e análise (quantitativa e qualitativa) dos métodos *in silico*, particularmente dos métodos de *docking*, tem evoluído rapidamente, a exemplos dos novos trabalhos que tem aparecido recentemente na literatura.

Li et al. descreveram uma nova estratégia, combinando ferramentas como *docking* Múltiplo e Impressão Digital de Afinidade, para detectar relações funcionais

entre as proteínas, baseando-se nas características de ligação do substrato e na matriz de interação ligante-proteína. Aplicaram-na, com sucesso, para a família das fosfolipases A₂, para investigar a interação proteína-ligante, classificação de proteínas com base em suas funções e seleção de inibidores. Os Dados de ligação (“*binding*”) foram gerados a partir do *docking* Múltiplo entre 12 PLAs (códigos PDB: 1MF4, 1SV3, 1CJY, 1OXL, 1SV9, 1AE7, 1POC, 5P2P, 1KVO, 1DB4, 1BP2, 1G4I) e 84 inibidores de PLA (LI et al., 2009).

Um estudo (BISSANTZ et al., 2000) avaliou os programas DOCK (gratuito para academia e com algoritmo baseado em fragmentos), FlexX (commercial e com algoritmo baseado em fragmentos) e GOLD (commercial e baseado em algoritmo genético) em combinação com sete funções de score diferentes. Duas proteínas alvo foram selecionadas (timidina quinase e receptor de estrogênio) junto com dois bancos de dados com 990 ligantes e mais 10 ligantes verdadeiros (ligantes com atividade biológica comprovada) em cada. O programa GOLD apresentou as melhores soluções de RMSD, raiz quadrada do desvio médio quadrático (Root Mean Square Deviation), e o melhor ranking dos ligantes tanto para a timidina quinase quanto para o receptor de estrogênio dentre todas as outras combinações de programas de *docking* e funções de score.

Para realizar uma comparação sistemática dessas metodologias distintas, utilizando um grupo de milhares de moléculas é indicado a utilização de modelos estatísticos, a abordagem mais utilizada e também recomendada para padronização das comparações é utilizando as curvas ROC (JAIN, AJAY N; NICHOLLS, 2008). Outras metodologias também são reportadas como a utilização do fator de enriquecimento (GRAAF, DE; ROGNAN, DIDIER, 2008) ou até a utilização de metodologias próprias como exemplo a SSLR, “sum of the sum of log rank” (HEVENER et al., 2009).

Porém todas essas métricas são projetadas para analisar conjuntos que possuem resultados experimentais. Na análise de um grupo específico sem dados experimentais, como é o caso das PLA₂s torna-se necessário lançar mão de outros métodos de comparação, como os que serão apresentados na seção de metodologia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste projeto é avaliar diversas metodologias de *docking* molecular, de maneira comparativa, em alvos biológicos conhecidos de venenos de serpentes, particularmente as fosfolipases tipo A₂ (PLA₂s), tentando, desta maneira, elucidar os mecanismos de interação intermolecular dos potenciais inibidores, com propriedades antiofídicas.

- Construção de um banco de dados com os alvos (PLA₂s) e ligantes (potenciais inibidores) selecionados para o estudo;
- Escolha dos programas/metodologias para realizar os cálculos de *docking* molecular;
- Avaliar, através da análise comparativa dos resultados de *docking*, os programas/metodologias para a realização destes ensaios *in silico*, baseado tanto no que diz respeito à performance ou desempenho computacional, quanto à precisão e preditividade dos resultados obtidos nos modelos teóricos.
- Analisar detalhadamente o melhor resultado de *docking* para cada programa, destacando as interações que justificam o resultado encontrado.

4 METODOLOGIA

4.1 Banco de Dados

Os ligantes (candidatos a inibidores de PLA₂s) utilizados neste estudo são provenientes de produtos naturais ou derivados sintéticos, identificados na literatura como o estado da arte atual para a quimioterapia antiofídica. Por outro lado, os alvos farmacológicos selecionados são PLA₂s pertencentes a família *Viperidae* (víboras), dos reptéis escamados da subordem serpentes.

Após uma varredura na literatura e nos bancos de dados, foram selecionadas para o *docking* molecular (ligante-proteína), 10 estruturas tridimensionais de PLA₂s já conhecidas, disponíveis no banco de dados pdb, na tabela 1 é possível ver as estruturas selecionadas.

Para levar em conta a pluralidade das possibilidades de cálculo, o alvo Crotoxin B(PDB: 2QOG) foi considerado de 3 formas distintas, i) Cadeia B sem o íon cálcio (Ca²⁺) e sem moléculas de água; ii) Cadeia B com o íon cálcio (Ca²⁺) e sem moléculas de água; iii) Cadeia B com o íon cálcio (Ca²⁺) e a molécula de água número 188, que participa diretamente do poliedro de coordenação do Ca²⁺.

Os ligantes selecionados totalizam 103 moléculas orgânicas, de pequeno e médio portes. Algumas moléculas aparecem com duas ou três estruturas, pois tiveram que ser duplicadas ou triplicadas, chegando ao número total de 119 estruturas para cálculo, uma vez que não foi possível achar um consenso na literatura a respeito da estrutura exata.

Decidimos por este procedimento com o intuito de mostrar que erros voluntários ou involuntários na estrutura química das moléculas podem levar a resultados de *score* e *pose* significativamente diferentes. Uma vez que o resultado de *docking* pode mudar, dependendo do tipo de alteração estrutural que é feita na molécula do ligante. Na tabela 2 é possível observar os ligantes selecionados para o estudo de *docking* molecular.

O banco de dados foi criado utilizando o programa Microsoft Access 2007, onde as estruturas das moléculas selecionadas foram extraídas principalmente de duas fontes: i) a tese de doutorado de Hage-Melim (HAGE-MELIM, 2009) e, ii) de um artigo sobre produtos naturais marinhos que tem as PLA₂s como alvo (FOLMER et al., 2010). Nessas referências, é possível encontrar informações tanto sobre os inibidores, quanto sobre as estruturas das moléculas. As estruturas tridimensionais também foram confirmadas, quando possível, nos bancos de dados de moléculas PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) e ChemSpider (<http://www.chemspider.com>). Quando não foi possível encontrar as estruturas foi necessário construir a molécula manualmente.

Tabela 1: Alvos selecionados para o estudo de *docking* molecular.

Alvos	Origem	Código	Resolução (Å)	Data Deposito	Ultima Modificação	Referências
Bothropstoxin-I	Bothrops jararacussu	2H8I	1,9	07/06/2006	13/07/2011	(MURAKAMI et al., 2007)
Bothropstoxin-I	Bothrops jararacussu	3I03	1,48	24/06/2009	30/11/2011	(FERNANDES, C. A. H. et al., 2010)
Bothropstoxin-II	Bothrops jararacussu	2OQD	2,19	31/01/2007	24/02/2009	(CORRÊA et al., 2008)
Piratoxin-III	Bothrops pirajai	1GMZ	2,40	27/09/2001	24/02/2009	(RIGDEN et al., 2003)
Crotoxin B	Crotalus durissus terrificus	2QOG	2,28	20/07/2007	24/02/2009	(MARCHI-SALVADOR et al., 2008)
Piratoxin-I	Bothrops pirajai	2Q2J	1,65	28/05/2007	22/09/2009	(SANTOS, DOS et al., 2009)
Piratoxin-I	Bothrops pirajai	2OK9	2,34	16/01/2007	27/10/2009	(MARCHI-SALVADOR et al., 2009)
Piratoxin-II	Bothrops pirajai	1QLL	2,04	01/09/1999	24/02/2009	(LEE, W.-H. et al., 2001)
Bn IV	Bothrops neuwiedi	3MLM	2,21	17/04/2010	17/04/2010	(DELATORRE et al., 2011)
Myotoxin II	Bothrops moojeni	1XXS	1,80	08/11/2004	24/02/2009	(WATANABE et al., 2005)

Os modelos de geometria para os ligantes usados neste trabalho foram obtidos através da aplicação do método semi-empírico RM1 (ROCHA, G. B. et al., 2006), disponível como parte do pacote de programas Spartan 08' ("Spartan '08 Tutorial and User's Guide," 2008), usando padrões internos para os critérios de convergência. Após a otimização da geometria dos ligantes, foi necessário efetuar uma correção manual dos tipos de átomos para o formato de arquivo MOL2, adotado por quatro dos seis programas de *docking* utilizados nesse estudo.

Com o intuito de aumentar a capacidade comparativa dos resultados de *docking*, foi realizado um alinhamento prévio das estruturas dos alvos, facilitando a definição do sítio ativo de forma uniforme para todos os cálculos, como também a comparação dos resultados. A estrutura da PrTX-I, código 2OK9, foi utilizada como referência.

Foram selecionados para serem avaliados comparativamente, diversos programas de *docking* molecular (ligante-proteína) que se baseiam, inclusive em diferentes abordagens metodológicas: *i*) programa GOLD (JONES et al., 1997), baseado em algoritmo genético; *ii*) programa SURFLEX-DOCK (JAIN, AJAY N, 2003), baseado no método de protomol; *iii*) programa DOCK (KUNTZ, 1982), baseado em um algoritmo incremental; *iv*) programa AUTODOCK (MORRIS et al., 1998), baseado em algoritmo genético; *v*) programa AUTODOCK VINA (TROTT; OLSON, 2010), baseado em algoritmo genético; *vi*) programa PLANTS (KORB et al., 2006), baseado no algoritmo de otimização de colônia de formigas.

É importante ressaltar que a combinação do *docking* dos 119 ligantes nos 12 alvos, usando os 6 programas escolhidos, totaliza $119 \times 12 \times 6 = 8568$ cálculos de *docking*.

Como os programas utilizam metodologias diferentes e utilizam funções de pontuação (score) distintas, é necessário descrever alguns detalhes dos mesmos.

Tabela 2: Ligantes selecionados para o estudo de *docking* molecular.

Ligantes	Ligantes
1. Ácido 2-hidroxi-4-metoxi Benzóico	2. Harpalicina I
3. Ácido Aristoloquico 1	4. Harpalicina II
5. Ácido Aristoloquico 2	6. Heparina
7. Ácido Betulinico	8. Hesperidina
9. Ácido Cafeico	10. Ilimaquinona
11. Ácido Clorogênico	12. Indometacina
13. Ácido Elágico	14. Iridina
15. Ácido Ginêmico 1	16. IsoQuercitrina
17. Ácido Ginêmico 2	18. <i>Luffariellin A</i>
19. Ácido Rosmarínico	20. <i>Luffariellin B</i>
21. Alfa-Tocoferol / Vitamina E	22. <i>Luffariellin C</i>
23. Amirina	24. <i>Luffariellin D</i>
25. Anisodamina	26. <i>Luffariellolide</i>
27. Apigenina	28. <i>Luffolide</i>
29. <i>Aplyolide</i>	30. <i>Lupeol</i>
31. <i>Aplyroseol 1</i>	32. Luteolina
33. Ar-Tumerona	34. <i>Manoalide</i>
35. Atropina	36. <i>MMHDA</i>
37. <i>Avarol</i>	38. Nerolidilcatecol
39. <i>Avarone</i>	40. <i>Norrisolide</i>
41. Benzoilsalireposideo	42. <i>Palauolide</i>
43. Bergapteno	44. <i>Palauolol</i>
45. Betulina	46. <i>Palinurin</i>
47. Bolinaquinona	48. pBPB (brometo de p-bromofenacil)
49. Bredemeiosida	50. <i>Petrosaspongiolide M</i>
51. Cabenegrina A-1	52. Primetina
53. Cabenegrina A-2	54. Quercetina
55. Canferol	56. Quercitrina
57. <i>Caulerpyne</i>	58. Resveratrol
59. Cinarina	60. <i>Rhipocephalin</i>
61. <i>Cladocorans A</i>	62. Rutina
63. <i>Cladocorans B</i>	64. Salireposide
65. <i>Clerodane</i>	66. <i>Scalaradial</i>
67. Clopromazina	68. <i>Schumaniofoside</i>
69. Colesterol	70. <i>Secomanoalide</i>
71. Cumarina	72. Sitosterol
73. Cumestrol	74. <i>Spongidine A</i>
75. <i>Cyclocymopol</i>	76. <i>Spongidine B</i>
77. <i>Cyclolinteinone</i>	78. <i>Spongidine C</i>
79. <i>Cymopol</i>	80. <i>Spongidine D</i>
81. Dehidrofalcarinol	82. Suramina
83. <i>Dendrillolide A</i>	84. Tetoridina
85. <i>Deoxymanoalide</i>	86. <i>Variabilin</i>
87. <i>Deoxysecomanoalide</i>	88. <i>Vidalol A</i>
89. <i>Dysidine</i>	90. <i>Vidalol B</i>
91. Edunol	92. Wedelolactona
93. Epitaondiol	94. Wedelolactona Análogo A
95. Eretianona	96. Wedelolactona Análogo B
97. Estigmasterol	98. Wedelolactona Análogo C

99. Falcarindiol	100. Wedelolactona Análogo D
101. Friedelina	102. Wedelolactona Análogo E
103. <i>Gracilin A</i>	

4.2 Programas/Metodologias

De maneira geral, a execução dos cálculos *docking* e a análise comparativa desses resultados foi realizada conforme o fluxograma da figura 6. Onde foi realizada uma preparação dos ligantes e alvos retirados do banco de dados. Em seguida, foram realizados os cálculos de *docking* para cada um dos seis programas selecionados. Os resultados obtidos com os programas foram submetidos a uma análise unificada das interações intermoleculares e, posteriormente, a uma análise estatística multivariada.

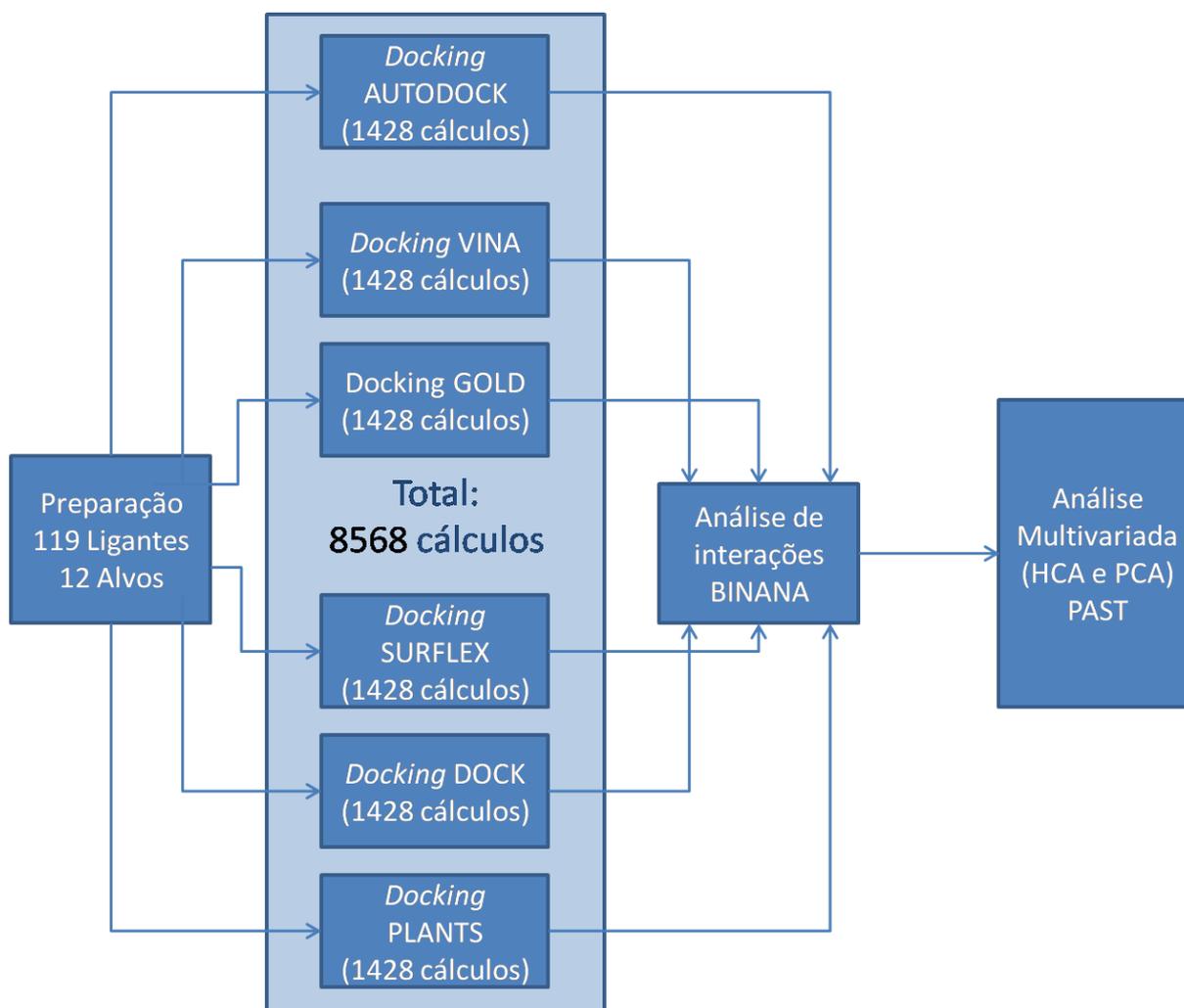


Figura 6: Fluxograma geral dos cálculos e análises realizadas.

Para descrever as metodologias aplicadas nos programas de *docking* serão utilizados termos específicos que precisam ser bem definidos:

- Pose é nome dado a cada solução de *docking*, depois do calculo são gerados vários poses de *docking* com diferentes valores de *scores*.
- *Score*, função de *score* ou função de pontuação, é um valor atribuído a um resultado de *docking* (pose) que representa a força de interação entre o complexo. Quando esse score apresentando em energia, quanto menor a energia mais estável é o complexo. Mas ele pode ser atribuído também de forma adimensional, e geralmente quanto maior for esse valor, maior é a interação do complexo.

4.2.1 GOLD

O algoritmo genético (GA) é um dos algoritmos de busca e otimização mais utilizados em programas de *docking*. Consiste numa técnica de procura, usada amplamente em computação, para encontrar soluções para problemas de otimização. A origem do nome se deve ao fato dele pertencer a uma classe de “algoritmos de evolução” que usam técnicas inspiradas em hereditariedade, como mutação, seleção e *crossover*. É baseado na teoria da seleção natural (WHITLEY, DARRELL, 1994).

Tem a vantagem de que a população de candidatos à solução de um problema evolui para soluções melhores. Neste procedimento, é designado um *score* (pontuação) para cada *pose* (posição e conformação do ligante, através de uma solução de *docking*) e assim os resultados são ordenadas (ranqueadas) e os *poses* mais “adaptados ao ambiente” sobrevivem (são selecionados para as próximas etapas do cálculo).

Desta forma, o programa faz uma procura no espaço conformacional definido para o *docking*, onde esse espaço representa as possíveis orientações e conformações do ligante complexado à proteína. O GA gera novas posições para o ligante que são sucessivamente mais e mais prováveis de representarem interações intermoleculares favoráveis com a proteína alvo.

Qualquer solução para um problema de *docking* requer uma poderosa metodologia de busca conformacional, como também um bom entendimento dos processos de reconhecimento molecular, para elaborar funções de pontuação (*score*) que possam prever os modos de ligação (JONES et al., 1997) ligante-alvo de maneira precisa e robusta.

O GA é utilizado em três dos programas selecionados para esse estudo (AUTODOCK, AUTODOCK VINA e GOLD). É importante entender as variações na aplicação dos algoritmos genéticos, assim como dos outros algoritmos utilizados, para melhor compreender o funcionamento de cada programa.

Um deles é o GOLD (“Genetic Optimisation for Ligand Docking”). Ele utiliza o GA para explorar todas as flexibilidades conformacionais do ligante, e flexibilidade parcial da proteína. Vários melhoramentos e modificações foram aplicadas à técnica original, resultando em um aumento substancial na confiabilidade e na aplicabilidade do algoritmo (JONES et al., 1997).

O GA é um algoritmo que mimetiza o processo evolucionário, manipulando uma coleção de dados estruturais chamados de cromossomos. Cada um deles codifica uma possível solução de *docking*, ou seja, nele estão contidas as informações de uma possível interação entre o ligante e o receptor. A estes

cromossomos pode ser atribuído uma pontuação (*score*) baseado na força de ligação do complexo ligante receptor (JONES et al., 1995).

Iniciado por uma população de cromossomos gerados randomicamente, o GA aplica repetidamente dois operadores genéticos (*crossover* e *mutação*), resultando em cromossomos que irão substituir os membros menos adaptados da população. O *crossover* combina cromossomos, enquanto que a *mutação* introduz perturbações randômicas. Ambos necessitam de cromossomos “pais”, selecionados de forma randômica da população existente, com um viés para os mais aptos, dessa forma introduzindo uma pressão evolutiva no algoritmo (JONES et al., 1995).

Essa seleção é conhecida como “seleção em roleta” (*roulette-wheel-selection*), já que o procedimento é análogo a rodar uma roleta, em que cada membro da população tem uma fatia da roleta proporcional ao seu *score*. Esta ênfase na sobrevivência do mais adaptado, garante que, ao longo do tempo, a população se desloque para uma solução ótima (JONES et al., 1995).

O GA utiliza uma nova representação do processo de *docking*. Cada cromossomo codifica uma conformação do ligante e do sítio ativo da proteína, também inclui um mapeamento dos sítios de ligação de hidrogênio do ligante para os sítios da proteína. Decodificando o cromossomo, um processo de ajuste de mínimos quadrados é aplicado para posicionar o ligante no sítio ativo da proteína de uma maneira que a maior quantidade de ligações de hidrogênio seja formada. A pontuação de um cromossomo é a combinação entre força e quantidade de ligações de hidrogênio que foram formadas nessa conformação, e também da energia de van der Waals do complexo formado (JONES et al., 1995).

A análise da proteína tem início com um procedimento chamado *flood-fill* (HO; MARSHALL, 1990), para determinar a acessibilidade dos solventes ao átomos do sítio ativo da proteína. Doadores e aceitadores de ligação de hidrogênio (HB) acessíveis são identificados utilizando os tipos de átomos do SYBYL (CLARK; CRAMER; OPDENBOSCH, VAN, 1989a). Pares de elétrons desemparelhados são adicionados a aceitadores de HB a uma distância de 1,0 Å. Qualquer ligação simples que conecta um doador na posição terminal ou um aceitador à proteína, é selecionada com rotacionável. Esta escolha de ligações rotacionáveis com a proteína, permite que aceitadores e doadores de HB no sítio ativo rotacionem seus pares de elétrons e átomos de hidrogênio na melhor opção para formar ligações de hidrogênio com o ligante. Nas versões mais recentes do GOLD a rotação também foi estendida para alguns resíduos de aminoácidos das cadeias laterais das proteínas (JONES et al., 1995).

Cada cromossomo no GA é composto por quatro strings, sendo dois binários e dois inteiros. A informação conformacional codificada por dois strings é baseada no código binário (JONES et al., 1997). Um para a proteína e outro para o ligante, onde cada byte da string codifica um ângulo de rotação de uma ligação rotacionável. Os dois strings inteiros codificam mapas, sugerindo possíveis ligações de hidrogênio entre o ligante e o sítio ativo da proteína. A primeira string de inteiros codifica pares de elétrons do ligante para os átomos de hidrogênio da proteína, cada posição da string está relacionada a um par de elétrons do ligante. Então se na posição 1 tem o valor 21, isso quer dizer que o primeiro par isolado do ligante está relacionado ao 21º átomo de hidrogênio do sítio ativo, caso alguma posição seja zero, isso indica que o par isolado não está relacionado a nenhum átomo de hidrogênio. Já a segunda string de inteiros mapeia os átomos de hidrogênio do ligante aos pares isolados da proteína.

Esses mapas sugerem HB entre o ligante e a proteína. Decodificando o cromossomo, o GA usa uma rotina de mínimos quadrados na tentativa de formar a maior quantidade de ligações de hidrogênio possíveis, dessa forma atingindo um maior valor de *score* (JONES et al., 1995).

A função de pontuação padrão do programa GOLD é a GOLDScore (GOLD 5.0.1, versão utilizada neste trabalho). Ela reserva um parâmetro específico para tratar a energia de ligação de hidrogênio, "H_Bond_Energy". Isso devido a grande importância das ligações de hidrogênio na estabilidade do complexo ligante-receptor. Outro termo calculado é o "Complex_Energy", é obtida pela energia de interação entre a proteína e o ligante. A energia intramolecular do ligante é representada pelo termo "Internal_Energy", é calculada por equações de mecânica molecular. Esses termos compõem a energia final de *score* (JONES et al., 1997).

O termo "H_Bond_Energy", é a soma de energia de todas as ligações de hidrogênio individualmente, podendo essas ligações serem caracterizadas pela presença de um doador de hidrogênio na proteína e um aceitador no ligante ou de um aceitador no receptor e um doador no ligante.

Ao invés de manipular uma grande população de cromossomos, um ambiente distribuído conhecido como o modelo de ilhas foi aplicado. Isso envolve várias subpopulações e migrações entre cromossomos individuais entre as subpopulações (STARKWEATHER et al., 1991). O modelo de ilha e o operador de migração foi implementado com descrito por JONES (JONES et al., 1995).

O modelo de ilha não torna o GA mais efetivo, ou seja, não melhorou o resultado final da busca, mas diminuiu o tempo para efetuar o cálculo, tornando a busca mais eficiente. O GA faz uso de três operadores genéticos: crossover, mutação e migração. Os operadores são escolhidos utilizando a seleção por roleta, baseado no peso dos operadores. Esses pesos foram escolhidos para que a mutação e o crossover fossem aplicados com a mesma probabilidade e a migração fosse aplicada em 5% do tempo. Depois da aplicação de 100.000 operações genéticas o algoritmo finaliza fornecendo a posição de *docking* de maior *score* (JONES et al., 1997).

Várias extensões foram feitas ao algoritmo básico descrito inicialmente para tornar o programa capaz de prever o modo de ligação de uma ampla variedade de complexos ligante-proteína.

É observado um grande número de interações ligante-proteína envolvendo coordenação de íons metálicos. Dessa forma foi incorporado ao programa GOLD a geometria de coordenação e energias desses íons metálicos. O que permite o *docking* de ligantes em proteínas contendo íons de Mg, Mn, Zn, Fe ou Ca. Esses íons são observados em estruturas cristalográficas de proteínas coordenando átomos eletronegativos predominantemente na geometria tetraédrica ou octaédrica (GLUSKER, 1991; JONES et al., 1997).

Se um ligante possui menos de três doadores de átomos de hidrogênio e aceitadores, então o *docking* por ajustes de mínimos quadrados não será possível. Além disso o *docking* pode não ser confiável se o ligante possui um pequeno número de grupos polares, especialmente porque alguns desses átomos podem estar solvatados na realidade. Assim, o GOLD utiliza uma codificação alternativa para ligantes de *docking* com menos de cinco doadores e aceitadores (JONES et al., 1997).

Uma opção muito importante, disponível no programa GOLD, é a possibilidade de ligar os inibidores de forma covalente. O programa não é capaz de identificar se a ligação é de caráter covalente ou não. Mas permite que o usuário

informe os átomos da proteína e do ligante que serão unidos pela ligação covalente. Ou seja, o tratamento é feito de forma restritiva, impondo a condição que o átomo da proteína está ligado de forma covalente com o átomo do ligante.

Isso é possível identificando o átomo da proteína que se ligaria ao ligante. Esse átomo precisa ser incluído no arquivo de entrada do ligante, apropriadamente ligado ao resto do ligante. No *docking* a rotina de ajuste dos mínimos quadrados foi modificada para garantir que o átomo da proteína no arquivo do ligante seja sobreposto ao seu átomo equivalente no sítio ativo da proteína (JONES et al., 1997).

4.2.2 AUTODOCK

Um outro programa que também utiliza o GA é o AUTODOCK, a versão do programa selecionada para realizar esse estudo foi a mais atual, versão 4.2. A metodologia aplicada pelo programa AUTODOCK combina um campo de força empírico de energia livre, com um algoritmo denominado algoritmo genético lamarckiano, fornecendo uma rápida predição das conformações de ligação, atribuindo um valor de energia livre ao complexo ligante-receptor (MORRIS et al., 2009).

Para permitir a busca no espaço conformacional, disponível para o ligante ao redor da proteína, o AUTODOCK utiliza um método baseado em grade, que permite uma avaliação rápida da energia de ligação das conformações. Nesse método, as proteínas são incorporadas, e em seguida uma sonda (átomo virtual) é sequencialmente colocada em cada ponto da grade tridimensional definida para a região de busca conformacional, preferencialmente centrada no sítio ativo conhecido. A energia de interação entre a sonda e o alvo é computada, e o valor é armazenado. Esses valores de energias da grade tridimensional podem ser usados como uma tabela de pesquisa durante a simulação de *docking* (MORRIS et al., 2009).

O método de busca utilizado como padrão, desde a versão 3.0 até a versão mais atual, é baseado na junção entre o GA e o método adaptativo de busca local. Ele é chamado de Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), que aumenta a performance do programa em relação aos métodos aplicados anteriormente, *Simulated Annealing* e o GA tradicional, fazendo com que o programa execute em menor tempo (MORRIS et al., 1998).

O LGA faz alusão a teoria de Jean Batiste de Lamarck, que afirmava que as características fenotípicas adquiridas durante a vida pudessem ser transmitidas hereditariamente. As questões mais importantes que surgem na técnica LGA, híbrida entre busca local aliada ao GA, giram em torno do mapeamento de desenvolvimento, que transforma uma representação genotípica em fenotípica. O espaço genotípico é definido em termos de operadores genéticos, mutação e crossover. Onde os pais de uma geração são perturbados para formar seus filhos. Já o espaço fenotípico é definido diretamente pelo problema, ou seja, a função de energia que está sendo otimizada. O operador de busca local é uma extensão útil da otimização do GA global, quando a função de energia apresenta características locais suaves e é possível explorá-la utilizando a busca local (MORRIS et al., 1998).

No LGA, a mutação genotípica desempenha um papel de certa forma diferente dos GA tradicionais. Geralmente a mutação desempenha um papel de operador de busca local, permitindo ajustes finos que não são eficientemente feitos pelo *crossover* nem pela seleção de indivíduos. Com um operador explícito de busca

local, entretanto, esse papel se torna desnecessário, assumindo assim um papel mais exploratório (MORRIS et al., 1998).

O AUTODOCK 4 utiliza um campo de força semi-empírico de energia livre, para prever a energia livre de ligação de pequenas moléculas em relação a alvos macromoleculares. O campo de força é baseado em um modelo termodinâmico abrangente que permite a incorporação de termos intramoleculares na energia livre de ligação predita. Isto é realizado através de avaliações de energia para ambos os estados, moléculas isoladas ou complexadas. Ele também incorpora um novo método de dessolvatação, baseado em cargas, que utiliza um conjunto típico de átomos e cargas (MORRIS et al., 2009) para as moléculas.

Ele também permite a modelagem completamente flexível de resíduos específicos da proteína, de maneira similar ao ligante. O usuário seleciona cadeias laterais específicas que são anotadas na proteína. Durante a simulação, elas são tratadas de forma explícita, permitindo uma rotação através dos graus de liberdade, utilizando os mesmos métodos usados para explorar o espaço conformacional do ligante flexível. A parte restante da proteína é representada utilizando a grade de afinidade já descrita (MORRIS et al., 2009), ou seja, a grade tridimensional com os valores de energia pré-determinados pela sonda atômica virtual.

É possível realizar, assim como no GOLD, um *docking* covalente no AUTODOCK. Não se trata de um opção disponível no programa, como é no GOLD, mas de metodologia proposta por Morris e colaboradores, que desenvolveram duas estratégias para realizar essa tarefa. Uma abordagem baseada em grade e outra baseada na modificação da cadeia lateral flexível, onde o segundo método apresentou melhores resultados em testes realizados entre as duas metodologias (MORRIS et al., 2009).

O AUTODOCK não possui valores de carga para metais, mas permite ao usuário ajustar manualmente suas cargas, desta forma, levando em consideração a presença de átomos metálicos durante o cálculo de *docking*.

4.2.3 AUTODOCK VINA

O último programa da lista, que também utiliza o GA, é AUTODOCK VINA (VINA). Ele possibilita um ganho na velocidade baseado no paralelismo, utilizando *multithreading* em máquinas multicore. No VINA, a grade de mapas é calculada de forma automática, sem a necessidade de interferência por parte do usuário. A função de pontuação implementada no VINA foi inspirada principalmente na função de *score* X-SCORE (WANG, R. et al., 2002).

A função implementada no programa VINA leva em consideração as contribuições intra e intermoleculares, enquanto a função X-SCORE considera apenas as contribuições intermoleculares. A função de pontuação aplicada no VINA, também combina certas vantagens de potenciais baseados em conhecimento (“knowledge”) a funções de *score* empíricas. A informação empírica é extraída tanto da preferência conformacional do complexo ligante-receptor, quanto das medidas experimentais de afinidade. Os metais são tratados como potenciais doadores de hidrogênio, assim como é descrito na função X-SCORE (TROTT; OLSON, 2010).

4.2.4 DOCK

O quarto programa utilizado nesse trabalho é um dos mais antigos programas de *docking*, conhecido como DOCK. Foi utilizado neste estudo a versão 6.5, a mais atual. No artigo da versão 6 é possível ver importantes extensões presentes na versão utilizada. Ele apresenta diversas novas funcionalidades: DOCK 3.5 score, score de solvatação Poisson-Boltzmann com área de superfície com acessibilidade ao solvente(PB/SA), campo de força AMBER de mecânica molecular com função de solvatação GB/SA e opcionalmente flexibilizar o receptor (LANG et al., 2009). Os cálculos foram realizados utilizando a função de pontuação GRID score.

O programa DOCK é composto por diversos subprogramas. A busca pela orientação no espaço é guiada por descritores geométricos, tipo esferas ou átomos que funcionam como peças situadas na superfície do ligante, capazes de encaixar em locais específicos na superfície do receptor. O objetivo é encontrar orientações capazes de mapear todos esses encaixes. Com base na molécula a ser realizado o estudo de *docking*, é feita uma busca por um conjunto de esferas que respeitem um critério de distâncias.

As esferas que passam no critério de distância são usadas para definir as matrizes de rotação e translação das moléculas. A configuração do ligante no receptor depende da localização desse conjunto de esferas na superfície das respectivas moléculas. Uma orientação, uma vez encontrada, é usada para uma avaliação preliminar de complementariedade, baseada em uma simples avaliação dos contatos atômicos entre o receptor e o ligante, é atribuído um valor de *score*. As configurações com boas energias de contato e que passam no filtro de volume, são guardadas para avaliações futuras (SHOICHET et al., 1992).

O DOCK utiliza um algoritmo chamado de *anchor-and-grow*(ancora e cresce), para construir ligantes de maneira flexível no sítio ativo de alvos biomoleculares. Nesse algoritmo a porção rígida mais larga é identificada e orientada no sítio ativo. As porções flexíveis do ligante, são em seguida ligadas a parte que está ancorada, é feito um cluster a cada camada de crescimento para maximizar a diversidade geométrica, até a molécula ser completamente formada. No procedimento de geração de amostras, a cada camada, elas são avaliadas pela sua energia de interação de van der Waals e ranqueadas, as que obtiverem melhor classificação vão formar a camada seguinte (LANG et al., 2009).

4.2.5 SURFLEX

O SURFLEX é uma metodologia de *docking* que combina a função empírica de *score* Hammerhead (JAIN, AJAY N., 1996) com um método de similaridade molecular (similaridade morfológica) (JAIN, A N., 2000), para gerar poses de fragmentos dos ligantes. Ele implementa uma abordagem de busca de construção incremental, assim como Hammerhead (WELCH, WILLIAM et al., 1996), mas também implementa uma nova metodologia de junção de fragmentos que é mais rápida e precisa. Esse novo método de junção de fragmentos é vagamente relacionado a abordagens de GA, mas é uma abordagem determinística (JAIN, AJAY N., 2003).

O SURFLEX emprega um sítio ativo para o ligante idealizado, chamado de protomol(RUPPERT, J et al., 1997), ele é gerado a partir da estrutura da proteína incluindo os hidrogênios. Três tipos de fragmentos moleculares são colocados no

sítio ativo da proteína em posições múltiplas, e são otimizados para interagir com a proteína (JAIN, AJAY N, 2003).

No procedimento de *docking*, cada ligante é fragmentado, resultando de 1 a 10 fragmentos moleculares, onde cada um deve ter algumas ligações rotacionais. É buscada a conformação de cada fragmento, cada conformação de cada fragmento é alinhada ao protomol para formar poses que maximizem a similaridade molecular com o protomol. São atribuídos *scores* aos fragmentos alinhados com base na função de *score* e no grau de interpenetração na proteína. Para construir moléculas completas a partir dos fragmentos alinhados são utilizadas abordagens de construção incremental (JAIN, AJAY N, 2003).

A parametrização da função modela as interações não covalentes dos ligantes orgânicos com as proteínas, incluindo proteínas ligadas a íons metálicos em seus sítios ativos. Os termos dominantes são o termo de contato hidrofóbico e um termo de contato polar, que tem um componente direcional e é escalonado por cargas formais nos átomos da proteína e do ligante (JAIN, AJAY N, 2003).

4.2.6 PLANTS

E, finalmente, o programa com um algoritmo menos parecido com os demais, o PLANTS (Protein-Ligand ANT System). É baseado no método de otimização em colônias de formigas (ACO). Ele considera o ligante flexível. A flexibilidade da proteína é considerada parcialmente pela otimização da posição dos átomos de hidrogênio que podem estar envolvidos em ligações de hidrogênio. A busca pelo espaço conformacional respeitada pela translação dos graus de liberdade é definida pelo tamanho do sítio de ligação do alvo (KORB et al., 2006).

No mundo real, as formigas andam inicialmente de forma aleatória, até que encontram comida. Quando encontram, retornam à colônia, deixando rastros de ferormônios, que são substâncias químicas liberadas e captadas por animais da mesma espécie, que permite o reconhecimento entre eles. A medida que outras formigas encontram esses rastros, elas tendem a não seguir mais caminhos aleatórios, passando a seguir a trilha encontrada, liberando mais ferormônios, de forma a sinalizar o caminho para o alimento (DORIGO et al., 2006).

A medida que o tempo passa, as trilhas de ferormônios começam a se evaporar, reduzindo dessa forma a sua força atrativa. E quanto mais formigas passarem rapidamente por um caminho, aumentaria a densidade de ferormônio. A evaporação do ferormônio possui a vantagem de evitar a convergência para uma solução local ótima. Se a evaporação não acontecesse todas as trilhas se tornariam bastante atrativas, limitando o espaço da solução para busca, impossibilitando alcançar a solução global ótima (DORIGO et al., 2006).

Dessa forma quando uma formiga encontra um caminho curto da colônia para o alimento, outras formigas tendem a seguir esse caminho, gerando um *feedback* positivo, otimizando o percurso até a fonte de alimento. A ideia do algoritmo do PLANTS é mimetizar esse comportamento utilizando formigas virtuais que caminham por um grafo, que por sua vez representa o problema a ser resolvido (DORIGO et al., 2006).

O PLANTS é baseado no sistema de formigas de máximos e mínimos (MMAS) (STÜTZLE; HOOS, 2000). As formigas artificiais constroem soluções escolhendo, baseado nos valores de ferormônios e informações heurísticas, um valor para cada grau de liberdade. A ordem dos graus de liberdade na construção da

solução é fixado arbitrariamente, desde que cada grau de liberdade seja tratado de forma independente dos outros.

A informação heurística é dada pelo potencial de torção de cada grau de liberdade rotacional. O raciocínio por trás dessa informação é que a construção de conformações de ligantes com alta energia deve ser evitada. A influência não linear das trilhas de ferromônios sobre as probabilidades de seleção para os graus de liberdade de torção são escolhidos para levar em conta a imperfeição da informação heurística (KORB et al., 2006).

Como é geralmente em todos os algoritmos MMAS, apenas uma solução é utilizada para depositar o ferromônio depois de cada interação, e no PLANTS não é diferente. É utilizada uma função de score empírica, como função de pontuação. Essa função é uma combinação de duas partes (KORB et al., 2006).

A primeira é parte da pontuação intermolecular, baseada numa versão modificada da função de score piecewise linear potential (PLP) (GEHLHAAR et al., 1995). Essa parte é utilizada principalmente para modelar interações estéricas entre a proteína e o ligante. A segunda parte introduz ligações de hidrogênio diretas entre as duas partes do complexo, como foi descrito na implementação da função de pontuação GOLDScore do GOLD (VERDONK et al., 2003). A pontuação intramolecular do ligante é composta por um termo simples e um potencial de torção (CLARK; CRAMER; OPDENBOSCH, VAN, 1989b). Além disso se o ponto de referencia do ligante é fora do sítio ativo pré-definido, um termo de penalidade é adicionado. A função é chamada de CHEMPLP (KORB et al., 2006).

4.3 Maquinas Utilizadas nos Cálculos

Foi utilizado um computador Xeon, com 8 núcleos de 2400 Mhz e com 8gb de memória RAM, para a realização da maioria dos cálculos envolvidos no trabalho. Apenas os cálculos envolvendo os programas SURFLEX e GOLD foram realizados em outras duas máquinas distintas, devido ao fato de se tratarem de softwares comerciais, onde suas licenças estão disponíveis apenas em computadores dedicados a rodar esses programas.

Para execução do programa SURFLEX foi utilizado uma máquina quad core, onde cada um dos seus 4 núcleos possuem 2400 Mhz, apresentando uma memória RAM de 2gb. Adicionalmente, programa GOLD foi executado em um computador quad 2 core com seus núcleos também de 2400 Mhz e com 4gb de memória RAM.

4.4 Execução dos Programas

É importante ressaltar que a combinação do *docking* dos 119 ligantes nos 12 alvos, usando os 6 programas escolhidos, totaliza $119 \times 12 \times 6 = 8568$ cálculos de *docking*.

Diante desta quantidade de cálculos de *docking* a serem realizados, foi necessário construir *scripts* em c-shell (para programas na plataforma Linux) e *scripts* .BAT (para a plataforma Windows). Os *scripts* foram construídos para automatizar ao máximo todo o processo dos cálculos de *docking*. Foram escritos 41 *scripts* ao todo. Esses *scripts* foram usados na execução dos 6 programas de *docking* analisados e no programa Binana.

Foram utilizados os ajustes padrão de cada programa, quando feita alguma modificação específica, essa foi relatada no procedimento do programa em questão.

A preparação dos alvos de *docking* para a execução dos programas foi realizada depois das estruturas tridimensionais serem alinhadas, e foi definido um ponto único para ser o centro do sítio ativo. Desta forma, esse ponto se aplica para todos os alvos previamente alinhados. A definição desse ponto foi realizada pela posição do ligante p-BPB que foi co-cristalizado com o alvo PrTX-I, sob o código 2OK9. O ponto selecionado no espaço tridimensional foi (X=26,041Å ; Y=1,612 Å; Z=50,085Å). A seguir será detalhada a execução de cada programa individualmente.

4.4.1 AUTODOCK

Para gerar os arquivos com as estruturas dos ligantes no formato necessário para executar o programa AUTODOCK, foi utilizado o script `prepare_ligand4.py`, em Python, disponível na ferramenta MGLTools. Para automatizar a geração das estruturas para todos os cálculos foi escrito um script capaz de converter todas as estruturas de uma só vez, a partir das estruturas no formato MOL2.

Para calcular a grade com o programa AutoGrid, foi necessário fornecer todos os tipos de átomos de todos os ligantes que foram submetidos ao cálculo de *docking*, para que os mapas do grid contenham as informações necessárias para o cálculo. Dessa forma, foi preciso fazer um sumário de todos os ligantes para determinar quais são os tipos de átomos contidos em todos eles.

Para realizar essa tarefa, foi utilizado o script `examine_ligand_dict.py`, pertencente a ferramenta MGLTools. É preciso fornecer como entrada para esse script o arquivo `ligand_dict.py` que foi escrito a medida que os arquivos `pdqt` foram sendo gerados na etapa anterior. Assim, foi gerado um arquivo `ligand_dict.py` e um arquivo de texto contendo o sumário dos tipos de átomos.

Os arquivos dos receptores no formato PDBQT também precisaram ser gerados e para isso foi utilizado o script `prepare_receptor4.py`, disponível na ferramenta MGLTools, aliado a um script escrito para automatizar a geração dos 12 alvos de um vez. Ao término da execução do script, foi preciso adicionar manualmente a carga +2 para o átomo de cálcio.

Antes de realizar o cálculo de *docking*, foi necessário calcular a grade com os mapas necessários. O arquivo de parâmetros da grade (GPF) foi calculado uma vez apenas e foi utilizado para todos os resultados de *docking*. Para isso, foi necessário fazer um link simbólico para cada um dos 12 receptores com um nome genérico “receptor.pdqt”.

Foi necessário também escolher um dos receptores para criar o arquivo GPF, particularmente um que contenha todos os tipos de átomos dos outros receptores. No caso desse estudo o alvo Cro (2QOG) é o único que possui um átomo diferente, o átomo de cálcio, dessa forma ele foi o receptor utilizado para criar o arquivo GPF.

Para gerar o arquivo GPF, foi utilizada a ferramenta MGLTools. O sítio ativo foi definido como uma caixa de 14 Å. Os tipos de átomos dos ligantes foram definidos manualmente, com base no arquivo de sumário gerado anteriormente. Os tipos de átomos usados foram: A, C, HD, N, NA, OA, SA, Cl, S e Br.

Com o arquivo GPF definido, foi possível realizar o cálculos dos mapas de afinidades utilizando o programa AutoGrid4. Para a realização do cálculo de todos os mapas com apenas um comando, foi utilizado um script `CriarMapasAutogrid.csh`. Um outro script foi utilizado, `ConferirMapasAutogrid.csh`, para conferir se os mapas foram realmente criados corretamente.

Antes de iniciar todos os cálculos de *docking* para o programa AUTODOCK, foi tomada a precaução de fazer um teste um grupo pequeno. Selecionando um alvo e um ligante. Para isso, foi implementado o script TestarAUTODOCK.csh que cria um arquivo de parâmetros de *docking* (DPF) restringindo a busca do GA de forma a tornar o cálculo mais rápido, apenas para finalidades de teste.

Para realizar todos os cálculos de *docking*, foi necessário organizar as pastas onde foram colocados os arquivos de saída dos programas. Para tal tarefa, foi utilizado o código PrepararDockingAUTODOCK.csh. Além de criar as pastas, o script também faz referência ou copia todos os arquivos necessários para a realização dos cálculos, bem como também criar os arquivos DPF utilizando o script disponível na ferramenta MGLTools, prepare_dpf42.py.

Por final foi utilizado o script DockingAUTODOCK.csh para a realização dos cálculos, o script chama o programa AUTODOCK4 e realiza todos os cálculos de forma automática.

4.4.2 AUTODOCK VINA (VINA)

Como o programa VINA utiliza os mesmos arquivos de entrada para as estruturas das moléculas que o AUTODOCK usa, esses arquivos foram simplesmente copiados.

Para a execução do VINA, foi necessário apenas os arquivos das estruturas e um arquivo de configuração "conf.txt". Para a construção desse arquivo foram utilizados os mesmos valores utilizados para definir o arquivo GPF na sessão anterior. O ponto central do sítio ativo foi definido no espaço tridimensional com os valores de X, Y e Z iguais a 26.041, 1.612 e 50.085, respectivamente. Um único arquivo de configuração foi utilizado para todos os cálculos.

Para a preparação do *docking* de todos os cálculos do VINA, foi utilizado o script PrepararDockingVINA.csh, que criou todos os diretórios para os arquivos de saída e copiou ou referenciou os três arquivos necessários para cada cálculo, a saber: o receptor.pdbqt, o ligante.pdbqt e o conf.txt.

Para a execução, foi utilizado o script DockingVINA.csh, que chama o programa VINA automaticamente, para rodar todos os cálculos desse programa.

4.4.3 DOCK

Por ser um programa bastante modulado, ou seja, ser formado por diversos subprogramas, o DOCK exigiu uma maior quantidade de passos para completar a execução.

Para realizar a preparação dos receptores, foram utilizados os arquivos extraídos do banco de dados PDB, sem adicionar os átomos de hidrogênios, mas apenas retirando os dados das cadeias não relevantes, a exemplo dos outros programas. Em seguida, foi executado o módulo DockPrep que compõem a ferramenta gráfica Chimera, para cada um dos 12 alvos. A carga do cálcio é solicitada durante a execução do módulo, onde foi fornecido o valor +2.

É necessário salvar o arquivo do receptor de duas formas. Uma, onde o receptor está completo e com suas cargas adicionadas, e na outra, onde foram retirados os átomos de hidrogênio dos receptores. Isso é necessário para o procedimento de geração de esferas.

O próximo passo foi a geração das superfícies moleculares. Para isso foi utilizado o programa DMS, disponível em (<http://www.cgl.ucsf.edu/Overview/software.html#dms>).

Para o programa gerar todas as superfícies para todos os alvos, foi utilizado o script GerarSuperficieMolecularDOCK.csh.

Com posse das superfícies moleculares, foi possível gerar as esferas que definiram o sítio ativo. Para a geração das esferas, foi utilizado o script GerarEsferas.sh para todos os casos, de forma sequencial. Depois de geradas, as esferas precisaram ser selecionadas para compor o sítio ativo. Foram selecionadas as esferas num raio de 14 Å, a partir do ligante utilizado com referência para definir o centro do sítio ativo de todos os alvos. Fez-se uso do script SelecionarEsferasDOCK.csh.

Para gerar a caixa para o GRID, foi utilizado o script GerarCaixa.sh e o arquivo de entrada box.in. Foi gerada uma caixa para cada alvo, de forma automática, seguindo os parâmetros padrões.

O grid foi calculado utilizando o script GerarGridDOCK.csh e o cálculo de *docking* foi preparado através do script PrepararDockingDOCK.csh. O script se encarregou de criar todas as pastas e fazer todos os links necessários para a execução dos cálculos. E, por fim, o cálculo foi executado lançando mão do script DockingDOCK.csh.

4.4.4 PLANTS

Para a execução do programa PLANTS é recomendado efetuar um pre-tratamento das estruturas dos ligantes e dos receptores, utilizando o programa SPORES.

No caso dos receptores, foi utilizado o script PrepararReceptoresComSPORES_PLANTS.csh, de forma automática.

Feito o pre-processamento, assim como o programa VINA, o PLANTS necessita apenas dos arquivos com as estruturas do ligante e do receptor como entrada, além do arquivo de configuração do cálculo.

O arquivo de configuração foi genérico para todos os cálculos e definido respeitando o ajuste padrão do programa.

Em seguida, foi realizada a preparação para o cálculo de *docking*, criando-se os respectivos diretórios e fazendo referências aos arquivos de entrada. Para esse fim, foi utilizado o script PrepararDockingPLANTS.sh.

Por fim, foi executado o cálculo de todos os alvos contra todos os ligantes para o programa PLANTS, com o auxílio do script DockingPLANTS.sh.

4.4.5 GOLD

O programa GOLD possui uma interface gráfica muito intuitiva. Para a preparação dos cálculos, foi utilizado o módulo *Wizard*, existente na interface gráfica do programa Hermes. O sítio ativo foi definido no raio de 14 Å a partir do ponto central (26,041; 1,612; 50,085) e todos os ligantes foram adicionados a cada cálculo com cada um dos alvos.

Com os arquivos de entrada para o cálculo de *docking* prontos, foi necessário a ajuda de um script DockingGOLD.bat para executar os cálculos de forma automática, sem a necessidade de intervenção do usuário.

4.4.6 SURFLEX

Inicialmente, com posse dos arquivos dos ligantes no formato MOL2, foi criado um arquivo de banco de dados (.MDB), formato interno do programa Sybyl, com todos os ligantes utilizados no cálculo. Em seguida, esse arquivo .MDB foi carregado na interface gráfica do Sybyl e convertido para o formato MMS.

Para fazer o tratamento dos ligantes foi utilizado o módulo Ligand Preparation, e como entrada o banco de dados no formato MMS. O formato de saída foi selecionado para MOL2.

Com isso, foi realizado o *docking* para os 12 alvos, um de cada vez, utilizando-se o arquivo contando todas as estruturas dos ligantes, seguindo os critérios padrão do SURFLEX para a geração do protomol.

4.5 Comparação Metodológica

O programa Binana, BINding ANALyzer (DURRANT; MCCAMMON, 2011) é um algoritmo implementado em Python para análise de interações no complexo ligante-receptor. O programa é capaz de identificar características importantes de ligação, tais como: ligações de hidrogênio, contatos hidrofóbicos, pontes salinas e interações pi. Ele aceita como arquivos de entrada os arquivos PDBQT, que podem ser gerados com a ferramenta MGLTools.

O Binana foi rodado para todos os resultados de *docking* previamente descritos, utilizando-se os ajustes padrão do programa, exceto por apenas uma alteração, onde foram consideradas as ligações de hidrogênio a uma distância de até 3,5 Å ao invés de apenas 3,0 Å.

Para rodar o Binana foi necessário converter todos os arquivos que estavam no formato MOL2 para o formato PDBQT, utilizando a ferramenta MGLTools. Para executar todas as análises com o programa Binana de forma automática, foi utilizado um script, RodarBinana.csh. Em seguida os resultados foram extraídos com o auxílio de outros scripts, onde foram analisados comparativamente.

4.5.1 Análise Hierárquica de Clusters

A Análise Hierárquica de Clusters (“HCA” – “Hierarchical Cluster Analysis”) (HASTIE et al., 2009), é uma maneira de visualizar os agrupamentos espontâneos presentes entre as amostras de um conjunto de dados, normalmente representado por um gráfico de dendrograma. Na sua construção, considera-se a distância Euclidiana entre duas amostras (“a” e “b”) no espaço original, utilizando-se a equação 1, onde “k”, “l”, “m” e “z” representam todas as variáveis do espaço multidimensional e d_{ab} representa a distância entre as amostras.

$$d_{ab} = \sqrt{(k_a - k_b)^2 + (l_a - l_b)^2 + (m_a - m_b)^2 + \dots + (z_a - z_b)^2} \text{ (eq.1)}$$

O estudo multivariado de HCA, usando o programa PAST (HAMMER et al., 2001), da série de resultados de *docking*, foi realizado a partir da análise da planilha de interações intermoleculares geradas com o programa Binana.

4.5.2 Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (“PCA” – “Principal Component Analysis”) (MARDIA et al., 1979; KACHIGAN, 1996) é uma técnica de estatística multivariada muito utilizada em diversas áreas do conhecimento, uma vez que permite a redução da dimensionalidade do conjunto de dados com a perda mínima de informação, permitindo, em muitos casos, também a observação de possíveis agrupamentos ou padrões no conjunto de amostras.

O procedimento pode ser visualizado como a obtenção de um menor número de novos eixos (dimensões), as Componentes Principais (PC), sendo estas combinações lineares dos eixos originais (variáveis originais) e que, espera-se, retenham o máximo possível da informação inicial. Assim, um pequeno número de PCs pode ser usado em lugar das variáveis originais, esperando-se que eventuais padrões nos dados possam ser identificados visualmente. Se as variáveis originais não são correlacionadas, a PCA não produz o efeito desejado, de reduzir significativamente a dimensionalidade do problema. Os resultados mais promissores são obtidos quando as variáveis originais são diretamente ou inversamente correlacionadas, pois as variáveis originais podem ser representadas apropriadamente por poucas PCs, deixando clara a existência de grande redundância nas variáveis originais.

Do ponto de vista do cálculo em si, a PCA é feita através da diagonalização da matriz de covariância ($\mathbf{X}^t\mathbf{X}$) onde \mathbf{X}^t é a transposta da matriz original dos dados, \mathbf{X} . Os pesos, ou *loadings* são os autovetores obtidos desta diagonalização, e representam a contribuição com que cada eixo original entra na formação dos novos eixos, ou seja, de cada PC. Os autovalores representam a variância descrita em cada PC. Em algumas situações, há a necessidade de um pré-tratamento da matriz de dados original. A primeira componente principal (PC1) será a componente com

maior variância, ou seja, com a maior parte da informação. As variâncias das demais PC's serão sempre menores que a variância das PC's anteriores e todas elas serão ortogonais entre si. O peso, ou contribuição, com que cada variável entra para a formação dos novos eixos pode ser vista no gráfico dos loadings. Já o gráfico dos scores mostra as coordenadas que cada objeto possui ao longo de cada componente principal.

O estudo multivariado de PCA foi realizado a partir de um conjunto de dados contendo as coordenadas (X,Y,Z) das geometrias (*poses*) obtidas como resultados de *docking* usando os programas DOCK, GOLD e PLANTS, para a molécula de Quercetina, em todos os alvos. Também foi feita a análise de HCA neste mesmo conjunto de dados, e para ambos os procedimentos, foi utilizado o programa PAST (HAMMER et al., 2001).

4.6 Análise Global dos Melhores Resultados de cada Programa

O melhor resultado de *docking* para um programa foi definido levando-se em consideração os valores de scores obtidos. Para cada programa, foram realizados 1428 cálculos (119 estruturas x 12 alvos), dos quais os 50 resultados de *docking* com valores de score mais promissores foram selecionados. O ligante que apareceu em maior número de vezes entre os 50 resultados mais importantes, ou seja, o ligante que formou complexos mais estáveis com uma maior quantidade de alvos entre os 50 selecionados, foi selecionado para a realização de uma análise mais detalhada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Banco de Dados

O primeiro fruto desse trabalho foi a construção de um banco de dados contendo moléculas com atividades antiveneno. O banco de dados é composto por 103 moléculas, sendo as mesmas que foram apresentadas na metodologia deste trabalho. Para cada molécula, existem informações sobre a origem (seja ela sintética ou derivada de algum produto natural) e sobre a atividade antiveneno reportada na literatura (HAGE-MELIM, 2009; FOLMER et al., 2010).

A contribuição mais importante do banco de dados para os estudos de modelagem molecular, é a presença da estrutura tridimensional de cada uma das 103 moléculas. Elas estão armazenadas no formato MOL2 do Sybyl("SYBYL-X 1.2"), sendo este formato amplamente utilizado para os estudos *in silico*, de uma maneira geral. Além das estruturas, também está presente uma imagem de cada molécula para facilitar a identificação das mesmas.

Como já descrito na metodologia, o banco de dados foi construído utilizando-se a ferramenta Microsoft Access 2007, que possibilita a realização de buscas personalizadas, atendendo a necessidades específicas do usuário, assim como a geração de relatórios com as informações requisitadas. As estruturas das moléculas presentes no banco de dados podem ser vistas no apêndice A.

Um problema encontrado em 15 das 103 moléculas foi a divergência de estruturas para uma mesma molécula, o que elevou o número de estruturas para 119.

5.1.1 Divergência entre as estruturas das moléculas

As moléculas com divergências estruturas são: *Aplyolide A*, *Cabenegrina A-2*, *Caulerpenyne*, *Dendrillolide A*, *Gracilin A*, *Ilimaquinone*, *Luffolide*, *Norrisolide*, *Palauolide*, *Palauolol*, *Palinurin*, *Petrosaspongiolide M*, *Rhipocephalin*, *Scalaradial* e *Spongidine B*.

Elas serão descritas, uma a uma, e a imagem original (proveniente da fonte de onde foi extraída) de suas estruturas também serão mostradas.

A primeira delas, *Aplyolide A*, no banco de dados ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>), a estrutura da molécula foi encontrada com estereoquímica R em um centro quiral, enquanto no artigo que cita a sua atividade antiveneno, a molécula apresenta isomeria S no mesmo centro quiral (FOLMER et al., 2010). As duas estruturas podem ser comparadas na figura 7.

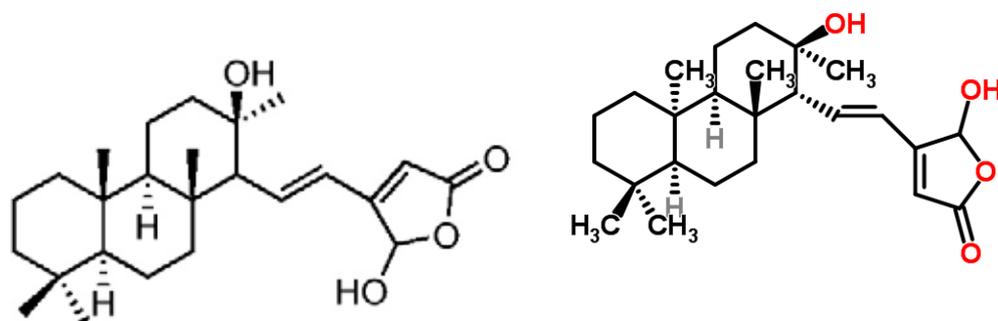


Figura 7: Estruturas da molécula *Aplyolide A*. a) Estrutura extraída do artigo que cita sua atividade (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura extraída do banco de dados ChemSpider.

Em seguida, a molécula Cabenegrina A-2, também possui isomeria R e S, e não é reportada na literatura qual a estereoquímica ativa da molécula (MILITÃO et al., 2007). As estruturas podem ser vistas na figura 8.

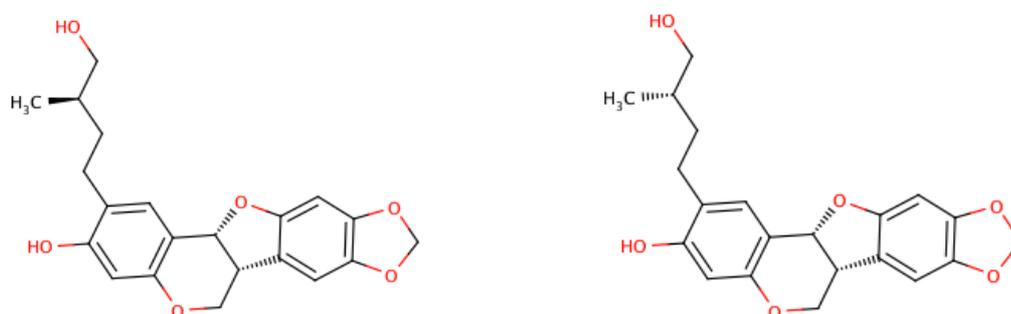


Figura 8: Estruturas da molécula Cabenegrina A-2. a) Estrutura do isômero R; b) Estrutura do isômero S.

A molécula Caulerpenyne possui uma divergência em um substituinte. No artigo, a estrutura é citada com o nome de *Caulerpyne* e possui o substituinte O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). Já no PubChem, a molécula foi encontrada com o nome de Caulerpenyne, e ao invés do substituinte anterior, foi encontrado o O-(C=O)-CH₃. É possível observar na figura 9.

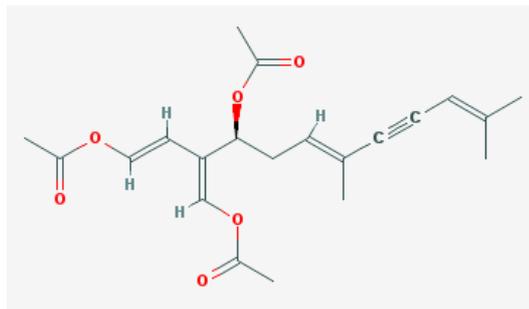
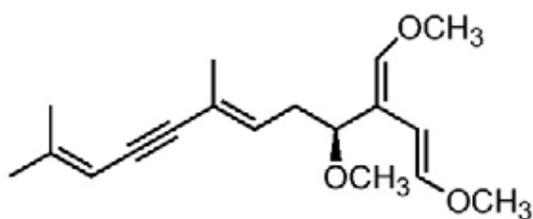


Figura 9: Estruturas da molécula *Caulerpenyne*. a) Estrutura com o grupo O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o grupo O-(C=O)-CH₃, extraída do PubChem.

No caso da molécula *Dendrilloide A*, foram encontradas divergências em 3 estruturas. Inicialmente foi encontrada a estrutura no artigo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010) onde o substituinte em questão era um grupo metila (CH₃). Em seguida, foi encontrado no PubChem a estrutura com o substituinte O-(C=O)-CH₃. Como em todos os casos, na tentativa de desambiguação estrutural, foi buscada um outra referência, que por sua vez apresentou um outra estrutura com uma hidroxila na posição em questão (POTTS et al., 1992), as três estruturas podem ser visualizadas na figura 10.

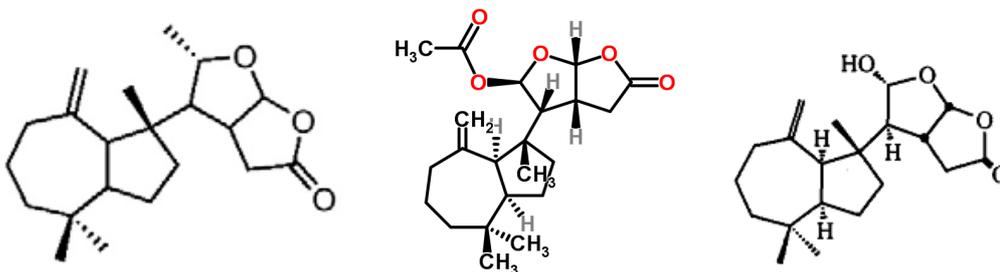


Figura 10: Estruturas da molécula *Dendrilloide A*. a) Molécula extraída do artigo sobre produtos naturais marinhos, com grupamento metila na posição em questão (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura extraída do banco de dados PubChem, com o substituinte O-(C=O)-CH₃. c) Estrutura extraída do artigo de Potts, 1992, com uma hidroxila da posição em questão (POTTS et al., 1992).

Continuando, a molécula *Gracilin A*, também apresentou divergência em sua estrutura. No artigo, a estrutura possui o substituinte O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). Já no ChemSpider, a molécula apresenta o substituinte O-(C=O)-CH₃. É possível observar na figura 11.

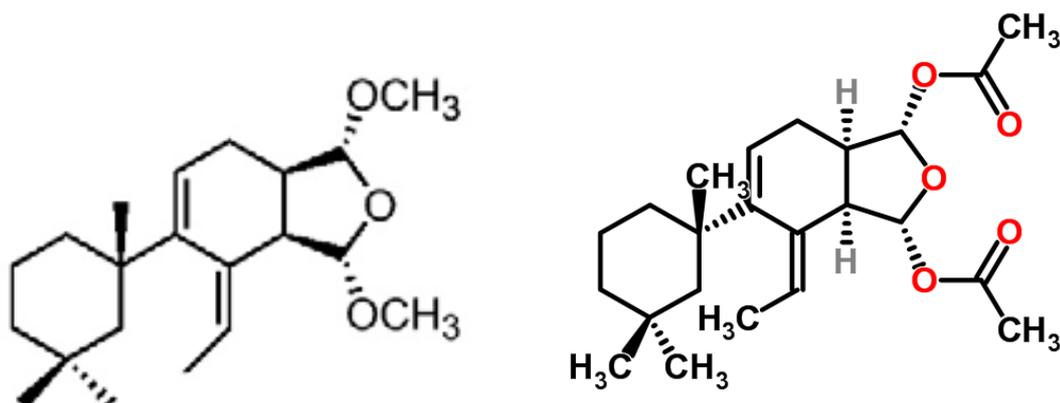


Figura 11: Estruturas da molécula *Gracilin A*. a) Estrutura com o substituinte O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o grupo O-(C=O)-CH₃. Extraída do ChemSpider.

A molécula llimaquinona possui uma ligação em posição diferente no duplo anel ciclohexano, entre as estruturas encontradas no PubChem e no artigo (FOLMER et al., 2010). As estruturas podem ser vistas na figura 12.

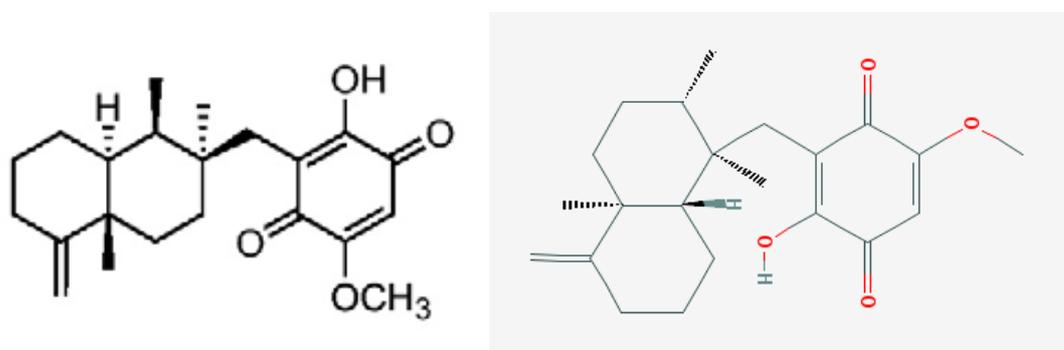


Figura 12: Estruturas da molécula llimaquinona. a) Estrutura extraída do artigo (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura extraída do PubChem.

As moléculas *Luffolide* e *Norrisolide*, também apresentam divergência em suas estruturas. No artigo, as estruturas possuem o substituinte O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). Já no PubChem e no ChemSpider, respectivamente, as moléculas apresentam o grupo O-(C=O)-CH₃. É possível observar nas figura 13 e 14.

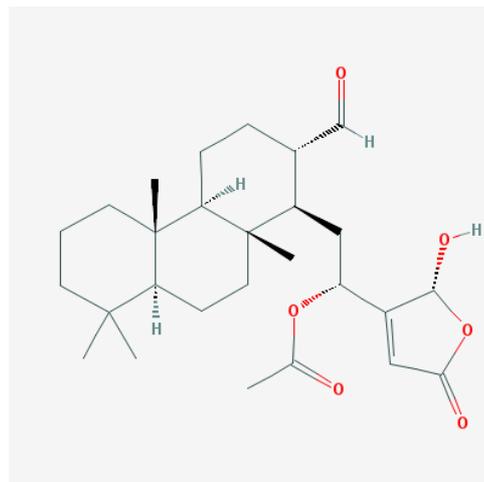
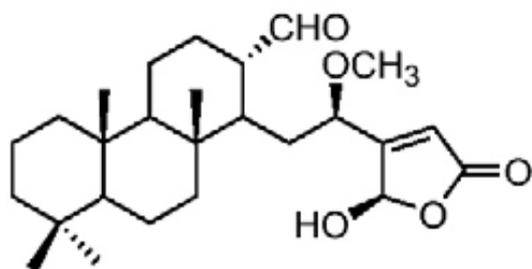


Figura 13: Estruturas da molécula *Luffolide*. a) Estrutura com o grupo O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o grupo O-(C=O)-CH₃, extraída do PubChem.

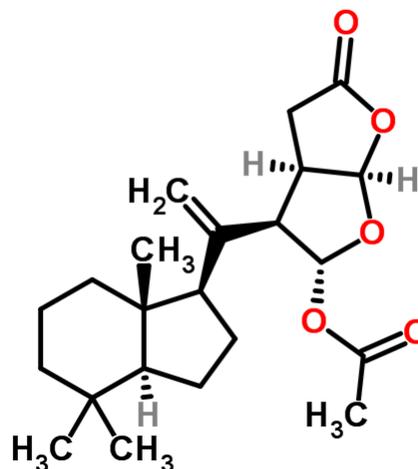
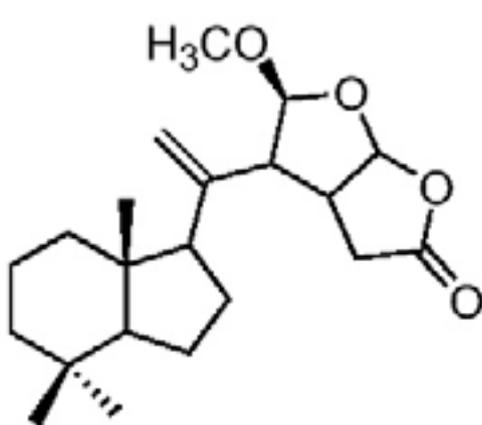


Figura 14: Estruturas da molécula *Norrisolide*. a) Estrutura com o substituinte O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o substituinte O-(C=O)-CH₃, extraída do ChemSpider.

A molécula *Palauolide*, apresenta uma divergência na estrutura tridimensional, sendo a estrutura extraída do artigo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010) o enantiômero da estrutura obtida do banco de dados PubChem. As estruturas podem ser observadas na figura 15.

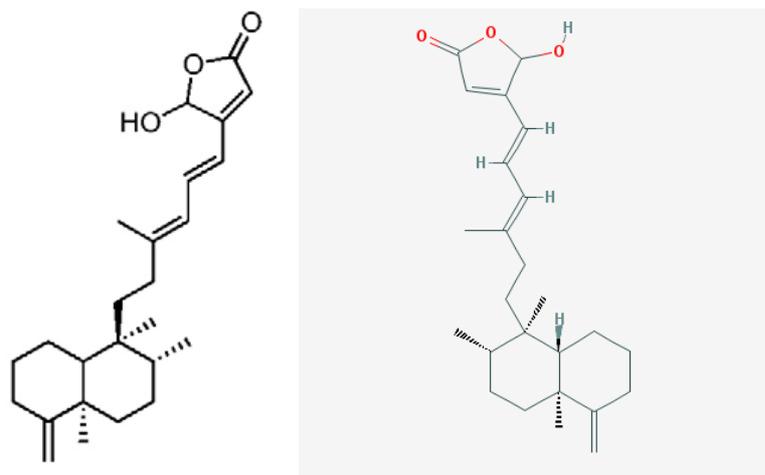


Figura 15: Estruturas da molécula *Palauolide*. a) Extraída do artigo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010); b) Extraída do PubChem.

A molécula *Palaulol* (*Palauolol*) apresenta divergência em sua estrutura, e no nome encontrado. Dessa forma não optar por uma estrutura, podendo se tratar de moléculas distintas ou de divergências estruturais de uma única molécula. Uma das estruturas foi extraída do artigo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010), e a outra estrutura extraída do PubChem. A estereoquímica de algumas ligações está alterada, como pode ser visto na figura 16.

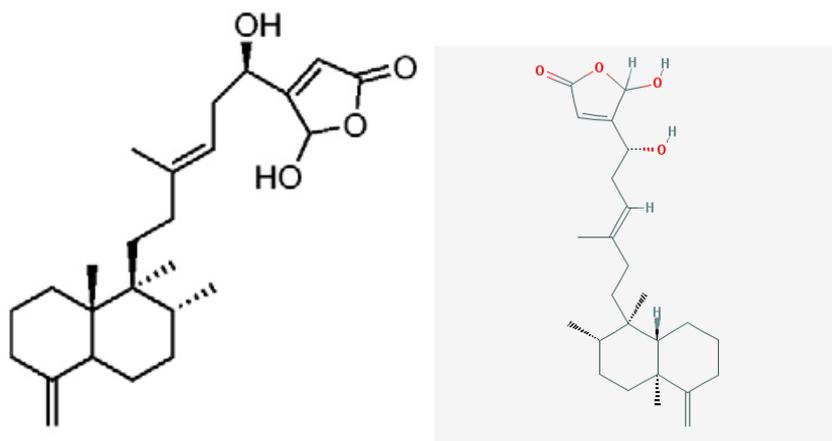


Figura 16: Estrutura da molécula *Palaulol*. a) Estrutura extraída do artigo sobre produtos marinhos naturais (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura extraída do PubChem.

A molécula *Palinurin* apresenta uma divergência entre duas fontes. Na estrutura extraída do ChemSpider, a molécula apresenta um átomo de carbono (CH_2) a mais na cadeia apolar, em comparação com a estrutura obtida do artigo sobre produtos marinho naturais (FOLMER et al., 2010). Na figura 17 é possível ver as duas estruturas.

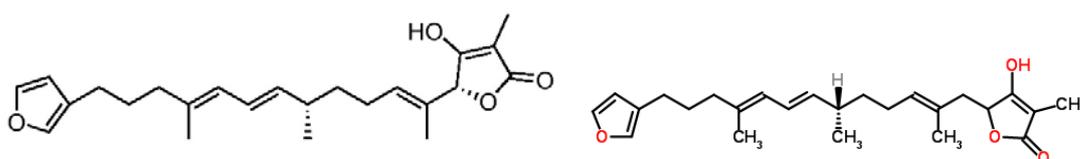


Figura 17: Estruturas da molécula *Palinurin*. a) Estrutura com um CH₂ a menos, extraída do artigo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura extraída do ChemSpider, com um CH₂ a mais na estrutura.

A molécula *Petrosaspongiolide M* apresenta uma divergência em sua estrutura. Existe uma instauração no anel de cinco membros, presente na estrutura extraída do artigo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010), que não existe na estrutura extraída do PubChem. É possível observar as estruturas na figura 18.

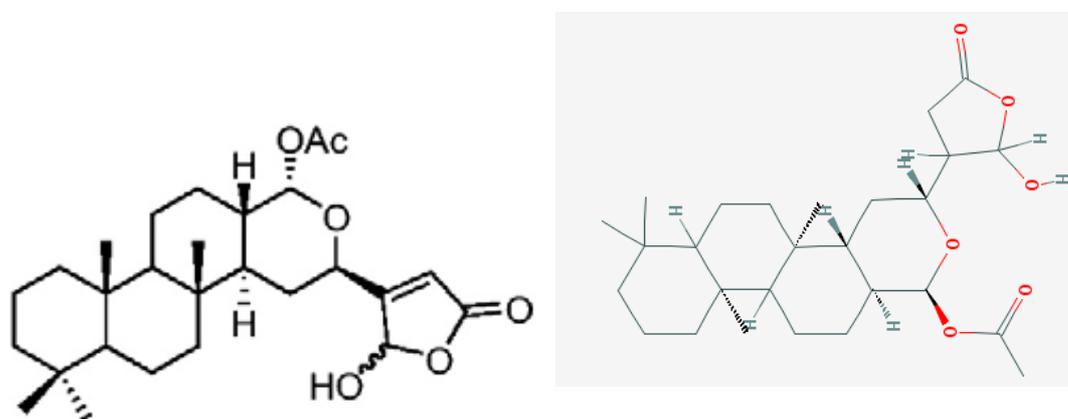


Figura 18: Estruturas da molécula *Petrosaspongiolide M*. a) Estrutura extraída do artigo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010), com uma instauração no anel de cinco membros. b) Estrutura extraída do PubChem.

As moléculas *Rhipocephalin* e *Spongidine B* também apresentam divergência em suas estruturas. No artigo, as estruturas possuem o grupo O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). Já no PubChem, as moléculas apresentam o radical O-(C=O)-CH₃. É possível observar na figura 19 e 20.

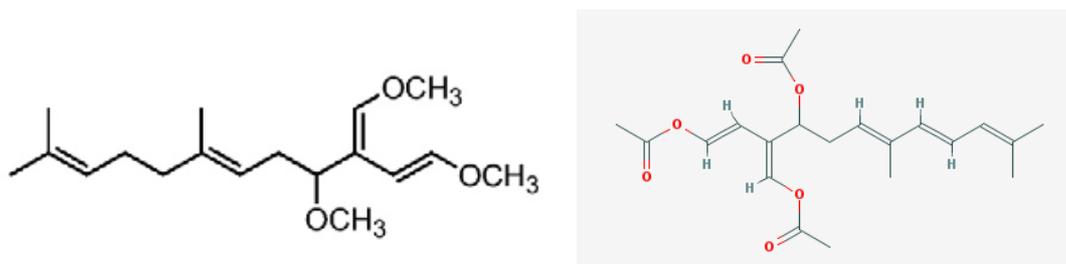


Figura 19: Estruturas da molécula *Rhipocephalin*. a) Estrutura com o substituinte O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o grupo O-(C=O)-CH₃. Extraída do PubChem.

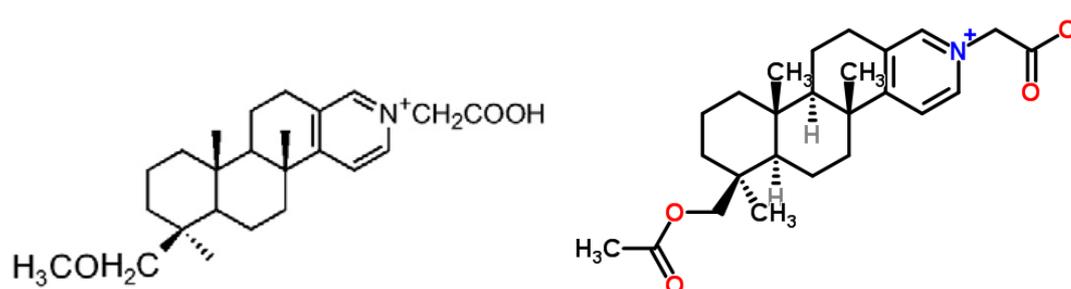


Figura 20: Estruturas da molécula *Spongidine B*. a) Estrutura com o grupo O-CH₃ (FOLMER et al., 2010). b) Estrutura com o substituinte O-(C=O)-CH₃. Extraída do PubChem.

E por ultimo, a molécula *Scalaradial*, que apresenta divergência em sua estrutura. No artigo, a estrutura possui o substituinte CH₃-C=O (FOLMER et al., 2010). Já no PubChem, a molécula apresenta o substituinte H-C=O. É possível observar na figura 21.

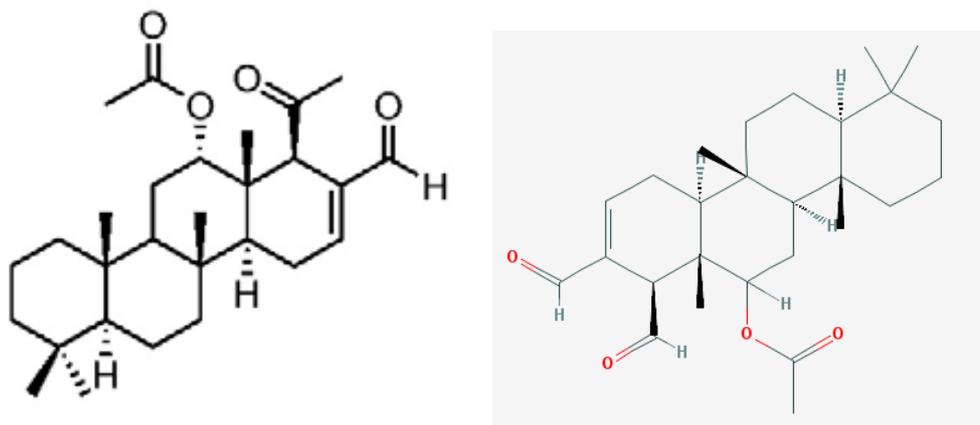


Figura 21: Estrutura da molécula *Scalaradial*. a) Estrutura extraída do artigo sobre produtos marinhos naturais (FOLMER et al., 2010) com o substituinte CH₃-C=O. b) Estrutura extraída do PubChem, com o grupo H-C=O.

A construção do banco de dados foi o ponto de partida para iniciar os ensaios *in silico*, mas precisamente de *docking*. Todas as moléculas com divergências estruturais foram consideradas em todas as suas formas estruturais, no intuito exclusivo de verificar a influência que essas modificações podem trazer aos resultados de *docking*.

Os resultados foram analisados de forma comparativa, e serão mostrados nas seções seguintes.

5.2 Principais Resultados de Docking para as moléculas (ligantes) do Banco de Dados

A partir da realização dos 8568 (119 ligantes x 12 alvos x 6 programas) cálculos de *docking*, foi possível extrair uma grande quantidade de dados, como por exemplo, valores de *scores*, estruturas de complexos ligante-receptor e os tempos de cálculo. Não é possível realizar uma comparação direta entre os *scores* dos diversos programas, uma vez que cada função de score apresenta uma unidade diferente e é baseada em um formalismo matemático distinto, através dos seus campos de força específicos. Dessa forma, os *scores* foram normalizados de duas formas. Na primeira, todos os *scores* obtidos por um programa foram divididos pelo *score* de menor valor do mesmo programa. Esses *scores* normalizados pelo valor mínimo podem ser observados no gráfico da figura 22 e 23. Na segunda forma, todos os *scores* obtidos por um programa foram divididos pelo *score* de maior valor do mesmo programa. Estes *scores* normalizados pelo valor máximo podem ser observados no gráfico da figura 24.

Nas figuras 22 e 23, é possível observar que as diferentes funções de score (campos de força) dos programas causam uma variação de valores de *scores* bastante diferente, em cada caso. O programa AUTODOCK, por exemplo tem uma variação de mais de 1000 vezes no *score*, entre os valores mais altos e o valor mínimo de *score*, igual a 1, no gráfico normalizado. De maneira diferente, o programa PLANTS apresenta uma variação dos valores de *score* em torno de 10 vezes, novamente comparando-se os valores mais altos com o valor de mínimo, com *score* relativo igual a 1. Em outras palavras, a variação dos resultados de *score*, entre o mínimo e o máximo de cada programa, pode ser da ordem de algumas unidades, de algumas dezenas, de algumas centenas, ou até na casa do milhar, como é o caso do programa AUTODOCK. Estas variações nos valores de *score* acabam afetando as margens de erro e, portanto, a comparação direta entre as diversas abordagens metodológicas.

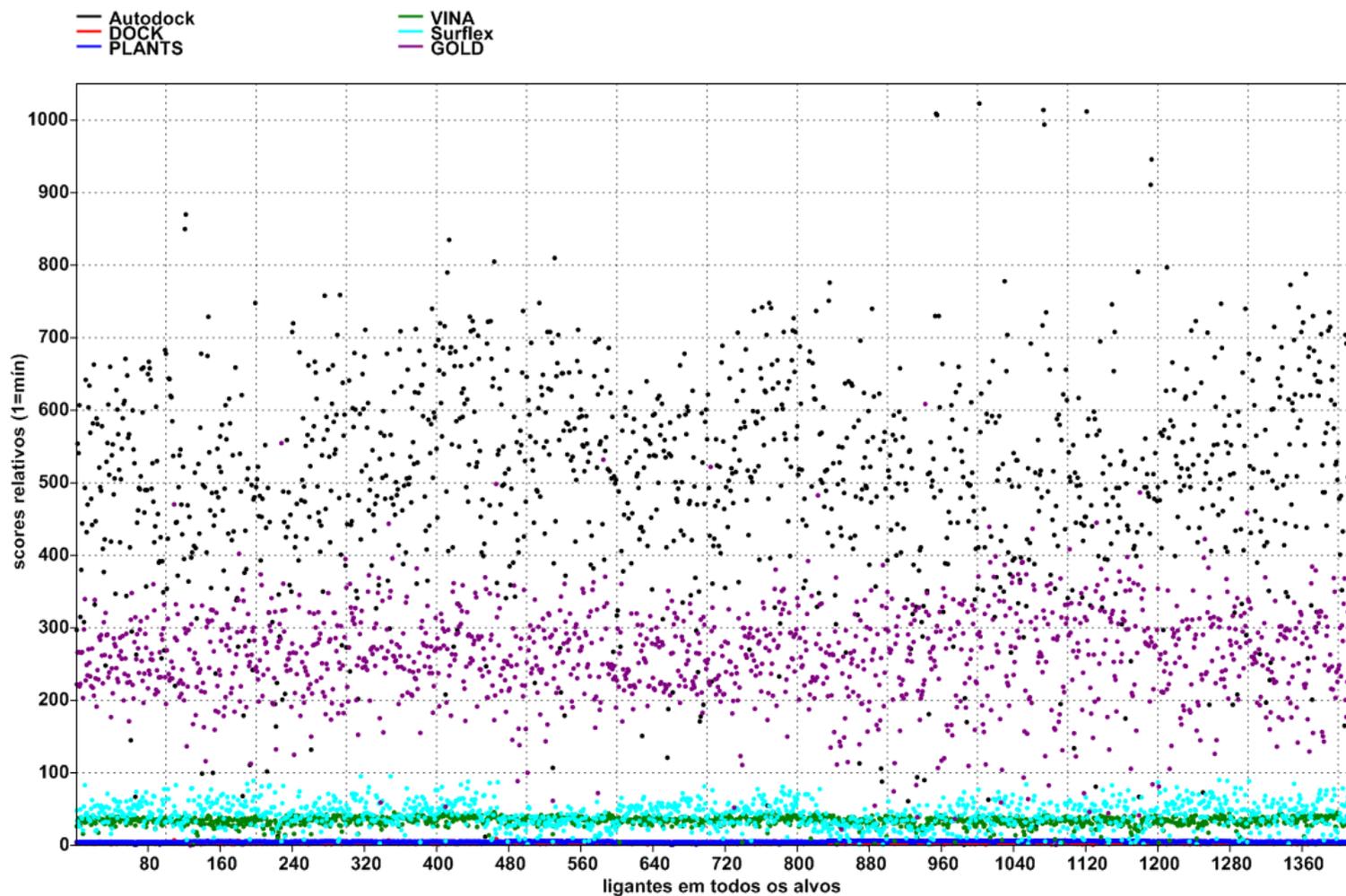


Figura 22: O gráfico de scores relativos de todos os ligantes em todos os alvos, normalizados pelo valor de mínimo. Desta forma, o valor unitário é o mínimo score de cada programa.

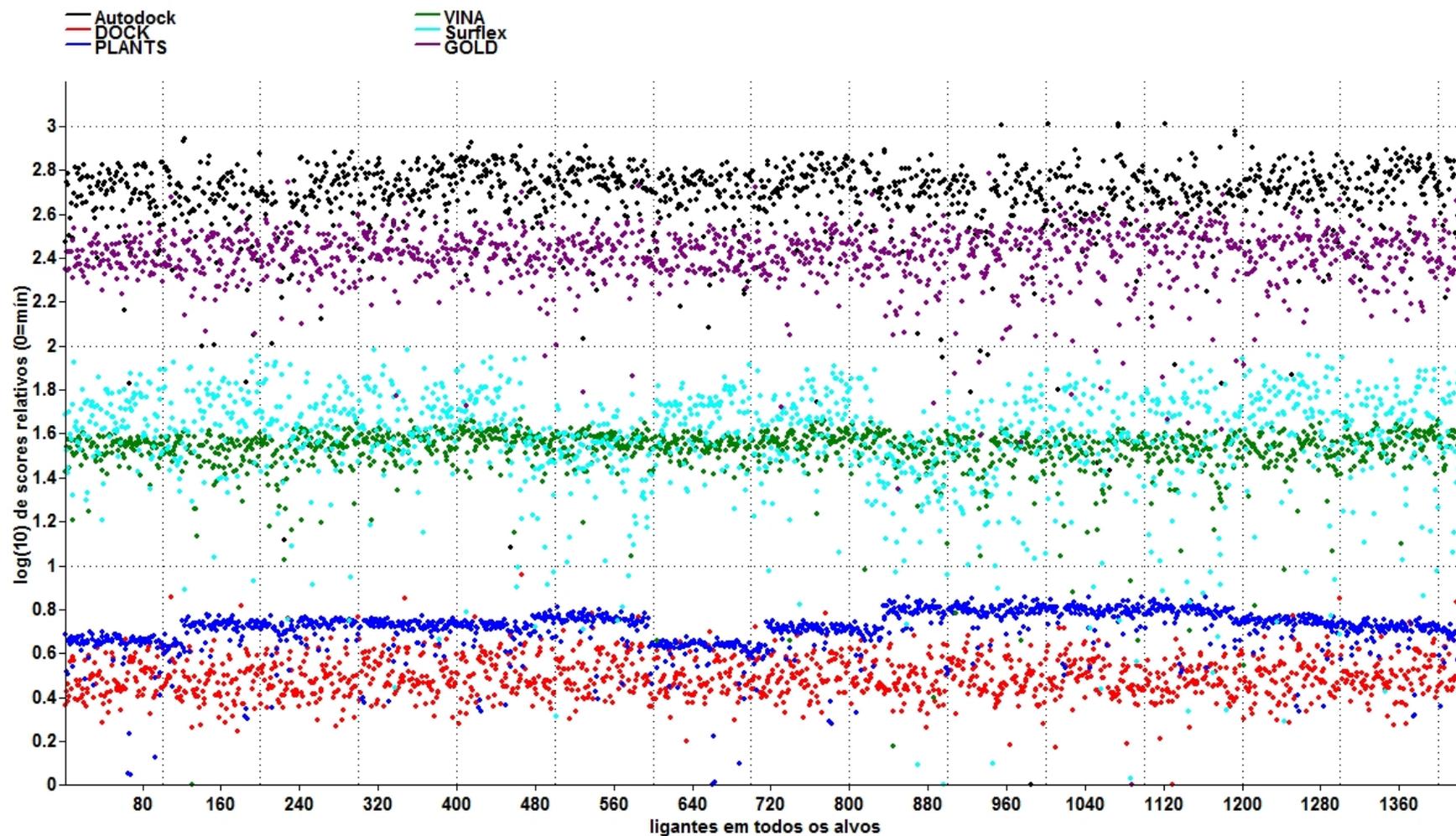


Figura 23: O gráfico de scores relativos de todos os ligantes em todos os alvos, normalizados pelo valor de mínimo, e logaritimizadas (base 10). Desta forma, o valor de $\log=0$ (zero) é o mínimo de cada programa.

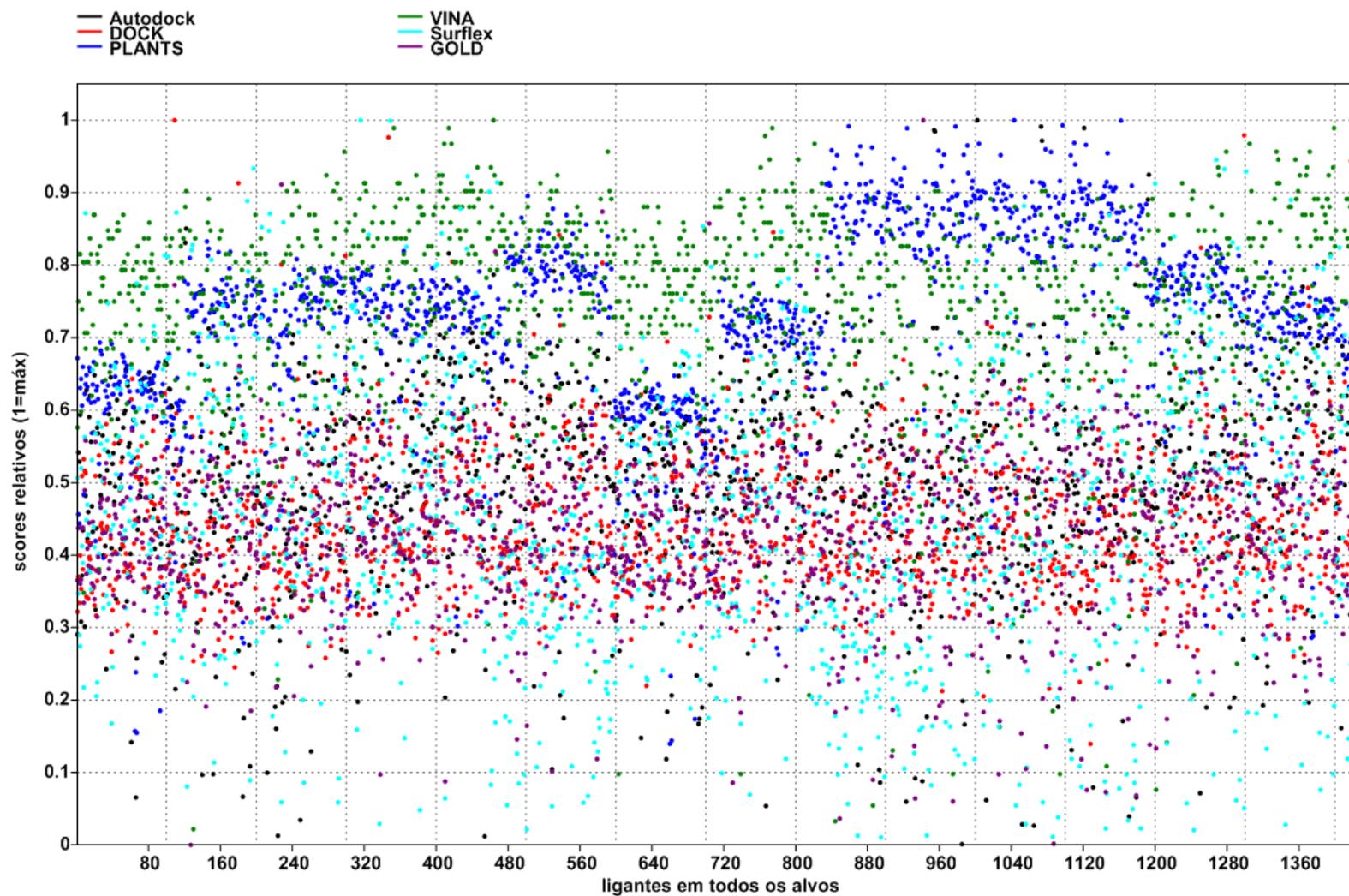


Figura 24: Gráfico de scores relativos de todos os ligantes em todos os alvos, normalizados pelo valor de máximo. Desta forma, o valor unitário é o máximo score de cada programa.

Para a visualização comparativa dos resultados de *docking*, foi construída uma figura para cada um dos doze alvos, contendo uma superposição de todos os ligantes calculados, em todos os programas, em um total de 119 ligantes x 6 programas = 714 soluções (poses) de *docking*. Em cada figura, é possível observar a estrutura do receptor (alvo) junto com todos os poses gerados para o mesmo alvo, para cada programa e para cada ligante. Estes resultados podem ser observados nas figuras de 25 a 36. Os resultados de cada programa foram coloridos nos ligantes da mesma cor, em todas as figuras: AUTODOCK (verde), DOCK (preto), GOLD (magenta), PLANTS (azul), SURFLEX (vermelho) e VINA (ciano).

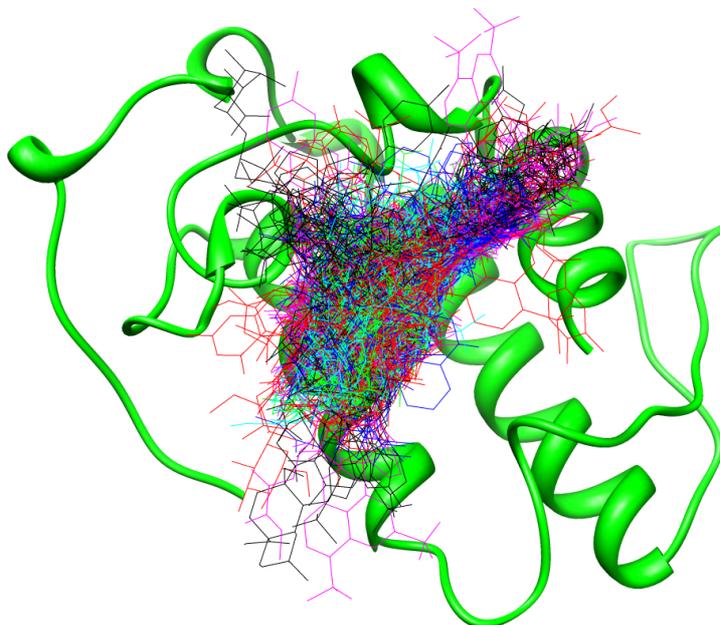


Figura 25: Estrutura do alvo 1GMZ_A no modelo ribbon, em verde. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

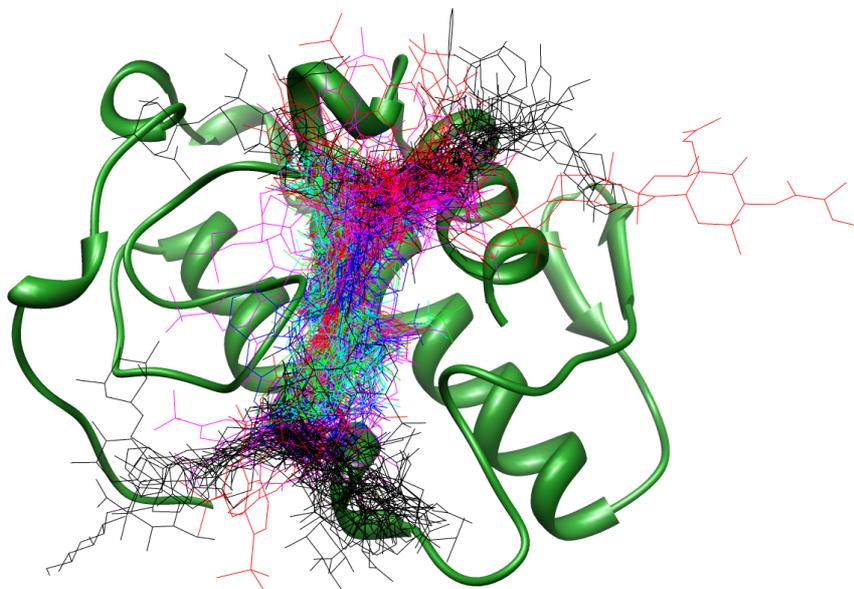


Figura 26: Estrutura do alvo 1QLL_A no modelo ribbon, em verde escuro. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

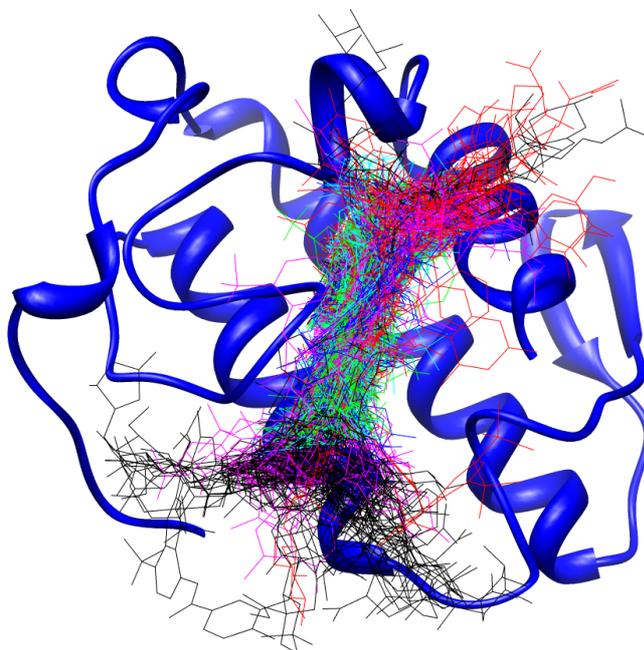


Figura 27: Estrutura do alvo 1XXS_A no modelo ribbon, em azul. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

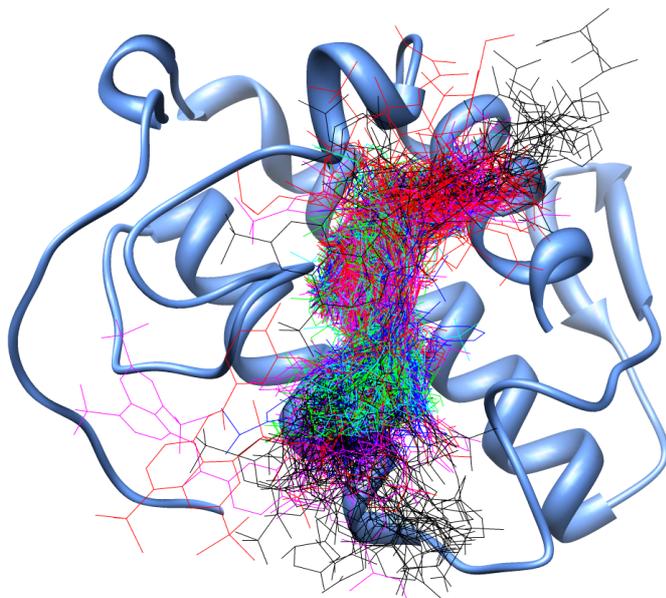


Figura 28: Estrutura do alvo 2H8I_A no modelo ribbon, em azul claro. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

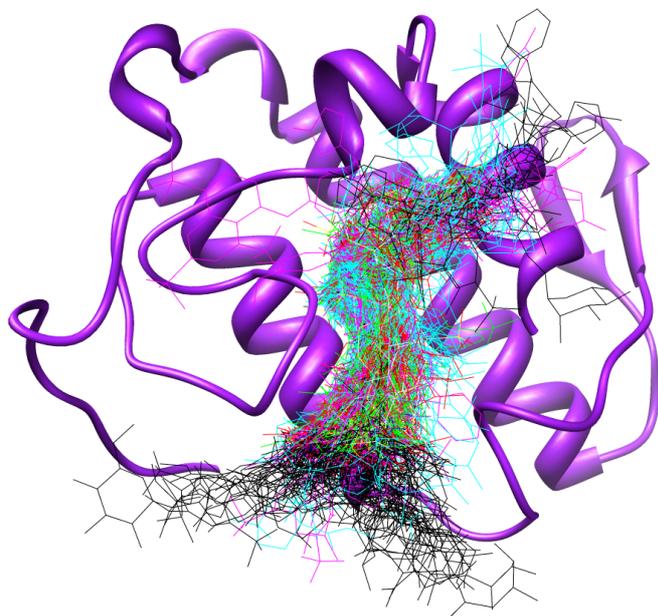


Figura 29: Estrutura do alvo 2OK9_A no modelo ribbon, em roxo. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

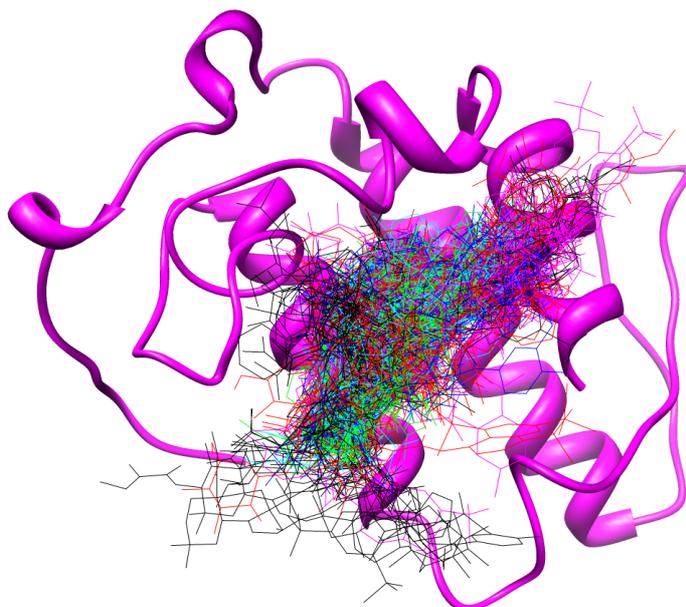


Figura 30: Estrutura do alvo 2OQD_A no modelo ribbon, em magenta. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

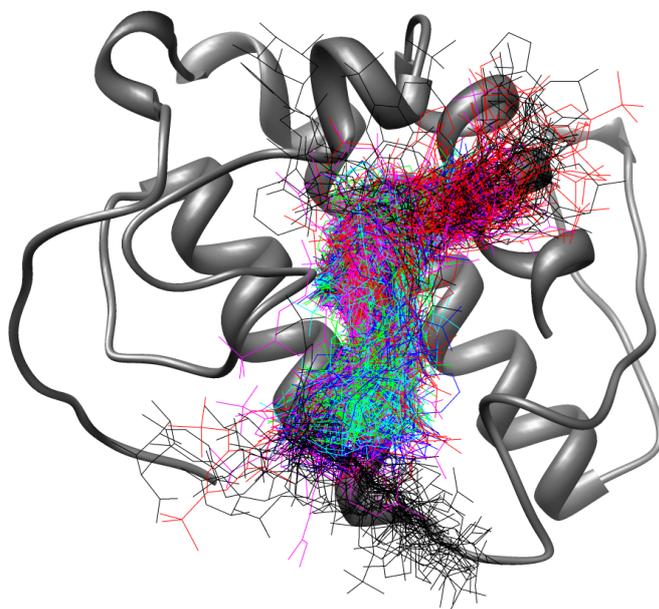


Figura 31: Estrutura do alvo 2Q2J_A no modelo ribbon, em cinza. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

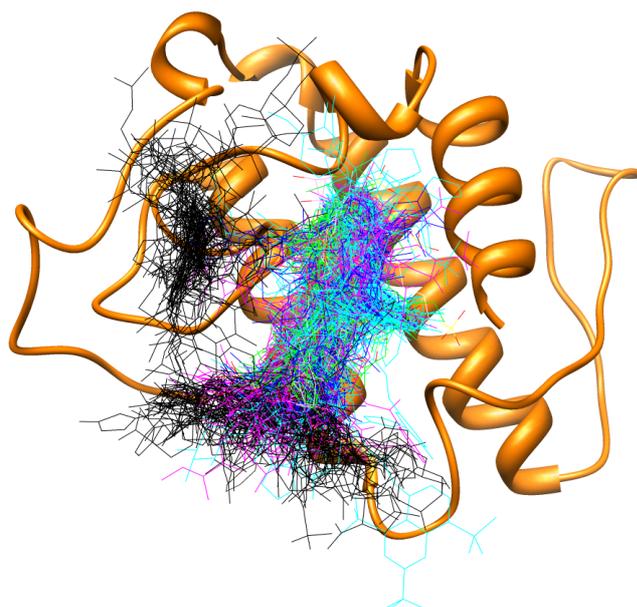


Figura 32: Estrutura do alvo 2QOG_B no modelo ribbon, em laranja. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

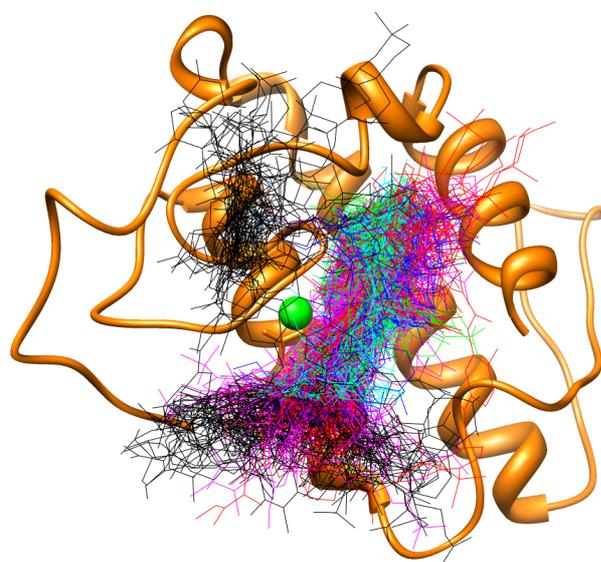


Figura 33: Estrutura do alvo 2QOG_B_Ca no modelo ribbon, em laranja. O átomo de cálcio está representado por uma esfera na cor verde. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

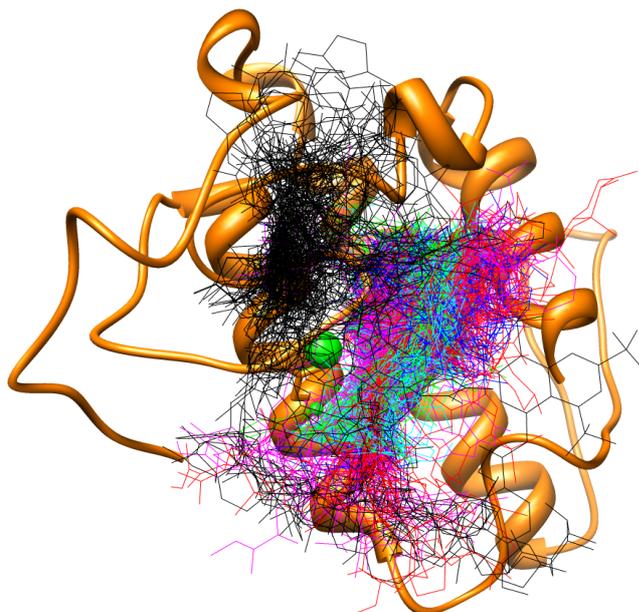


Figura 34: Estrutura do alvo 2QOG_B_Ca_HOH188 no modelo ribbon, em laranja. O átomo de cálcio está representado pela maior esfera na cor verde e o átomo de oxigênio da molécula de água pela esfera menor. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

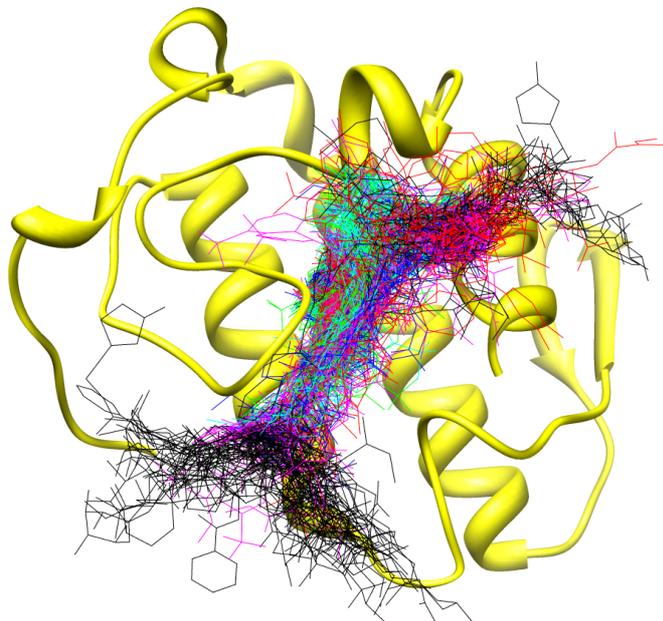


Figura 35: Estrutura do alvo 3I03 no modelo ribbon, em amarelo. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

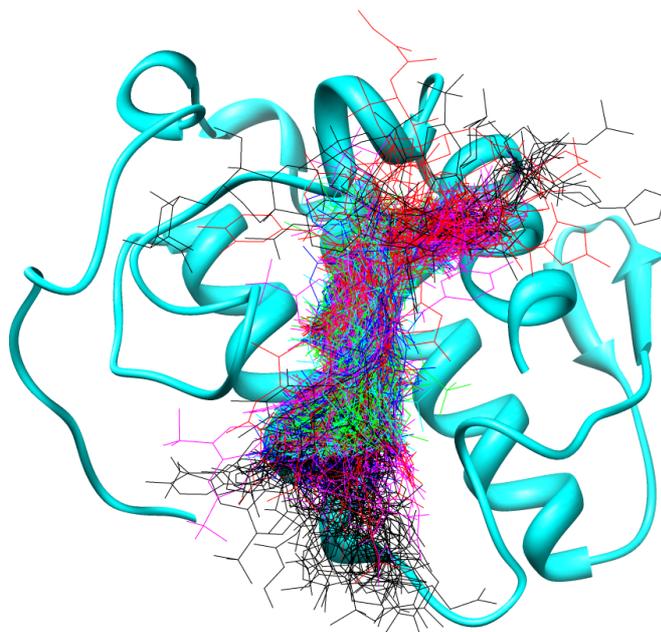


Figura 36: Estrutura do alvo 3MLM_A no modelo ribbon, em ciano. Em wire na cor verde os poses gerados com o programa AUTODOCK. Em wire na cor preta os poses gerados com o programa DOCK. Em wire na cor magenta os poses gerados com o programa GOLD. Em wire na cor azul os poses gerados com o programa PLANTS. Em wire na cor vermelha os poses gerados com o programa SURFLEX. Em wire na cor ciano os poses gerados com o programa AUTODOCK VINA.

A classe das sPLA₂s, é uma classe com estrutura molecular bastante conservada, o que justifica um certo padrão dos resultados de *docking* entre as enzimas utilizadas. A semelhança estrutural entre as PLA₂ (alvos dos cálculos de *docking*) pode ser melhor observada na figura 37, onde está mostrado o alinhamento tridimensional das estruturas provenientes do banco de dados PDB.

Também foi feito o alinhamento múltiplo de sequências das PLA₂s, utilizando-se o programa ClustalX (THOMPSON, J. et al., 1997), com parâmetros padrão. Os resultados podem ser observados na figura 38, onde é possível observar que as sequências são muito parecidas, ou seja, apresentam alta homologia. A PLA₂ Cro, sob o código 2QOG_B é a que possui a estrutura mais diferente em relação as outras, isso se deve ao fato de pertencer ao gênero *Crotalus*, enquanto as outras pertencem ao gênero *Bothrops*.

É importante observar que o alvo 2QOG aparece apenas uma vez tanto no alinhamento tridimensional, quanto no alinhamento de sequências, totalizando, portanto 10 sequências e estruturas nestes alinhamentos. O número total de alvos que aparecem nos resultados de *docking* é 12, pois o alvo 2QOG é usado de 3 formas diferentes (2QOG_B, 2QOG_B_Ca e 2QOG_B_Ca_HOH188), com e sem o íon cálcio e a molécula de água número 188, como já foi descrito na metodologia.

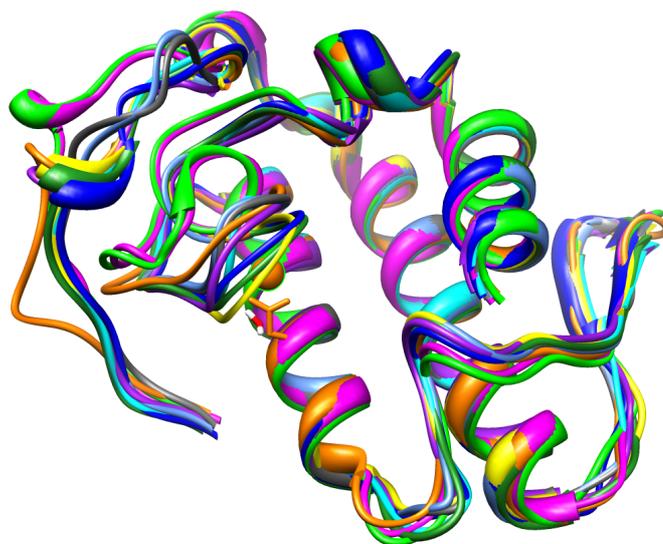


Figura 37: Alinhamento das estruturas tridimensionais das PLA₂s (alvos). Em verde o alvo 1GMZ_A, em verde escuro o alvo 1QLL_A, em Azul o alvo 1XXS_A, em azul claro o alvo 2H8I_A, em roxo o alvo 2OK9, em magenta o alvo 2OQD_A, em cinza o alvo 2Q2J_A, em laranja o alvo 2QOG_B, em amarelo o alvo 3I03 e em ciano o alvo 3MLM.

Um ponto de grande importância na análise de um programa de *docking* é a sua performance ou demanda computacional. Em ensaios de *virtual screening*, onde são utilizados milhares de ligantes, como tipicamente é feito pela grande indústria farmacêutica mundial (“big pharma”), é necessário optar por um programa que seja capaz de realizar os cálculos rapidamente, mantendo-se a mínima precisão necessária nos resultados.

Neste sentido, foi feita uma análise comparativa de demanda computacional para os seis programas utilizados neste trabalho. Os tempos absolutos, em segundos, necessários para realizar os cálculos em cada alvo, podem ser observados na tabela 4.

```

* :.:** ** * . * *** ** *:* *****:*.*** *.: *..* *.*** :. * **:. * :.:****:..* *..* **: * :. * :. *
20K9_A SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLTYNKLYRY-HLKPFCKK-ADDC 121
2Q2J_A SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLTYNKLYRY-HLKPFCKK-ADDC 121
1QLL_A SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLTYNKLYRY-HLKPFCKK-ADDC 121
2H8I_A SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLTYNKLYRY-HLKPFCKK-ADDC 121
3I03_A SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLTYNKLYRY-HLKPFCKK-ADDC 121
3MLM_A SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLTYNKLYRY-HLKPFCKK-ADDC 121
1XXS_A SLFELGKMILQETGKNPAKSYGVYGCNCGVGGGRGKPKDATDRCCYVHKCCYKKLTGCNPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENLTYNKLYRY-NYLPACKK-ADDC 122
1GMZ_A DLWQFGKMLKETGKLPFPYVVTYGCYCGVGGGRGKPKDATDRCCFVHDCCYGKLTSCPKKTDYSYSRDKGTIVCGENPCPKELCECDKAAAVCFRENLTYNKLYRY-YLKSCLKKXADD 122
2Q0D_A DLWQFGKMLKETGKLPFPYVVTYGCYCGVGGGRGKPKDATDRCCFVHDCCYGKLTSCPKKTDYSYSRENGVIIICGEGTPCEKQICECDKAAAVCFRENLTYNKLYRY-YLKSCLKKXADD 122
2Q0G_B HLLQFNKMIKFETRKNAPFVAFYGCYCGVGGGRGKPKDATDRCCFVHDCCYGKLAQNTKWDIVPYSLSGYITCGKGTWCEEQICECDRVAEECLRRSLSTYKYGYMF-YPDSRCRGPSET 122
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120...

```

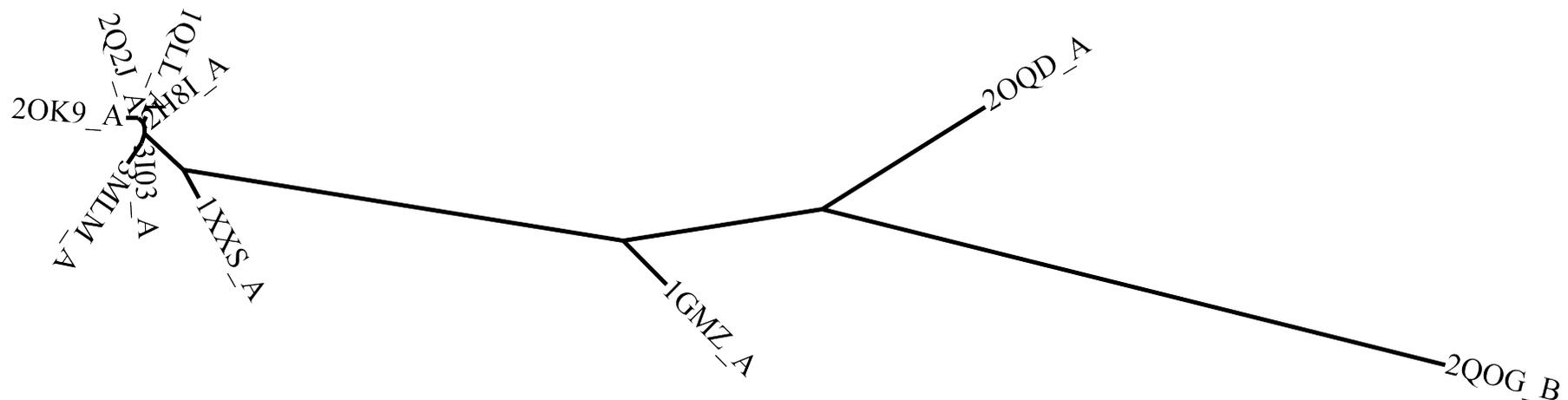
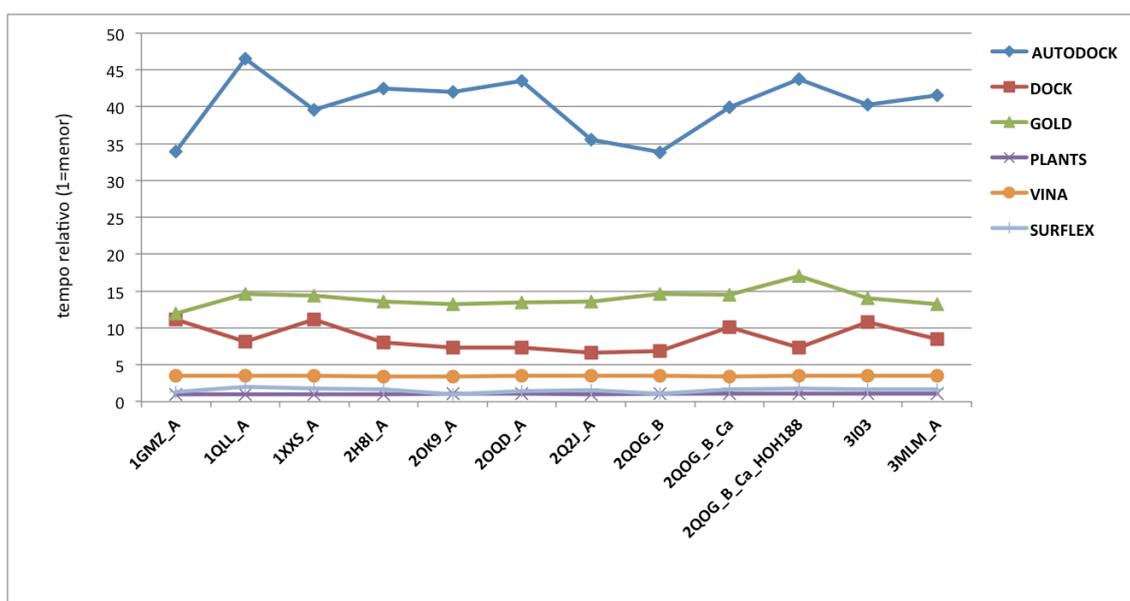


Figura 38: Na parte superior, está apresentado o alinhamento múltiplo de seqüências das PLA2s utilizadas como alvos nos cálculos de *docking*. Na parte inferior da figura, está apresentada a árvore de agrupamento, no formato circular (radial).

Tabela 4: Tempos totais em segundos para cada programa.

	AUTODOCK	DOCK	GOLD	PLANTS	VINA	SURFLEX
1GMZ_A	65027	21291	22909	1973	6648	2460
1QLL_A	89347	15671	27956	1918	6657	3900
1XXS_A	75915	21337	27524	1968	6776	3480
2H8I_A	81481	15503	26157	1940	6589	3120
2OK9_A	80621	14117	25397	1994	6551	1920
2OQD_A	83510	14042	25941	2006	6772	2700
2Q2J_A	68259	12719	26116	1965	6699	3060
2QOG_B	64988	13110	28064	2078	6650	2160
2QOG_B_Ca	76681	19450	27879	2039	6635	3300
2QOG_B_CaW	84078	13975	32768	2060	6658	3420
3I03	77404	20824	26862	2015	6784	3300
3MLM_A	79715	16238	25327	2035	6674	3180

O programa PLANTS acompanhado de perto pelo SURFLEX, liderou os resultados no quesito performance, como é melhor observado no gráfico de tempo relativo da figura 39. Para obter este gráfico, os tempos (em segundos) da tabela 4 foram todos divididos pelo menor tempo de todos (SURFLEX, alvo 2OK9_A), de tal forma que é possível verificar quantas vezes cada cálculo foi mais demorado do que o cálculo mais rápido, definido pelo valor 1 no gráfico da figura 39.

**Figura 39:** Gráfico de tempo relativo entre os programas de *docking* para cada alvo utilizado.

É importante destacar alguns resultados obtidos para as moléculas que apresentaram divergências estruturais no momento da construção do Banco de Dados inicial, como foi descrito na metodologia. Como exemplo, a molécula *Petrosaspongiolide M*, onde na estrutura obtida do PubChem existe uma instauração no anel de cinco membros, não presente na estrutura do artigo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010).

Essa alteração gera uma modificação nos tipos de átomos (“atom types”) da molécula, que tem influência direta no cálculo da função de pontuação, por causa dos diferentes parâmetros do campo de força para estes diferentes tipos de átomos.

Consequentemente, serão geradas soluções de *docking*(*poses*) diferentes, refletindo nos valores de scores atribuídos a cada *pose*.

Então, essa alteração aparentemente pouco significativa, foi capaz de produzir grandes diferenças entre os resultados de *docking*, como pode ser observado nos valores de score obtidos com o programa AUTODOCK. Com o alvo 2QOG, particularmente, foram observadas diferenças de score de até 5 unidades de Kcal/mol, como pode ser melhor observado no gráfico da figura 40 e na figura 41, que mostra os dois *poses* com maior discrepância energética. Uma simples alteração ou um erro do usuário na construção da estrutura molecular pode comprometer a fidelidade do cálculo de *docking*.

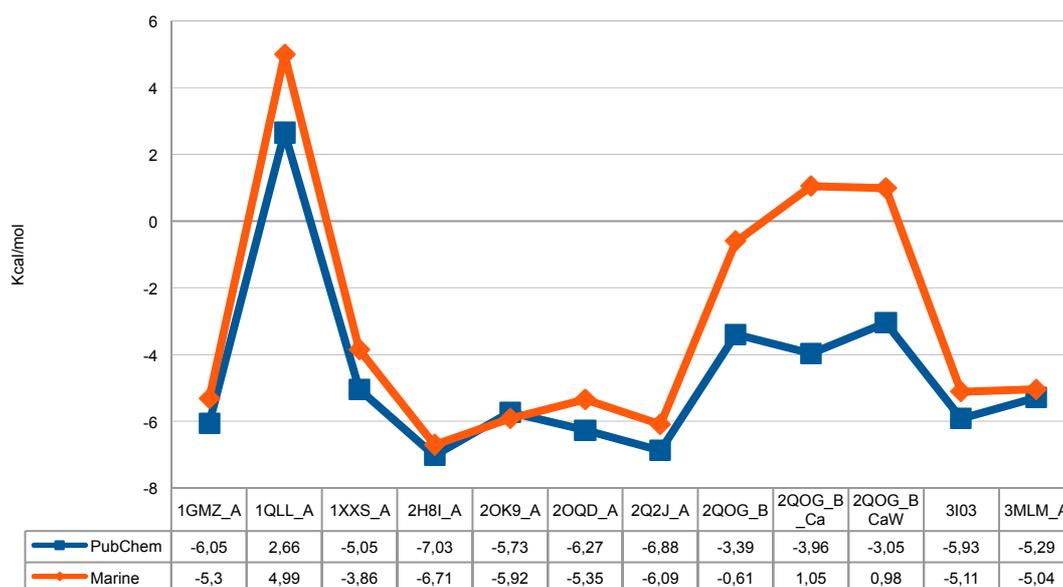


Figura 40: Valores de score (Kcal/mol) para os resultados de *docking*, obtidos com o programa AUTODOCK, para as duas estruturas da molécula *Petrosaspongiolide M*. Uma estrutura foi obtida a partir do PubChem e outra do artigo sobre produtos marinhos naturais (FOLMER et al., 2010).

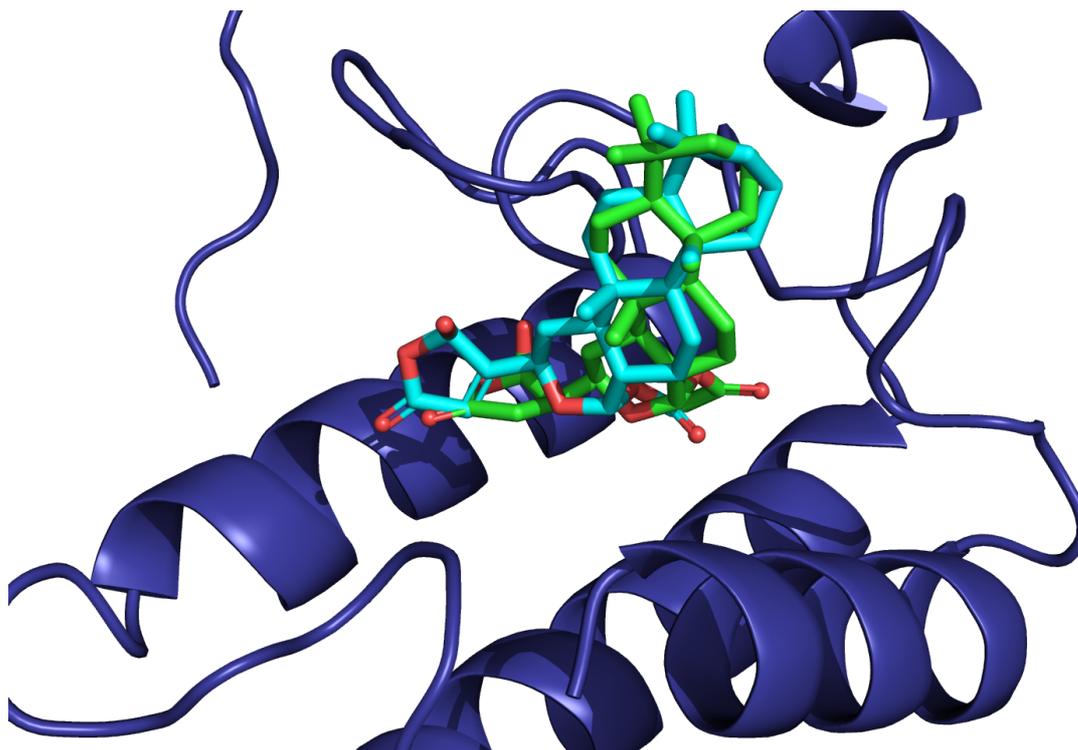


Figura 41: Resultados de *docking* da molécula *Petrosaspongiolide M* no alvo 2QOG_Ca obtido pelo programa AUTODOCK. Em ciano a estrutura extraída do PubChem com uma insaturação no anel de 5 membros e em verde a estrutura sem a insaturação, extraída do arquivo sobre produtos naturais marinhos (FOLMER et al., 2010) A estrutura com a insaturação obteve uma energia de -3,96 Kcal/mol enquanto a outra obteve uma energia de 1,05 Kcal/mol.

Vale salientar que este tipo de análise realizado para a molécula *Petrosaspongiolide M* também poderia ser estendida para as demais moléculas que apresentaram discrepâncias. Este exemplo foi utilizado aqui, apenas para demonstrar o efeito que a diferença nas estruturas pode causar nos resultados de *docking*.

Como o conjunto de moléculas utilizado nesse estudo não possui dados de *binding* em quantidade representativa, não é possível fazer a comparação dos scores com os resultados de *binding*.

5.3 Resultados de comparação das interações intermoleculares presentes nos complexos ligante-alvo

Fazendo-se uso do programa Binana (DURRANT; MCCAMMON, 2011), foram obtidos os resultados de comparação das interações intermoleculares identificadas para cada complexo ligante-alvo, para os 8568 (119 ligantes x 12 alvos x 6 programas) cálculos de *docking* realizados. A tabela com as interações é composta por seis atributos: Ligações de hidrogênio, contatos hidrofóbicos, pontes salinas, interações pi-pi, interações pi em "T" e interações cátion-pi.

Além dos dados utilizados para gerar a tabela, o programa também gera os arquivos de script para visualização com o programa VMD, "visual molecular dynamics" (HUMPHREY et al., 1996). O arquivo já possui todas as informações necessárias para visualizar as interações. Diante da grande quantidade de

resultados de *docking*, não é possível visualizar todos os 8568 resultados obtidos com o programa Binana.

Dessa forma, foi selecionado o cálculo entre a molécula Cinarina e o alvo 3MLM_A, realizado pelo programa SURFLEX, para demonstrar o potencial de análise e inspeção visual com o programa VMD. Na figura 42 é possível ver em destaque a hidroxila da molécula Cinarina e, próximo a ela, um átomo de oxigênio do alvo 3MLM_A, também em destaque, caracterizando uma ligação de hidrogênio intermolecular.

Também foi possível verificar a existência de contato hidrofóbicos, onde foram destacados os átomos de carbono que participam dessas interações (ver figura 43). O programa Binana também destacou interações entre anéis aromáticos paralelos e classificou como interação pi-pi. Como é possível observar na figura 43. A molécula Cinarina foi selecionada por possuir os 3 tipos de interações apresentados, podendo essa análise ser realizada para qualquer um dos outros resultados.

O Binana com o VMD, juntos, realizam uma análise bastante completa de um resultado de *docking*. Porém ainda não é capaz de analisar todos os resultados do estudo de uma forma global.

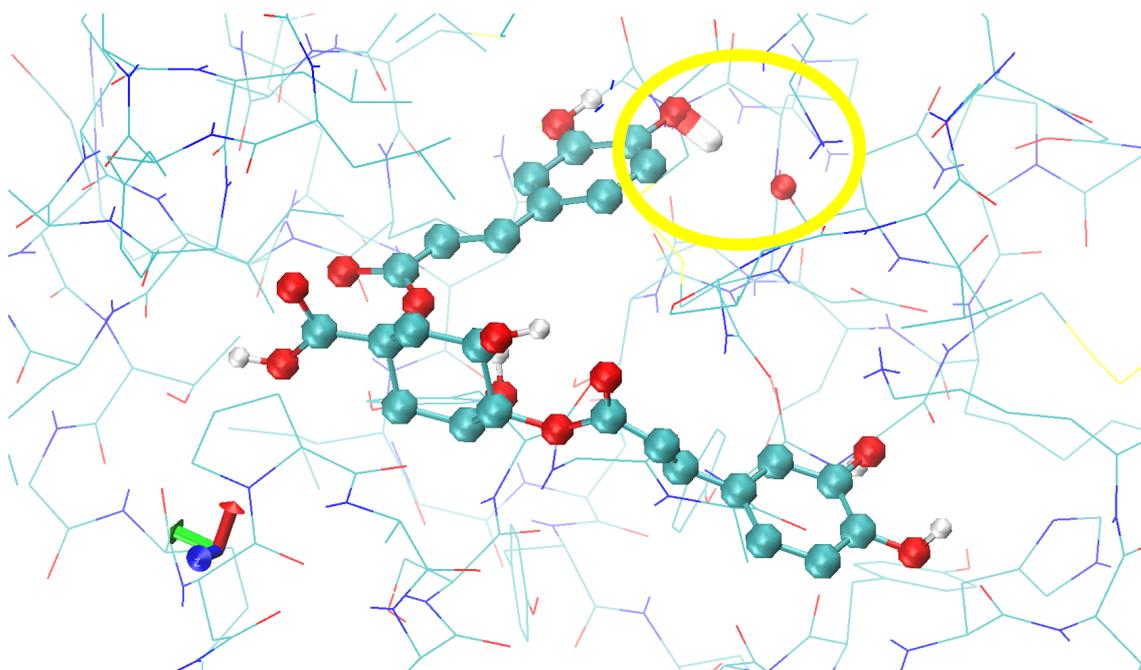


Figura 42: Estrutura tridimensional do complexo formado pelo *docking* realizado com o programa SURFLEX, para a molécula Cinarina e o alvo 3MLM_A. Em destaque a ligação de hidrogênio intermolecular. Imagem gerada com o programa VMD (HUMPHREY et al., 1996).

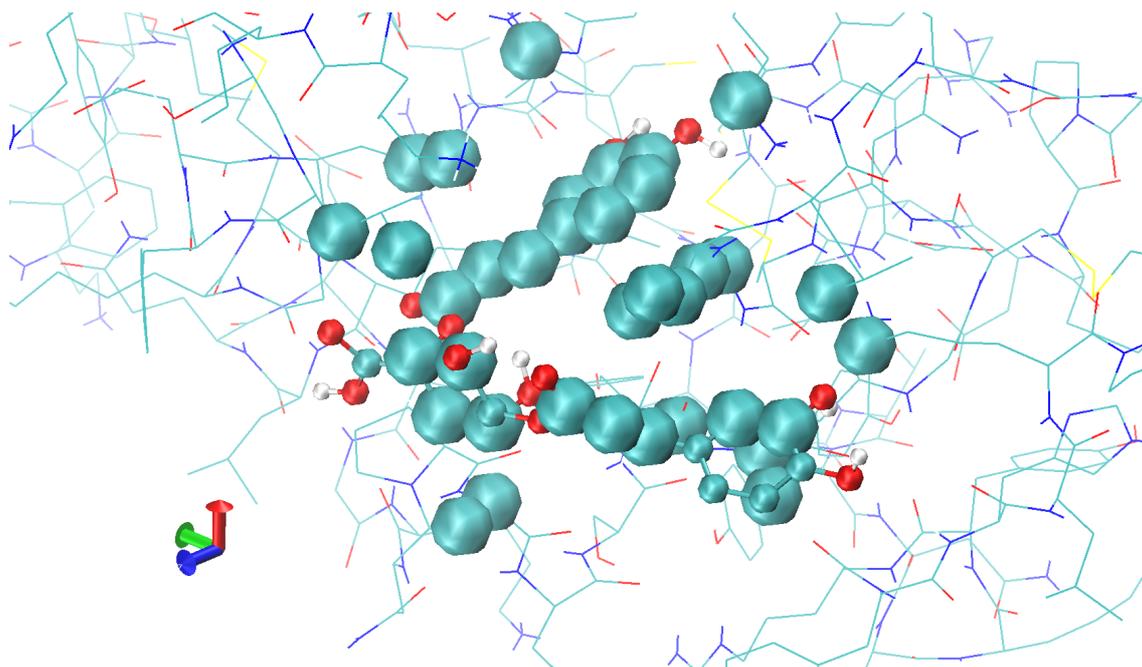


Figura 43: Estrutura tridimensional do complexo formado pelo *docking* realizado com o programa SURFLEX, para a molécula Cinarina e o alvo 3MLM_A. Em destaque os contatos hidrofóbicos intermoleculares. Imagem gerada com o programa VMD (HUMPHREY et al., 1996).

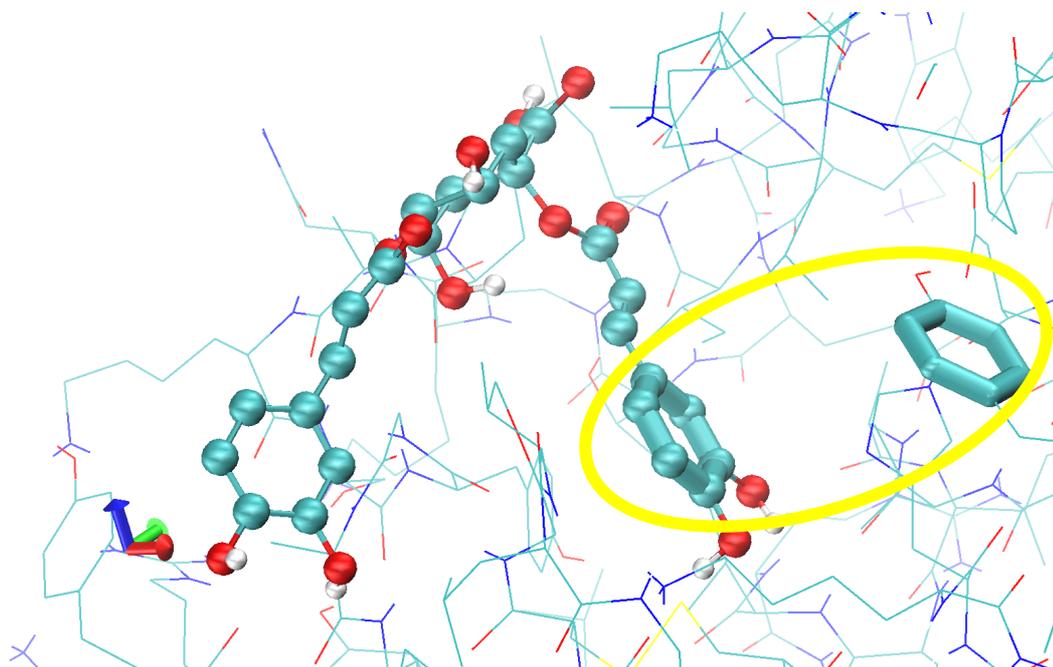


Figura 44: Estrutura tridimensional do complexo formado pelo *docking* realizado com o programa SURFLEX, para a molécula Cinarina e o alvo 3MLM_A. Em destaque a interação pi-pi intermolecular entre os anéis aromáticos paralelos. Imagem gerada com o programa VMD (HUMPHREY et al., 1996).

5.4 Resultados de análises multivariadas sobre os múltiplos resultados de *docking* realizados

Como descrito na seções 4.5.1 e 4.5.2 da Metodologia, foi utilizado o programa PAST (HAMMER et al., 2001) para a realização de dois tipos de análises estatísticas multivariadas, Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Hierárquica de Clusters (HCA). Estas análises foram realizadas na tentativa de observar agrupamentos espontâneos presentes entre as amostras (cálculos de *docking*) do conjunto de dados utilizado.

5.4.1 Análise multivariada das interações intermoleculares quantificadas com o programa Binana

A primeira análise diz respeito ao número de interações intermoleculares identificadas através da utilização do programa Binana. Analisando a quantidade de ligações de hidrogênio encontradas nos diversos complexos formados por cada programa, foi possível observar uma grande aproximação entre os resultados obtidos com o programa AUTODOCK e AUTODOCK VINA, no dendograma construído a partir da Análise Hierárquica de Clusters (HCA), como pode ser observado na Figura 45. O programa GOLD também está próximo dos dois anteriores. Dessa forma, estes 3 programas baseados em algoritmo genético estão mais próximos entre si, do que os programas com base em outros algoritmos.

No caso das interações HC (contatos hidrofóbicos), também é possível observar a aproximação dos programas AUTODOCK e AUTODOCK VINA. O programa DOCK foi o programa que obteve os resultados mais distintos em relação a esse tipo de interação (ver o dendograma da figura 46).

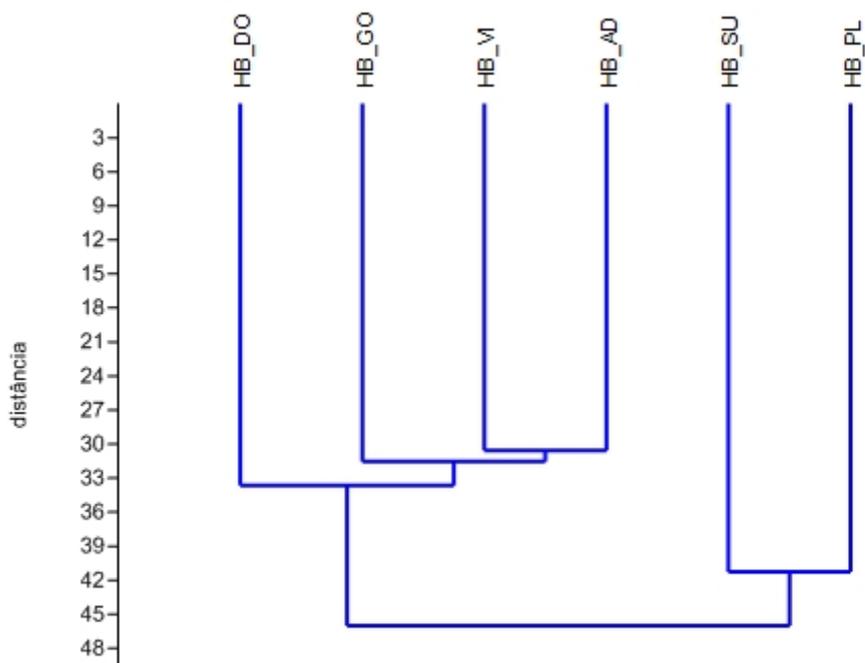


Figura 45: Dendrograma obtido a partir da Análise Hierárquica de Clusters (HCA) para as interações HB (ligação de hidrogênio). Programas: DOCK (DO), GOLD (GO), VINA (VI), AUTODOCK (AD), SURFLEX (SU) e PLANTS (PL).

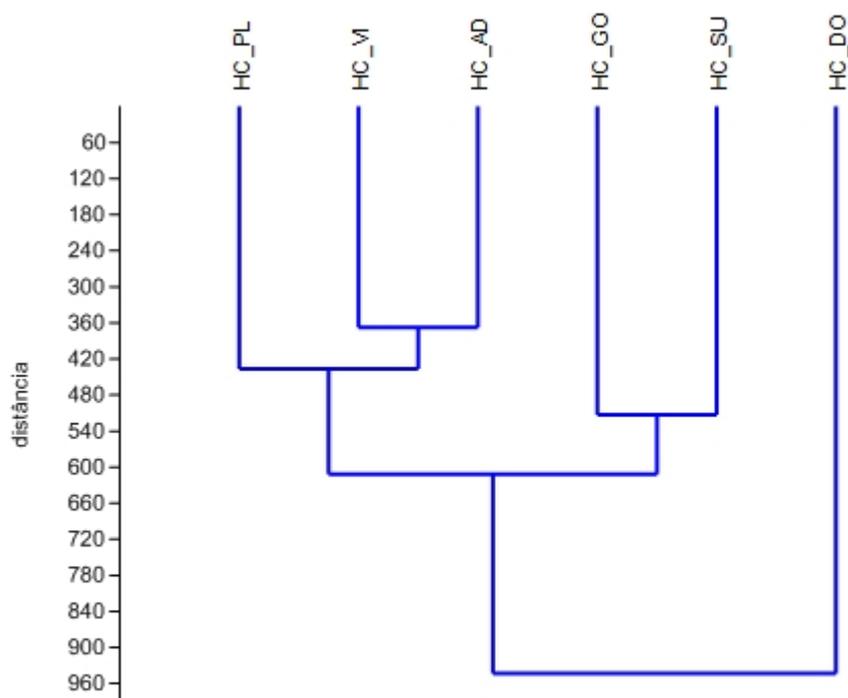


Figura 46: Dendrograma obtido a partir da Análise Hierárquica de Clusters (HCA) para as interações HC (contatos hidrofóbicos). Programas: DOCK (DO), GOLD (GO), VINA (VI), AUTODOCK (AD), SURFLEX (SU) e PLANTS (PL).

É importante salientar que este tipo de análise multivariada, utilizando Análise Hierárquica de Clusters (HCA), pode ser realizado com os outros tipos de interação identificados e quantificados pelo programa Binana. Estão mostrados aqui apenas 2 exemplos de aplicação.

5.4.2 Análise multivariada das posições de *docking* (poses) obtidas para a molécula Quercetina

O objetivo principal destas análises de PCA e HCA sobre as coordenadas dos átomos das moléculas encontradas como soluções (*poses*) de *docking* é estabelecer um formalismo matemático (estatístico) multivariado para fazer a análise comparativa destas geometrias (*poses*) obtidas como resultados dos cálculos de *docking*. Desta forma, enquanto estas análises aqui apresentadas descreverem os resultados de maneira matemática (estatística), as figuras 25 a 36 oferecem um subsídio gráfico, visual, para o mesmo tipo de análise comparativa.

Nesta análise multivariada, foram utilizadas as coordenadas (X,Y,Z) das geometrias (*poses*) obtidas como resultados de *docking* usando os programas DOCK, GOLD e PLANTS, para a molécula de Quercetina em todos os alvos. A molécula Quercetina foi escolhida para exemplificar este tipo de análise por ter sido o foco principal do trabalho que foi publicado (ver no apêndice), mas este tipo de análise multivariada dos *poses* poderia ser aplicado para os demais resultados de *docking*, envolvendo os outros ligantes e os outros alvos. Foi aplicado um estudo de PCA e também uma análise de HCA no mesmo conjunto de dados, ambos utilizando o programa PAST (HAMMER et al., 2001).

É possível observar a dispersão dos valores nas coordenadas (X,Y,Z) dos diversos átomos da molécula Quercetina, para os programas citados, nas figuras 47 e 46.

Na figura 48, é possível observar que os átomos de carbono e oxigênio que compõem os anéis da Quercetina, são os átomos que menos variam sua posição nos eixos (X,Y,Z).

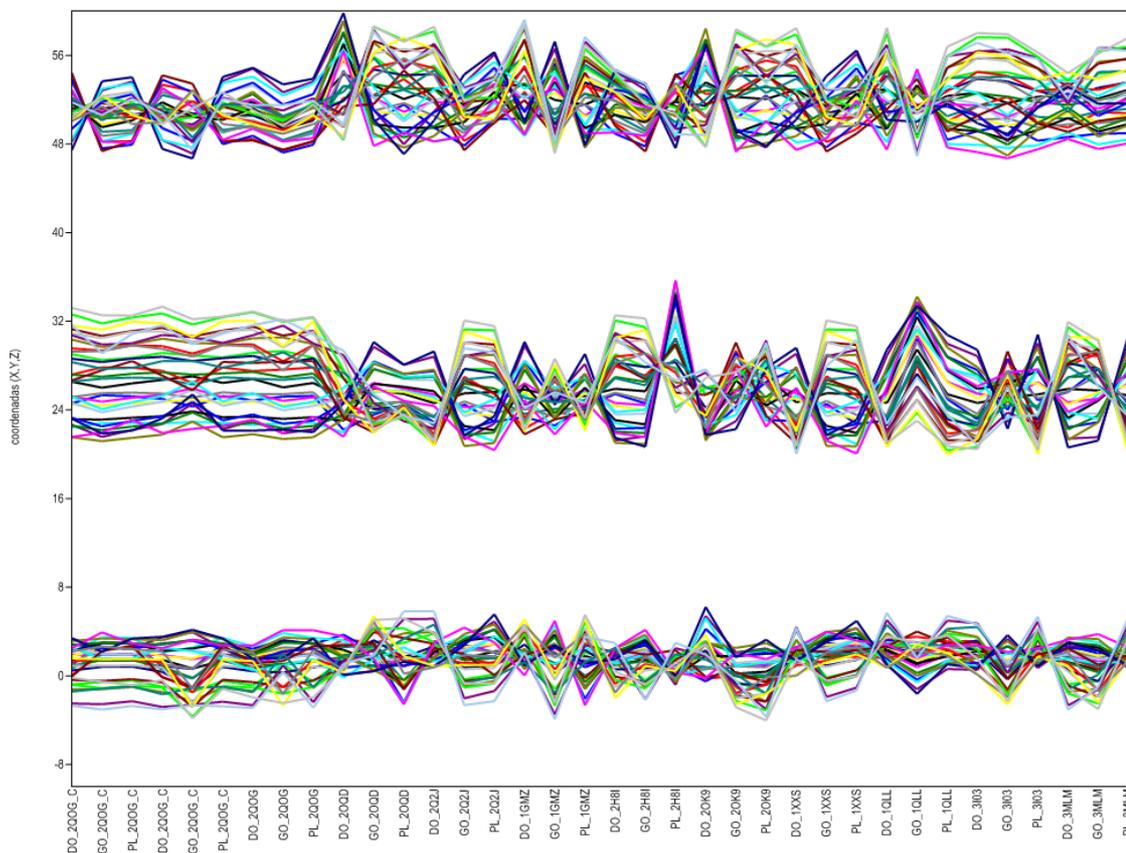


Figura 47: Dispersão de valores, em angstroms(Å), para as coordenadas (X,Y,Z) dos átomos da Quercetina, obtidas com os programas DOCK (DO), GOLD (GO) e PLANTS (PL), para os diferentes alvos. Em cima os valores para a coordenada Z, no meio, X, e na parte de baixo, Y.

variações desse alvo bem distantes entre si, demonstrando a forte influência tanto da presença do átomo de Ca^{2+} , quanto da molécula de água, nos seus resultados.

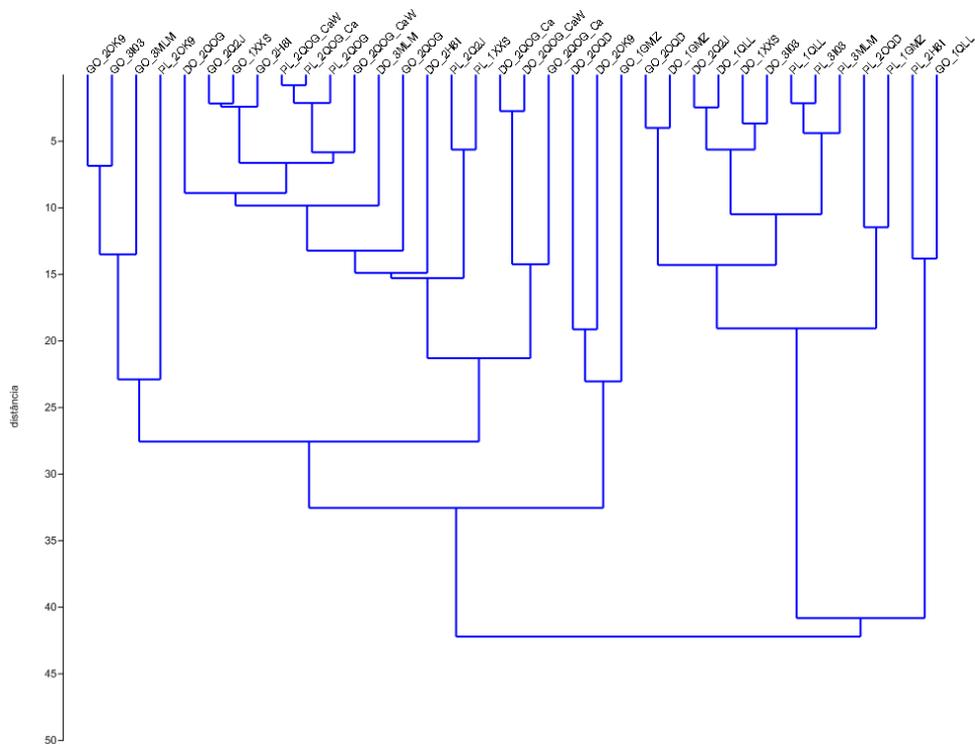


Figura 49: Dendrograma da HCA realizada sobre os valores das coordenadas (X,Y,Z) dos átomos da molécula Quercetina, obtidas com os programas DOCK (DO), GOLD (GO) e PLANTS (PL), para todos os doze alvos.

Para complementar o estudo multivariado, foi realizado um estudo de PCA sobre as coordenadas (X,Y,Z) dos átomos da Quercetina, onde foi possível observar, no gráfico de *scores* da PCA (ver figura 50) que os pontos próximos entre si, representam moléculas com coordenadas também bastante semelhantes, ou seja, resultados de *docking* (pose) bem próximos no espaço tridimensional.

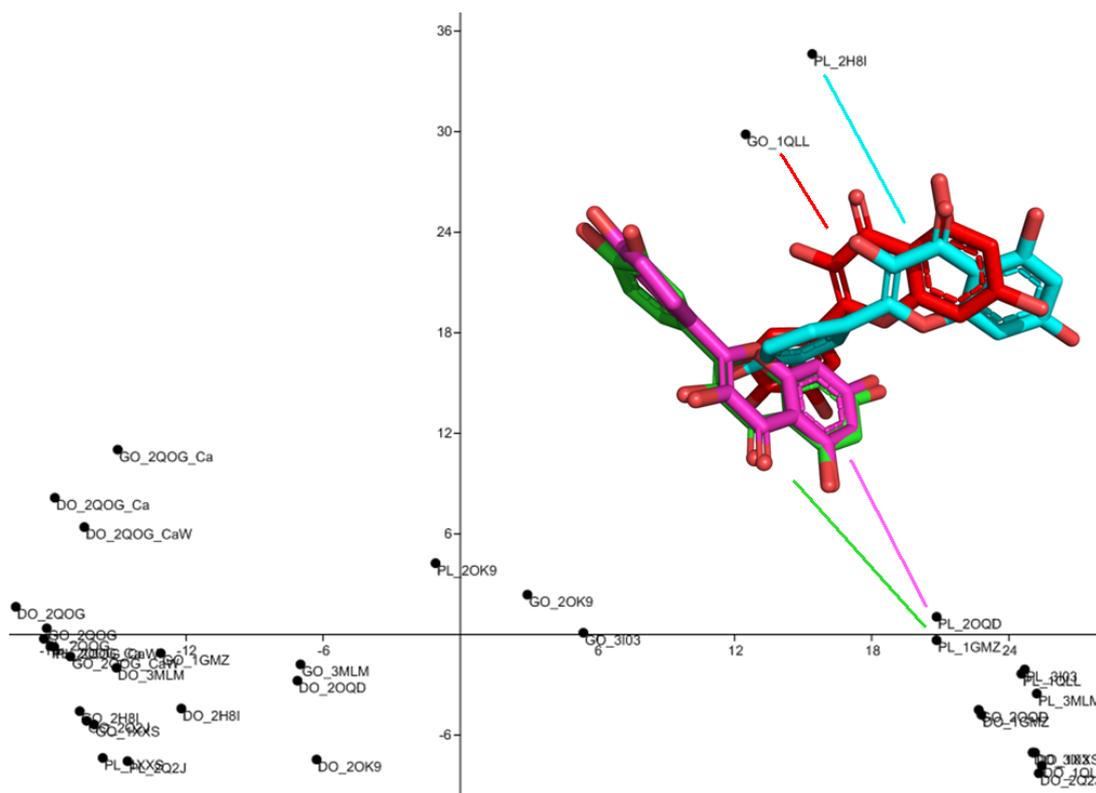


Figura 50: Gráfico de *scores* da PCA realizada sobre os valores das coordenadas (X,Y,Z) dos átomos da molécula Quercetina, obtidas com os programas DOCK (DO), GOLD (GO) e PLANTS (PL), para todos os doze alvos. O eixo horizontal representa a primeira componente principal (PC1) e o vertical, a segunda componente principal (PC2). Em destaque, utilizando 4 cores diferentes, estão representados os 4 resultados de *docking* (4 poses) que são encontrados nos pontos apontados no gráfico de *scores*, para efeito de comparação visual (molecular) e comparação numérica (PC1 e PC2).

5.5 Análise Global dos Melhores Resultados de *Docking*

Para complementar a análise realizada neste trabalho, foram selecionados os resultados de cálculo que mais se destacaram em cada programa, para uma inspeção mais detalhada. O programa PyMol (SCHODINGER) foi utilizado para realizar a análise e gerar as figuras. A lista dos melhores resultados para cada programa pode ser vista na tabela 5.

Tabela 5: Tabela com os melhores resultados selecionados para cada programa.

Programa	Ligante	Alvo	Scores
AUTODOCK	Ácido Aristolóquico 1	Crotoxin B (Ca ²⁺ HOH188)	-10,0
VINA	Wedelolactona Análogo A	Myotoxin II	-9,1
GOLD	Suramina	Crotoxin B	109,56
DOCK	Suramina	BthTX-I	-110,3
SURFLEX	<i>Variabilin</i>	Myotoxin II	9,46
PLANTS	Primetina	Crotoxin B (Ca ²⁺)	-36,05

Entre os resultados em que houve empate na frequência dos melhores resultados (ver histograma na figura 51), foi selecionado o ligante com valor absoluto de scores mais importante.

O histograma da figura 51 mostra que os programas apresentam resultados bem distintos entre si. Ou seja, as moléculas de melhor resultado não aparecem de forma sistemática entre os melhores resultados dos outros programas, apenas as moléculas Harpalicina I, Suramina, Hesperidina e Heparina aparecem como melhor resultado em mais de um programa.

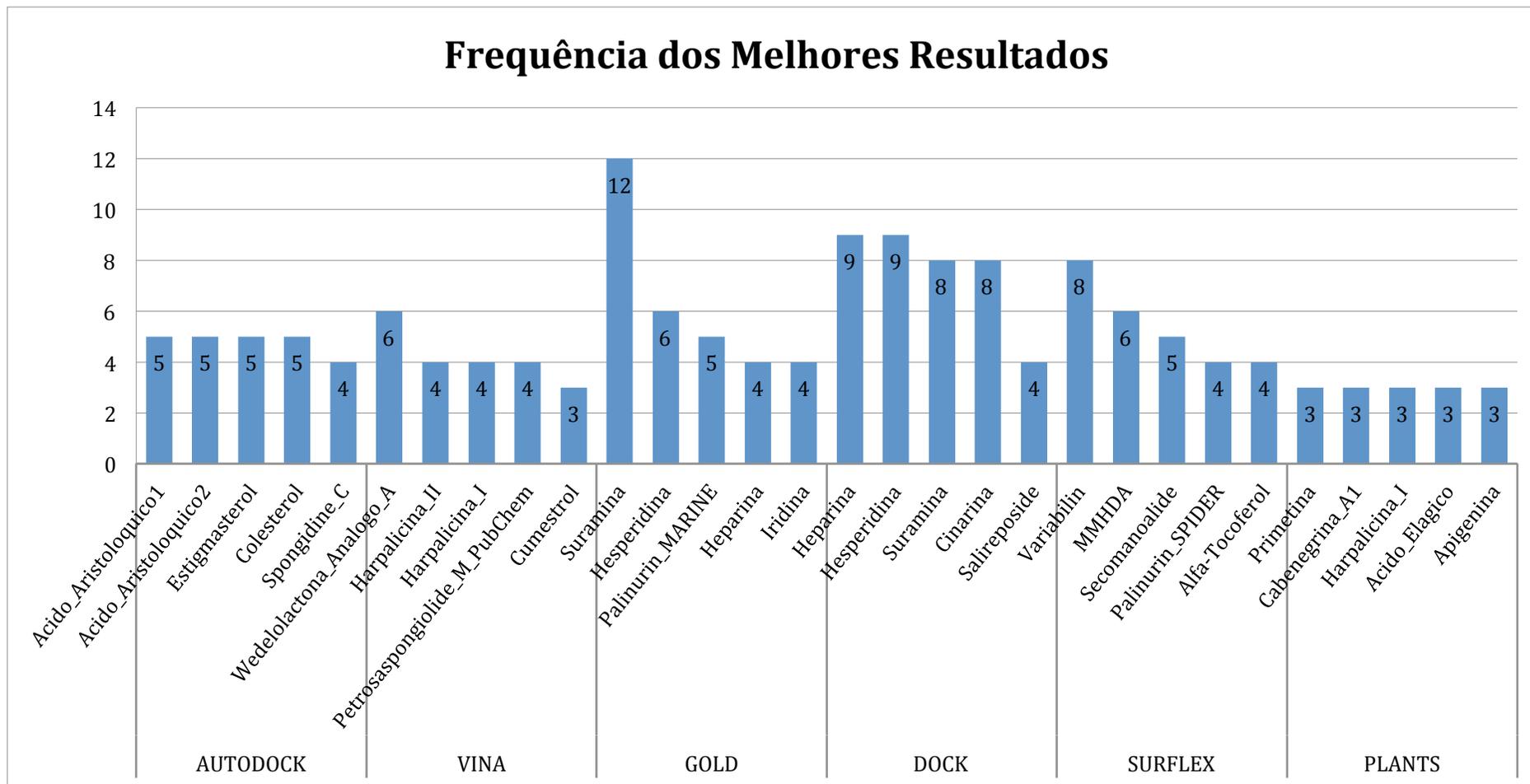


Figura 51: Histograma com a frequência dos 5 melhores ligantes entre os 50 melhores resultados, para cada programa.

5.5.1 AUTODOCK

O melhor resultado do programa AUTODOCK foi obtido no cálculo realizado entre o ligante Ácido Aristolóquico 1 e o alvo *Crotoxin B* (2QOG B Ca²⁺ HOH118), com score de -10,0. O átomo de Ca²⁺ coordena a posição do ligante formando o poliedro de coordenação, envolvendo átomos do ligante, da molécula de água e dos resíduos de aminoácido de TYR28, GLY30, GLY32 e ASP49. O que torna o átomo de Ca²⁺ fundamental para a estabilidade do complexo.

A ligação de hidrogênio com distância de 3,2 Å com o resíduo LYS61 e a ligação com a molécula de água de 2,9 Å, também contribuem para a estabilidade do complexo. Os contatos hidrofóbicos com o resíduo PHE6 também contribuem de forma positiva para a estabilidade do complexo. Ver figura 52.

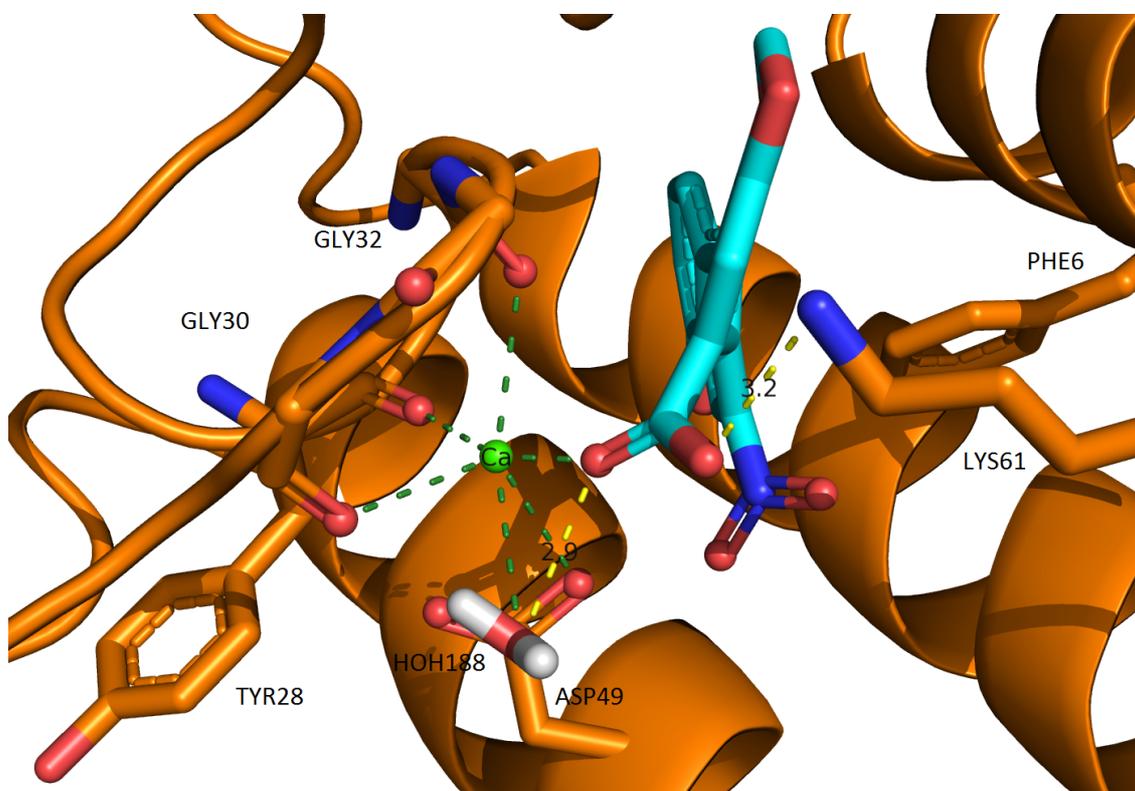


Figura 52: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa AUTODOCK, foi obtido no cálculo entre o alvo 2QOG B Ca HOH188 e o ligante Ácido Aristolóquico 1. É possível observar o poliedro de coordenação do átomo de Ca²⁺ e as ligações de hidrogênio de 3,2 Å e 2,9 Å com o resíduo LYS61 e com a molécula de água 188, respectivamente. Assim como os contatos hidrofóbicos com o resíduo PHE5.

5.5.2 AUTODOCK VINA

O programa VINA obteve o seu melhor resultado no cálculo envolvendo o ligante Wedelolactona Análogo A e o alvo *Myotoxin* (1XXS), com score de -9,1. A estabilidade do complexo pode ser explicada pela presença das ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos ALA19 e HIS48, com distâncias de 3,4 Å e 3,0 Å, respectivamente, como é possível observar na figura 53.

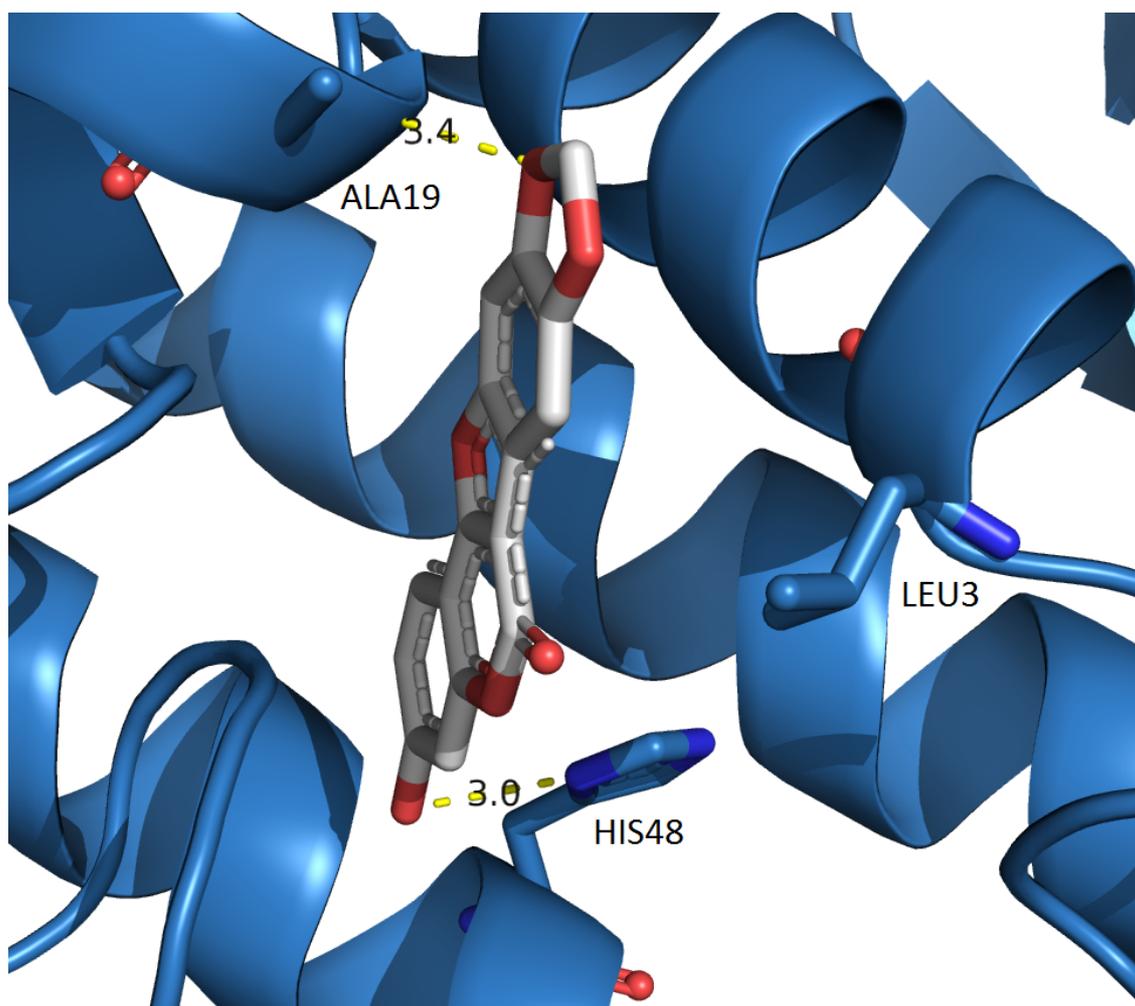


Figura 53: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa VINA, obtido no cálculo entre o alvo 1XXS e o ligante Wedelolactona Análogo A. É possível observar as ligação de hidrogênio de 3,4 Å com o resíduo de aminoácido ALA19 e com o resíduo HIS48 de 3,0 Å. Assim como contatos hidrofóbicos com o resíduo LEU3.

5.5.3 GOLD

O programa GOLD obteve o seu melhor resultado com o ligante Suramina e o alvo *Crotoxin B*, sem o átomo de Ca^{2+} e sem a presença da molécula de água 188. Atingiu um valor de score de 109,56. O complexo apresenta quatro ligações de hidrogênio descritas na tabela 6.

Tabela 6: Ligações de hidrogênio do complexo obtido no cálculo de *docking* entre o alvo *Crotoxin B* sem o átomo de Ca^{2+} e sem a molécula de água e a molécula Suramina. Realizado com o programa GOLD.

Resíduo de Aminoácido	Distância
ASN7	3,1 Å
CYS58	3,4 Å
THR60	2,5 Å
LYS61	3,5 Å
TRP62	2,8 Å

A Suramina, por ser uma molécula relativamente grande, é capaz de interagir com diversos resíduos da PLA₂. Essa característica aumenta a possibilidade de formação de um numero maior de ligações de hidrogênio, como é possível observar na tabela 6 e na figura 54.

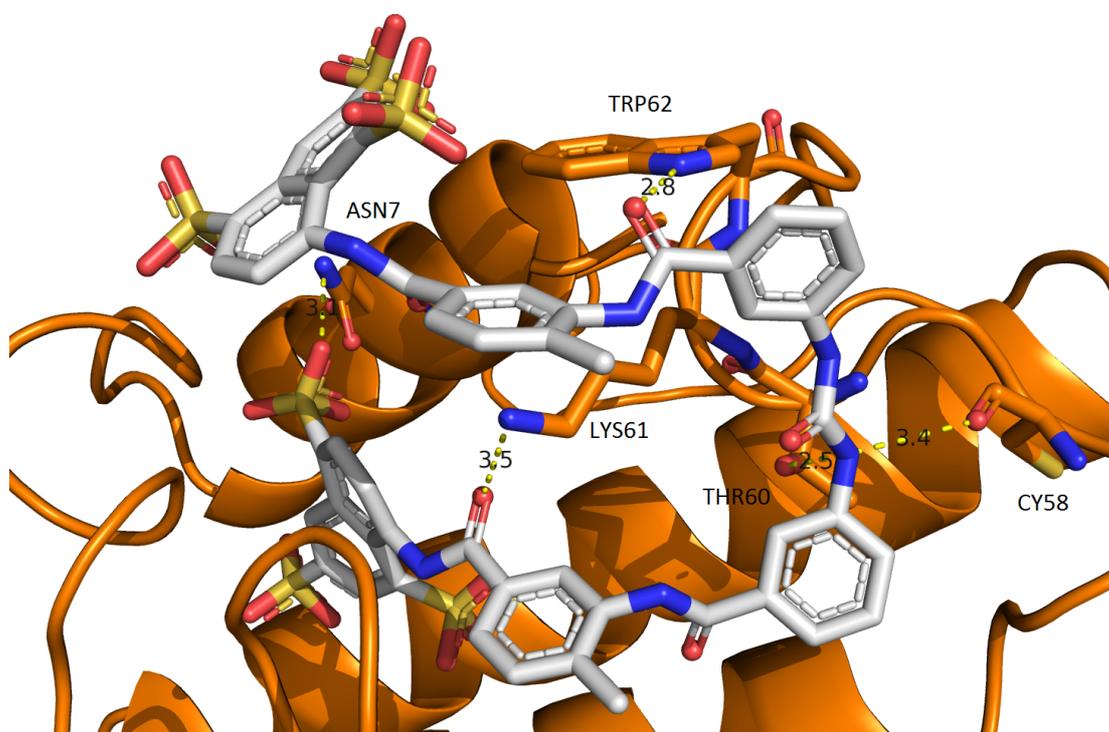


Figura 54: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa GOLD, obtido no cálculo entre o alvo 2QOG B e o ligante Suramina. Ligações de hidrogênio de 3,1Å, 3,4 Å, 2,5 Å, 3,5 Å e 2,8 Å, com ASN7, CYS58, THR60, LYS61 e TRP62, respectivamente.

5.5.4 DOCK

No caso particular do programa DOCK, foi feita a opção pelo ligante Suramina, mesmo que este não tenha sido o ligante que apareceu o maior número de vezes entre os melhores 50 resultados de *docking*. O procedimento adotado, neste caso, foi que a Suramina obteve os 5 valores de score mais importantes para este programa.

O programa DOCK atingiu o score mais estável (-110,3) com o ligante Suramina, interagindo com o alvo BthTX-I (2H8I). Porém foi observado apenas uma ligação de hidrogênio, com o resíduo ARG34, com distância de 3,1 Å. Contatos hidrofóbicos são observados com os resíduos LEU3, LEU6 e THR52. Ver figura 55.

Comparando os melhores resultados obtidos com o programa GOLD e DOCK, mesmo sendo realizados com alvos diferentes, é possível observar uma certa diferença nas interações intermoleculares encontradas nos complexos formados. O programa GOLD foi capaz encontrar 5 ligações de hidrogênio a mais que o programa DOCK.

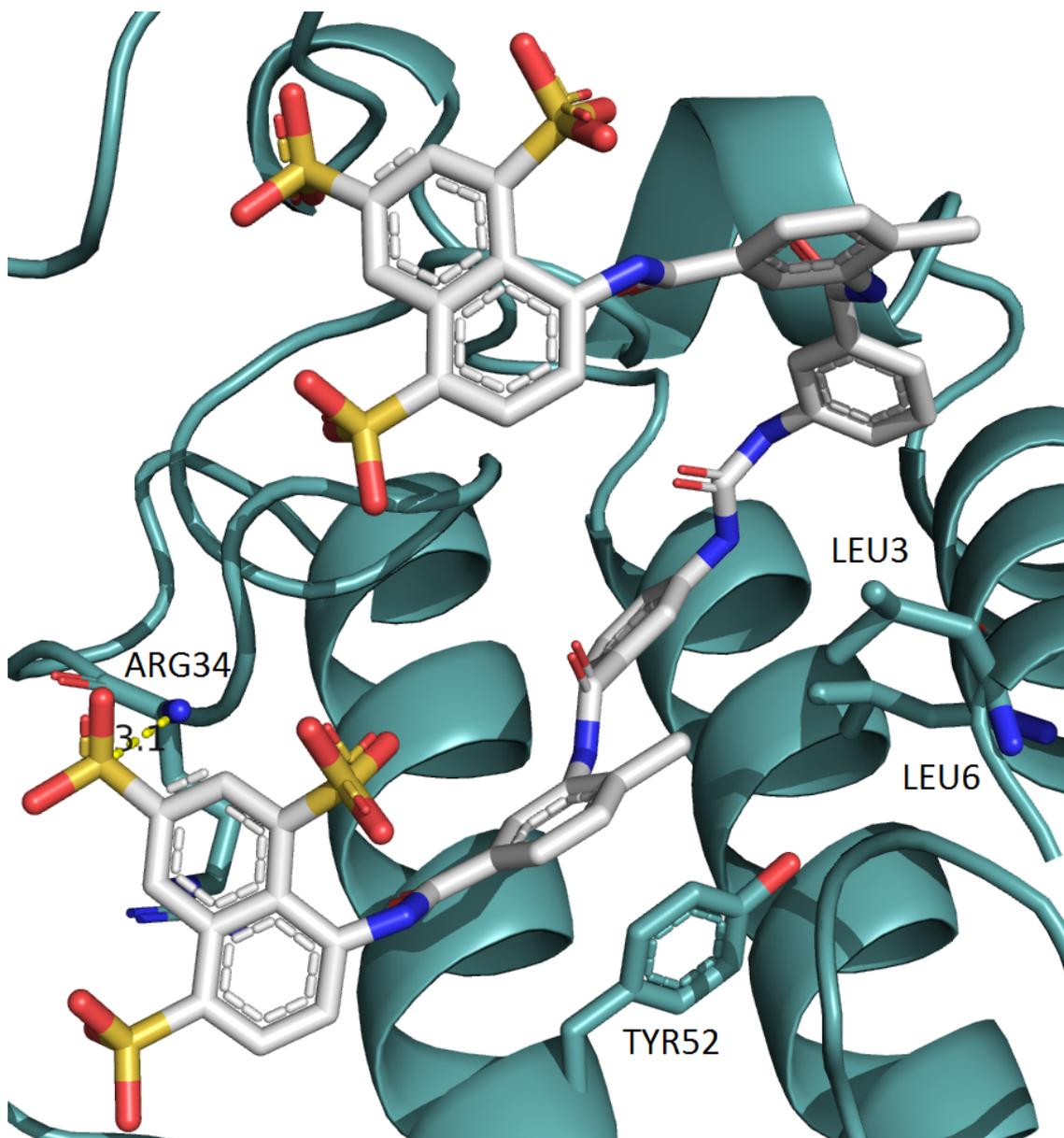


Figura 55: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa DOCK, obtido no cálculo entre o alvo 2H8I e o ligante Suramina. É possível observar a ligação de hidrogênio de 3,1 Å com o resíduo de aminoácido ARG34. Assim como os contatos hidrofóbicos com os resíduos LEU3, LEU6 e TYR52.

5.5.5 SURFLEX

No cálculo de *docking* da molécula *Variabilin* com o alvo *Myotoxin* (1XXS), o programa SURFLEX obteve o seu melhor resultado. O score obtido foi de 9,46. É possível observar que os três resíduos LEU6, ILE10 e LEU97 formam área hidrofóbica do sítio ativo da PLA₂ (ver figura 56), o que deve ser explorado no processo de otimização de moléculas na busca de inibidores de PLA₂s.

As ligações de hidrogênio com os resíduos de GLY23 e VAL31, com respectivamente 3,0 e 3,4 Å de distância, complementam a caracterização das interações intermoleculares no complexo. Ver figura 56.

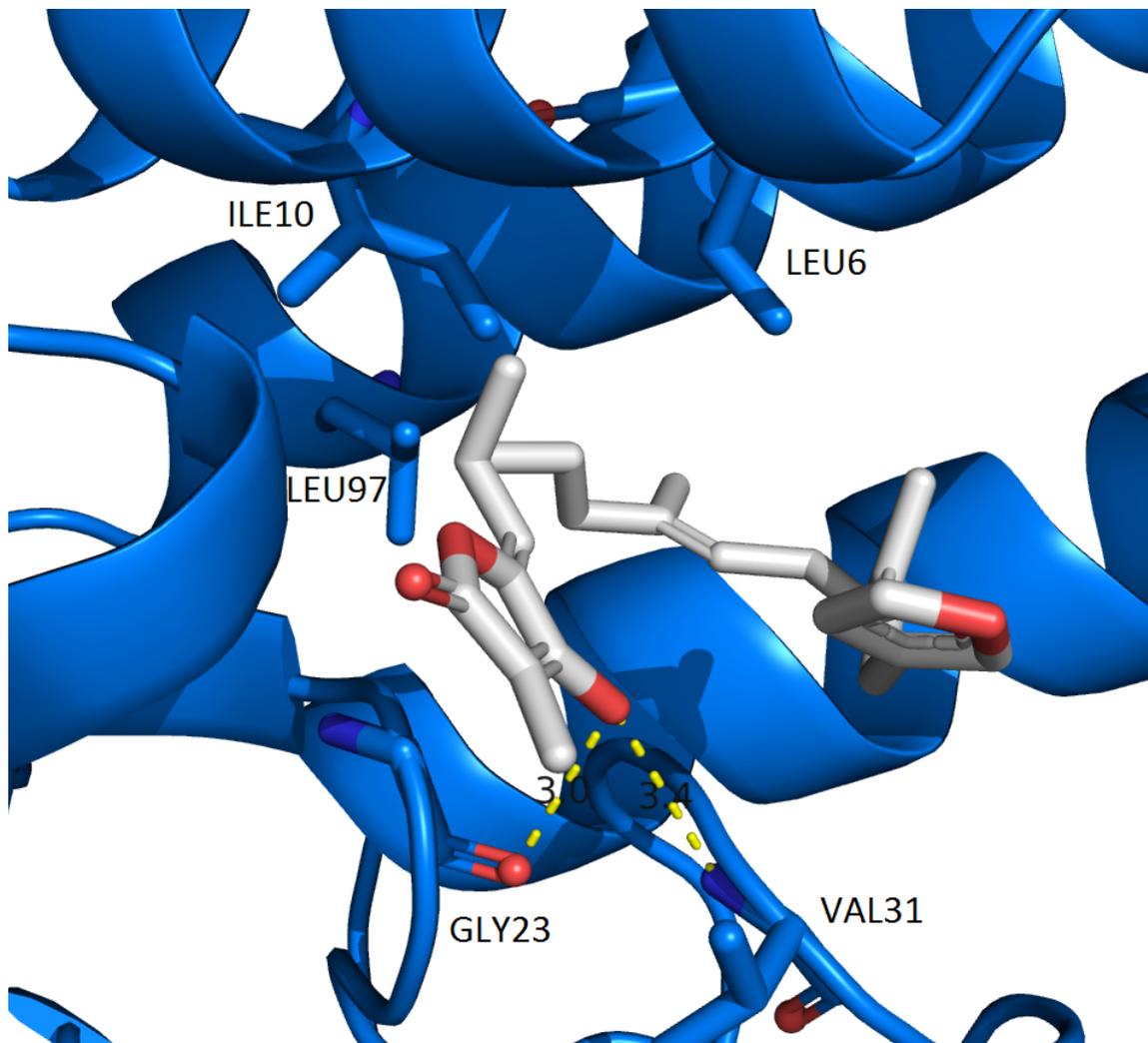


Figura 56: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa SURFLEX, obtido no cálculo entre o alvo 1XXS e o ligante *Variabilin*. É possível observar as ligações de hidrogênio de 3,0 Å e 3,4 Å com os resíduos de aminoácido GLY23 e VAL31, respectivamente. Assim como os contatos hidrofóbicos com os resíduos LEU6, ILE10 e LEU97.

5.5.6 PLANTS

Por fim, o programa PLANTS apresentou seu melhor resultado no cálculo entre o ligante Primetina e o alvo *Crotoxin B* (2QOG B Ca). Ele obteve o score de -36,05. Também é possível observar na figura 57 a presença dos resíduos hidrofóbicos no sítio ativo. O anel aromático da Primetina fica ancorado próximo a essa cavidade. A Primetina faz três ligações de hidrogênio com os resíduos ASN7, GLY30 e LYS61, com distâncias de 3,6 Å, 3,2 Å e 3,1 Å, respectivamente.

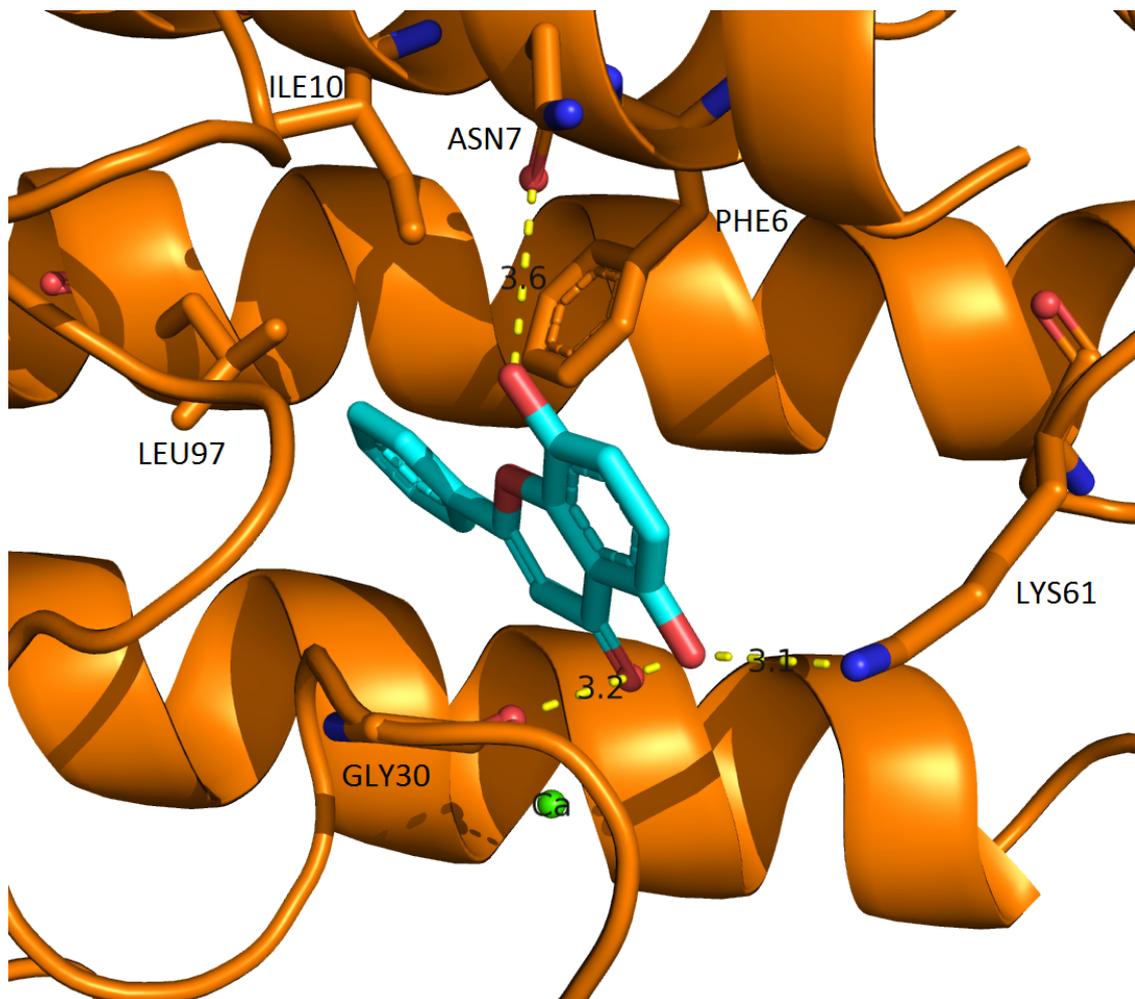


Figura 57: Melhor resultado de *docking* realizado com o programa PLANTS, obtido no cálculo entre o alvo 2QOG B Ca e o ligante Primetina. É possível observar as ligações de hidrogênio de 3,6 Å, 3,2 Å e 3,1 Å com os resíduos de aminoácido ASN7, GLY30 e LYS61, respectivamente. Assim como os contatos hidrofóbicos com os resíduos PHE6, ILE10 e LEU97.

O reconhecimento dos resíduos de aminoácidos capazes de formar ligações de hidrogênio é de grande importância, assim como os resíduos apolares. Dessa forma, pode-se potencializar o efeito inibidor de um novo ligante, efetuando alterações em sua estrutura, para interagir melhor com sítio ativo, tornando o complexo inibidor-alvo mais estável.

As moléculas relacionadas como melhores resultados são ligantes importantes para o estudo da terapia anti-veneno. Esses ligantes podem ser foco de otimizações moleculares que possam vir a potencializar o efeito inibitório das PLA₂.

5.6 Trabalhos publicados em revista

5.6.1 Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A₂.

Este artigo foi publicado na revista *Chemico-Biological Interactions*, no ano de 2011, fruto do trabalho de colaboração científica com o grupo de toxicologia do departamento de farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Nesse estudo, foram avaliados os efeitos do flavonoide Quercetina na inibição de sPLA₂ extraída do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

A Quercetina foi capaz de inibir a atividade enzimática e algumas atividades farmacológicas, incluindo a atividade antibacteriana, a capacidade de induzir agregação plaquetária e aproximadamente 40% da miotoxicidade. Porém, este inibidor não foi capaz de reduzir as atividades neurotóxicas e inflamatórias da sPLA₂. Os resultados sugeriram a existência de dois sítios farmacológicos na proteína, um correlacionado com a atividade enzimática e um outro sítio distinto. Dessa forma, o estudo de *docking* foi realizado para entender melhor as possíveis interações entre a Quercetina e a sPLA₂ (COTRIM et al., 2011). O programa GOLD foi escolhido para a realização do estudo.

Para obter a afinidade *in silico* da Quercetina e da Crotoxina B, a sPLA₂s isolada, foi utilizada a estrutura retirada do banco de dados PDB, sob o código 2QOG. A estrutura da cadeia B foi escolhida para efetuar os cálculos, mantendo o íon Ca²⁺ e a molécula de água número 188, localizada a 3,16 Å do átomo de Ca²⁺.

Os cálculos de *docking* foram realizados levando-se em consideração a flexibilidade do ligante Quercetina, de modo que os graus de liberdade foram considerados ativos durante o cálculo. O sítio ativo foi definido como todos os átomos num raio de 10 Å a partir do resíduo de aminoácido His48 (COTRIM et al., 2011).

A melhor solução de *docking* para o ligante Quercetina pode ser vista na figura 58. O score obtido nesse resultado foi 43,94, mostrando uma boa afinidade com o alvo. A presença de algumas interações intermoleculares importantes como: i) ligação de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos CYS45 e HIS48, com distâncias de 2,69 e 3,00 Å, respectivamente; ii) ligação de hidrogênio com a molécula de água 188, com distância de 3,16 Å; iii) um contato polar com o átomo de Ca²⁺ com distância de 3,19 Å; e iv) interações hidrofóbicas com o resíduo PHE5 podem ser levadas em consideração para a estabilidade do complexo Quercetina-sPLA₂ (COTRIM et al., 2011).

A primeira página do artigo pode ser encontrada no apêndice B. Esse trabalho de colaboração, assim como outros em andamento ou submetidos, são análises detalhadas provenientes do aprofundamento que foi possível de ser alcançado durante a comparação das metodologias de *docking* deste projeto.

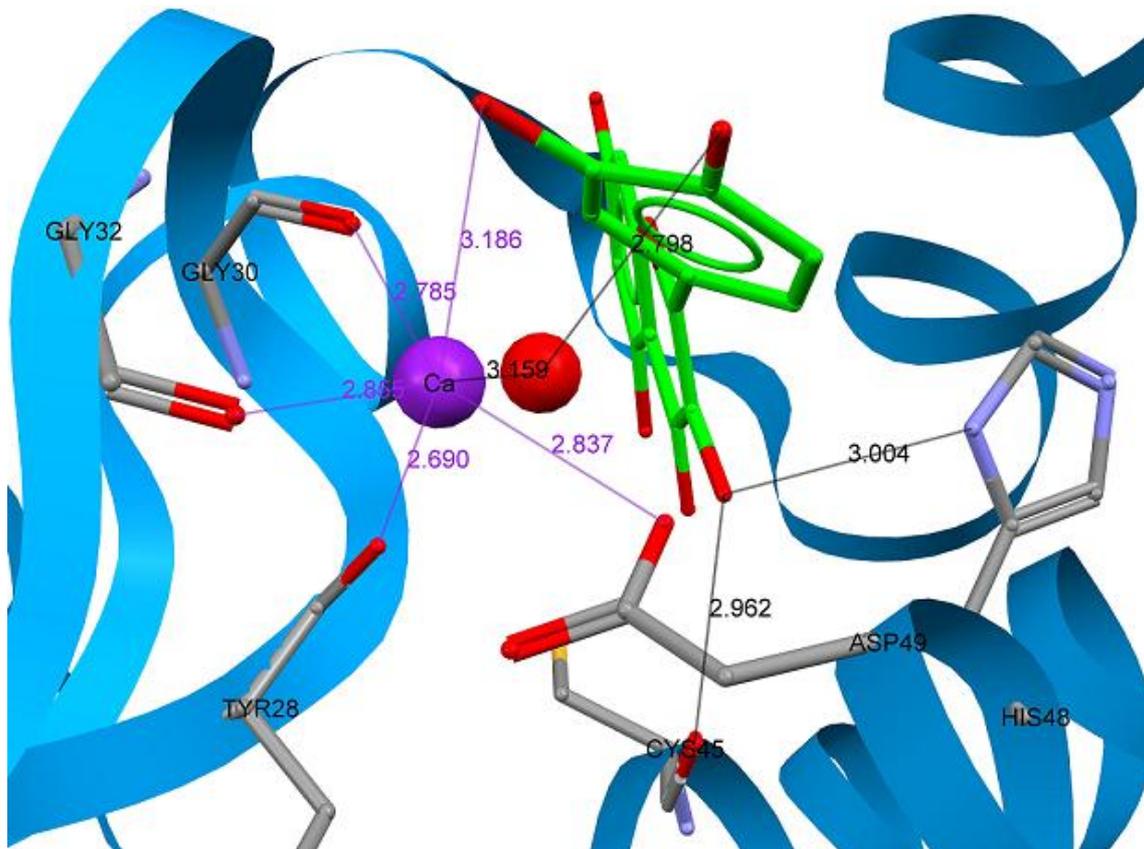


Figura 58: Melhor solução de *docking* para a Quercetina (modelo stick) e resíduos importantes para a interação no alvo Crotoxina B, além do íon Ca²⁺ e o oxigênio pertencente a molécula de água 188. Ligações de hidrogênio (distância em Å) mostradas como linhas, não envolvendo o íon Ca²⁺. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhorar a visualização, e as linhas ligadas ao íon Ca²⁺ representam o seu poliedro de coordenação.

6 CONCLUSÕES

O resultado de alterações relativamente pouco significativas na estrutura da molécula de um ligante podem influenciar significativamente, em alguns casos, um resultado de *docking*. Dessa forma a determinação correta da estrutura tanto do alvo, quanto do ligante para o *docking*, é de fundamental importância, assim como os cuidados necessários na construção dos modelos estruturais dessas moléculas. Desta forma, foi importante destacar as discrepâncias discutidas na seção 5.1.1 de resultados e discussões, que fizeram aumentar o número de 103 moléculas para 119 estruturas química utilizadas nos cálculos de *docking*.

A construção do banco de dados de estruturas de moléculas com atividade anti-veneno, além de ter sido muito útil para identificar e categorizar as discrepâncias de estruturas química. Também mostrou-se como uma boa base para futuros estudos *in silico* na busca de um fármaco capaz de inibir potentemente enzimas PLA₂, conseqüentemente atenuando os efeitos locais causados por acidentes ofídicos.

Os estudos em colaboração com grupos experimentais tem uma grande importância para a elucidação dos mecanismos farmacológicos relacionados a toxilogia de PLA₂s. Uma vez que os programas de *docking* tem capacidade explicativa e preditiva, com uma boa precisão, além da dificuldade intrínseca de realização de estudos de cristalografia de raio-X para novos alvos ou ligantes.

Em relação ao estudo comparativo dos 8568 (119 ligantes x 12 alvos x 6 programas) cálculos de *docking*, é importante destacar a importância da capacidade de automatização do procedimento de análise das interações intermoleculares de todos os complexos (poses), realizado com o programa Binana. Uma vez que não foi possível realizar uma análise de inspeção visual manual individualizada, nesse estudo, por se tratar de um conjunto muito grande de moléculas e estruturas químicas.

Com a análise detalhada dos melhores resultados para cada programa, foi possível identificar os importantes resíduos envolvidos no processo de inibição das PLA₂s. Resíduos estes capazes de estabelecer ligações de hidrogênio e uma região de aminoácidos hidrofóbicos. Isto facilita a otimização dos inibidores através do desenho de novas possíveis moléculas com atividade anti-PLA₂.

As abordagens analíticas multivariadas utilizadas foram capazes de revelar aspectos interessantes sobre as semelhanças e diferenças entre os resultados de *docking* obtidos com os diversos programas e alvos analisados. Com a aplicação destas análises, pôde-se estabelecer um formalismo analítico para a interpretação dos resultados nas escalas visual, numérica e gráfica, através, respectivamente, da geração das imagens para visualização molecular, das análises estatísticas (multivariadas) e da confecção dos gráficos provenientes destas análises.

De maneira conclusiva, foi possível identificar os programas que apresentam menor demanda computacional na análise comparativa de seus tempos de cálculo, o que pode vir a ser muito útil em futuros estudos de *docking*, até mesmo com um número muito maior de ligantes que podem ser calculados e analisados, aumentando-se muito o banco de dados de inibidores potenciais de PLA₂s.

7 PERSPECTIVAS

Existem perspectivas imediatas deste trabalho, como por exemplo, dar continuidade aos trabalhos em colaboração científica, podendo contribuir ainda mais depois da crescente curva de aprendizado percorrida no desenvolver desse trabalho, além da elucidação das melhores metodologias/programas que podem ser usados para solucionar os problemas de *virtual screening* nesta área de toxilogia com PLA₂s.

Também deve ser uma perspectiva direta deste trabalho, a inclusão de outros programas de *docking* na comparação metodológica. Um deles é o programa GLIDE, que tem se destacado em alguns estudos comparativos (CROSS et al., 2009; HEVENER et al., 2009).

Adicionalmente, pretende-se utilizar programas de construção de bibliotecas químicas, utilizando métodos de química combinatória virtual, por exemplo, para tentar encontrar outros ligantes, em especial, inibidores de PLA₂s mais potentes. O programa AUTOGROW (DURRANT et al., 2009) é um programa capaz de realizar a construção de novos ligantes a partir de ligantes pré-existentes. Isto resultaria em uma ampla varredura de espaço químico com o objetivo final de contribuir para a inovação terapêutica na área de antiofídicos.

8 REFERÊNCIAS

ALLEN, M. P.; TILDESLEY, D. J. **Computer Simulation of Liquids**. Clarendon Press, 1987.

ARNI, R.K; WARD, R.J. Phospholipase A2—a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0041010196000360>>. .

BAKER, D.; SALI, A. Protein structure prediction and structural genomics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5540, p. 93-6, 2001. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11588250>>. Acesso em: 12/6/2011.

BERNARD, P. SCIOR, T. DIDIER, B. HIBERT, M.; BERTHON, J. Y. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A(2) inhibitors. **Phytochemistry**, v. 58, n. 6, p. 865-74, 2001. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684183>>. .

BISSANTZ, C. FOLKERS, G.; ROGNAN, D. Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 25, p. 4759-67, 2000. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11123984>>. .

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of lipid research**, v. 50 Suppl, p. S237-42, 2009. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2674709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18/7/2011.

CARDOSO, J. L. C. FRANÇA, F. O. S. WEN, F. H. MÁLAQUE, S. A.; HADDAD, V. J. **Animais peçonhentos do Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003.

CECCHINI, A. L. SOARES, A M; CECCHINI, R. et al. Effect of crotopotin on the biological activity of Asp49 and Lys49 phospholipases A(2) from Bothrops snake venoms. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 138, n. 4, p. 429-36, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15536050>>. Acesso em: 9/9/2011.

CERVELLATI, R. RENZULLI, C. GUERRA, M. C.; SPERONI, E. Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7504-9, 2002. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475261>>. .

- CHIOATO, L. OLIVEIRA, A. H. C. D. E. RULLER, R. SA, J. M.; WARD, RICHARD J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys(49)-phospholipase A(2). **Biochem J**, v. 366, p. 971-976, 2002.
- CHIOATO, L.; WARD, RICHARD J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A2 by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 869-83, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019488>>. Acesso em: 1/8/2011.
- CLARK, M. CRAMER, R. D.; OPDENBOSCH, N. VAN. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 982-1012, 1989a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.540100804>>. Acesso em: 27/9/2011.
- CLARK, M. CRAMER, R. D.; OPDENBOSCH, N. VAN. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 982-1012, 1989b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.540100804>>. Acesso em: 27/9/2011.
- CORRÊA, L. C. MARCHI-SALVADOR, D. P. CINTRA, ADÉLIA C O; et al. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity: Insights into Ca²⁺-independent catalytic mechanism. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1784, n. 4, p. 591-9, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18261474>>. Acesso em: 18/7/2011.
- COTRIM, C. A. OLIVEIRA, S. C. B. DE; FILHO, E. B. S. DIZ; et al. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. **Chemico-biological interactions**, v. 189, n. 1-2, p. 9-16, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21056032>>. Acesso em: 7/11/2011.
- CROSS, J. B. THOMPSON, D. C. RAI, B. K. et al. Comparison of several molecular docking programs: pose prediction and virtual screening accuracy. **Journal of chemical information and modeling**, v. 49, n. 6, p. 1455-74, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19476350>>.
- CUMMINGS, B. S. Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs. **Biochemical pharmacology**, v. 74, n. 7, p. 949-59, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17531957>>. Acesso em: 2/11/2011.
- DELATORRE, P. ROCHA, B. A. M. SANTI-GADELHA, T. et al. Crystal structure of Bn IV in complex with myristic acid: a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ from Bothrops neuwiedi venom. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 513-8, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21108987>>. Acesso em: 18/7/2011.
- DORIGO, M. BIRATTARI, M.; STUTZLE, T. Ant Colony Optimization. ,2006. Bruxelas: IRIDIA.

DURRANT, J. D. AMARO, R. E.; MCCAMMON, J. A. AutoGrow: a novel algorithm for protein inhibitor design. **Chemical biology & drug design**, v. 73, n. 2, p. 168-78, 2009.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2724963&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5/7/2011.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. BINANA: a novel algorithm for ligand-binding characterization. **Journal of molecular graphics & modelling**, v. 29, n. 6, p. 888-93, 2011.

Elsevier Inc. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3099006&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19/9/2011.

ESPINO-SOLIS, G. P. RIAÑO-UMBARILA, L. BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: state of the art and perspectives. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183-99, 2009. Elsevier B.V. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19457345>>. Acesso em: 28/9/2011.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A2. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 833-840, 2000. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908400011755>>. Acesso em: 2/12/2011.

FERNANDES, C. A. H. MARCHI-SALVADOR, D. P. SALVADOR, G. M. et al.

Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca(2+)-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA(2)s.

Journal of structural biology, 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371382>>. Acesso em: 18/7/2011.

FOLMER, F. JASPARS, M. SCHUMACHER, M. DICATO, M.; DIEDERICH, M. Marine natural products targeting phospholipases A2. **Biochemical pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1793-800, 2010. Elsevier Inc. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833149>>. Acesso em: 18/7/2011.

GEHLHAAR, D. K. VERKHIVKER, G. M. REJTO, P. A. et al. Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming. **Chemistry & Biology**, v. 2, n. 5, p. 317-324, 1995. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074552195900500>>. Acesso em: 18/12/2011.

GELDENHUYS, W. J. GAASCH, K. E. WATSON, M. ALLEN, D. D.; SCHYF, C. J. VAN DER. Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 11, n. 3-4, p. 127-32, 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533710>>. .

GLASER, K.; JACOBS, R. Molecular pharmacology of manoalide☆Inactivation of bee venom phospholipase A2. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 449-453, 1986.

Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295286902182>>. Acesso em: 2/12/2011.

- GLUSKER, J. P. Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. **Advances in protein chemistry**, v. 42, p. 1-76, 1991. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2763257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
- GRAAF, C. DE; ROGNAN, DIDIER. Selective structure-based virtual screening for full and partial agonists of the beta2 adrenergic receptor. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4978-85, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18680279>>. .
- GUTIÉRREZ, JOSÉ MARÍA; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS medicine**, v. 3, n. 6, p. e150, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1472552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19/9/2011.
- GUTIÉRREZ, J.M. NÚÑEZ, J. CINTRA, A.C.O. HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J.R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake Bothrops jararacussu. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 55, n. 3, p. 217-229, 1991. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001448009190002F>>. Acesso em: 1/12/2011.
- HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug discovery today**, v. 8, n. 12, p. 536-44, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12821301>>. .
- HAGE-MELIM, L. I. DA S. H. **Estudo das interações entre fosfolipases A2 e o inibidor vegetal, ácido rosmarínico de Cordia verbenacea (Boraginaceae) por cocristalização e modelagem molecular**. Ribeirão Preto: Tese de Doutorado, 2009.
- HAMMER, Ø. HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST : PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS. **Education**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.
- HASTIE, T. TIBSHIRANI, R.; FRIEDMAN, J. **The Elements of Statistical Learning**. 2nd ed. New York: Springer, 2009.
- HAVT, A; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. The renal effects of Bothrops jararacussu venom and the role of PLA(2) and PAF blockers. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 39, n. 12, p. 1841-6, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11600146>>. .
- HEVENER, K. E. ZHAO, W. BALL, D. M. et al. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. **J Chem Inf Model**, v. 49, n. 2, p. 444-460, 2009.
- HO, C. M. W.; MARSHALL, G. R. Cavity search: An algorithm for the isolation and display of cavity-like binding regions. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 4, n. 4, p.

337-354, 1990. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00117400>>. Acesso em: 8/12/2011.

HUMPHREY, W. DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8744570>>. .

IZABEL, L.; MELIM, H. **Estudo das interações entre fosfolipases A 2 e o inibidor vegetal , ácido rosmarínico de Cordia verbenacea (Boraginaceae) por cocristalização e modelagem molecular**, 2009. USP.

JAIN, A N. Morphological similarity: a 3D molecular similarity method correlated with protein-ligand recognition. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 14, n. 2, p. 199-213, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10721506>>. .

JAIN, AJAY N. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: A continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 10, n. 5, p. 427-440, 1996. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00124474>>. Acesso em: 18/12/2011.

JAIN, AJAY N. Surfex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 4, p. 499-511, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12570372>>. Acesso em: 9/8/2011.

JAIN, AJAY N; NICHOLLS, A. Recommendations for evaluation of computational methods. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 22, n. 3-4, p. 133-9, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2311385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5/7/2011.

JIANG, J. NEUBAUER, B. L. GRAFF, J. R. et al. Expression of group IIA secretory phospholipase A2 is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. **The American journal of pathology**, v. 160, n. 2, p. 667-71, 2002. American Society for Investigative Pathology. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1850653&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12/12/2011.

JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, L. ÁLVAREZ-CORRAL, M. MUÑOZ-DORADO, M.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, I. Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 125-154, 2007. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11101-007-9059-z>>. Acesso em: 21/9/2011.

JONES, G. WILLETT, P.; GLEN, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **Journal of molecular biology**, v. 245, n. 1, p. 43-53, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7823319>>. .

- JONES, G. WILLETT, P. GLEN, R. C. LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727-48, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126849>>. Acesso em: 8/9/2011.
- KACHIGAN, S. K. **Statistical Analysis – An Interdisciplinary Introduction to Univariate & Multivariate Methods**. Radius Press, 1996.
- KALLAJOKI, M. ALANEN, K. A; NEVALAINEN, M.; NEVALAINEN, T. J. Group II phospholipase A2 in human male reproductive organs and genital tumors. **The Prostate**, v. 35, n. 4, p. 263-72, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9609549>>. .
- KIHARA, H. Studies on Phospholipase A in Trimeresurus flavoviridis Venom III. Purification and Some Properties of Phospholipase A Inhibitor in Habu Serum. **J Biochem**, v. 80, p. 341-349, 1976.
- KIYOHARA, H. EGAMI, H. KAKO, H. et al. Immunohistochemical localization of group II phospholipase A2 in human pancreatic carcinomas. **International journal of pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology**, v. 13, n. 1, p. 49-57, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384235>>. Acesso em: 12/12/2011.
- KORB, O. ST, T.; EXNER, T. E. PLANTS : Application of Ant Colony Optimization to Structure-Based Drug Design. **Lecture Notes in Computer Science**, v. 4150, p. 247-258, 2006.
- KUNTZ, I. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions*1. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, n. 2, p. 269-288, 1982. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002228368290153X>>. Acesso em: 6/12/2011.
- LANG, P. T. BROZELL, S. R. MUKHERJEE, S. et al. DOCK 6 : Combining techniques to model RNA – small molecule complexes DOCK 6 : Combining techniques to model RNA – small molecule complexes. **Spring**, 2009.
- LEE, W.-H. SILVA GIOTTO, M. T. DA; MARANGONI, SÉRGIO; et al. Structural Basis for Low Catalytic Activity in Lys49 Phospholipases A2A Hypothesis: The Crystal Structure of Piratoxin II Complexed to Fatty Acid † , ‡. **Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 28-36, 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi0010470>>. Acesso em: 11/10/2011.
- LI, B. LIU, Z. ZHANG, LIANGREN; ZHANG, LIHE. Multiple-docking and affinity fingerprint methods for protein classification and inhibitors selection. **Journal of chemical information and modeling**, v. 49, n. 7, p. 1725-33, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19499911>>. .
- LINDAHL, M; TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. **Inflammation**, v. 21, n. 3, p. 347-56, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9246576>>. .

- LINDAHL, MATS; TAGESSON, CHRISTER. Selective inhibition of group II phospholipase A2 by quercetin. **Inflammation**, v. 17, n. 5, p. 573-582, 1993. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00914195>>. Acesso em: 24/11/2011.
- LIU, T. LIN, Y. WEN, X. JORISSEN, R. N.; GILSON, M. K. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Database issue, p. D198-201, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1751547&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28/7/2011.
- LIZANO, S. DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 963-77, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019494>>. Acesso em: 18/7/2011.
- LLC, S. The PyMOL Molecular Graphics System. . Disponível em: <www.pymol.org>. .
- LOMBARDO, D.; DENNIS, E. A. Cobra venom phospholipase A2 inhibition by manoalide. A novel type of phospholipase inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 7234-7240, 1985.
- LOMONTE, B. ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019489>>. Acesso em: 1/8/2011.
- LOMONTE, B. LEÓN, G. ANGULO, Y. RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, V. Neutralization of Bothrops asper venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 7, p. 1012-28, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19324064>>. Acesso em: 13/11/2011.
- MAKINO, T. ONO, T. LIU, N. et al. Suppressive Effects of Rosmarinic Acid on Mesangioproliferative Glomerulonephritis in Rats. **Nephron**, v. 92, n. 4, p. 898-904, 2002. Disponível em: <<http://www.karger.com/doi/10.1159/000065457>>. Acesso em: 7/10/2011.
- MARCHI-SALVADOR, D. P. CORRÊA, L. C. MAGRO, A. J. et al. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from Crotalus durissus terrificus venom. **Proteins**, v. 72, n. 3, p. 883-91, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18275084>>. Acesso em: 18/7/2011.
- MARCHI-SALVADOR, D. P. FERNANDES, C. A. H. SILVEIRA, L. B. SOARES, ANDREIMAR M; FONTES, M. R. M. Crystal structure of a phospholipase A(2) homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1794, n. 11, p.

- 1583-90, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616648>>. Acesso em: 18/7/2011.
- MARDIA, K. V. KENT, J. T.; BIBBY, J. M. *Multivariate Analysis*. ,1979. London.
- MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 1171-81, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15922782>>. Acesso em: 23/9/2011.
- MELO, M. M. LÚCIA, M.; HABERMEHL, G. G. Plant extracts for topic therapy of *Bothrops alternatus* envenomation Artigo. **Blood**, v. 17, n. 1, p. 29-34, 2007.
- MILITÃO, G. C. G. PINHEIRO, S. M. DANTAS, I. N. F. et al. Bioassay-guided fractionation of pterocarpanes from roots of *Harpalyce brasiliensis* Benth. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 21, p. 6687-91, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17764956>>. Acesso em: 18/7/2011.
- MONTI, M. C. CHINI, M. G. MARGARUCCI, L. et al. The molecular mechanism of human group IIA phospholipase A2 inactivation by bolinaquinone. **Journal of molecular recognition : JMR**, v. 22, n. 6, p. 530-7, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19621421>>. Acesso em: 18/7/2011.
- MORRIS, G. M. GOODSSELL, D. S. HALLIDAY, R. S. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](http://doi.wiley.com/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)>. Acesso em: 29/6/2011.
- MORRIS, G. M. HUEY, R. LINDSTROM, W. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **J Comput Chem**, v. 30, p. 2785-2791, 2009.
- MORS, W. B. NASCIMENTO, M. C. PEREIRA, B. M.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite--the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 627-42, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130675>>. .
- MURAKAMI, M. T. VIÇOTI, M. M. ABREGO, J. R. B. et al. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 49, n. 3, p. 378-87, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157889>>. Acesso em: 18/7/2011.
- NAKAGAWA, MASASHI; NAKANISHI, K. DARKO, L. L.; VICK, J. A. Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 38, p. 3855-3858, 1982. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403900877266>>. Acesso em: 24/11/2011.

- NIKNAMI, M. PATEL, M. WITTING, P. K.; DONG, Q. Molecules in focus: cytosolic phospholipase A2-alpha. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 5, p. 994-7, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18761105>>. Acesso em: 19/9/2011.
- PEREIRA, N. A. PEREIRA, B. M. NASCIMENTO, M. C. DO; PARENTE, J. P.; MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. **Planta medica**, v. 60, n. 2, p. 99-100, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8202573>>. Acesso em: 24/11/2011.
- PITHAYANUKUL, P. RUENRAROENGSAK, P. BAVOVADA, R. et al. Inhibition of Naja kaouthia venom activities by plant polyphenols. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, n. 3, p. 527-33, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15740891>>. Acesso em: 30/6/2011.
- POTTS, B. C. FAULKNER, D. J.; JACOBS, R. S. Phospholipase A2 inhibitors from marine organisms. **Journal of natural products**, v. 55, n. 12, p. 1701-17, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1294693>>. .
- RAREY, M. KRAMER, B. LENGAUER, T.; KLEBE, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **Journal of molecular biology**, v. 261, n. 3, p. 470-89, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8780787>>. .
- RIGDEN, D. J. HWA, L. W. MARANGONI, SÉRGIO; TOYAMA, MARCOS H.; POLIKARPOV, I. The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from Bothrops pirajai reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 59, n. 2, p. 255-262, 2003. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444902021467>>. Acesso em: 11/10/2011.
- ROCHA, G. B. FREIRE, R. O. SIMAS, A. M.; STEWART, J. J. P. RM1 : A Reparameterization of AM1 for H , C , N , O , P , S , F , Cl , Br , and I. **Journal of Computational Chemistry**, v. 02, 2006.
- RODRIGUES, C. R. Processos Modernos no Desenvolvimento de Fármacos: Modelagem Molecular. ,2001. Rio de Janeiro.
- RUPPERT, J; WELCH, W; JAIN, A N. Automatic identification and representation of protein binding sites for molecular docking. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 6, n. 3, p. 524-33, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2143670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13/12/2011.
- SANTOS, J. I. DOS; CINTRA-FRANCISCHINELLI, M. BORGES, R. J. et al. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase

- A₂ class. **Proteins**, v. 79, n. 1, p. 61-78, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20878713>>. Acesso em: 18/7/2011.
- SANTOS, J. I. DOS; SOARES, ANDREIMAR MARTINS; FONTES, M. R. M. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A(2) from Bothrops genus reveal their myotoxic site. **Journal of structural biology**, v. 167, n. 2, p. 106-16, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401234>>. Acesso em: 18/7/2011.
- SCOTT, D. WHITE, S. OTWINOWSKI, Z. et al. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1541-1546, 1990. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2274785>>. Acesso em: 1/12/2011.
- SHETTY, K. Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; focus on Lamiaceae. **Asia Pacific J Clin Nutr**, v. 6, n. 3, p. 162-171, 1997.
- SHOICHET, B. K. BODIAN, D. L.; KUNTZ, I. D. Molecular Docking Using Shape Descriptors. **Biochemistry**, v. 13, n. 3, 1992.
- SILVA, A J M DA; MELO, P A; SILVA, N. M. et al. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of coumestans with different patterns of oxygenation. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 11, n. 3, p. 283-6, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11212092>>.
- SILVA, ALCIDES J M DA; COELHO, A. L. SIMAS, A. B. C. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of prenylated and benzylated pterocarpanes against snake venom. , v. 14, p. 431-435, 2004.
- SILVA, E. D. DE; SCHEUER, P. J. Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine sponge (polejaeff). **Tetrahedron Letters**, v. 21, n. 17, p. 1611-1614, 1980. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403900777665>>. Acesso em: 2/12/2011.
- SILVA, G. L. D. MATOS, F. J. D. A.; SILVEIRA, E. R. 4'-dehydroxycabenegrin A-i from roots of harpalyce brasiliiana. , v. 46, n. 6, p. 1059-1062, 1997.
- SOARES, ANDREIMAR M; GIGLIO, JOSÉ R. Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 42, n. 8, p. 855-68, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019487>>. Acesso em: 1/8/2011.
- STARKWEATHER, T. WHITLEY, D; MATHIAS, K. Optimization using distributed genetic algorithms. **Parallel Problem Solving from Nature**, v. 496, p. 176-185, 1991.
- STÜTZLE, T.; HOOS, H. H. Max - Min Ant System. **Future Generation Computer Systems**, v. 16, n. 8, p. 889-914, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167739X00000431>>. Acesso em: 18/12/2011.
- SYBYL-X 1.2. . 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA: Tripos International.

- Spartan “08 Tutorial and User”s Guide. ., 2008. Irvine, CA. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=RedirectURL&_method=externObjLink&_locat or=url&_issn=09680896&_origin=article&_zone=art_page&_plusSign=+&_targetURL=http %3A%2F%2Fwww.wavefun.com%2Fproducts%2Fspartan.html>. .
- TAKEDA, A. A S. SANTOS, J. I. DOS; MARCUSSI, S. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A(2) complexed with p-bromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors at 1.9- and 1.45-Å resolution. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1699, n. 1-2, p. 281-4, 2004. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15158738>>. Acesso em: 24/11/2011.
- TAKEDA, H. TSUJI, M. INAZU, M. EGASHIRA, T.; MATSUMIYA, T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **European journal of pharmacology**, v. 449, n. 3, p. 261-7, 2002. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167468>>. .
- THOMPSON, J. GIBSON, T. J. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997. Disponível em: <<http://www.nar.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/25.24.4876>>. Acesso em: 4/9/2011.
- TICLI, F. K. HAGE, L. I. S. CAMBRAIA, R. S. et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 46, n. 3, p. 318-27, 2005. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15992846>>. Acesso em: 18/7/2011.
- TOYAMA, M H; COSTA, P. D. NOVELLO, J. C. et al. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA2 and anticoagulant activities and high myotoxic activity. **Journal of protein chemistry**, v. 18, n. 3, p. 371-8, 1999. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395455>>. .
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-61, 2010. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3041641&tool=pmcentrez&rend ertype=abstract>>. Acesso em: 18/7/2011.
- VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A(2)? **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 815-31, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086212>>. .
- VERDONK, M. L. COLE, J. C. HARTSHORN, M. J. MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, n. 4, p. 609-23, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12910460>>. Acesso em: 19/7/2011.

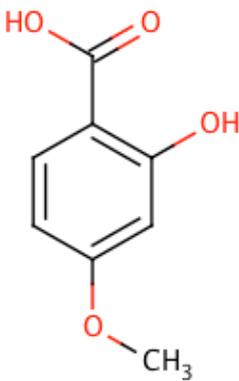
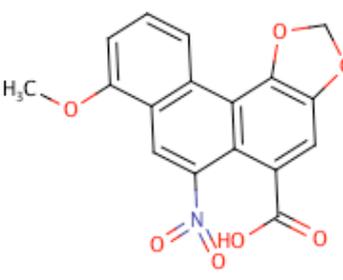
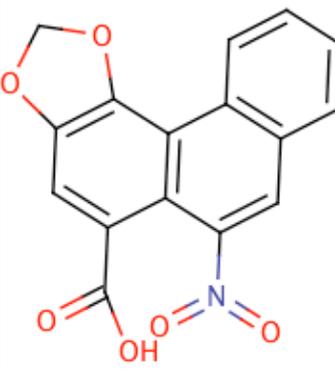
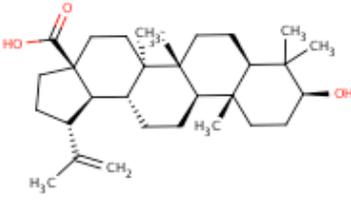
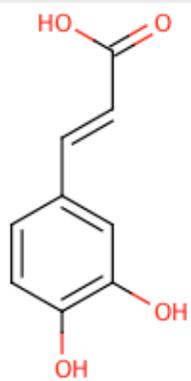
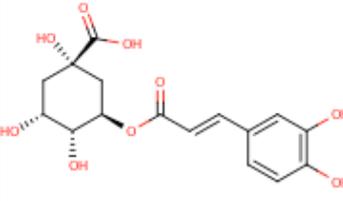
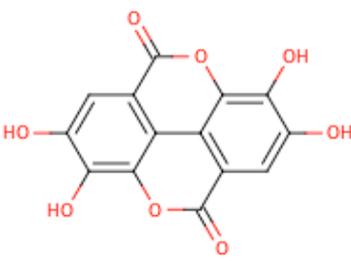
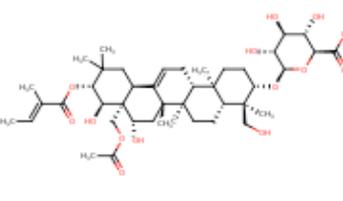
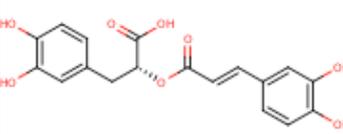
- VISHWANATH, B. S.; GOWDA, T. V. Interaction of aristolochic acid with *Vipera russelli* phospholipase A2: Its effect on enzymatic and pathological activities. **Toxicon**, v. 25, n. 9, p. 929-937, 1987. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0041010187901553>>. .
- WANG, R. LAI, L.; WANG, S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 16, n. 1, p. 11-26, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12197663>>. .
- WATANABE, L. SOARES, ANDREIMAR M; WARD, RICHARD J; FONTES, M. R. M.; ARNI, RAGHUVIR K. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A2: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. **Biochimie**, v. 87, n. 2, p. 161-7, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15760708>>. Acesso em: 18/7/2011.
- WELCH, WILLIAM; RUPPERT, JIM; JAIN, AJAY N. Hammerhead: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites. **Chemistry & Biology**, v. 3, n. 6, p. 449-462, 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074552196900939>>. Acesso em: 19/9/2011.
- WHITLEY, DARRELL. A Genetic Algorithm Tutorial. ,1994. Fort Collins: Statistics and Computing.
- YAMASHITA, S. OGAWA, M. SAKAMOTO, K. et al. Elevation of serum group II phospholipase A2 levels in patients with advanced cancer. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 228, n. 2, p. 91-9, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7988039>>. .
- YAMASHITA, S. YAMASHITA, J.; OGAWA, M. Overexpression of group II phospholipase A2 in human breast cancer tissues is closely associated with their malignant potency. **British journal of cancer**, v. 69, n. 6, p. 1166-70, 1994. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1969450&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .
- YEDGAR, S; LICHTENBERG, D.; SCHNITZER, E. Inhibition of phospholipase A(2) as a therapeutic target. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 182-7, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11080687>>. .
- YEDGAR, SAUL; COHEN, Y.; SHOSEYOV, D. Control of phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1761, n. 11, p. 1373-82, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16978919>>. Acesso em: 30/11/2011.
- YING, Z. TOJO, H. KOMATSUBARA, T. NAKAGAWA, MANABU; OKAMOTO, M. Enhanced expression of group II phospholipase A2 in human hepatocellular carcinoma. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1226, p. 201-205, 1994.

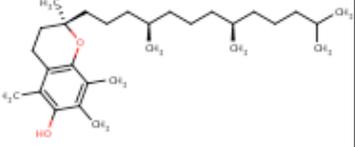
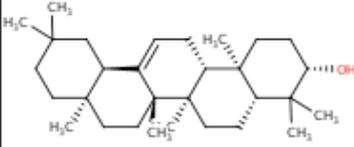
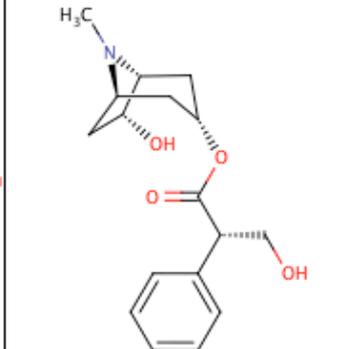
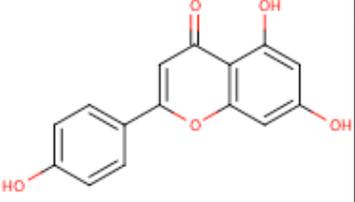
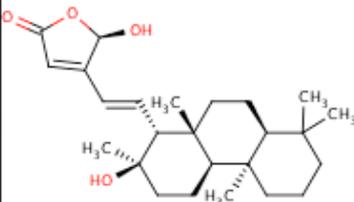
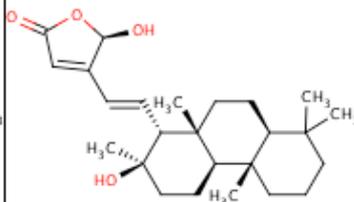
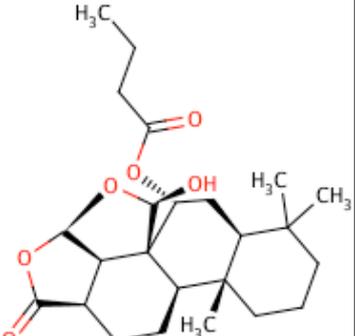
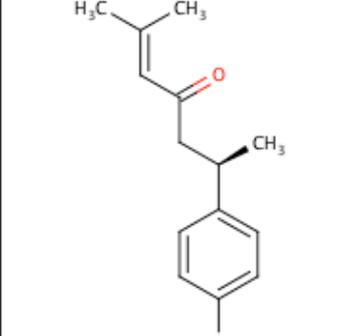
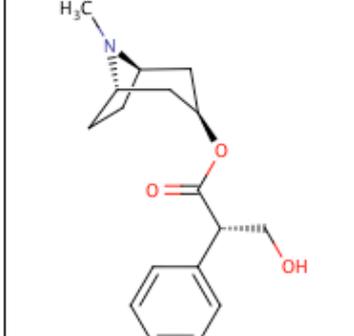
ZHOU, X. TAN, T.-C. VALIYAVEETTIL, S. et al. Structural characterization of myotoxic ecarpholin S from *Echis carinatus* venom. **Biophysical journal**, v. 95, n. 7, p. 3366-80, 2008. Elsevier. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2547436&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24/11/2011.

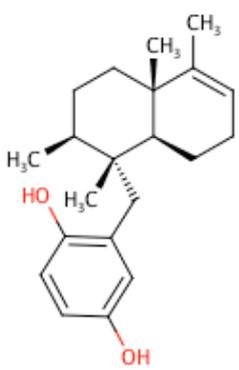
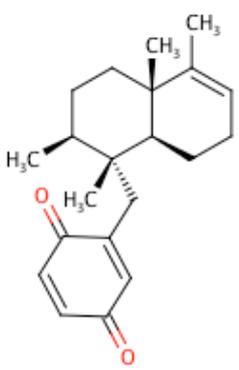
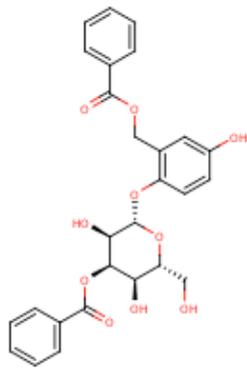
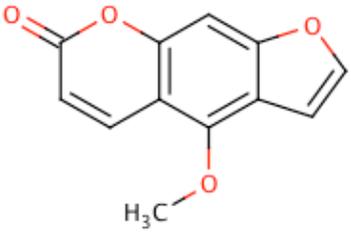
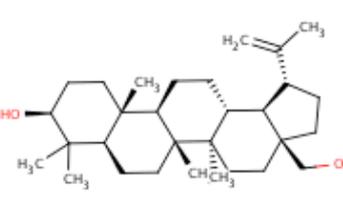
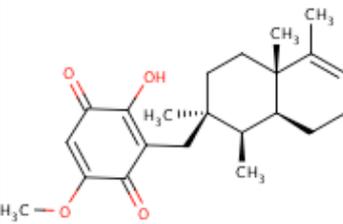
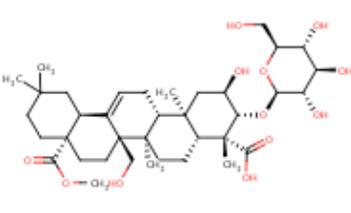
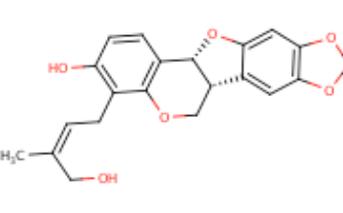
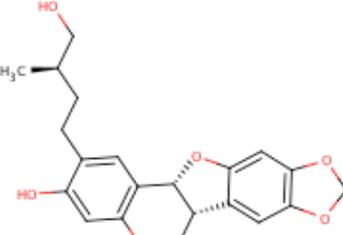
9 APÊNDICES

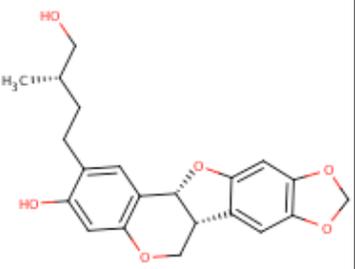
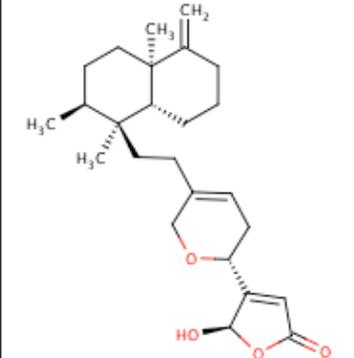
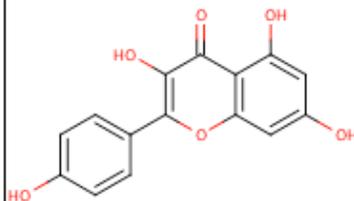
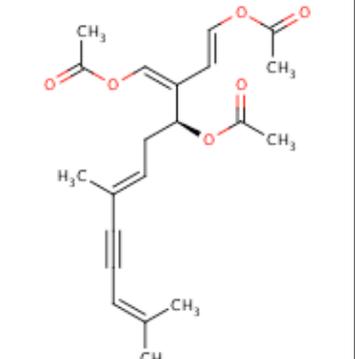
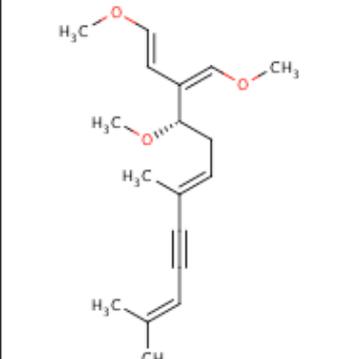
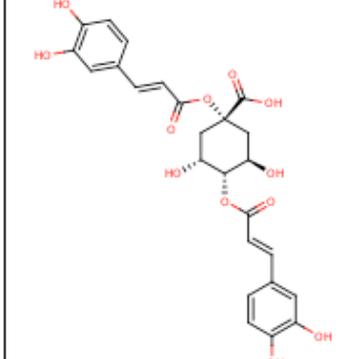
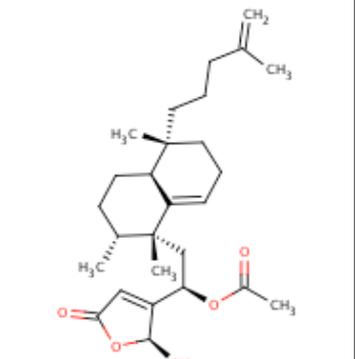
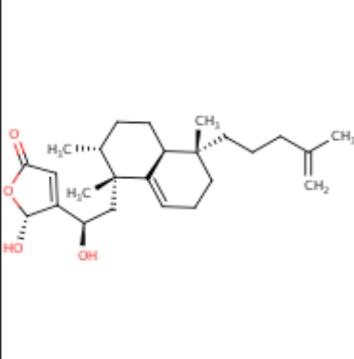
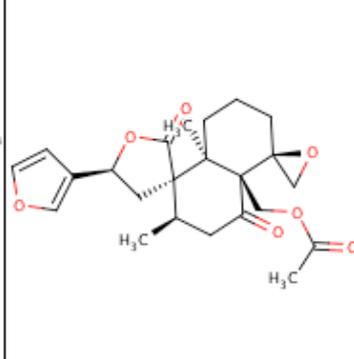
Apêndice A

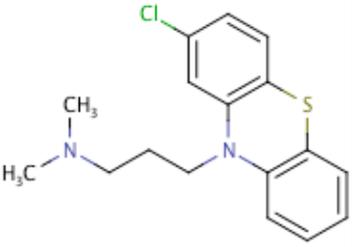
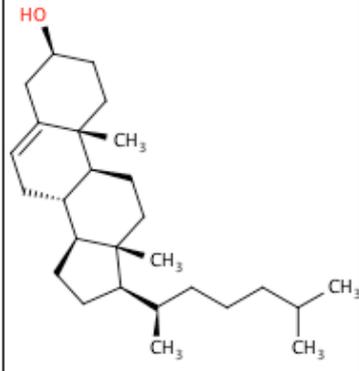
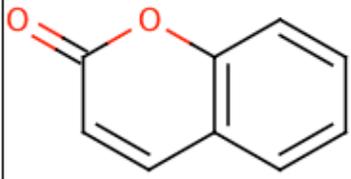
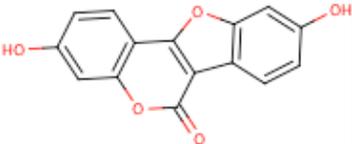
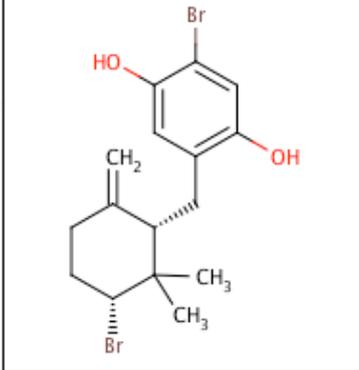
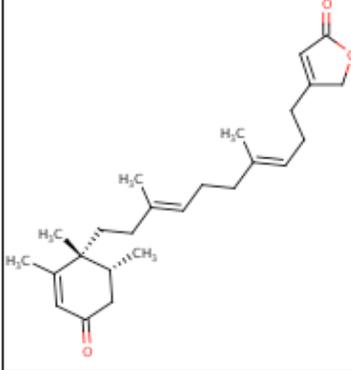
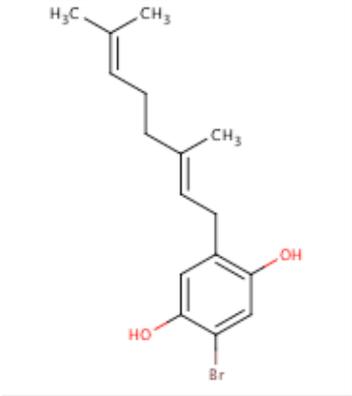
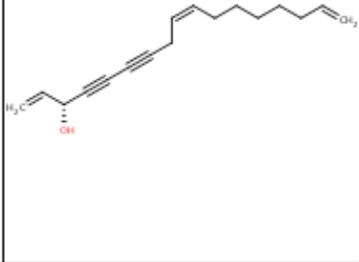
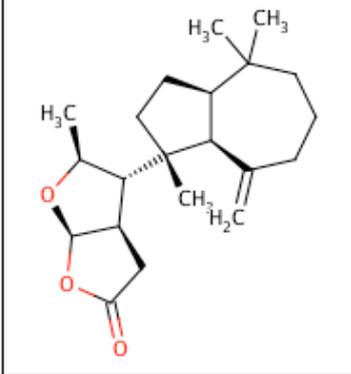
Estruturas químicas (2-D) das moléculas antiveneno utilizadas no estudo, que constituem o Banco de Dados descrito na metodologia.

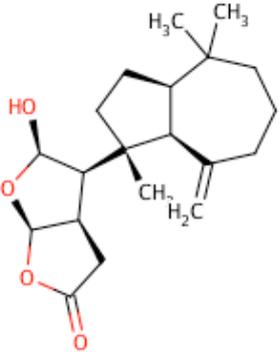
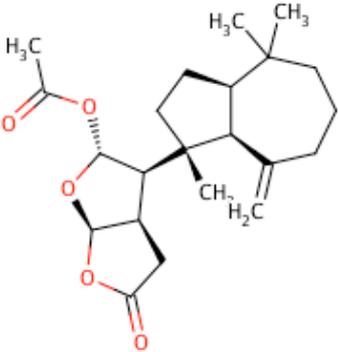
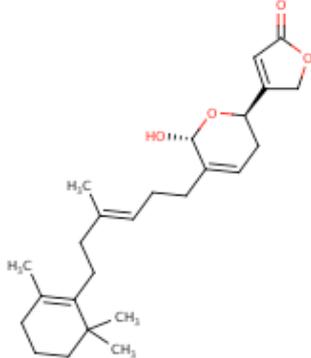
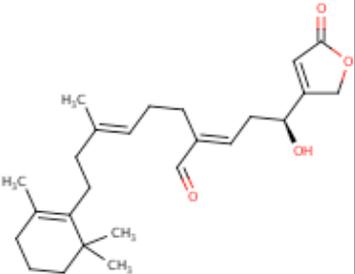
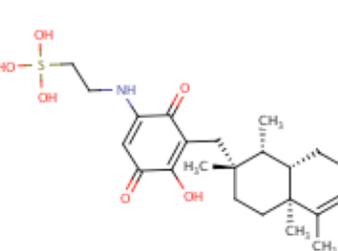
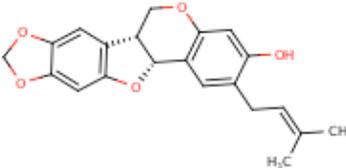
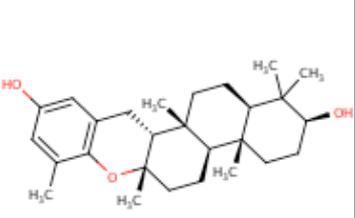
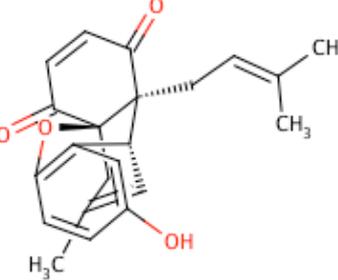
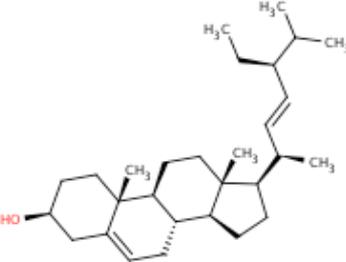
<p style="text-align: center;">1</p>  <p style="text-align: center;">Acido_2-hidroxi-4-metoxibenzoico_Spider67776</p>	<p style="text-align: center;">2</p>  <p style="text-align: center;">Acido_Aristolochico1_2236</p>	<p style="text-align: center;">3</p>  <p style="text-align: center;">Acido_Aristolochico2_108168</p>
<p style="text-align: center;">4</p>  <p style="text-align: center;">Acido_Betulinico_64971</p>	<p style="text-align: center;">5</p>  <p style="text-align: center;">Acido_Cafeico_689043</p>	<p style="text-align: center;">6</p>  <p style="text-align: center;">Acido_Clorogenico_1794427</p>
<p style="text-align: center;">7</p>  <p style="text-align: center;">Acido_Elagico_5281855</p>	<p style="text-align: center;">8</p>  <p style="text-align: center;">Acido_Ginamico1_11953919</p>	<p style="text-align: center;">9</p>  <p style="text-align: center;">Acido_Rosmarinico_5281792</p>

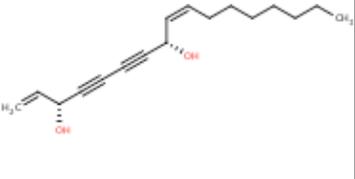
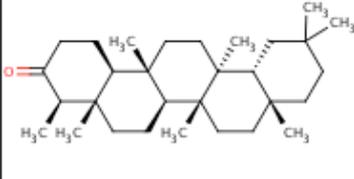
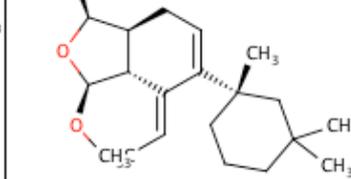
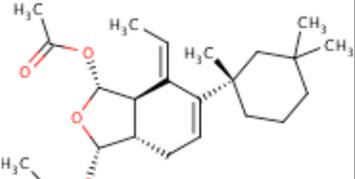
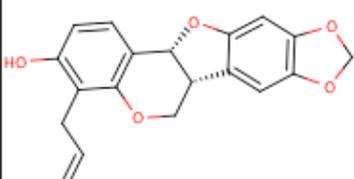
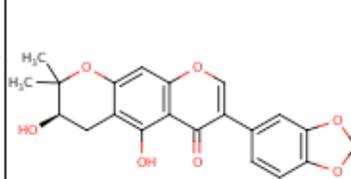
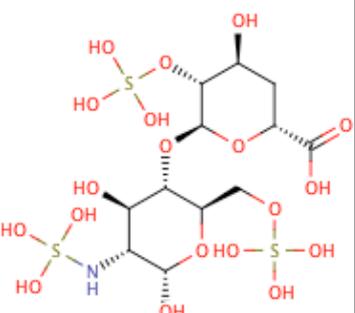
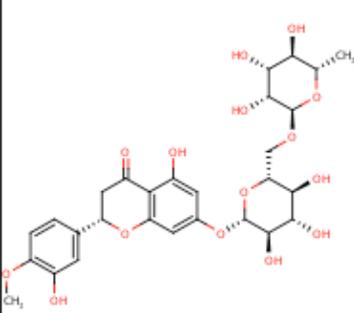
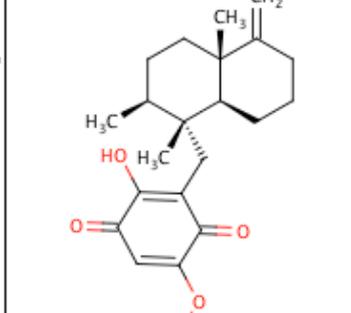
<p style="text-align: center;">10</p> 	<p style="text-align: center;">11</p> 	<p style="text-align: center;">12</p> 
<p>Alfa-Tocoferol_14985</p>	<p>Amirina_73145</p>	<p>Anisodamina_2198</p>
<p style="text-align: center;">13</p> 	<p style="text-align: center;">14</p> 	<p style="text-align: center;">15</p> 
<p>Apigenina_5280443</p>	<p>Aplyolide_A_R_Spider10473077</p>	<p>Aplyolide_A_S_MARINE</p>
<p style="text-align: center;">16</p> 	<p style="text-align: center;">17</p> 	<p style="text-align: center;">18</p> 
<p>Aplyroseol1_spider9070342</p>	<p>Ar-Tumerona_558221</p>	<p>Atropina_174174</p>

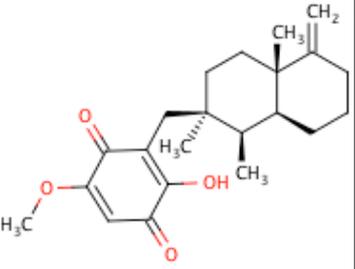
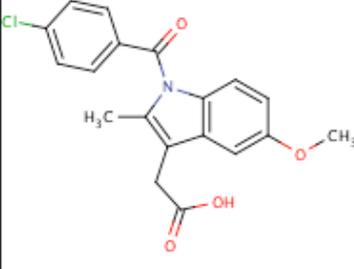
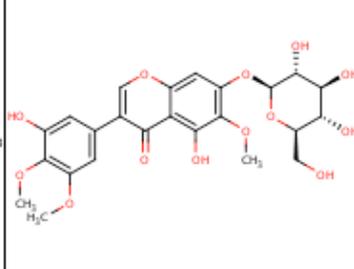
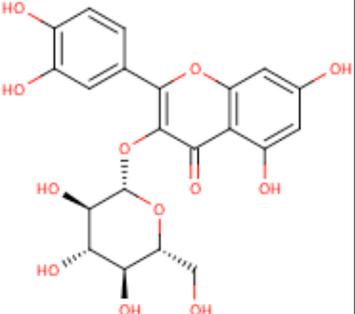
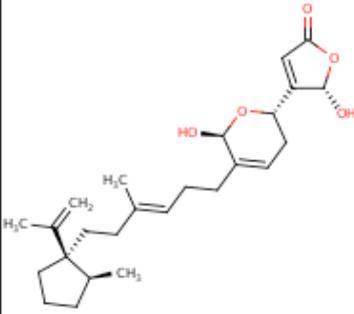
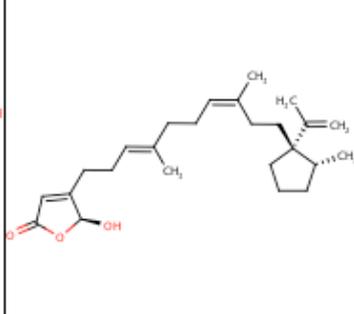
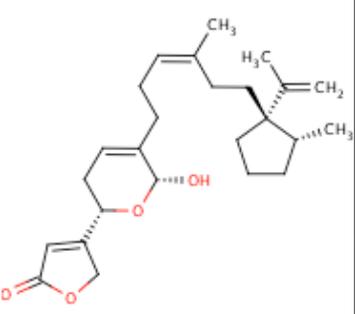
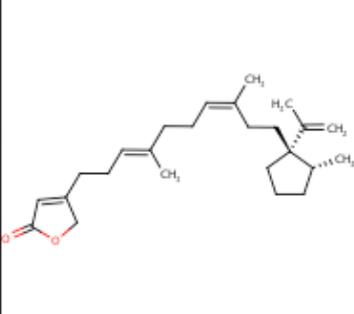
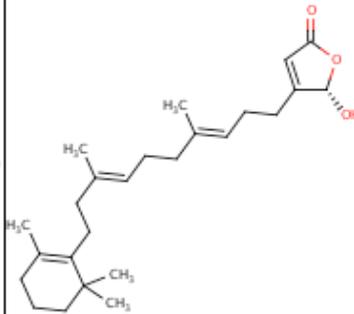
<p style="text-align: center;">19</p>  <p style="text-align: center;">Avarol_72185</p>	<p style="text-align: center;">20</p>  <p style="text-align: center;">Avarone_72186</p>	<p style="text-align: center;">21</p>  <p style="text-align: center;">Benzoilsalireposideo_639684</p>
<p style="text-align: center;">22</p>  <p style="text-align: center;">Bergapteno_2355</p>	<p style="text-align: center;">23</p>  <p style="text-align: center;">Betulina_72326</p>	<p style="text-align: center;">24</p>  <p style="text-align: center;">Bolinaquinona_10066979</p>
<p style="text-align: center;">25</p>  <p style="text-align: center;">Bredemeyerosida_D_Tese</p>	<p style="text-align: center;">26</p>  <p style="text-align: center;">Cabegrina_A1</p>	<p style="text-align: center;">27</p>  <p style="text-align: center;">Cabegrina_A2-R</p>

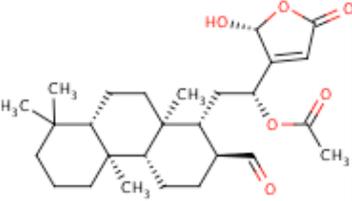
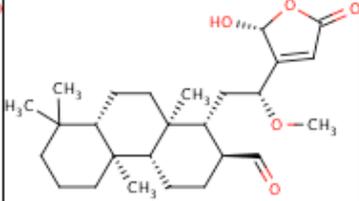
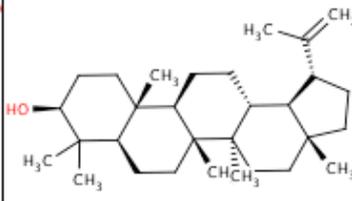
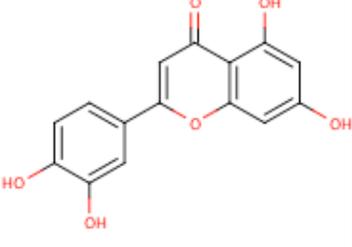
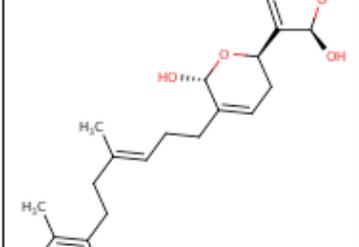
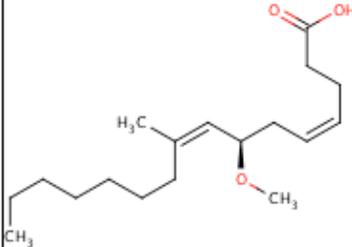
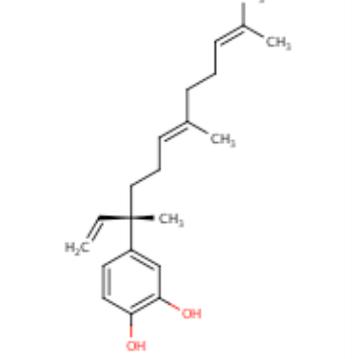
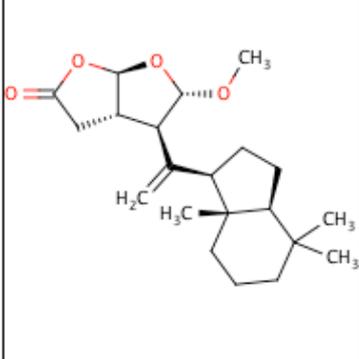
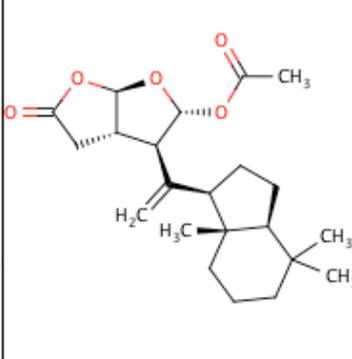
<p style="text-align: center;">28</p>  <p style="text-align: center;">Cabegrina_A2-S</p>	<p style="text-align: center;">29</p>  <p style="text-align: center;">Cacospongionolide_B_17747013</p>	<p style="text-align: center;">30</p>  <p style="text-align: center;">Canferol_5280863</p>
<p style="text-align: center;">31</p>  <p style="text-align: center;">Caulerpyne_5311436</p>	<p style="text-align: center;">32</p>  <p style="text-align: center;">Caulerpyne_MARINE</p>	<p style="text-align: center;">33</p>  <p style="text-align: center;">Cinarina_5316647</p>
<p style="text-align: center;">34</p>  <p style="text-align: center;">Cladocoran_A_Spider10477007</p>	<p style="text-align: center;">35</p>  <p style="text-align: center;">Cladocoran_B_Spider10477008</p>	<p style="text-align: center;">36</p>  <p style="text-align: center;">Clerodane_5458786</p>

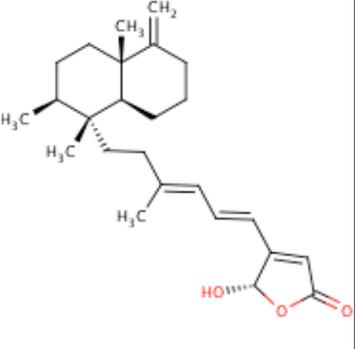
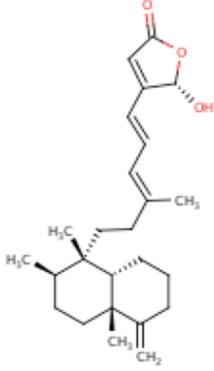
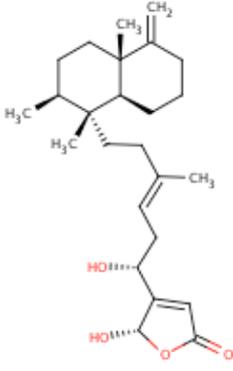
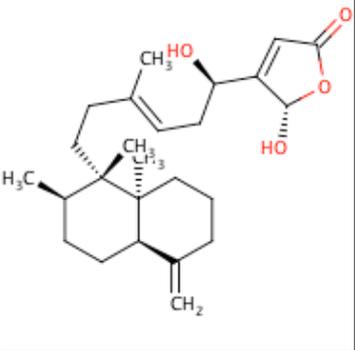
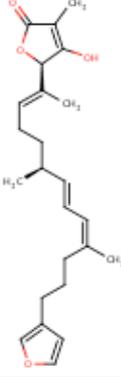
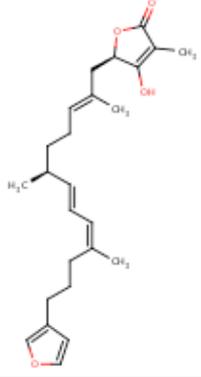
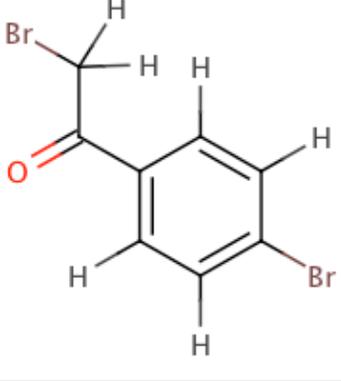
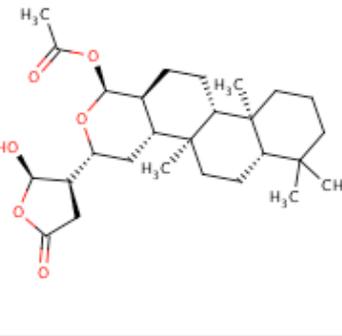
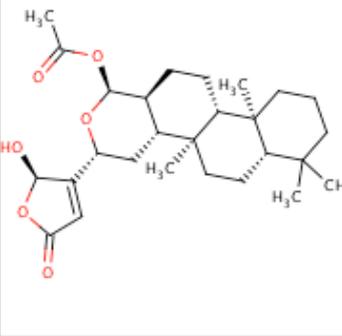
<p style="text-align: center;">37</p>  <p style="text-align: center;">Clorpromazina_2726</p>	<p style="text-align: center;">38</p>  <p style="text-align: center;">Colesterol_5997</p>	<p style="text-align: center;">39</p>  <p style="text-align: center;">Cumarina_323</p>
<p style="text-align: center;">40</p>  <p style="text-align: center;">Cumestrol_5281707</p>	<p style="text-align: center;">41</p>  <p style="text-align: center;">Cyclocymopol_Spider10472975</p>	<p style="text-align: center;">42</p>  <p style="text-align: center;">Cyclolinteinone_6444308</p>
<p style="text-align: center;">43</p>  <p style="text-align: center;">Cymopol_5386672</p>	<p style="text-align: center;">44</p>  <p style="text-align: center;">Dehidrofalcarinol_13895593</p>	<p style="text-align: center;">45</p>  <p style="text-align: center;">Dendrillolide_A_MARINE</p>

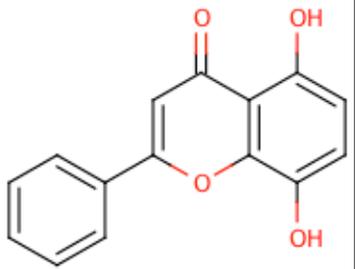
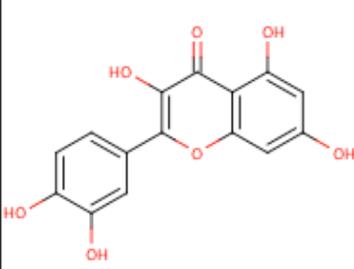
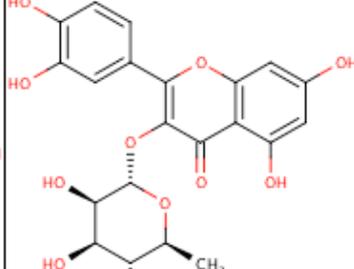
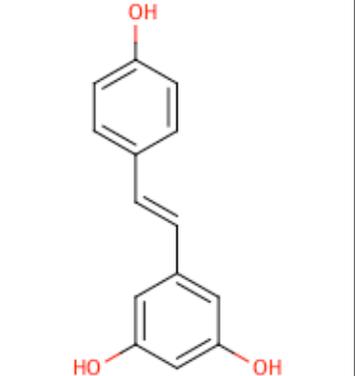
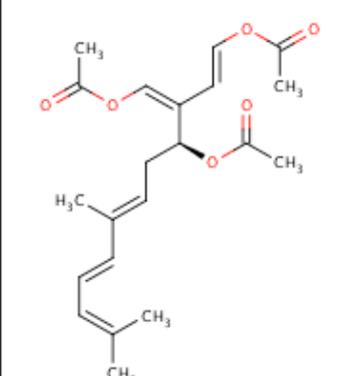
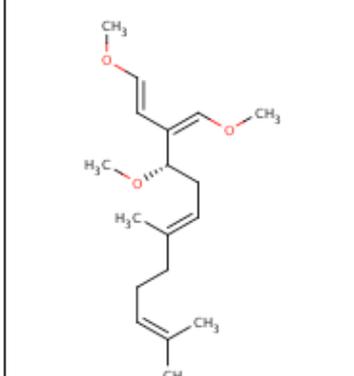
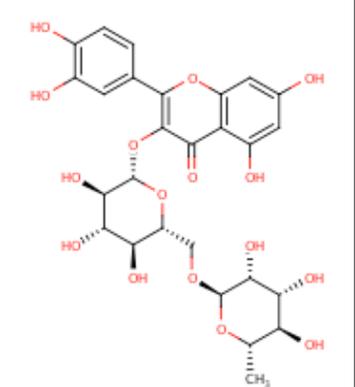
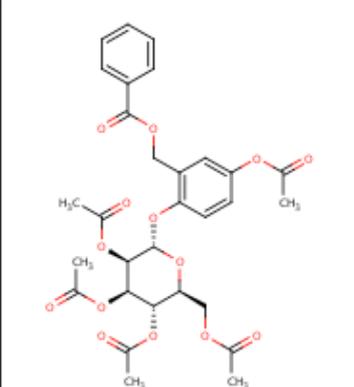
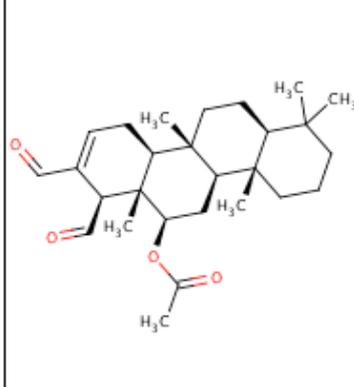
<p style="text-align: center;">46</p>  <p style="text-align: center;">Dendrillolide_A_Ref42</p>	<p style="text-align: center;">47</p>  <p style="text-align: center;">Dendrillolide_A_Spider10281370</p>	<p style="text-align: center;">48</p>  <p style="text-align: center;">Deoxymanoalide_MARINE</p>
<p style="text-align: center;">49</p>  <p style="text-align: center;">Deoxysecomanoalide_MARINE</p>	<p style="text-align: center;">50</p>  <p style="text-align: center;">Dysidine_Spider10214288</p>	<p style="text-align: center;">51</p>  <p style="text-align: center;">Edunol_182148</p>
<p style="text-align: center;">52</p>  <p style="text-align: center;">Epitaondiol_156834</p>	<p style="text-align: center;">53</p>  <p style="text-align: center;">Eretianona_177298</p>	<p style="text-align: center;">54</p>  <p style="text-align: center;">Estigmasterol_5280794</p>

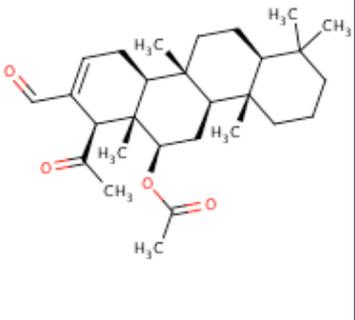
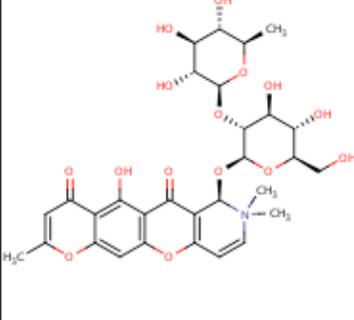
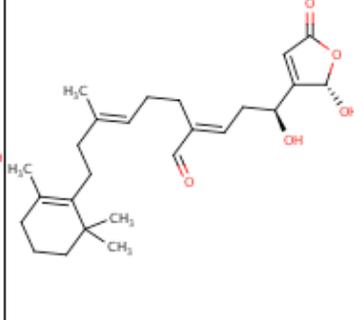
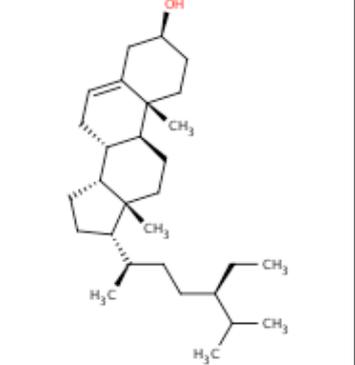
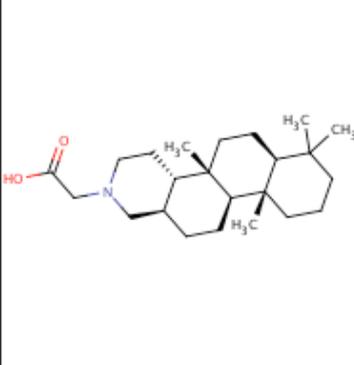
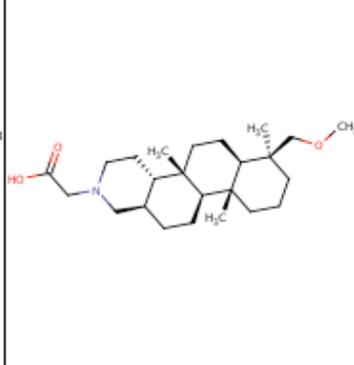
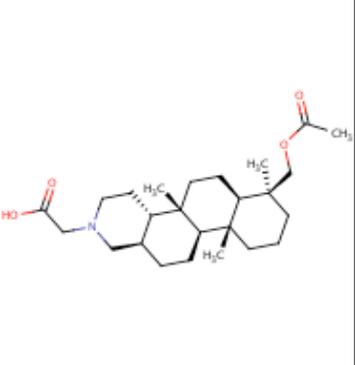
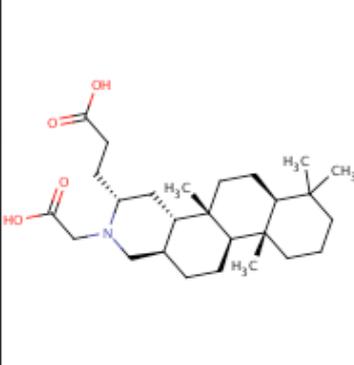
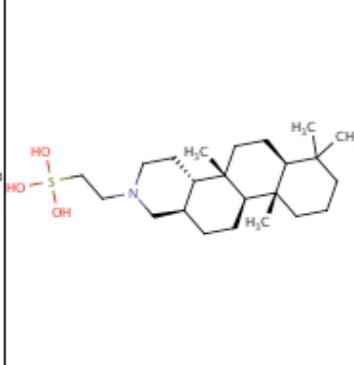
<p style="text-align: center;">55</p>  <p>Falcarindiol_5281148</p>	<p style="text-align: center;">56</p>  <p>Friedelina_91472</p>	<p style="text-align: center;">57</p>  <p>Gracilin_A_MARINE</p>
<p style="text-align: center;">58</p>  <p>Gracilin_A_Spider10233474</p>	<p style="text-align: center;">59</p>  <p>Harpalcina_I</p>	<p style="text-align: center;">60</p>  <p>Harpalcina_II</p>
<p style="text-align: center;">61</p>  <p>Heparina_1U4L</p>	<p style="text-align: center;">62</p>  <p>Hesperidina_10621</p>	<p style="text-align: center;">63</p>  <p>Ilimaquinona_72291</p>

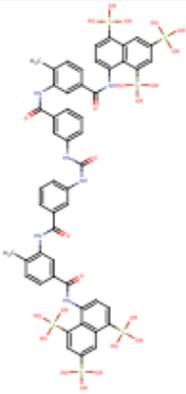
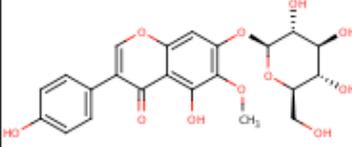
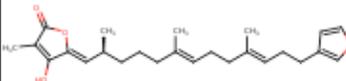
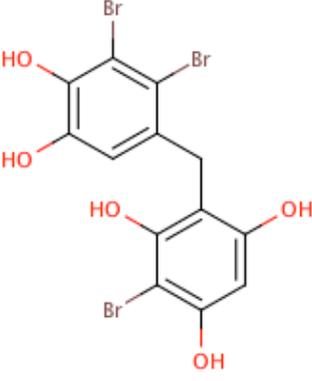
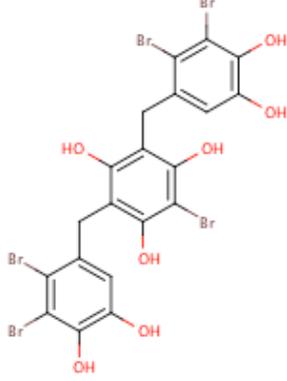
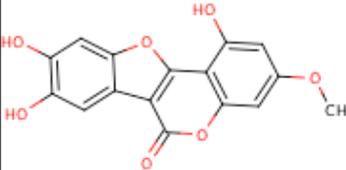
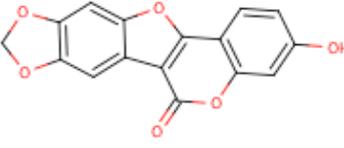
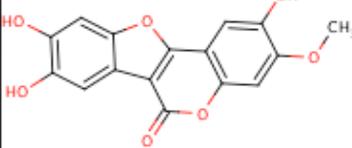
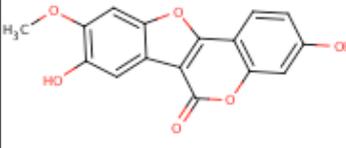
<p style="text-align: center;">64</p>  <p style="text-align: center;">Ilimaquinona_MARINE</p>	<p style="text-align: center;">65</p>  <p style="text-align: center;">Indometacina_3715</p>	<p style="text-align: center;">66</p>  <p style="text-align: center;">Iridina_5281777</p>
<p style="text-align: center;">67</p>  <p style="text-align: center;">IsoQuercitrina_5280804</p>	<p style="text-align: center;">68</p>  <p style="text-align: center;">Luffariellin_A_5387266</p>	<p style="text-align: center;">69</p>  <p style="text-align: center;">Luffariellin_B_MARINE</p>
<p style="text-align: center;">70</p>  <p style="text-align: center;">Luffariellin_C_SPIDER10472121</p>	<p style="text-align: center;">71</p>  <p style="text-align: center;">Luffariellin_D_MARINE</p>	<p style="text-align: center;">72</p>  <p style="text-align: center;">Luffariellolide_5387248</p>

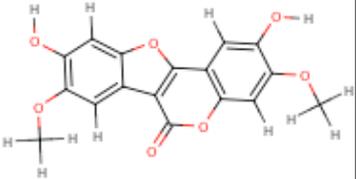
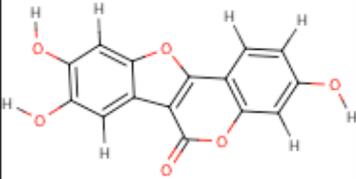
73	74	75
		
Luffolide_3081204	Luffolide_MARINE	Lupeol_259846
76	77	78
		
Luteolina_5280445	Manoalide_6437368	MMHDA_Spider10475158
79	80	81
		
Nerolidilcatecol_5352089	Norrisolide_MARINE	Norrisolide_spider9524326

<p style="text-align: center;">82</p>  <p style="text-align: center;">Palauolide_13859138</p>	<p style="text-align: center;">83</p>  <p style="text-align: center;">Palauolide_MARINE</p>	<p style="text-align: center;">84</p>  <p style="text-align: center;">Palauolol_5352111</p>
<p style="text-align: center;">85</p>  <p style="text-align: center;">Palauolol_MARINE</p>	<p style="text-align: center;">86</p>  <p style="text-align: center;">Palinurin_MARINE</p>	<p style="text-align: center;">87</p>  <p style="text-align: center;">Palinurin_SPIDER10469862</p>
<p style="text-align: center;">88</p>  <p style="text-align: center;">p-BPB_7454</p>	<p style="text-align: center;">89</p>  <p style="text-align: center;">Petrosaspongiolide_M_44422438</p>	<p style="text-align: center;">90</p>  <p style="text-align: center;">Petrosaspongiolide_M_Marine</p>

<p style="text-align: center;">91</p> 	<p style="text-align: center;">92</p> 	<p style="text-align: center;">93</p> 
<p>Primetina_11055</p>	<p>Quercetina_5280343</p>	<p>Quercitrina_5280459</p>
<p style="text-align: center;">94</p> 	<p style="text-align: center;">95</p> 	<p style="text-align: center;">96</p> 
<p>Resveratrol_445154</p>	<p>Rhipocephalin_5281528</p>	<p>Rhipocephalin_MARINE</p>
<p style="text-align: center;">97</p> 	<p style="text-align: center;">98</p> 	<p style="text-align: center;">99</p> 
<p>Rutina_5280805</p>	<p>Salireposide_540058</p>	<p>Scalarial_119491</p>

<p style="text-align: center;">100</p> 	<p style="text-align: center;">101</p> 	<p style="text-align: center;">102</p> 
<p>Scalaradial_MARINE</p>	<p>Schumanniofoside_5491293</p>	<p>Secomanoalide_5387263</p>
<p style="text-align: center;">103</p> 	<p style="text-align: center;">104</p> 	<p style="text-align: center;">105</p> 
<p>Sitosterol_25201437</p>	<p>Spongidine_A_Spider16738468</p>	<p>Spongidine_B_Marine</p>
<p style="text-align: center;">106</p> 	<p style="text-align: center;">107</p> 	<p style="text-align: center;">108</p> 
<p>Spongidine_B_Spider16738469</p>	<p>Spongidine_C_Spider16738470</p>	<p>Spongidine_D_Spider16738471</p>

<p style="text-align: center;">109</p> 	<p style="text-align: center;">110</p> 	<p style="text-align: center;">111</p> 
<p>Suramina_5361</p>	<p>Tetoridina_5281810</p>	<p>Variabilin_MARINE</p>
<p style="text-align: center;">112</p> 	<p style="text-align: center;">113</p> 	<p style="text-align: center;">114</p> 
<p>Vidalol_A_132036</p>	<p>Vidalol_B_132037</p>	<p>Wedelolactona_5281813</p>
<p style="text-align: center;">115</p> 	<p style="text-align: center;">116</p> 	<p style="text-align: center;">117</p> 
<p>Wedelolactona_Analogo_A</p>	<p>Wedelolactona_Analogo_B</p>	<p>Wedelolactona_Analogo_C</p>

118	119
 <p>The structure shows a central lactone ring fused to two benzene rings. The left benzene ring has a hydroxyl group at the top and a methoxy group at the bottom. The right benzene ring has a hydroxyl group at the top and a methoxy group at the bottom. The lactone ring has a carbonyl group at the top and an oxygen atom at the bottom.</p>	 <p>The structure is identical to the one in column 118, showing a central lactone ring fused to two benzene rings with hydroxyl and methoxy substituents.</p>
Wedelolactona_Analogo_D	Wedelolactona_Analogo_E

Apêndice B

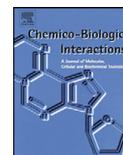
Trabalhos publicados em revistas indexadas.

Chemico-Biological Interactions 189 (2011) 9–16



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint

Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2

Camila Aparecida Cotrim^{a,*}, Simone Cristina Buzzo de Oliveira^a, Eduardo B.S. Diz Filho^a, Fabiana Vieira Fonseca^a, Lineu Baldissera Jr.^b, Edson Antunes^b, Rafael Matos Ximenes^c, Helena Serra Azul Monteiro^c, Marcelo Montenegro Rabello^d, Marcelo Zaldini Hernandez^d, Daniela de Oliveira Toyama^e, Marcos Hikari Toyama^f

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^b Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^c Laboratório de Farmacologia de Venenos, Toxinas e Lectinas (LAFAVET), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^d Laboratório de Química Teórica Medicinal – LQTM, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^e Universidade Presbiteriana Mackenzie, CCBS, São Paulo, Brazil

^f Campus Experimental do Litoral Paulista – UNESP, São Vicente, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2010

Received in revised form 27 October 2010

Accepted 29 October 2010

Available online 4 November 2010

Keywords:

sPLA
Crotalus durissus terrificus
Quercetin
Pharmacological sites
Molecular docking

ABSTRACT

As polyphenolic compounds isolated from plants extracts, flavonoids have been applied to various pharmaceutical uses in recent decades due to their anti-inflammatory, cancer preventive, and cardiovascular protective activities. In this study, we evaluated the effects of the flavonoid quercetin on *Crotalus durissus terrificus* secretory phospholipase A2 (sPLA2), an important protein involved in the release of arachidonic acid from phospholipid membranes. The protein was chemically modified by treatment with quercetin, which resulted in modifications in the secondary structure as evidenced through circular dichroism. In addition, quercetin was able to inhibit the enzymatic activity and some pharmacological activities of sPLA2, including its antibacterial activity, its ability to induce platelet aggregation, and its myotoxicity by approximately 40%, but was not able to reduce the inflammatory and neurotoxic activities of sPLA2. These results suggest the existence of two pharmacological sites in the protein, one that is correlated with the enzymatic site and another that is distinct from it. We also performed molecular docking to better understand the possible interactions between quercetin and sPLA2. Our docking data showed the existence of hydrogen-bonded, polar interactions and hydrophobic interactions, suggesting that other flavonoids with similar structures could bind to sPLA2. Further research is warranted to investigate the potential use of flavonoids as sPLA2 inhibitors.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Phospholipases A2 (PLA2, EC 3.1.1.4) are small proteins that catalyze the hydrolysis of glycerophospholipids at the sn-2 position in a Ca²⁺-dependent reaction, releasing lysophospholipids and fatty acids [1–3]. These enzymes are the main component of snake venom and have been investigated not only because they have a wide range of biological effects, but also due to their similar-

ity to mammalian phospholipases [4,5]. However, in contrast to their mammalian counterparts, several snake venom PLA2s are toxins that induce pharmacological effects [6] through arachidonic acid metabolism leading to the production of various lipid pro-inflammatory mediators such as prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes [7]. Recent studies have shown that inhibition of cytosolic PLA2 (cPLA2) leads to a decrease in eicosanoid levels and, reduced inflammation [8].

Due to the role of PLA2s in the inflammatory process, there is pharmacological interest in PLA2 inhibitors, and among these, the flavonoids have been successfully studied. Flavonoids are widely produced in plants tissues making them suitable targets for pharmaceutical extraction and chemical synthesis [8,9]. The inhibitory effect of flavonoids on secretory PLA2 (sPLA2) was reported by Gil et al. [10], and Lindahl and Tagesson [11]. Their results showed that inhibition of sPLA2 from different sources following incubation with various flavonoids is dependent on the 5-hydroxyl group as well as the double bond and the double-bonded oxygen in the oxane ring, and that the hydroxyl groups at the 3'- and 4'-

* Corresponding author at: Instituto de Biologia – UNICAMP, Rua Monteiro Lobato, 255 – Cidade Universitária Zeferino Vaz, Zip Code: 13083-862, Campinas, SP, Brazil. Tel.: +55 19 3521 6132.

E-mail addresses: cami.cotrim@yahoo.com.br (C.A. Cotrim), simonebuzzo@hotmail.com (S.C.B. de Oliveira), eduardodizfilho@gmail.com (E.B.S. Diz Filho), fvmacieira@yahoo.com.br (F.V. Fonseca), libajunior@hotmail.com (L. Baldissera Jr.), edson.antunes@uol.com.br (E. Antunes), rmximenes@hotmail.com (R.M. Ximenes), hsazul@gmail.com (H.S.A. Monteiro), marcelorabello@globo.com (M.M. Rabello), zaldini@ufpe.br (M.Z. Hernandez), gaveira@mackenzie.br (D. de Oliveira Toyama), mhtjpn@yahoo.com (M.H. Toyama).

Apêndice C

Trabalhos submetidos para publicação em revistas indexadas.

Inhibition of neurotoxic secretory phospholipase A₂ enzymatic, edematogenic and myotoxic activities by harpalycin 2, an isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliiana* Benth.

Marcelo M. Rabello^{1#}, Rafael M. Ximenes^{2#}, Renata M. Araújo^{3,4}, Edilberto R. Silveira⁴, Fábio H. R. Fagundes^{5,6}, Eduardo B. S. Diz-Filho^{5,6}, Simone C. Buzzo^{5,6}, Daniela de O. Toyama⁷, Henrique H. Gaeta⁶, Marcelo Z. Hernandez¹, Helena S. A. Monteiro^{2*} and Marcos H. Toyama⁶

Affiliation

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Brasil.

³ Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil.

⁴ Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREN), Universidade Federal do Ceará, Brasil.

⁵ Departamento de Bioquímica, Instituto de Biomedicina, Universidade de Campinas, Brasil.

⁶ Unidade de São Vicente, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Brasil.

⁷ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie, Brasil.

> From: fitote@elsevier.com

> Date: Wed, 21 Dec 2011 02:14:17 +0000

> Subject: Submission Confirmation

>

>

>Your submission entitled "Inhibition of neurotoxic secretory phospholipase A2 enzymatic, edematogenic and myotoxic activities by harpalycin 2, an isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliiana* Benth." has been received by Fitoterapia

>

> You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/fitote/>.

>

> Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

>

> Thank you for submitting your work to this journal.

>

> Kind regards,

>

> Elsevier Editorial System

> Fitoterapia

10 ANEXOS

Anexo A Tabela de Aminoácidos

Símbolo	Nome	Abreviação	Cadeia lateral
ALA	Alanina	A	Hidrofóbica
ARG	Arginina	R	Carregada positivamente
ASN	Asparagina	N	Polar sem carga
ASP	Aspartato ou Ácido Aspártico	D	Carregada negativamente
CYS	Cisteína	C	Caso especial
GLN	Glutamina	Q	Polar sem carga
GLU	Glutamato ou Ácido Glutâmico	E	Carregada negativamente
GLY	Glicina	G	Caso especial
HIS	Histidina	H	Carregada positivamente
ILE	Isoleucina	I	Hidrofóbica
LEU	Leucina	L	Hidrofóbica
LYS	Lisina	K	Carregada positivamente
MET	Metionina	M	Hidrofóbica
PHE	Fenilalanina	F	Hidrofóbica
PRO	Prolina	P	Caso especial
SER	Serina	S	Polar sem carga
THR	Treonina	T	Polar sem carga
TRP	Triptofano	W	Hidrofóbica
TYR	Tirosina	Y	Hidrofóbica
VAL	Valina	V	Hidrofóbica