

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
QUÍMICA BIOLÓGICA

TESE

**Planejamento Baseado na Estrutura da
Metaloprotease BpMP-I e Avaliação de
Tiossemicarbazonas Ativas contra a Peçonha da
Serpente *Bothrops pauloensis***

Francis Barbosa Ferreira

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

QUÍMICA BIOLÓGICA

**PLANEJAMENTO BASEADO NA ESTRUTURA DA
METALOPROTEASE BPMP-I E AVALIAÇÃO DE
TIOSSEMICARBAZONAS ATIVAS CONTRA A PEÇONHA DA
SERPENTE *Bothrops pauloensis***

FRANCIS BARBOSA FERREIRA

Sob a Orientação do Professor
Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna

e Co-orientação da Professora
Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no curso de Pós-Graduação
em Química, área de concentração em
Química Biológica.

Seropédica, RJ
Julho de 2016

572.76

F383p

T

Ferreira, Francis Barbosa, 1981-

Planejamento baseado na estrutura da metaloprotease BPMP-I e avaliação de tiossemicarbazonas ativas contra a peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* / Francis Barbosa Ferreira. - 2016.

101 f.: il.

Orientador: Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química, 2016.

Bibliografia: f. 65-80.

1. Metaloproteinases - Teses. 2. Metaloproteinases - Inibidores - Uso terapêutico - Teses. 3. Cobra - Veneno - Efeito fisiológico - Teses. 4. Tiossemicarbazida - Teses. 5. Hemorragia - Teses. 6. Bioquímica - Teses. I. Sant'Anna, Carlos Mauricio Rabello de, 1965-II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

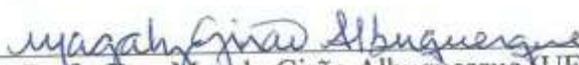
FRANCIS BARBOSA FERREIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração Química Biológica.

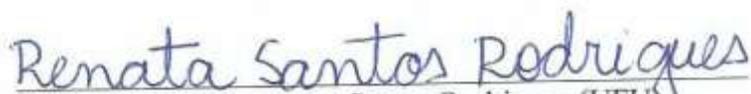
TESE APROVADA EM 04/08/2016



Prof. Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna (UFRRJ)
(Orientador)



Profª. Dra. Magaly Girão Albuquerque (UFRJ)



Profª. Dra. Renata Santos Rodrigues (UFU)



Profª. Dra. Rosane Nora Castro (UFRRJ)



Prof. Dr. Emerson Guedes Pontes (UFRRJ)

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente à minha esposa, Sandra, pelo amor, companheirismo, carinho e compreensão em todos os momentos felizes e tristes passados durante a realização deste trabalho.

Aos meus filhos, Maria Luiza B. Dantas, pela descontração nos momentos mais difíceis, e João Pedro.

Aos meus pais, Carlos e Ana Maria, pelo amor incondicional e por fazer de mim esta pessoa que sou hoje. Tenho muito orgulho de vocês, amo-lhes muito.

Agradecimentos

Aos meus filhos, Maria Luiza Barbosa Dantas, por me fazer sorrir e por suportar todos os dias de ausência, e João Pedro, que ainda está por vir, mas que já amo incondicionalmente. Razão do meu viver!

À minha esposa, companheira, amiga e amante Sandra, pelo carinho, paciência, compreensão e dedicação. Pelo abraço nas horas difíceis. Pelo sermão nos momentos de fraqueza. Por tudo aquilo que você representa pra mim. Te amo, muito!

Aos meus pais, Carlos e Ana Maria, pelo apoio, carinho e dedicação. Amo vocês!

Ao Prof. Dr. Carlos Mauricio R. de Sant'Anna, pela orientação, amizade, confiança, oportunidades, paciência e ensinamentos. Muito Obrigado Mauricio!

À Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pela coorientação e por abrir as portas do laboratório para realização deste trabalho! Muito obrigado, Veri!

À Profa. Dra. Cristiane Sales, pela atenção, pelo acolhimento e oportunidade. A senhora abriu as portas da Rural para mim, muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Arthur E. Kummerle pela contribuição imprescindível neste trabalho, pela paciência e pelos ensinamentos. Muito obrigado!

À minha grande amiga Dra. Dayane pela amizade desde os tempos de “cursinho”, pelo auxílio em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho e por nos divertir tanto no laboratório. Valeu “moranguinho”!

Ao aluno Thiago pela dedicação e força de vontade para realizar a síntese dos compostos.

Aos meus amigos Fernanda e Saulo, por me acolher em seu lar como membro da família.

Aos demais Professores do Departamento de Química: Profa. Dra. Rosane, Prof. Dr. Marco Edilson, e outros que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação e com a realização deste trabalho.

Aos demais colegas de laboratório: Dr. Daniel “Comandante”, Dra. Catarina, Sheisi e Larissa.

Ao técnico administrativo Paulo pelo auxílio sempre que necessário.

À FAZU – Faculdades Associadas de Uberaba por ceder o Laboratório de Química para realização de experimentos.

À CAPES e FAPERJ pelo auxílio financeiro.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

FERREIRA, Francis Barbosa. **Planejamento Baseado na Estrutura da Metaloprotease BpMP-I e Avaliação de Tiossemicarbazonas Ativas contra a Peçonha da Serpente *Bothrops pauloensis***. 2016. 127p. Tese (Doutorado em Ciências, Química Biológica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Neste trabalho, foram utilizadas semi e tiossemicarbazonas, selecionadas na quimioteca do LaDMol-QM (Dequim-UFRRJ), para o estudo das interações destas com o sítio ativo de uma metaloprotease da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* por modelagem molecular e ensaios de inibição da atividade enzimática e biológica sobre a toxina. A estrutura cristalográfica de uma metaloprotease (BaPI) complexada com um inibidor (um peptideomimético) (código PDB 2W12) foi utilizada como molde para a construção do modelo 3D da metaloprotease da peçonha de *B. pauloensis* (BpMP-I). O modelo 3D teórico da BpMP-I, inédito para esta toxina, apresentou bons parâmetros de qualidade, sendo considerado adequado para estudos de planejamento de ligantes baseado na estrutura. As tiossemicarbazonas obtiveram melhores resultados, quando comparados com os resultados das semicarbazonas, tanto para os ensaios de docagem molecular quanto para estudos de inibição da atividade enzimática *in vitro*. Estudos por métodos semiempíricos indicam uma entalpia de interação positiva, sugerindo que a inibição enzimática por estes compostos deve ser um processo controlado entropicamente. Os resultados foram utilizados para selecionar o derivado LDQM-IN-23 e propor modificações estruturais planejadas racionalmente, visando melhorar a interação deste com a toxina. O estudo do sítio catalítico da metaloprotease mostrou que esta possui uma cavidade adjacente com grupos amino das ligações peptídicas disponíveis para interação. Foi proposta, então, a inserção de um grupo carboxilato com diferentes espaçadores, 2 (LDQM-IN-23b) e 3 grupos metileno (LDQM-IN-23c). Os resultados de docagem e otimização semi-empírica mostraram que houve uma melhora considerável na interação dos ligantes modificados, os quais foram sintetizados e testados para as atividades de inibição enzimática e biológica. Na inibição enzimática, houve melhora da CI_{50} com o aumento do espaçador. O composto LDQM-IN-23 tem CI_{50} de 3011,00 μM e os compostos modificados possuem a CI_{50} de 79,12 (LDQM-IN-23b) e 1,77 μM (LDQM-IN-23c). Estes compostos foram testados para a inibição da atividade hemorrágica *in vivo* induzida pela Botropoidina, uma metaloprotease da classe P-III, e pela peçonha bruta de *B. pauloensis*. Os três compostos conseguiram inibir a atividade hemorrágica induzida pela toxina isolada e pela peçonha, sendo que o composto LDQM-IN-23c mostrou maior eficiência, quando comparado com os outros dois, e para a proporção de 1:10 (m/m peçonha/inibidor) a inibição da atividade foi de 100%. Foi realizado um estudo de docagem deste composto líder com outras metaloproteases de peçonha de serpentes (SVMPs – Snake Venom Metalloproteinases), de espécies e gêneros diferentes, mostrando que este ligante consegue interagir com outras SVMPs e é um candidato para inibir a atividade hemorrágica de SVMPs presentes na peçonha, não só de *B. pauloensis*, mas de outras serpentes.

Palavras-chave: Metaloproteases. Veneno de serpentes. Tiossemicarbazonas. Inibição de atividade hemorrágica. Planejamento de ligantes auxiliado por computador.

ABSTRACT

FERREIRA, Francis Barbosa. **BpMP-I Metalloproteinase Structure Based Design and Evaluation of Thiosemicarbazones Active against *Bothrops pauloensis* snake venom.** 2016. 127p. Thesis (Chemistry PhD, Biological Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

In this work, semi and thiosemicarbazones selected from the LaDMol-QM library, were used to study their interactions with a metalloproteinase from the snake *Bothrops pauloensis* (BpMP-I) by molecular modelling and enzymatic inhibition assays with the toxin. The crystallographic structure of BaPI (PDB code: 2W12) was used as a mold to build the 3D model of BpMP-I by homology modeling. The theoretical model of BpMP-I showed good quality parameters and was used in a subsequent molecular modeling study. The thiosemicarbazones showed better molecular docking results and *in vitro* enzymatic inhibitions assays than semicarbazones. Studies by semi-empirical methods indicate a positive enthalpy of interaction, suggesting that the enzyme inhibition by these compounds must be an entropy-driven process. The results were used together to select the LDQM-IN-23 compound and propose rationally designed modifications to improve the interactions with the toxin. The study of the catalytic site of BpMP-I showed that there is an adjacent pocket with amino groups of the peptide bonds available for interaction. All results were used together to design structural changes, aiming the enhancing of the interaction with toxin. Therefore, was proposed the insertion of the carboxyl group with different spacers, containing 2 (LDQM-IN-23b) and 3 methylene groups (LDQM-IN-23c). The docking results and semi-empirical optimization showed that there was a considerable improvement in the interaction for the modified compounds. The modified compounds were synthesized and tested for biological and enzymatic inhibition activity. It was observed that the IC₅₀ values have improved: the original molecule, LDQM-IN-23 has an IC₅₀ of 3,011 μM and the modified molecules have IC₅₀ of 79.12 (LDQM-IN-23b) and 1.77 μM (LDQM-IN-23c). These molecules were tested for inhibition of hemorrhagic activity induced by Bothropoidin, a P-III class metalloproteinase, and by the *B. pauloensis* whole snake venom. The three molecules can inhibit the hemorrhagic activity induced by isolated toxin and whole venom, and LDQM-IN-23c showed higher efficiency compared with the other two, and in a rate of 1:10 (w/w venom/inhibitor) the inhibition of the hemorrhagic activity was 100%. A molecular docking study of this lead compound with Snake Venom Metalloproteases (SVMPs) from different snake species and genera showed that this molecule can effectively interact with these SVMPs.

Keywords: Metalloprotease. Snake venom. Thiosemicarbazones. Hemorrhagic activity inhibition. Computer Assisted Ligand Design.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Bothrops pauloensis*. **A** – Distribuição geográfica (SILVA, 2004); **B** – Foto de exemplar (CAMPBELL; LAMAR, 2004). **C** – Padrão de manchas da espécie (SILVA, 2004; SILVA; RODRIGUES, 2008). Figura retirada da dissertação de mestrado de Thais Machado (MACHADO, 2010). 3
- Figura 2:** Aparato de inoculação da peçonha, *Daboia siamensis*. A: Espécime dissecado; B: Diagrama. Fonte: WARRELL, 2010. 4
- Figura 3:** **A)** Comparação do perfil proteômico de *Bothrops atrox* da Colômbia (acima) e do Brasil (abaixo) (NUÑES *et al.*, 2009); **B)** perfil protéico da peçonha de *Bothrops jararaca*: 1 – Adulto, 2 – Jovem (Newborn), 5 – Padrão de massa molecular, em PAGE-SDS em condições reduzidas (ANTUNES *et al.*, 2010); **C)** perfil protéico de diferentes espécies botrópicas em PAGE-SDS (QUEIROZ *et al.*, 2008). 6
- Figura 4:** Comparação entre o perfil transcriptômico e proteômico da peçonha de *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 2012). Legenda: SVMP: Snake Venom Metallo Proteases (Metaloproteases de veneno de serpentes); BPP: Bradykinin-potentiating Peptide (Peptídeo potencializador); PLA₂: Phospholipase A₂ (Fosfolipase A₂); svVEGF: snake venom Vascular Endothelial Grow Factor (Fator de crescimento vascular endotelial de veneno de serpentes); NGF: Neurotrophic Growth Factor (Fator de crescimento neurotrófico); LAO: L-amino oxidase; CRISP: Cysteins-rich secretory proteins (Proteínas secretórias ricas em cisteína). 7
- Figura 5:** Dano tecidual local evidenciando edema, bolhas, equimose e necrose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a). 8
- Figura 6:** Classificação das metaloendopeptidases. Em amarelo está destacado o clã das Metzincinas e em vermelho a família das Adamalinas e ADAMs, na qual está contida as SVMPs. Fonte: Adaptado de Cerdà-Costa e Gomis-Rüth (2014). 11
- Figura 7:** Esquema do motivo de ligação ao zinco com três resíduos de histidina e o — “*Met-turn*” mostrando a sequência comum das metzincinas. O resíduo de glutamato também foi evidenciado, o qual desempenha importante função na atividade catalítica. Segmentos variáveis são identificados pelas linhas pontilhadas (STÖCKER; BODE, 1995). 12
- Figura 8:** Mecanismo de catálise das metaloproteases. A) Foram destacados os resíduos de histidina coodenando o zinco no sítio catalítico, juntamente com uma molécula de água. O resíduo de glutamato, que participa do processo de catálise, também está em destaque. Uma ligação peptídica, representando o substrato, também foi mostrada. B) Após a transferência do próton da água para o resíduo de glutamato, há um ataque nucleofílico e a formação de um intermediário tetraédrico. C) Há o rompimento da ligação peptídica com a inserção de um hidrogênio ao Nitrogênio, liberando os produtos da reação e regeneração da enzima (Adaptada de AKAO, 2011). 13
- Figura 9:** Estrutura de SVMP-PIII – RVV-X, e seus respectivos domínios, M (metaloprotease), D/DL (desintegrina/semelhante a desintegrina), CR (rico em cisteína) e CTLPs (proteínas semelhantes à lectinas tipo-C). Fonte: TAKEDA *et al.*, 2012. 16
- Figura 10:** Representação esquemática das SVMPs. Cada domínio ou segmento é representado por uma cor diferente. PS: peptídeo sinal; SH: Resíduo de cisteína responsável pelo sistema cisteína *swicth*; Metalo: domínio catalítico; Desintegrina: domínio desintegrina ou desintegrina-like; RC: domínio rico em cisteína; Lectina: Domínio lectina tipo-C. Adaptado de Takeya e Takeda (2012). 17

Figura 11: Acima: Sequência primária da BpMP-I (NAVES-DE-SOUZA <i>et al.</i> , 2012). Em destaque estão os resíduos de histidina, glutamato e metionina, importantes para a atividade catalítica da toxina. Abaixo: Estrutura tridimensional em α -hélice e β -pregueada e superfície de van der Waals.....	18
Figura 12: Estrutura do <i>p</i> -cumarato de triacontila, composto isolado de <i>Bombacopsis glabra</i> (MENDES <i>et al.</i> , 2013).	20
Figura 13: A) Estrutura da função ácido hidroxâmico. B) Estrutura de um inibidor de metaloproteases, o Marimastat – British Biotech (LAING <i>et al.</i> , 2007).....	20
Figura 14: Estrutura genérica de semicarbazonas e tiossemicarbazonas. A numeração dos átomos é definida segundo a IUPAC – <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional da Química Pura e Aplicada).....	21
Figura 15: Exemplo de gráfico de Ramachandran (estrutura 2W12) gerada pelo programa RAMPAGE (LOVELL <i>et al.</i> , 2012), mostrando em azul intenso as regiões favoráveis, azul claro, regiões permitidas, bege escuro, regiões favoráveis para glicina, bege claro, regiões permitidas para glicina e, em branco, as regiões desfavoráveis.	23
Figura 16: Exemplo de gráfico de pontuação Z (<i>Z-score</i>) (estrutura 4AIG). O X vermelho mostra a pontuação obtida pelo modelo, comparado com as pontuações de outras estruturas com tamanhos semelhante, depositadas no banco de dados cristalográfico (BENKERT <i>et al.</i> , 2011).....	24
Figura 17: Etapas da construção de um modelo tridimensional utilizando modelagem comparativa (ou por homologia). Adaptado de Casavotto e Phatak (2009).....	25
Figura 18: Esquema de GA utilizado pelo programa GOLD (CCDC). Adaptado de JONES <i>et al.</i> , 1997.	33
Figura 18: Estrutura básica das semi e tiossemicarbazonas utilizadas.	38
Figura 19: Alinhamento das sequências da BpMP-I (NAVES-DE-SOUZA <i>et al.</i> , 2012) com a BaPI (LINGOT <i>et al.</i> , 2009) (PDB: 2W12) mostrando os resíduos conservados (79%) e a similaridade total das estruturas (89%). Em destaque estão os resíduos de histidina em vermelho, os quais coordenam o zinco no sítio catalítico, e o resíduo de glutamato em verde, essencial para a atividade catalítica.	40
Figura 20: Validação do modelo teórico 3D da BpMP-I. A) Sobreposição das estruturas 3D da BpMP-I (azul) e da BaPI (verde); B) Gráfico Ramachandran do modelo da BpMP-I gerado pelo programa Rampage (LOVELL <i>et al.</i> , 2012) mostrando que 99% dos resíduos de aminoácidos estão na região permitida do gráfico.	40
Figura 21: Continuação.	43
Figura 22: Comparação da estrutura original co-cristalizada (2W12) (carbonos em azul) com a da solução, com menor valor de RMSD segundo maior valor de pontuação (73,8), obtida pela função GoldScore durante re-docagem (carbonos em verde).....	44
Figura 23: Moléculas LDQM-IN-23 (esquerda) e LDQM-IN-58 (direita) docadas no sítio catalítico da BpMP-I.....	46
Figura 24: Interações obtidas para a molécula LDQM-IN-23 após o docagem no sítio catalítico da BpMP-I.....	47
Figura 25: Cavidade adjacente ao sítio catalítico da toxina. Em destaque estão mostrados o ligante, interagindo com o Zn^{2+} e com a Gly109, e os resíduos para interações potenciais, Gln106, Ile108 e Ile169.	50

- Figura 26:** Modificação estrutural proposta para a molécula LDQM-IN-23. O espaçador “n” pode variar entre 2 e 3 carbonos, gerando as moléculas modificadas LDQM-IN-23b e LDQM-IN-23c, respectivamente. 51
- Figura 27:** Resultados da docagem das moléculas modificadas racionalmente no sítio catalítico da toxina BpMP-I. Em destaque estão os principais resíduos envolvidos na interação com os ligantes LDQM-IN-23b (A) e 23c (B). Os marcadores para os nomes dos resíduos participantes mais o íon Zn^{2+} estão em azul, e as distâncias (em Å) entre átomos que possuem interações entre si foram marcados de amarelo. 53
- Figura 28:** Ensaio de inibição promovido pelos ligantes LDQM-IN-23, 23b e 23c sobre a atividade hemorrágica induzida pela toxina isolada Botropoidina (Bdn) (GOMES et al., 2015) na proporção de 1:20 (m/m) toxina/ligante. A) Porcentagem de inibição da atividade hemorrágica; B) Figuras ilustrando cada tratamento realizado. O controle negativo foi realizado com salina (NaCl 0,9%). Controle positivo: Botropoidina isolada (Bdn). Bdn + 23: toxina isolada mais o ligante LDQM-IN-23. Bdn + 23b: Toxina isolada mais o ligante LDQM-IN-23b. Bdn + 23c: toxina isolada mais o ligante LDQM-IN-23c. Foi utilizada a mesma sequência para A e B. Os resultados são mostrados como a média \pm desvio padrão (n=4) em triplicata. * Resultados estatisticamente significativos com relação ao controle negativo ($p < 0,05$). 55
- Figura 29:** Ensaio de inibição promovido pelos ligantes LDQM-IN-23, 23b e 23c sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* (Bp) na proporção de 1:20 (m/m) Bp/ligante. A) Porcentagem de inibição da atividade hemorrágica; B) Figuras ilustrando cada tratamento realizado. O controle negativo foi realizado com salina (NaCl 0,9%). Controle positivo: Bp de *Bothrops pauloensis*. Bp + 23: Bp mais o ligante LDQM-IN-23. Bp + 23b: Bp mais o ligante LDQM-IN-23b. Bp + 23c: Bp mais o ligante LDQM-IN-23c. Foi utilizada a mesma sequência para A e B. Os resultados foram mostrados como a média \pm desvio padrão (n=4) em triplicata. * Resultados estatisticamente significativos com relação ao controle negativo ($p < 0,05$). 56
- Figura 30:** Ensaio de inibição promovido pelo ligante LDQM-IN-23c sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* (Bp) nas proporções de 1:1, 1:5 e 1:10 (m/m) Bp/ligante. A) Porcentagem de inibição da atividade hemorrágica; B) Figuras ilustrando cada tratamento realizado. O controle negativo foi realizado com salina (NaCl 0,9%). Controle positivo: Bp de *Bothrops pauloensis*. Bp + 23c: Bp mais o ligante LDQM-IN-23. Foi utilizada a mesma sequência para A e B. Os resultados foram mostrados como a média \pm desvio padrão (n=4) em triplicata. * Resultados estatisticamente significativos com relação ao controle negativo ($p < 0,05$). 57
- Figura 31:** Análise comparativa da sequência primária de aminoácidos da proteína madura BpMP-I. Foi realizado o alinhamento com o domínio metalo (catalítico) de outras SVMPs da mesma família de serpentes (Viperidae). Em cinza estão marcados os resíduos de histidina, os quais fazem parte do sítio catalítico, além do resíduo de metionina (*met-turn*). O símbolo (*) representa resíduos de aminoácidos conservados em todas as sequências analisadas. O hífen representa gaps introduzidos nas sequências para maximizar o alinhamento. 59
- Figura 32:** Análise filogenética molecular da sequência da BpMP-I com outras sequências similares de SVMPs depositadas no PDB pelo método neighbor-joining. Foram consideradas as sequências das proteínas na forma madura. A maior distância das sequências das toxinas 1BUD e 4J4M com relação à BpMP-I evidencia o menor grau de parentesco. 61
- Figura 33:** Sítio de interação ao substrato das toxinas BpMP-I (azul) e 1BUD (verde). Em destaque estão os resíduos Phe175 e Ile168 da BpMP-I e Thr171 e Ile169 da 1BUD, além do

ligante LDQM-IN-23c: em azul para a BpMP-I e verde para a 1BUD. A superfície de van der Waals dos resíduos em destaque e do ligante também foi mostrada. 61

Figura 34: A) Determinação do coeficiente de partição (P) de um soluto. B) Modelo bilinear usado para descrever as correlações entre a atividade biológica e a lipofilicidade de uma série de fármacos congêneres. (Adaptado de: BARREIRO; FRAGA, 2015). 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Domínios estruturais das SVMPs.....	15
Tabela 2: Substituintes utilizados na estrutura básica representada na Figura 15.....	38
Tabela 3: Pontuações de docagem (função GoldScore) dos ligantes no sítio catalítico da enzima BpMP-I.	45
Tabela 4: Valores das entalpias de interação das tiossemicarbazonas com a enzima BpMP-I obtidos após a otimização das estruturas pelo método PM6 (programa MOPAC 2012).	48
Tabela 5: Valores das entalpias de interação das tiossemicarbazonas com a enzima BpMP-I contendo uma molécula de água, obtidos após a otimização das estruturas pelo método PM6 (programa MOPAC 2012).	48
Tabela 6: Resultados de determinação de inibição enzimática; valores obtidos para o ensaio de inibição de 50% da atividade enzimática (CI ₅₀).	49
Tabela 7: Valores das pontuações de docagem (função GoldScore) e das entalpias obtidas após a otimização das estruturas pelo método PM6 (programa MOPAC 2012).	52
Tabela 8: Comparação dos valores de CI ₅₀ da estrutura LDQM-IN-23 e das estruturas com modificações planejadas racionalmete.	54
Tabela 7: Pontuações de docagem (GoldScore) dos ligantes no sítio catalítico das SVMPs.	60

LISTA DE ABREVIACÕES

- ADAM – *A Desintegrin and Metalloproteinases*
- ADAMT – *A Desintegrin and Metalloproteinases with Thrombospondin Motifs*
- AM1 – *Austin Model 1* (Modelo de Austin 1)
- ASP – *Astex Statistical Potential* (Potencial Estatístico Astex)
- Bdn – Botropoidina
- BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta de Pesquisa para Alinhamento Local Básico)
- Bp – *Bothrops pauloensis*
- BPP – *Bradykinin-potentiating Peptide* (Pepídeo Potencializador de Bradicinina)
- CEBEA – Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
- CI₅₀ – Concentração de Inibição 50
- CR – *Cystein Rich* (Rico em Cisteína)
- CTLs – *C-type Lectin Proteins* (Proteínas Semelhantes à Lectina Tipo-C)
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)
- GA – *Genetic Algorithm* (Algoritmo Genético)
- GOLD – *Genetic Optimization for Ligand Docking* (Otimização Genética para Ancoramento do Ligante)
- IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional da Química Pura e Aplicada)
- MM – Mecânica Molecular
- MQ – Mecânica Quântica
- NAD – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide* (Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina)
- NGF – *Neurotrophic Growth Factor* (Fator de Crescimento Neurotrófico)
- NJ – *Neighborjoining*
- OM – Orbital Molecular
- PAF – *Platelet Activating Factor* (Fator de Ativação Plaquetária)
- PDB – *Protein Data Bank* (Banco de Dados de Proteína)
- PES – *Potential Energy Surface* (Superfície de Energia Potencial)
- PLA₂ – Fosfolipase A₂
- PLP – *Piecewise Linear Potential* (Potencial Linear por partes)
- PM3 – *Parameterized Model 3* (Modelo Parametrizado 3)

PM6 – *Parameterized Model 6* (Modelo Parametrizado 6)
PM7 – *Parameterized Model 7* (Modelo Parametrizado 7)
QM – Química Medicinal
QMEAN – *Qualitative Model Energy Analysis* (Modelo Qualitativo de Análise de Energia)
RE – Retículo Endoplasmático
RM1 – *Recife Model 1* (Modelo de Recife 1)
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMSD – *Root Mean Square Deviation* (Raiz do Desvio Médio Quadrático)
SAO – Soro Antiofídico
SBDD – *Structure Based Drug Design* (Planejamento de Fármacos Baseados na Estrutura)
SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia
SCF – *Self Consistent Field* (Campo auto-consistente)
SD – *Slater Determinants* (Determinante de Slater)
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SOM – Spin Orbital Molecular
SVMPs – *Snake Venom Metalloproteinases* (Metaloproteínas de peçonha de serpentes)
svVEGF – *Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Vascular Endotelial de peçonha de serpentes)
TCA – Ácido Tricloroacético
UFU – Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1	Serpentes: classificação e aspectos evolutivos	2
2.2	Características Epidemiológicas do Acidente Ofídico	3
2.3	Composição e Fisiopatologia das Peçonhas Botrópicas e Botropóicas	4
2.4	Fisiopatologia do Envenenamento Botrópico e Botropóico	7
2.5	Metaloproteases	10
2.5.1	Metzincinas.....	12
2.5.2	Adamalisinases/ Reprolisinases	13
2.5.3	Estrutura e função de Metaloproteases (SVMP)	14
2.6	Terapêutica.....	19
2.7	Inibidores	19
2.8	Modelagem Molecular	21
2.8.1	Modelagem Comparativa	21
2.8.2	Cálculos Semiempíricos	25
2.8.3	Entalpia de interação	30
2.8.4	Docagem.....	31
3	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	34
4	METODOLOGIA.....	35
4.1	Obtenção das toxinas	35
4.2	Compostos Sintéticos Utilizados	35
4.3	Obtenção e Manutenção dos Animais Para os Ensaios Biológicos	35
4.4	Quantificação de Proteínas	35
4.5	Ensaio Enzimático	36
4.5.1	Atividade azocaseinolítica.....	36
4.6	Atividade Hemorrágica.....	36
4.7	Ensaio de Inibição da Atividade Enzimática e Hemorrágica	36
4.8	Análise Estatística	37
4.9	Alinhamento e Análise Filogenética.....	37
4.10	Modelagem Computacional.....	37
4.10.1	Construção do modelo 3D da metaloprotease	37
4.10.2	Construção da estrutura das ligantes	37
4.10.3	Docagem Molecular	38
4.10.4	Cálculos semi-empíricos	38

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS	63
6.1	Conclusões	63
6.2	Perspectivas	65
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXOS	81
	Anexo 1	81
	Anexo 2 – Artigo em submissão	100

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o envenenamento ofídico está incluído na lista de doenças negligenciadas, sendo um problema de saúde pública, não só no Brasil, mas no mundo todo, acometendo, principalmente, os países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos. No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* são as maiores causadoras dos acidentes ofídicos, responsáveis por cerca de 73% destes (GUTIERREZ *et al.*, 2010; BRASIL, 2016a).

O quadro clínico desenvolvido após o acidente com uma serpente do gênero *Bothrops* pode ser muito variado, sendo dependente de vários fatores como a quantidade de peçonha inoculada, da localização da picada, idade e tamanho da espécie da serpente e da vítima e do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico (NUNES *et al.*, 2014; BRASIL, 2016b). As manifestações clínicas podem ser tanto locais quanto sistêmicas, sendo que as manifestações mais comuns são edema, hiperalgesia, hemorragia e necrose, além de alterações na hemostasia do paciente e no sistema nervoso (BRASIL, 2016a).

A constituição química destas peçonhas é muito complexa, com a maior parte de seus constituintes sendo proteínas, tóxicas ou não, as quais podem atuar na vítima de forma isolada ou sinérgica, potencializando, ainda mais, os danos causados (GUTIERREZ *et al.*, 2010; BRHAMA *et al.*, 2015). Várias destas proteínas foram isoladas e caracterizadas estrutural e funcionalmente (NAVES-DE-SOUZA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2013). Muitas delas apresentam um grande potencial farmacológico, podendo ser utilizadas como modelos para produção de fármacos no tratamento de várias doenças, como hipertensão, trombose e câncer.

Dentre estas proteínas, as metaloproteases são bastante importantes, visto que podem induzir uma variedade de efeitos tóxicos nas vítimas de acidente ofídico, sendo que o principal efeito é a hemorragia (NAVES-DE-SOUZA *et al.*, 2012). As toxinas metaloproteases estão divididas em três grupos, P-I a P-III, diferindo na composição dos domínios estruturais (FOX; SERRANO, 2008). As metaloproteases de veneno de serpentes (SVMP, do inglês *Snake Venom Metalloproteinases*) do grupo P-I possuem apenas o domínio metalo (catalítico); o grupo P-II possui, além do domínio metalo, o domínio desintegrina; o grupo P-III possui o domínio metalo, o domínio desintegrina e/ou domínios ricos em cisteína e lectina tipo-C.

As SVMPs estão sendo amplamente estudadas e o entendimento da estrutura e função, bem como dos mecanismos de ação e dos efeitos farmacológicos, podem ampliar nosso conhecimento em áreas relacionadas ao tratamento das vítimas de acidentes ofídicos e ao desenvolvimento de novos fármacos para distúrbios hemostáticos, inflamatórios e, ainda, com ação bactericida e antitumoral (NAVES-DE-SOUZA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2015).

Atualmente, a utilização da modelagem molecular como ferramenta para o estudo da estrutura de proteínas e para o planejamento de novos fármacos tornou-se bastante comum. O uso da modelagem pode contribuir para reduzir o tempo e o custo do processo para obtenção da estrutura 3D de proteínas de interesse, quando comparados com os métodos de cristalografia e RMN, além de auxiliar nos estudos de interação proteína/ligante, possibilitando direcionar ou planejar o desenvolvimento de ligantes com melhor interação com seus alvos bioquímicos (COTRIM *et al.*, 2011; CASTAÑEDA *et al.*, 2012).

A construção dos modelos proteicos 3D através da modelagem comparativa (ou por homologia) constitui o principal método para predição da estrutura de proteínas. Esta técnica permite a obtenção de uma estrutura 3D baseada na estrutura cristalográfica de uma proteína homóloga disponível em um banco de dados (SANTOS-FILHO; ALENCASTRO, 2003; CAVASOTTO; PHATAK, 2009). Adicionalmente, as técnicas de docagem de ligantes em proteínas e a otimização geométrica dos complexos obtidos permitem avaliar previamente a

qualidade da interação entre proteína e ligante, sendo possível, ainda, a avaliação de modificações estruturais deste ligante visando melhorar a interação com a proteína de interesse.

Neste sentido, o intuito deste trabalho é combinar estudos de modelagem molecular, que incluem o desenvolvimento de um modelo 3D de uma toxina presente na peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* e sua utilização em estudos de interação toxina/ligante por meio da combinação das técnicas de docagem molecular e cálculos semiempíricos, com estudos experimentais de determinação da atividade inibitória dos compostos frente à toxina. A combinação dos resultados destes estudos será usada para planejar modificações estruturais nos melhores ligantes, visando otimizar a interação destes com a toxina e suas atividades.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Serpentes: classificação e aspectos evolutivos

De acordo com a Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2016), as serpentes formam um grupo, juntamente com lagartos e anfisbenas, a ordem Squamata, integrando a classe Reptilia. As serpentes brasileiras estão divididas, atualmente, em 10 famílias: Anomalepididae, Leptotyphlopidae, Typhlopidae, Aniliidae, Tropidophiidae, Boidae, Colubridae, Dipsadidae, Elapidae e Viperidae (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2016), das quais, quatro famílias se destacam: Boidae, Colubridae, Elapidae e Viperidae, no território brasileiro.

No Brasil, a família Viperidae é constituída por 28 espécies divididas em 6 gêneros: *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Rhinocerophis*, de acordo com a nova classificação realizada por Mattoni e colaboradores (2012), sendo que esta nova classificação foi aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH).

Várias investigações sobre a origem e evolução das serpentes na América do Sul sugerem que as características morfológicas e ecológicas destas serpentes são resultantes de um processo de irradiação adaptativa ocorrida a cerca de 10 milhões de anos (WÜSTER *et al.*, 2002). Essa grande diversidade dificulta, até hoje, a classificação e o estabelecimento das relações filogenéticas. As serpentes botrópicas, por exemplo, foram originalmente divididas em 8 grupos, baseados nos aspectos morfológicos (contagem de escamas, coloração, ornamentação, morfologia do hemipênis, osteologia, dentre outros), bioquímicos (eletroforese do plasma) e moleculares (sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e nuclear) (JANEIRO-CINQUINI *et al.*, 1987; PENSANTES; FERNANDES, 1989; FERNANDES; ABE, 1991; CADLE, 1992; PARKINSON *et al.*, 2002; WÜSTER *et al.*, 2002).

Fenwick e colaboradores (2009) realizaram estudos morfológicos e moleculares, como análise do DNA mitocondrial, e propuseram uma nova classificação para o gênero *Bothrops*. Neste estudo algumas serpentes antes botrópicas passaram a pertencer a um novo gênero, agora denominado ***Bothropoides*** com 11 espécies (*B. alcatraz*, *B. diporus*, *B. erythromelas*, *B. insularis*, *B. lutzi*, *B. matogrossensis*, *B. pubescens*, *B. pauloensis*, *B. neuwiedi*, *B. marmoratus* e *B. jararaca*). O gênero *Bothrops* agora é composto de 17 espécies (*B. andianus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. brasiliensis*, *B. caribbaeus*, *B. isabellae*, *B. jararacussu*, *B. lanceolatus*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, *B. muriciensis*, *B. osbornei*, *B. pirajai*, *B. punctatus*, *B. sanctaecrucis*, e *B. venezuelensis*).

Em 2012, um trabalho realizado por Mattoni e colaboradores agrupou novamente os gêneros *Bothropoides* e *Bothrops*, sendo que o termo *Bothropoides* poderia ser utilizado como sinônimo de *Bothrops*. A espécie atualmente denominada *Bothrops pauloensis*, cuja toxina

isolada de sua peçonha foi objeto de estudo do presente trabalho, era descrita como *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Amaral, 1925), uma das doze subespécies do complexo *Bothrops neuwiedi* o qual era composto pelas seguintes subespécies, a saber: *B. n. bolivianus*, *B. n. diporus*, *B. n. goyazensis*, *B. n. lutz*, *B. n. matogrossensi*, *B. n. meridionalis*, *B. n. neuwiedi*, *B. n. paranaensis*, *B. n. pauloensis*, *B. n. piauhyensis*, *B. n. pubescens* e *B. n. urutu*. A subespécie *B. n. pauloensis* passou por duas reclassificações taxonômicas, onde foi denominada inicialmente como uma nova espécie *Bothrops pauloensis* (SILVA; RODRIGUES, 2008). Posteriormente, Fenwick e colaboradores (2009) realizaram uma revisão taxonômica baseada em evidências moleculares e morfológicas e alteraram o nome de várias espécies, sendo que a espécie *Bothrops pauloensis* passou a ser denominada *Bothropoides pauloensis*. Com o novo estudo de Mattoni e colaboradores (2012), a espécie *Bothropoides pauloensis* voltou a ser chamada de *Bothrops pauloensis*. Essa nova nomenclatura vem sendo utilizada por diferentes trabalhos citados na literatura e será a partir de agora adotada nessa revisão.

A espécie *Bothrops pauloensis* pode ser encontrada na região central do Brasil nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e São Paulo, como mostra a figura 1.

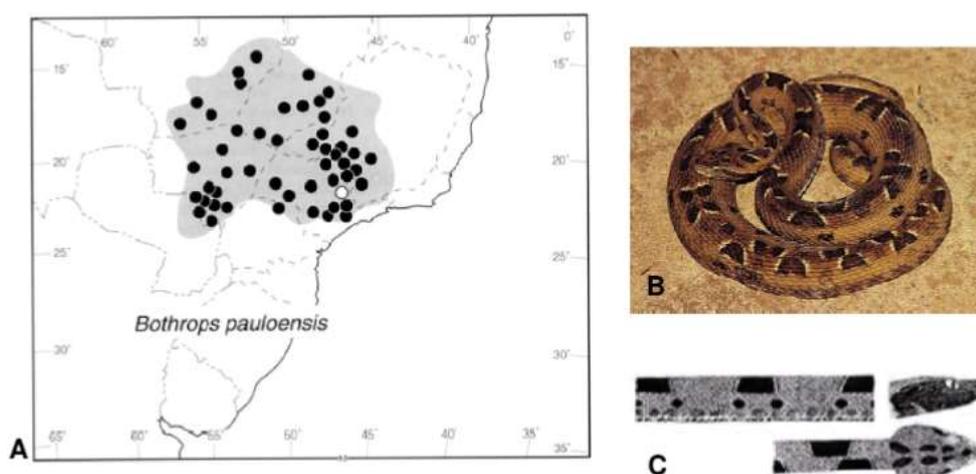


Figura 1: *Bothrops pauloensis*. **A** – Distribuição geográfica (SILVA, 2004); **B** – Foto de exemplar (CAMPBELL; LAMAR, 2004). **C** – Padrão de manchas da espécie (SILVA, 2004; SILVA; RODRIGUES, 2008). Figura retirada da dissertação de mestrado de Thais Machado (MACHADO, 2010).

2.2 Características Epidemiológicas do Acidente Ofídico

Os acidentes ofídicos estão crescendo em número de casos e em número de óbitos resultantes destes (GUTIERREZ *et al.*, 2010). Devido a isso e à falta de empenho governamental no sentido de se buscar tratamentos mais eficazes, o envenenamento ofídico é um problema de saúde pública, sendo considerado como uma das doenças negligenciadas (GUTIERREZ *et al.*, 2010). Kasturiratne e colaboradores (2008) estimaram que o número de acidentes ofídicos em 2007 foi de aproximadamente 420 mil casos registrados por ano em todo o mundo, com um índice de mortalidade de aproximadamente 4,7% (19.800 casos). Em 2015, Gutierrez e colaboradores estimam que o número de acidentes ofídicos chegue a 5

milhões de casos por ano, com cerca de 125 mil óbitos e com aproximadamente 400 mil casos de sequelas permanentes.

No Brasil, o número de notificações de ofidismo aumentou entre os anos de 2000 e 2011, ocorrendo uma redução gradual no número de acidentes até 2015. De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/1-Casos-Ofidismo-2000-2015.pdf>), ocorreram 24.460 casos de acidentes ofídicos em 2015, com mortalidade de 0,43% dos casos. Cerca de 73,5% foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*. A mortalidade, em geral baixa, porém, pode aumentar dependendo do tipo de envenenamento e do tempo decorrido entre o acidente e o atendimento. Por exemplo, no envenenamento crotálico, cujo atendimento demora de 6 a 12 horas após o acidente, o índice de mortalidade é de 4,7% (BRASIL, 2016b).

O número de casos de ofidismo no Brasil varia de acordo com a região (mais elevado nas regiões Norte e Nordeste) e com a época do ano, em que aumentam os acidentes com o aumento das chuvas e da temperatura, coincidentes com o período de maior atividade humana no campo. Os acidentes acometem com maior frequência adultos jovens do sexo masculino. Nas regiões Sul e Sudeste, os acidentes ocorrem em maior número no período de janeiro a abril (BRASIL, 2016a).

2.3 Composição e Fisiopatologia das Peçonhas Botrópicas e Botropóicas

As peçonhas de serpentes produzidas nas glândulas veneníferas que são um tipo de especialização de glândulas salivares (KOCHVA *et al.*, 1987) como mostra a figura 2. Estas são extremamente complexas contendo várias substâncias farmacologicamente ativas que atuam na indução das alterações fisiopatológicas decorrentes do envenenamento. Aproximadamente 90% da massa seca peçonha são proteínas tóxicas ou não tóxicas. Outros compostos também estão presentes como citrato, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos em especial as flavinas mononucleotídeo dinucleotídeo que são responsáveis pela cor amarela das peçonhas e em menor proporção aminoácidos livres e lipídeos (SOUZA *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 1992).

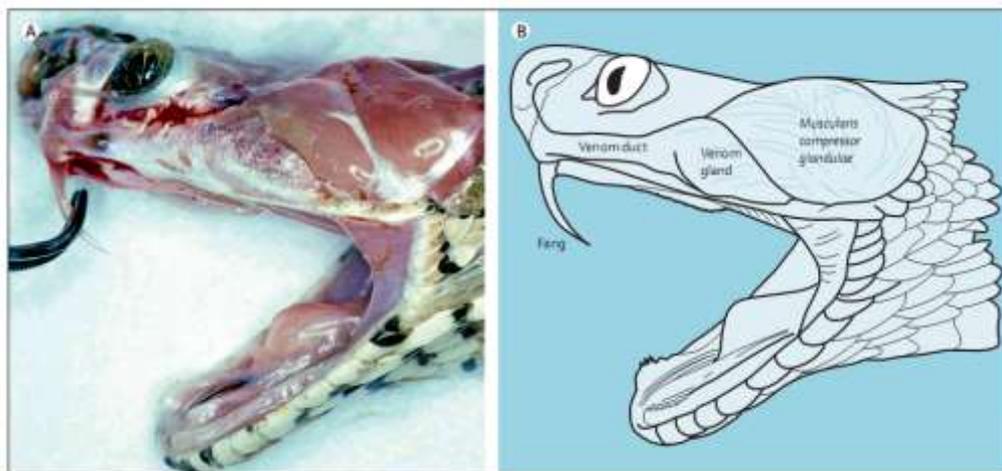


Figura 2: Aparato de inoculação da peçonha, *Daboia siamensis*. A: Espécime dissecado; B: Diagrama. Fonte: WARRELL, 2010.

Como constituintes enzimáticos mais importantes das peçonhas botrópicas e botropóicas, podemos encontrar metaloproteínas, serinoproteínas, desintegrinas, miotoxinas, fosfolipases A₂, L-amino oxidases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases, acetilcolinesterase, arginina esterase, hialuronidase, 5'- nucleotidase e NAD-nucleosidase, dentre outros (TU, 1988; STOCKER, 1990; QUEIROZ *et al.*, 2008; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009a).

Vários fatores podem afetar a composição da peçonha, incluindo origem geográfica, idade e sexo da serpente, estação do ano e tipo de presa. Alguns trabalhos demonstraram a variação na composição das peçonhas de mesmas espécies de acordo com a variação geográfica (RODRIGUES *et al.*, 1998; NUÑES *et al.*, 2009). Foi verificado que a composição da peçonha de *Bothrops atrox*, obtida de regiões diferentes (Colômbia e Brasil) é diferente, principalmente em relação à composição de metaloproteínas e fosfolipases A₂, como pode ser observado na figura 3A.

A variação da composição também pode ocorrer de acordo com a idade dos espécimes (ANTUNES *et al.*, 2010). Foi demonstrado que as peçonhas de *Bothrops jararaca* filhotes e adultos, apresentam uma importante variação intra-específica da composição da peçonha, bem como uma variação das atividades biológicas e imunológicas destas peçonhas (Figura 3B). A variação da composição das peçonhas também ocorre interespecificamente, como foi mostrado por Queiroz e colaboradores (2008). Os autores analisaram peçonhas de várias espécies botrópicas e concluíram que existem diferenças entre estas, o que pode refletir nas diferentes atividades biológicas produzidas pelas mesmas (Figura 3C).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de entender melhor a composição das peçonhas das serpentes, utilizando análises de proteômica e transcriptômica (RODRIGUES *et al.*, 2012; BRAHMA *et al.*, 2015). A análise proteômica da peçonha de *B. asper* realizada por Gutiérrez e colaboradores (2009a) mostrou a variação na composição desta peçonha quando coletadas de serpentes de diferentes regiões. Terra e colaboradores (2009) compararam a proteômica das peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops lanceolatus*, avaliando as diferenças na composição, principalmente, de metaloproteínas nestas duas peçonhas. As análises transcriptômicas de algumas peçonhas mostraram o perfil de expressão gênica. Kashima e colaboradores (2004) e Neiva e colaboradores (2009) realizaram a análise transcriptômica das glândulas de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops atrox*, respectivamente, contribuindo para o conhecimento da diversidade genética presente nas glândulas das serpentes deste gênero.

A combinação da análise de transcriptoma e proteômica das peçonhas revela parte da composição protéica e peptídica das mesmas e ainda traz novos conhecimentos sobre modificações pós-traducionais ocorridas nas glândulas de peçonha (VALENTE *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2012). Rodrigues e colaboradores (2012) realizaram a análise transcriptômica e proteômica da peçonha de *Bothrops pauloensis*, e verificaram que há uma diferença entre o transcriptoma e o proteoma, tanto na quantidade de certas toxinas quanto na estrutura, sugerindo que algumas proteínas possuem maior importância que outras na evolução desta espécie, por isso são mais expressas que outras, e algumas modificações nas estruturas destas proteínas ocorrem após a tradução de seus genes (Figura 4).

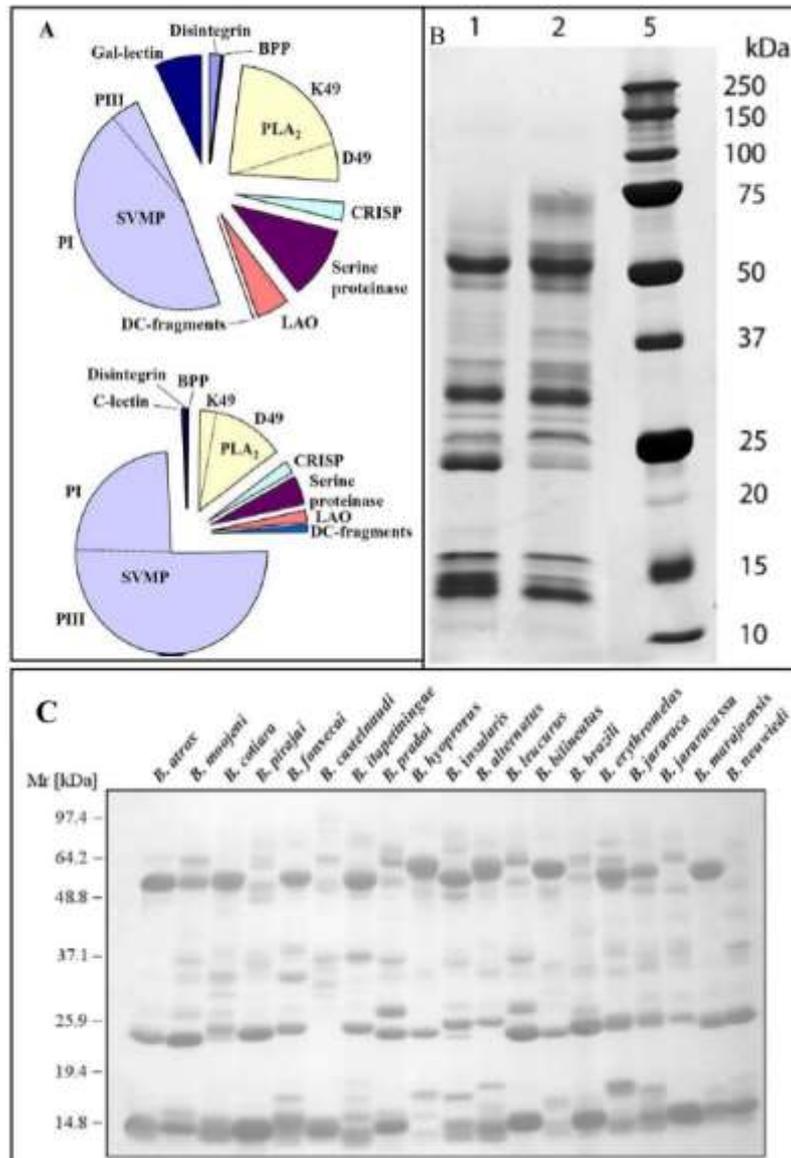


Figura 3: **A)** Comparação do perfil proteômico de *Bothrops atrox* da Colômbia (acima) e do Brasil (abaixo) (NUÑES *et al.*, 2009); **B)** perfil protéico da peçonha de *Bothrops jararaca*: 1 – Adulto, 2 – Jovem (Newborn), 5 – Padrão de massa molecular, em PAGE-SDS em condições reduzidas (ANTUNES *et al.*, 2010); **C)** perfil protéico de diferentes espécies botrópicas em PAGE-SDS (QUEIROZ *et al.*, 2008).

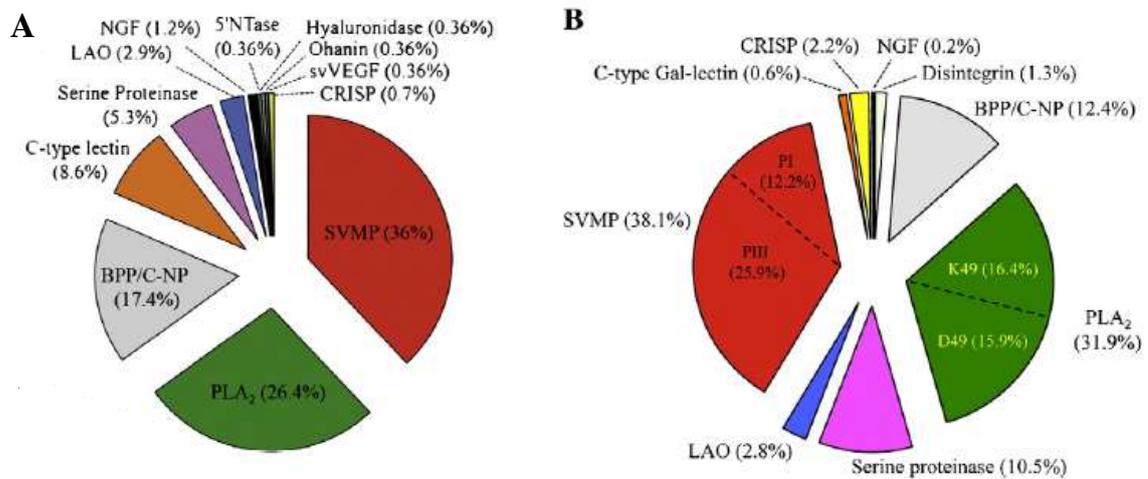


Figura 4: Comparação entre o perfil transcriptômico e proteômico da peçonha de *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 2012). Legenda: SVMP: Snake Venom Metallo Proteases (Metaloproteases de veneno de serpentes); BPP: Bradykinin-potentiating Peptide (Peptídeo potencializador); PLA₂: Phospholipase A₂ (Fosfolipase A₂); svVEGF: snake venom Vascular Endothelial Grow Factor (Fator de crescimento vascular endotelial de veneno de serpentes); NGF: Neurotrophic Growth Factor (Fator de crescimento neurotrófico); LAO: L-amino oxidase; CRISP: Cysteins-rich secretory proteins (Proteínas secretórias ricas em cisteína).

O conhecimento da composição protéica dessas peçonhas tem uma importância significativa, pois pode auxiliar também no aspecto terapêutico específico ligado a acidentes ofídicos. O estudo da proteômica das peçonhas pode trazer um conhecimento maior sobre quais toxinas são mais importantes para determinadas espécies e, com isso, aperfeiçoar a produção de antivenenos. Vários autores estão utilizando a venômica em conjunto com a antivenômica (identificação de epítopos contidos nas proteínas das peçonhas reconhecidos pelo soro antiveneno por técnicas de proteômica) na tentativa de um melhor direcionamento na fabricação dos soros antivenenos melhorando a eficiência destes e reduzindo os efeitos colaterais (CALVETE *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009a).

2.4 Fisiopatologia do Envenenamento Botrópico e Botropóico

Os efeitos tóxicos provocados pelas peçonhas botrópicas e botropoicas podem ser tanto locais quanto sistêmicos. Um dos principais efeitos locais induzidos por esta peçonha é a lesão tecidual (RODRIGUES *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2007; GUTIERREZ *et al.*, 2009b; OLIVEIRA *et al.*, 2009; GUTIERREZ *et al.*, 2010). O dano tecidual local é caracterizado por edema acentuado e progressivo, dor intensa e manifestações hemorrágicas percebidas com sangramento no local da picada, sendo que o quadro pode evoluir para necrose severa (Figura 5) (WARRELL *et al.*, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a). As complicações que se seguem após o envenenamento podem levar ao surgimento de bolhas, gangrena, abscesso, síndrome compartimental, insuficiência renal aguda e choque.



Figura 5: Dano tecidual local evidenciando edema, bolhas, equimose e necrose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a).

A lesão tecidual pode ser causada por várias toxinas distintas ou pela ação destas em sinergia, e, dependendo do caso, o dano tecidual se torna tão intenso, algumas vezes irreversível, podendo levar à isquemia e até amputação do membro afetado (SILVEIRA; NISHIOKA, 1992). As fosfolipase A₂ miotóxicas induzem a mionecrose através de uma perturbação do sarcolema, levando a um influxo de íons cálcio e à necrose muscular (GUTIERREZ; OWNBY, 2003). As metaloproteínases também desempenham um importante papel no dano tecidual através da indução indireta da mionecrose pela isquemia (GUTIERREZ *et al.*, 2009b). Estas toxinas degradam proteínas da lâmina basal de vasos sanguíneos levando a um extravasamento de sangue nestas regiões, com consequente déficit sanguíneo para a musculatura.

O edema tecidual é um efeito multifatorial. Mediadores inflamatórios liberados ou sintetizados após o envenenamento podem levar ao edema, assim como à hiperalgesia (GUTIERREZ; LOMONTE, 2003). Danos em microvasos (capilares e vênulas) causados por metaloproteínases hemorrágicas levam ao extravasamento e formação do edema (GUTIERREZ *et al.*, 2009b). As PLA₂ desempenham um importante papel nesse quadro, pois estas toxinas induzem a degranulação dos mastócitos, com a liberação de histaminas, e a produção de prostaglandinas, mediadores da formação do edema local (TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Várias destas toxinas podem induzir efeitos sistêmicos. Dentre as manifestações mais comuns podem ocorrer: alterações na coagulação sanguínea, mialgia, anúria, oligúria (podendo levar à insuficiência renal), hipotensão, hipotermia e cefaléia (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004), além de hemorragias (gengivorragia e em outras cavidades do corpo) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a).

Algumas toxinas podem induzir alterações na hemostasia, atuando diretamente sobre este sistema hemostático, inibindo-o ou estimulando-o. O sistema hemostático funciona sob um delicado balanço entre o processo de formação do coágulo até sua completa dissolução (fibrinólise), mantidos em equilíbrio pelas propriedades hemodinâmicas do sangue (BRAUD *et al.*, 2000).

Estas toxinas podem ser agrupadas em diferentes categorias: 1) procoagulantes: ativadores de fatores V, X, IX e protrombina, além de proteases com ação semelhante à trombina (*thrombin-like*); 2) anticoagulantes: ativadores de Proteína C, proteínas que ativam a

formação do complexo fator IX/X, inibidores de trombina e PLA₂; 3) Fibrino(geno)líticas: proteínas que degradam fibrinogênio e/ou fibrina e proteínas ativadoras de plasminogênio; 4) hemorraginas: proteínas que interagem com a parede dos vasos; 5) inibidor ou ativador de plaquetas; 6) inibidores de serinoproteinases (serpininas) (WHITE, 2005).

A alteração na hemostasia do paciente após o envenenamento ofídico pode ser induzida por enzimas proteolíticas, geralmente classificadas de acordo com suas estruturas e funções.

As SVMPs têm sido extensivamente estudadas e consideradas fundamentais no desenvolvimento de patologias induzidas pelas peçonhas. Em geral, a ação das SVMPs está relacionada à proteólise dos componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e nidogênio), proteínas do plasma (fibrinogênio, fator de von Willenbrand, protrombina) e proteínas da superfície celular (integrinas e caderinas). Além disso, SVMPs são capazes também de interagir com receptores das plaquetas, de células endoteliais e fibroblastos, ativando ou inibindo a resposta celular. Estes efeitos promovem alterações patológicas graves, observadas após o envenenamento, tais como hemorragia, inibição da agregação plaquetária, coagulopatia, mionecrose e resposta inflamatória (WHITE, 2005; MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2007).

As serinoproteinases causam desordens hemostáticas interferindo em pontos distintos da coagulação sanguínea por degradação proteolítica, inibindo ou ativando fatores específicos envolvidos na cascata de coagulação, agregação plaquetária e fibrinólise (BRAUD *et al.*, 2000). A maioria das serinoproteinases com ação semelhante à trombina (*thrombin-like*) atua sobre uma das cadeias do fibrinogênio A α ou B β , podendo atuar em ambas, liberando fibrinopeptídeos A, B ou AB (MARKLAND, 1998; COSTA *et al.*, 2009), além de monômeros de fibrina, os quais se agrupam formando um coágulo frouxo. Como a maioria das “*thrombin-like*” não possui a capacidade de ativar o fator XIII, o qual é responsável pela estabilização do coágulo, este é facilmente removido da circulação sanguínea (STOCKER *et al.*, 1982). Com isso há uma rápida diminuição do estoque de fibrinogênio *in vivo*, levando a um efeito anticoagulante e desfibrinogenante; *in vitro*, porém, estas enzimas são pró-coagulantes (MARKLAND, 1998; COSTA *et al.*, 2010).

Um componente importante da peçonha botrópica/botropóica, é a toxina PLA₂, que tem como substrato os fosfolípidos que são constituintes da membrana plasmática celular. As PLA₂'s de peçonhas de serpentes vêm sendo amplamente estudadas devido à variedade de seus efeitos farmacológicos, como neurotoxicidade, miotoxidade, cardiotoxicidade, citotoxicidade, ativação e/ou inibição da agregação plaquetária, anticoagulação, edema, convulsão, hipotensão, dentre outras; nem todas as PLA₂'s, porém, induzem todos esses efeitos (FRANCISCHETTI *et al.*, 1998; KINI, 2003; MASUDA *et al.*, 2005).

As PLA₂'s enzimaticamente ativas catalisam a hidrólise especificamente na ligação 2-acil éster de fosfolípidos, liberando como produtos os lisofosfolípidos e ácidos graxos livres (SIX; DENNIS, 2000). Um destes ácidos pode ser o araquidônico, que é precursor de eicosanóides, como as prostaglandinas e hormônios, potentes mediadores da resposta inflamatória, além de poder funcionar como segundo mensageiro (DENNIS, 1997; DESSEN, 2000). Os lisofosfolípidos liberados podem ser convertidos em fator de ativação plaquetária (PAF).

As fosfolipases A₂ podem ser divididas em cinco grupos principais: PLA₂ secretórias (sPLA₂), citosólicas (cPLA₂), Ca²⁺ independentes, acetilidrolases do fator de agregação plaquetária (PAF-AH) e as lisossômicas, divididas de acordo com o mecanismo catalítico e suas características funcionais e estruturais.

As PLA₂'s secretórias foram subdivididas em quatorze grupos, de acordo com o número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto, sendo que as PLA₂'s das peçonhas de serpentes estão incluídas nos grupos I e II (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

Essas enzimas são pequenas, com massa molecular variando de 13 a 18 kDa, e causam danos sistêmicos e locais pela interferência nos processos fisiológicos normais da vítima (KINI, 2003).

2.5 Metaloproteases

As metaloproteases são enzimas proteolíticas, podendo ser classificadas como metaloexopeptidases (EC: 3.4.17) ou metaloendopeptidases (EC: 3.4.24). A classificação apresentada no banco de dados MEROPS, e aceita pela comunidade científica, agrupa as metaloproteases em espécies, famílias e clãs, com base na similaridade sequencial e na distância evolutiva (RAWLINGS *et al.*, 2014).

Outra classificação aceita se baseia na estrutura do sítio ativo. Nesta classificação, as metaloproteases são separadas em dois grupos. O primeiro grupo é formado pelas metaloproteases que possuem apenas um metal no sítio catalítico (mononucleares) e o outro grupo é formado pelas metaloproteases que possuem dois metais no sítio catalítico (binucleares) (Figura 6), sendo que as endopeptidases pertencem ao primeiro grupo e as exopeptidases estão presentes no segundo grupo (CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014; ZHANG *et al.*, 2015).

O metal presente no sítio catalítico das mononucleares é um íon divalente, geralmente o zinco, mas este pode ser substituído íons cobalto, manganês ou níquel. Estes metais são ancorados e coordenados por certos resíduos de aminoácidos, geralmente histidina, glutamato ou aspartato (GOMIS-RÜTH; BOTELHO; BODE, 2012).

Na tribo das zincinas (MACKERROW, 1987), o zinco está ligado à dois resíduos de histidina e um resíduo de glutamato, que fazem parte da sequência **HEXXH**. Em outra tribo, das inverzincinas, a sequência ligante do zinco está invertida, **HXXEH** (BECKER; ROTH, 1993; HOOPER, 1994; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014). A tribo das zincinas é dividida em cinco clãs: metzincinas; gluzincinas; S2P-zincinas; aspzincinas; enzimas semelhantes à FtsH (Figura 6).

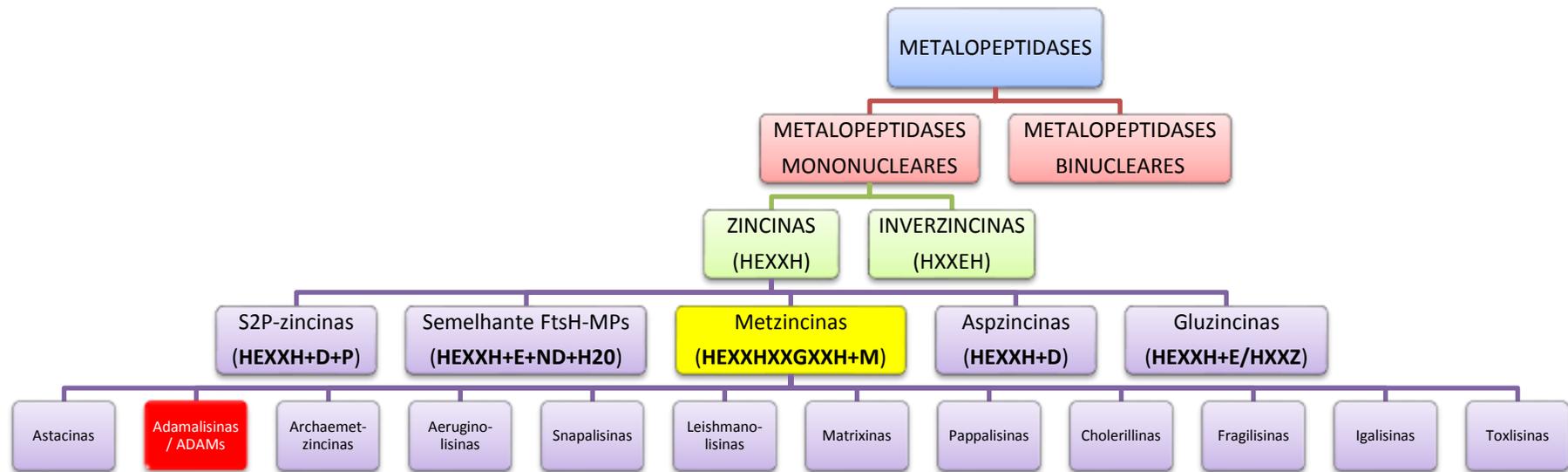


Figura 6: Classificação das metaloendopeptidases. Em amarelo está destacado o clã das Metzincinas e em vermelho a família das Adamalissinas e ADAMs, na qual está contida as SVMPS. Fonte: Adaptado de Cerdà-Costa e Gomis-Rüth (2014).

2.5.1 Metzincinas

O clã das metzincinas possui uma sequência consenso de seu domínio catalítico: **HEXXHXXGXXH+M**). Os três resíduos de histidina coordenam o zinco no sítio catalítico, além de um resíduo de metionina, altamente conservado nas estruturas das metzincinas, formando uma alça ou “laço”. O *Met-turn*, como é conhecido, está localizado próximo aos resíduos de histidina que coordenam o zinco, formando uma fenda hidrofóbica, mas sem contato direto com o metal, servindo para ancoramento do substrato (Figura 7) (BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKER, 1993; HEGE; BAUMANN, 2001).

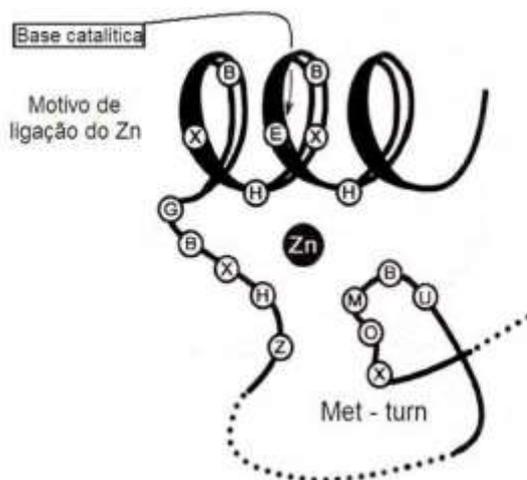


Figura 7: Esquema do motivo de ligação ao zinco com três resíduos de histidina e o — “*Met-turn*” mostrando a sequência comum das metzincinas. O resíduo de glutamato também foi evidenciado, o qual desempenha importante função na atividade catalítica. Segmentos variáveis são identificados pelas linhas pontilhadas (STÖCKER; BODE, 1995).

Esse clã está dividido em doze famílias: astacinas, aeruginolisinas ou serralisinas, leishmanolisinas, snaplisinas, matrixinas, adamalisinas/ADAMs, archaemetzincinas, pappalisinas, fragilisinas, toxilisinas, cholerialisinas, igalisinas (Figura 6). Essas famílias apresentam um domínio catalítico formado por uma estrutura de 130 a 270 resíduos de aminoácidos, contendo em seu domínio catalítico a mesma sequência consenso presentes nas zincinas, possuindo, no entanto, alguns elementos estruturais distintos, como a presença adicional de estruturas secundárias (BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKER, 1993; HOOPER, 1994; GOMIS-RÜTH, 2003; GOMIS-RÜTH, 2009; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014).

As metzincinas são secretadas como zimogênios, possuindo um pró-domínio, o qual apresenta um resíduo de cisteína que interage com o zinco do sítio catalítico, num mecanismo conhecido como cisteína “*switch*”, bloqueando o domínio catalítico e inibindo a função enzimática. Estas enzimas são ativadas através da hidrólise do pró-domínio iniciada por proteases, mas a retirada total do pró-domínio ocorre por autólise (MATRISIAN, 1992; GRAMS *et al.*, 1993). Estas metaloproteases também podem ser ativadas por agentes oxidantes, surfactantes e metais pesados, entre outros, que modificam o resíduo de cisteína e dessa forma promovem a desestabilização da ligação do zinco com o grupo tiol da cisteína, ativando a enzima (SPRINGMAN *et al.*, 1990).

Estudos estruturais das metaloproteases, como a termolisina, elucidaram como o Zn^{2+} participa nas etapas da catálise. Ele está coordenado tetraedricamente com os resíduos

His142, His146, His152 e com uma molécula de água. A coordenação da molécula de água com o íon zinco provoca um aumento da polarização na ligação O-H, o que facilita a transferência de um próton da molécula de água para o grupo carboxilato do resíduo catalítico Glu143 (posição das termolisinas, que pode se alterar em outras famílias). O ânion hidroxila formado, um forte nucleófilo, ataca o carbono carbonílico da ligação peptídica do substrato, com a formação de um intermediário tetraédrico. Com a transferência do próton de Glu143 para o nitrogênio da ligação peptídica do intermediário, esta é clivada liberando os subprodutos da reação; a enzima é regenerada com a incorporação de uma nova molécula de água (Figura 8) (STOCKER *et al.*, 1995; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; CORONADO *et al.*, 2014).

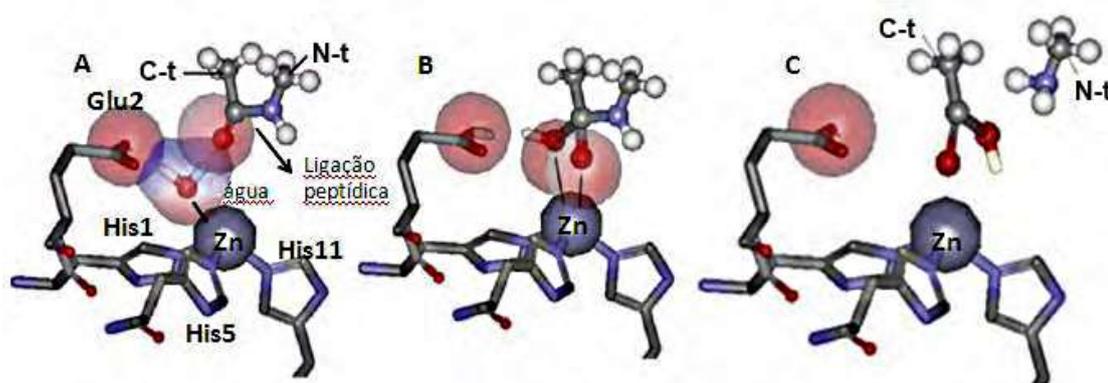


Figura 8: Mecanismo de catálise das metaloproteases. A) Foram destacados os resíduos de histidina coodenando o zinco no sítio catalítico, juntamente com uma molécula de água. O resíduo de glutamato, que participa do processo de catálise, também está em destaque. Uma ligação peptídica, representando o substrato, também foi mostrada. B) Após a transferência do próton da água para o resíduo de glutamato, há um ataque nucleofílico e a formação de um intermediário tetraédrico. C) Há o rompimento da ligação peptídica com a inserção de um hidrogênio ao Nitrogênio, liberando os produtos da reação e regeneração da enzima (Adaptada de AKAO, 2011).

2.5.2 Adamalisin/ Reprrolisin

Dentro do clã das metzincinas está a família nomeada adamalisin, ADAMS ou reprrolisin, a qual está subdivida em três grupos: ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*), ADAMT (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*) e as já mencionadas SVMPs (WOLFSBERG *et al.*, 1995; BJARNASON; FOX, 1994; GOMIS-RÜTH, 2003; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014)

As ADAMs estão relacionadas com a fertilização e função do esperma. Elas também estão envolvidas na miogênese, neurogênese, diferenciação de células osteoblásticas e na modulação da migração celular. Além disso, estão relacionadas com desordens fisiológicas, como processos inflamatórios, asma, artrite reumatoide, e doença de Alzheimer (TAKEYA; IWANAGA, 1998; KAWAGUCHI *et al.*, 2002; PRIMAKOFF; MYLES, 2002).

As ADAMTs estão envolvidas na formação das gônadas, desenvolvimento embrionário e angiogênese, ativação do procolágeno, além de participarem de processos inflamatórios, degradação da cartilagem nas artrites e na invasão tumoral (BLOBEL, 1997; SLACK; MAS; SEAH, 2001; CAL *et al.*, 2002; GOMIS-RÜTH, 2003; MOCHIZUKI;

OKADA, 2007; MURPHY; NAGASE, 2008; APTE, 2009; TAKEDA; TAKEYA; IWAGANA, 2012; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2014)

As SVMPs, como anteriormente descrito, são enzimas presentes nas peçonhas de serpentes que induzem alterações no sistema hemostático, além de gerarem hemorragias locais e sistêmicas. Essas proteases são também responsáveis por efeitos que caracterizam a lesão tecidual após o acidente ofídico, como edema, hemorragia, necrose e inflamação (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MATSUI *et al.*, 2000; LAING *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2005).

2.5.3 Estrutura e função de Metaloproteases (SVMP)

As SVMPs são classificadas em três grupos, de acordo com a presença ou ausência de seus múltiplos domínios estruturais, de PI a PIII. Estes grupos são resultantes de processamentos proteolíticos, com a disposição de diferentes domínios em diferentes formas (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; FOX; SERRANO, 2008). Os domínios estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Domínios estruturais das SVMPs.

DOMÍNIO	ESTRUTURA E FUNÇÃO
<i>Peptídeo sinal (P)</i>	Constituído por uma sequência de 18 resíduos de aminoácidos, em sua maioria hidrofóbica, e que provavelmente direciona a proteína sintetizada no retículo endoplasmático (RE) (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; FOX; SERRANO 2008)
<i>Pró-domínio</i>	Composto por 200 resíduos de aminoácidos que são extremamente conservados nas SVMPs. Essa região contém a sequência PKMCGVT, que proporciona a inativação da enzima pelo mecanismo “ <i>cysteine-switch</i> ” modulando a atividade enzimática desse grupo (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).
<i>Metaloprotease ou catalítico</i>	Apresenta uma sequência de 200 a 210 resíduos de aminoácidos. Nesse domínio está presente o motivo ligante de zinco, HEXXHXXGXXH, e a sequência CIMXP onde se encontra um resíduo de metionina (<i>Met-turn</i>) que pode ser responsável por manter a estabilidade da estrutura para favorecer a ligação do zinco (FOX; SERRANO, 2008; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006)
<i>Interdomínio</i>	Segmento com 13-15 resíduos de aminoácidos que se encontra entre os domínios metaloproteinase e desintegrina/semelhante à desintegrina. (FOX; SERRANO, 2008; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006)
<i>Desintegrina e semelhante a desintegrina (Desintegrin-like)</i>	Podem variar de 41 a 100 resíduos de aminoácidos estabilizados por pontes dissulfeto. Estes domínios possuem diferentes motivos, responsáveis pela interação com diferentes tipos de integrinas (KINI; EVANS, 1992; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006)
<i>Rico em Cisteína</i>	Formando por 112 resíduos de aminoácidos, nas SVMPs está localizada na porção C-terminal do domínio desintegrina. Está intimamente relacionado à inibição da agregação plaquetária.
<i>Semelhante a lectina tipo-C (CTLPs)</i>	São domínios encontrados nas SVMPs da classe PIII _d . Se ligam a açúcares de forma específica. Também estão relacionadas com a agregação plaquetária.

As SVMPs são um dos maiores constituintes das peçonhas botrópicas e uma das principais proteases encontradas nas peçonhas da família Viperidae (FOX; SERRANO 2008; RODRIGUES *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2015).

A diversidade nos tipos de SVMP é resultado de processamento proteolítico, gerando uma variedade de proteínas multifuncionais, classificadas de acordo de seus domínios estruturais (figura 9). As SVMPs da classe P-I são proteínas de baixa massa molecular, entre 20-30 kDa; possuem apenas o domínio metaloprotease ou catalítico, sendo responsável pela atividade enzimática da enzima. As SVMPs das classes PIIa a PIIe têm massa molecular intermediária, variando entre 30-60 kDa; possuem os domínios metaloprotease e desintegrina. Estes domínios podem estar presentes como dímeros ou somente como dímeros de desintegrina. As SVMPs das classes PIIIa a PIIIc têm alta massa molecular, variando de 60-100 kDa. Estão presentes os domínios metaloprotease, desintegrina-like e domínio rico em

cisteínas, os quais também podem formar dímeros. As SVMPs do tipo PIIIId (Fig. 9), anteriormente classificada como PIV, contêm os mesmos domínios estruturais das PIII, com a adição de 2 domínios lectina tipo-C conectados por pontes dissulfeto (FOX;SERRANO, 2008) (Figura 10).

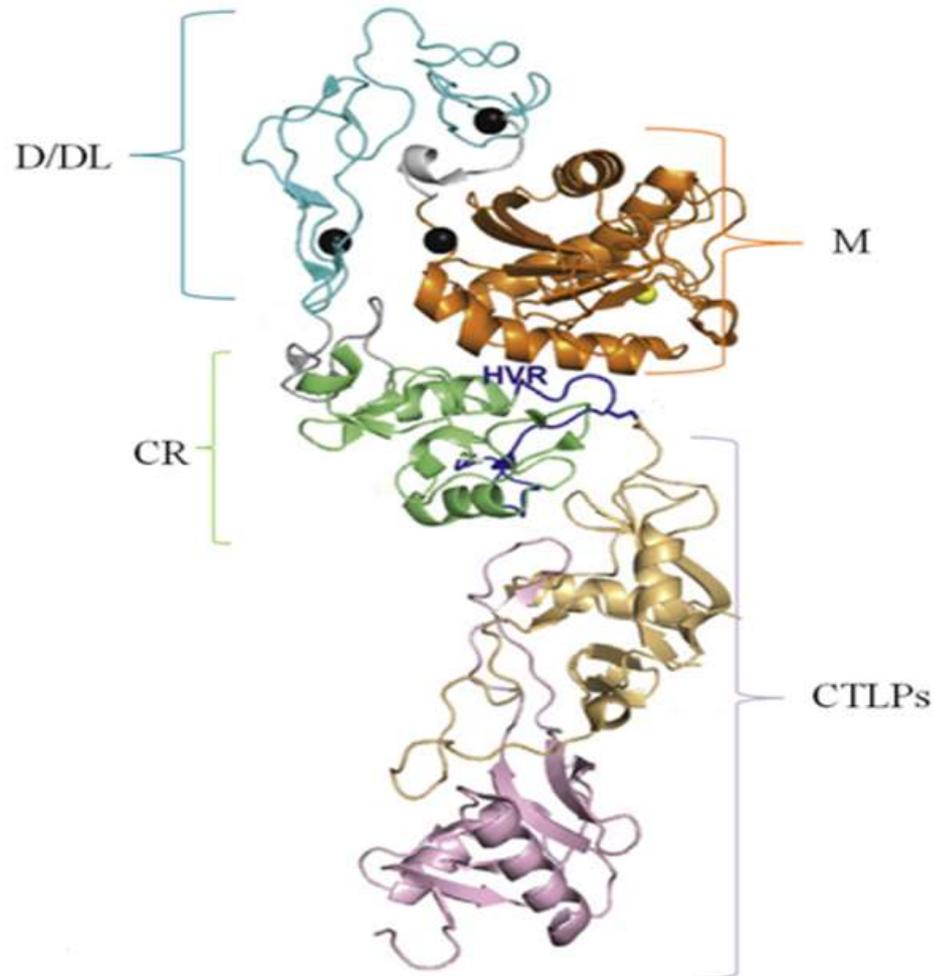


Figura 9: Estrutura de SVMP-PIII – RVV-X, e seus respectivos domínios, M (metaloprotease), D/DL (desintegrina/semelhante a desintegrina), CR (rico em cisteína) e CTLPs (proteínas semelhantes à lectinas tipo-C). Fonte: TAKEDA *et al.*, 2012.

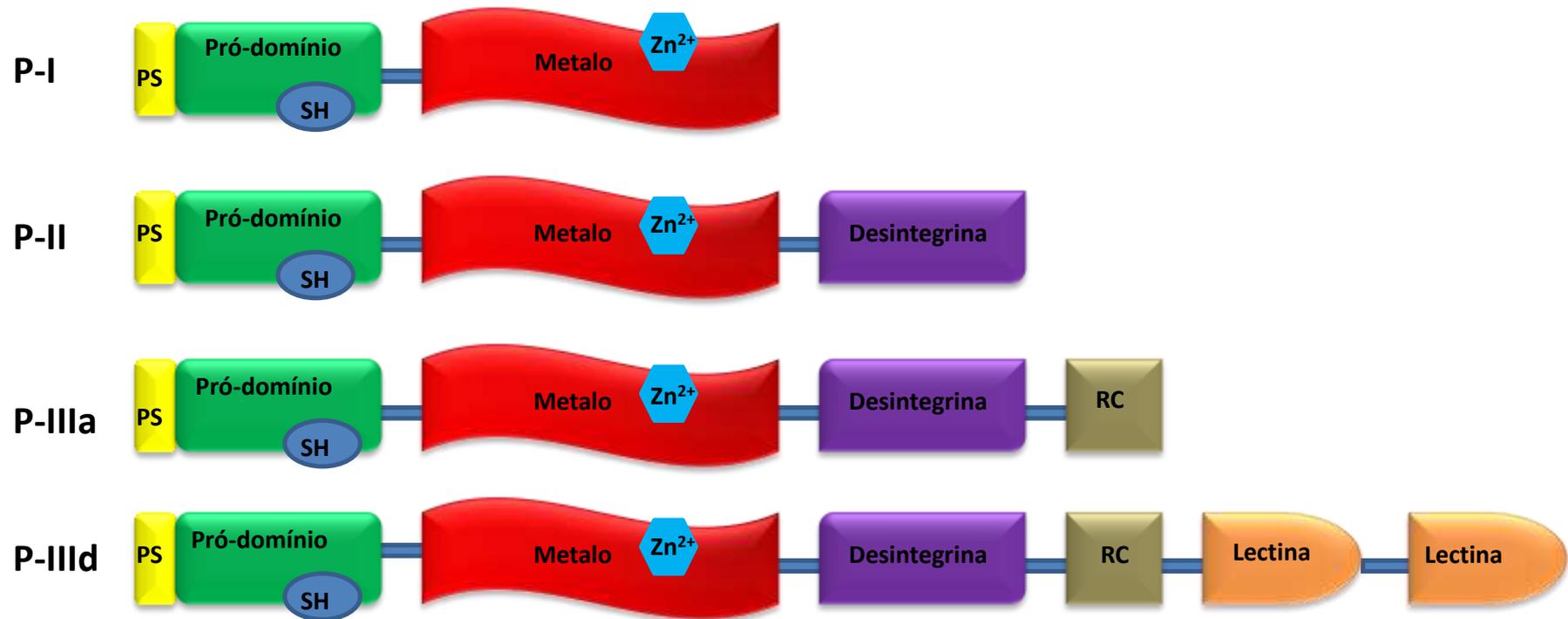


Figura 10: Representação esquemática das SVMs. Cada domínio ou segmento é representado por uma cor diferente. PS: peptídeo sinal; SH: Resíduo de cisteína responsável pelo sistema cisteína *swith*; Metalo: domínio catalítico; Desintegrina: domínio desintegrina ou desintegrina-like; RC: domínio rico em cisteína; Lectina: Domínio lectina tipo-C. Adaptado de Takeya e Takeda (2012).

A principal atividade induzida pelas SVMPs nas vítimas é a hemorragia (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005). Porém, esta atividade não é induzida pelas SVMPs da classe P-I, visto que estas possuem apenas o domínio metalo. De acordo com Takeda e colaboradores (2012), os domínios desintegrina e semelhante à desintegrina são essenciais para o ancoramento das SVMPs à membrana basal facilitando a hidrólise da membrana basal pelo domínio metalo. Os domínios desintegrina e semelhante à desintegrina estão presentes nas SVMPs das classes P-II e P-III e, portanto, induzem atividade hemorrágica na vítima.

A SVMP BpMP-I, objeto de estudo deste trabalho, é uma metaloprotease da classe P-I com massa molecular de 20 kDa e foi isolada e caracterizada por Naves-de-Souza e colaboradores (2012). Esta toxina possui atividade proteolítica sobre a azocaseína e sobre o fibrinogênio, porém não possui atividade hemorrágica. A sequência primária desta toxina mostra que ela possui 202 resíduos de aminoácidos em sua forma madura, com os três resíduos de histidina que participam da coordenação ao zinco no sítio catalítico conservados, além dos resíduos de glutamato e metionina necessários para a atividade catalítica das SVMPs (Figura 11).

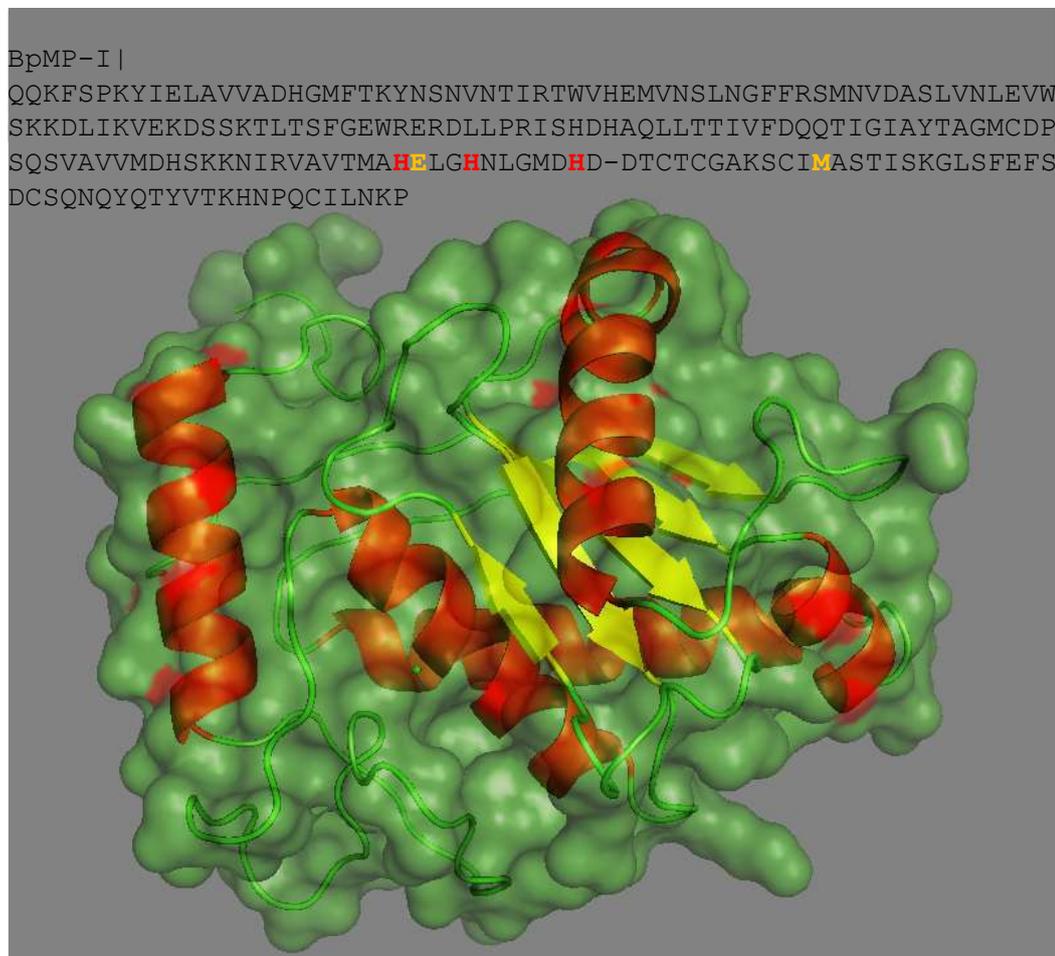


Figura 11: Acima: Sequência primária da BpMP-I (NAVES-DE-SOUZA *et al.*, 2012). Em destaque estão os resíduos de histidina, glutamato e metionina, importantes para a atividade catalítica da toxina. Abaixo: Estrutura tridimensional em α -hélice e β -pregueada e superfície de van der Waals.

2.6 Terapêutica

O principal tratamento disponível e o mais eficaz para o combate aos efeitos tóxicos, até mesmo letais, associados ao envenenamento por serpentes é a administração do soro antiofídico (SAO) (CUPO *et al.*, 1991; BRASIL, 2016a). Porém, alguns problemas, que vão desde a distribuição dos soros antiofídicos até reações de hipersensibilidade decorrentes do tratamento estes, dificultam sua utilização. De acordo com o Ministério da Saúde (2016b), estados como Roraima, Amapá, Paraíba, Pernambuco e Sergipe possuem um baixo percentual de utilização do SAO resultante da insuficiência na quantidade de ampolas distribuídas e/ou no número de postos de atendimento, além da sub-notificação, maior no Norte e Nordeste, e da conservação inadequada do material imunológico, contribuindo para a deficiência nesse tipo de tratamento.

Outros fatores importantes prejudiciais nessa terapêutica são as reações de hipersensibilidade desenvolvida pelo paciente ao SAO. Segundo Cupo e colaboradores (1991), podem ocorrer 4 tipos principais de reações: imediatas, geralmente dentro de 10 a 180 min do início da soroterapia; precoces, ocorrendo nas primeiras 24 h; tardias, as quais ocorrem de 5 a 14 dias após a soroterapia; e as pirogênicas.

Vários trabalhos relataram casos de reações de hipersensibilidade após a administração do SAO. Um estudo realizado por Andrade-Filho em 2015, mostrou que 41,5% dos pacientes tratados com o SAO tiveram reações alérgicas nas primeiras duas horas após a administração, sendo que 4,7% destas reações foram de nível III, em uma escala que vai de I a IV (nível I: menos graves; nível IV: mais graves, como complicações respiratórias e cardiovasculares graves). Isbister e colaboradores (2008) mostraram que aproximadamente 25% dos pacientes tratados com SAO na Austrália desenvolveram reações de hipersensibilidade, sendo que 5% destes pacientes apresentaram reações anafiláticas graves.

Devido a estas dificuldades no tratamento de acidentes ofídicos com o uso de SAO, uma alternativa a ser explorada é a busca por moléculas capazes de neutralizar o efeito tóxico das peçonhas com maior eficiência e com maior facilidade de produção, armazenamento e distribuição do que a terapêutica atualmente utilizada. Segundo Gutierrez e colaboradores (2013), existe a necessidade de pesquisas para a descoberta de novas moléculas com potencial inibitório contra toxinas de serpentes, assim como das estruturas destas, possibilitando elucidar o mecanismo de sua ação, além de suas possíveis aplicações no tratamento de acidentes ofídicos, que ofereçam pouco ou nenhum efeito colateral.

2.7 Inibidores

Existem muitos trabalhos mostrando que algumas moléculas, de fontes naturais ou sintéticas, podem inibir efetivamente toxinas de peçonha de serpentes (GIMENES *et al.*, 2014; MENDES *et al.*, 2012; HOWES *et al.*, 2007).

Os inibidores de origem natural podem ser isolados de espécies animais ou vegetais. Nas espécies animais, os inibidores estão presentes, principalmente, no plasma dos indivíduos, sendo que a maior parte destes inibidores são glicoproteínas com massa molecular variando de 30-90 kDa (GIMENES *et al.*, 2014). Já os inibidores de peçonha de serpentes isolados de plantas, em sua maioria, são flavonoides e compostos fenólicos como, por exemplo, o *p*-cumarato de triacontila, isolado de *Bambacopsis glabra* (MENDES *et al.*, 2013; VALE *et al.*, 2011) (Figura 12).

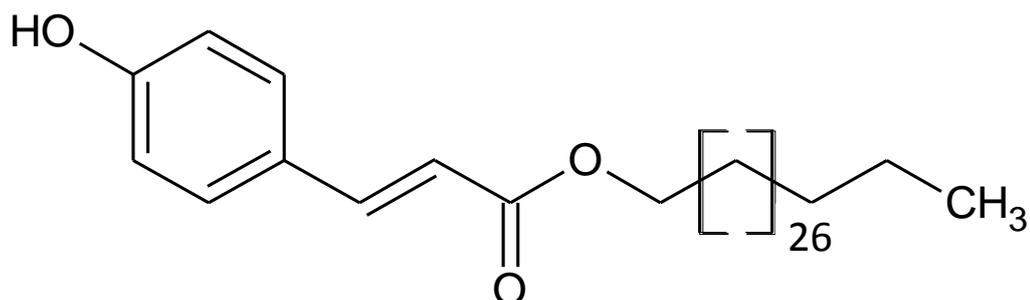


Figura 12: Estrutura do *p*-cumarato de triacontila, composto isolado de *Bombacopsis glabra* (MENDES *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de inibidores sintéticos constitui uma importante ferramenta na tentativa de se obter moléculas capazes de inibir os efeitos tóxicos tanto locais quanto sistêmicos das peçonhas de serpentes, visto que estes podem ser desenvolvidos estrategicamente de forma que inibam especificamente uma ou mais toxinas de interesse (LAING *et al.*, 2007; VILLALTA-ROMERO *et al.*, 2012).

Muitos estudos utilizam estruturas pré-determinadas e já conhecidas como inibidores de algumas toxinas ou enzimas como ponto de partida para construção de novos inibidores específicos. Villalta-Romero e colaboradores (2012) sintetizaram uma série de inibidores de metaloproteases, peptídeos contendo a função ácido hidroxâmico (Figura 13), conhecida pela capacidade em quelar metais. Um exemplo de inibidor de metaloproteases de largo espectro, contendo a função ácido hidroxâmico, que chegou a ensaios pré-clínicos (como antineoplásico, mas sem sucesso) é o Marimastat (*N*-[2,2-dimetil-1-(metilcarbamoil)propil]-2-[hidroxi-(hidroxicarbamoil)metil]-4-metil-pentanamida) (figura 13).

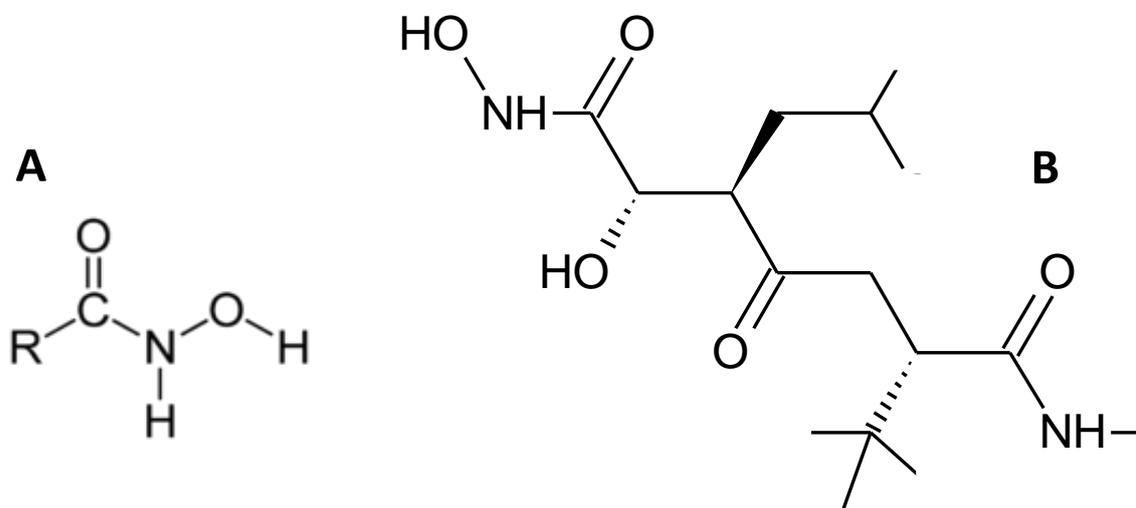
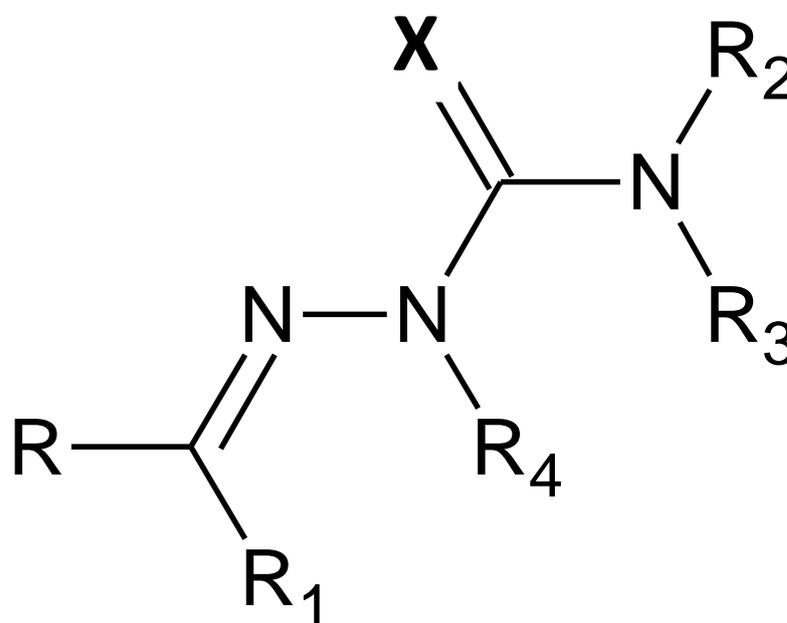


Figura 13: A) Estrutura da função ácido hidroxâmico. B) Estrutura de um inibidor de metaloproteases, o Marimastat – British Biotech (LAING *et al.*, 2007).

Outra função bastante utilizada em inibidores pela capacidade de quelar metais são as semi e tiossemicarbazonas (RODRIGUES-ARQUELLES *et al.*, 1995; BERALDO, 2004; POPOVIC-BIJELIC *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2014). Estes compostos (Figura 14) constituem uma importante classe de moléculas cujas propriedades têm sido extensivamente

estudadas na Química Medicinal em razão de sua capacidade quelante. Apesar da ampla diversidade farmacológica desses compostos, como atividade citotóxica ou antitumoral, antimicrobiana, antichagástica, antifúngica, pesticidas e herbicidas, especificidades estruturais podem selecionar atividades específicas.



$X = O, S$

R, R_1, R_2, R_3 e $R_4 = H$, grupos alquila ou arila

Figura 14: Estrutura genérica de semicarbazonas e tiosemicarbazonas. A numeração dos átomos é definida segundo a IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional da Química Pura e Aplicada).

2.8 Modelagem Molecular

2.8.1 Modelagem Comparativa

A modelagem molecular pode ser aplicada não só em estudos acerca das estruturas moleculares, mas também em estudos de interação entre moléculas (COTRIM *et al.*, 2011; BERNARD *et al.*, 2001), como acontece entre compostos bioativos e seus alvos biológicos, geralmente proteínas. Isso facilita o entendimento da relação entre a estrutura e a atividade dos compostos bioativos, podendo auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos, através do chamado Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura (SBDD, do inglês *Structure Based Drug Design*). Em estudos com inibidores enzimáticos, a modelagem molecular pode ser associada com dados experimentais de inibição para melhor entender a relação entre a estrutura e a atividade destes compostos (COTRIM *et al.*, 2011; CASTAÑEDA *et al.*, 2012).

Alguns fatores tornam esta ferramenta uma importante aliada nos estudos para a busca de compostos bioativos:

1-A aquisição experimental de estruturas 3D de proteínas nem sempre é possível, porque a obtenção de amostra suficiente para estudos de cristalografia ou ressonância

magnética nuclear (RMN) é difícil e, no caso da cristalografia, os cristais obtidos podem não ter qualidade suficiente; além da obtenção de modelos de proteínas, a modelagem molecular dispõe de ferramentas para a caracterização de sítios de interação com os ligantes bioativos (SANTOS-FILHO *et al.*, 2003);

2-A modelagem permite a identificação e seleção prévia de compostos como ligantes potenciais para estudos posteriores em alvos específicos, terapeuticamente interessantes (POLITI *et al.*, 2010);

3-A modelagem pode ser usada para a otimização estrutural dos ligantes de modo a orientar o processo de síntese (WADOOD *et al.*, 2012).

Estes fatores associados tornam a modelagem molecular útil para o desenvolvimento de novos fármacos, contribuindo para diminuir o tempo e o custo do mesmo.

A modelagem por homologia ou modelagem comparativa é uma técnica de modelagem molecular de proteínas baseada na comparação de padrões ou sequências conservadas de proteínas com estruturas primárias similares, geralmente membros da mesma família (CAVASOTTO; PHATAK, 2009). Os modelos são construídos utilizando estruturas cristalográficas de proteínas semelhantes, utilizando, para isso, técnicas como alinhamento das sequências (alvo e molde) e análise de identidade e similaridade entre as sequências (SANTOS; SANT'ANNA, 2002; SANTOS-FILHO *et al.*, 2003). A identidade de uma sequência refere-se à presença do mesmo resíduo de aminoácido na mesma posição, em duas sequências alinhadas. A similaridade está relacionada à presença de resíduos de aminoácidos com as mesmas propriedades físico-químicas na mesma posição em duas sequências alinhadas (GIBAS; JAMBERCK, 2001). De acordo com Casavotto e Phatak (2009), as sequências devem possuir no mínimo 30% de identidade para se obter modelos com qualidade aceitável.

Os moldes são obtidos em bibliotecas digitais, as quais possuem estruturas 3D de proteínas depositadas. Uma das bibliotecas mais utilizadas é o *Protein Data Bank* (PDB), que possui estruturas cristalográficas de proteínas. A escolha do molde é feita com base em alguns critérios como o nível de identidade e similaridade como o alvo, a qualidade da estrutura depositada no banco de dados e a presença de ligantes e cofatores (BORDOLI *et al.*, 2009).

Após a escolha do molde, a próxima etapa é a construção do modelo tridimensional. Esta etapa pode ser realizada através de programas específicos como *Swiss-PDB Viewer* (GUEX; PEITSCH, 1997), no qual é possível realizar a substituição dos resíduos de aminoácidos não idênticos ou similares do molde pelos resíduos do modelo na mesma posição, preservando a característica tridimensional previamente estabelecida da estrutura cristalográfica do molde. Outra forma para a construção do modelo 3D é a utilização de métodos automatizados disponíveis, como o servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) (ARNOLD *et al.*, 2006; KIEFER *et al.*, 2009; GUEX *et al.*, 2009; BIASINI *et al.*, 2014), o qual gera a estrutura 3D do modelo de interesse, a partir do molde previamente selecionado, com a estrutura já otimizada e validada.

A validação do modelo construído, por qualquer dos métodos apresentados, é de fundamental importância, pois permite avaliar a qualidade deste modelo. O gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN, 1968), o qual pode ser gerado por diversos programas, como *Swiss-PDB Viewer* e pelo RAMPAGE (LOVELL *et al.*, 2012), dentre outros, é um dado de validação de um modelo muito importante, pois ele define os resíduos de aminoácidos que se encontram em regiões energeticamente favoráveis e desfavoráveis, mostrando a distribuição das combinações entre os ângulos Φ e Ψ que os resíduos de aminoácidos de uma proteína podem apresentar. Os resíduos de aminoácidos que possuem problemas estereoquímicos estarão em regiões desfavoráveis do gráfico (Figura 15).

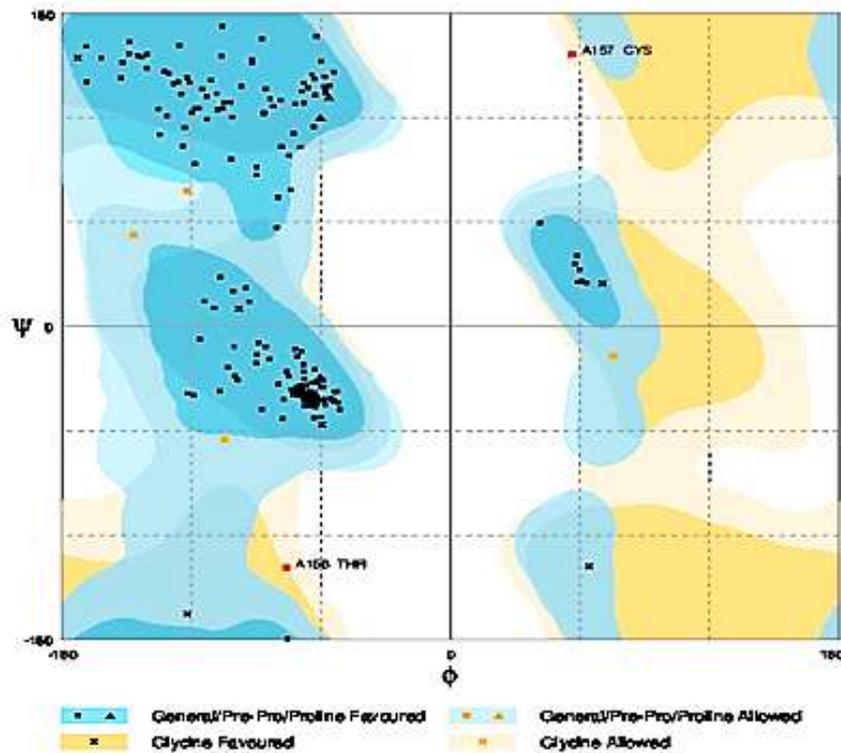


Figura 15: Exemplo de gráfico de Ramachandran (estrutura 2W12) gerada pelo programa RAMPAGE (LOVELL *et al.*, 2012), mostrando em azul intenso as regiões favoráveis, azul claro, regiões permitidas, bege escuro, regiões favoráveis para glicina, bege claro, regiões permitidas para glicina e, em branco, as regiões desfavoráveis.

Existem outras formas para validação do modelo. Uma delas é através do gráfico de pontuação Z, o qual indica a qualidade geral do modelo através da energia dos resíduos de aminoácidos do modelo. O valor da pontuação Z do modelo é indicado em um gráfico que contém a pontuação Z de várias proteínas determinadas experimentalmente (cristalografia ou RMN) que estão depositadas no banco de dados. Assim, a Pontuação Z da estrutura do modelo é colocada no mesmo gráfico com as outras estruturas, utilizando uma cor diferente para mostrar se o valor está dentro da faixa de energias obtidas para as outras proteínas (Figura 16).

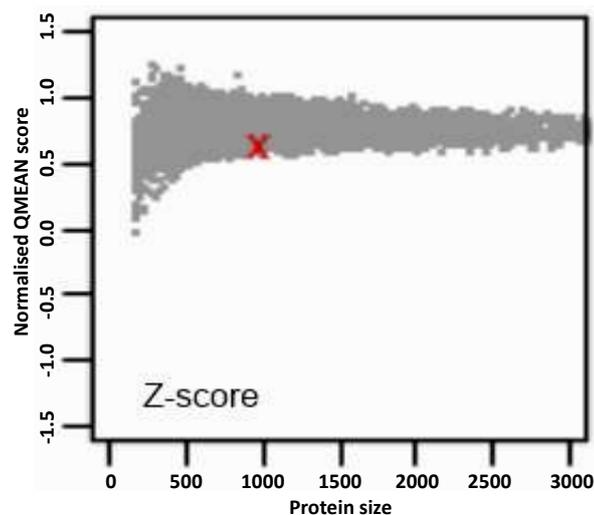


Figura 16: Exemplo de gráfico de pontuação Z (*Z-score*) (estrutura 4AIG). O X vermelho mostra a pontuação obtida pelo modelo, comparado com as pontuações de outras estruturas com tamanhos semelhante, depositadas no banco de dados cristalográfico (BENKERT *et al.*, 2011).

Em resumo, a modelagem comparativa pode ser dividida em cinco etapas principais: 1) alinhamento das sequências primárias do alvo com possíveis moldes; 2) escolha do molde (*template*) com base nos critérios já mencionados; 3) construção do modelo, com o auxílio de programas específicos; 4) otimização do modelo; 5) e validação do modelo (Figura 17).

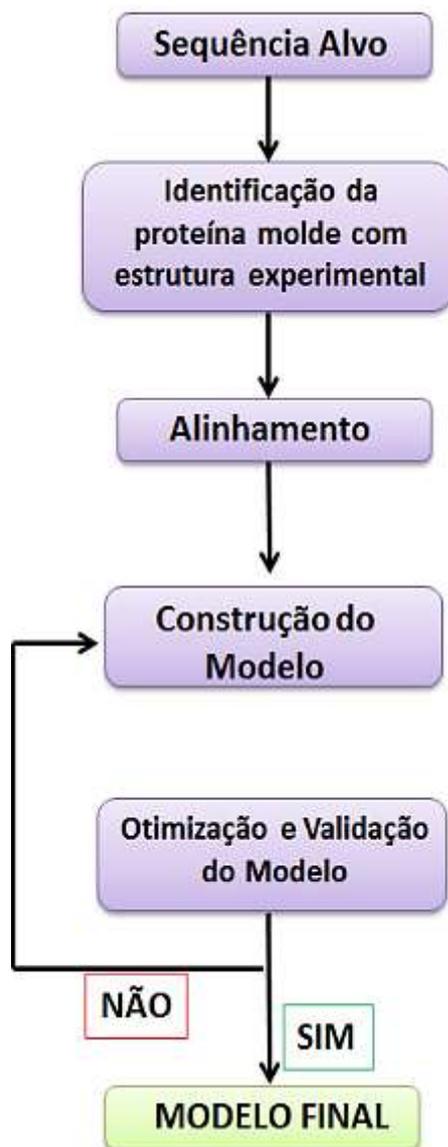


Figura 17: Etapas da construção de um modelo tridimensional utilizando modelagem comparativa (ou por homologia). Adaptado de Casavotto e Phatak (2009).

Os modelos de proteínas gerados podem ser utilizados em estudos de interação proteína/ligante e para o planejamento de novos fármacos baseado na estrutura. Existem vários métodos de modelagem molecular utilizados para este fim. A metodologia a ser utilizada neste trabalho empregará os métodos quânticos semiempíricos e o método de docagem ou ancoramento molecular.

2.8.2 Cálculos Semiempíricos

Para estudos que envolvem distribuição eletrônica de átomos, moléculas ou sistemas com maior grau de complexidade e detalhamento e, ainda, para estudos de reações nas quais ligações químicas são formadas e/ou rompidas, é necessário a utilização e aplicação de métodos que envolvam a mecânica quântica (MQ). Para isso, se faz necessário o esclarecimento de alguns conceitos da MQ. Os métodos de MQ consideram a dualidade

partícula-onda da matéria, descrevendo as moléculas em função da relação entre núcleos e elétrons. Esta relação não pode ser descrita nos métodos clássicos de Mecânica Molecular (MM), pelo fato dos elétrons serem partículas extremamente leves. Como consequência desta dualidade, ao invés de se deslocar ao longo de uma trajetória perfeitamente definida, uma partícula se distribui no espaço como uma onda, que na MQ substitui o conceito clássico de trajetória e é definida pela função de onda, ψ (psi) (JENSEN, 1999; ATKINS; PAULA, 2004).

Apesar de serem significativamente mais exigentes do ponto de vista computacional do que cálculos de MM, métodos que utilizam cálculos da MQ são muito utilizados, pois permitem obter resultados quantitativos da termodinâmica e cinética moleculares, propriedades de estados de transição, estabilidade relativa de moléculas e mecanismos de reações, além de propriedades moleculares que dependem da distribuição de elétrons.

A obtenção da energia do sistema, pelos métodos da MQ, ocorre através da solução da equação de Schrödinger, a qual depende da função de onda do sistema (equação 1). No caso particular do átomo de hidrogênio (próton de massa infinita), esta equação tem solução exata (ATKINS; PAULA, 2004).

$$\left[\frac{-h^2}{8\pi^2m} \nabla^2 - \frac{Ze^2}{r} \right] \Psi(x, y, z) = E\Psi(x, y, z) \quad (1)$$

A soma dos operadores de energia cinética e potencial de um elétron de massa m a uma distância r do núcleo de carga Z , a constante de Planck h , e a carga do elétron (e), estão representados pelo termo entre colchetes. E é a energia total do elétron e ψ a função de onda que descreve o seu movimento. No operador energia cinética, ∇^2 é a abreviação descrita na equação 2:

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (2)$$

A equação de Schrödinger pode ser descrita como dependente ou independente do tempo. Para a realização de cálculos quânticos semiempíricos, é escolhida a forma independente do tempo, por se tratar de cálculos de estados estacionários de sistemas moleculares (SILVA, 2005).

A equação de Schrödinger será resolvida de forma aproximada para qualquer sistema com mais de duas partículas, como as moléculas. Levando em consideração que a massa nuclear é muito maior que a massa dos elétrons e a velocidade de movimentação dos elétrons é muito maior do que a do núcleo, Max Born e J. Robert Oppenheimer (1927) mostraram que os elétrons deveriam se ajustar de forma praticamente instantânea a qualquer mudança de posição nuclear. Então uma forma de simplificar a equação de Schrödinger é assumir a imobilidade dos núcleos. Esta aproximação é conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer, que permite separar a equação de Schrödinger em duas: uma parte eletrônica e outra parte nuclear. Ou seja, a função de onda total para uma molécula pode ser descrita da seguinte forma (equação 3) (LEVINE, 1995; LEACH, 2001):

$$\Psi_{tot}(\text{núcleos}, \text{elétrons}) = \Psi(\text{elétrons}) \Psi(\text{núcleos}) \quad (3)$$

A energia total é igual à soma da energia nuclear (a repulsão eletrostática entre as partículas positivas do núcleo) e a energia eletrônica, que pode ser obtida pela resolução da equação de Schrödinger “eletrônica”. Esta equação possui a forma a seguir, com dependência na posição dos núcleos:

$$\hat{H}^{el} \Psi^{el} = E^{el} \Psi^{el} \quad (4)$$

onde

$$\hat{H} = \frac{-\hbar^2}{8\pi^2m} \sum_a^{\text{elétron}} \nabla_a^2 - e^2 \sum_A^{\text{elétron}} \sum_a^{\text{elétron}} \frac{Z_A}{r_{Aa}} + e^2 \sum_{a>}^{\text{elétron}} \sum_b^{\text{elétron}} \frac{1}{r_{ab}} \quad (5)$$

r_{Aa} é a distância entre o núcleo A e o elétron a e r_{ab} a distância entre dois elétrons a e b . Para cada configuração considerada, a equação de Schrödinger é resolvida para os elétrons, considerando que estes se encontram nos campos produzidos pelos núcleos. O termo que descreve a energia cinética nuclear está ausente, já que os núcleos estão parados no espaço, e é necessário que o termo de interação coulombiano entre núcleos seja adicionado à energia eletrônica E^{el} , para produzir a energia total E do sistema de forma satisfatória (equação 6) (LEVINE, 1995):

$$E = E^{el} + e^2 \sum_{A>}^{\text{núcleo}} \sum_B^{\text{núcleo}} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (6)$$

Nota-se que não há referência à massa nuclear na equação de Schrödinger “eletrônica”. Este fato se deve à superfície de energia potencial (*potencial energy surface*, ou PES), que compreende uma solução da equação de Schrödinger “eletrônica” e independente da massa nuclear. Mesmo com a aproximação de Born-Oppenheimer, a equação ainda não é resolvida analiticamente para sistemas com mais que um elétron, sendo necessárias ainda outras aproximações (JENSEN, 1999; LEACH, 2001; SILVA, 2005).

A equação de Schrödinger “eletrônica” não admite soluções exatas devido às complexas interações intereletrônicas. Com isso, deve-se recorrer a uma solução aproximada para um sistema de muitos elétrons. Em uma dessas aproximações, assume-se que os elétrons do sistema serão descritos por uma combinação de funções de onda de um elétron e estendidas por toda a molécula. Esta função é usualmente chamada de orbital molecular (OM), sendo denotada por φ_i^μ (equação 7) (ROGERS, 2003):

$$\varphi_i^\mu = \varphi_i(x^\mu, y^\mu, z^\mu) \quad (7)$$

onde μ designa um determinado elétron com coordenadas x^μ , y^μ e z^μ , e o índice i designa os vários orbitais moleculares.

Em um tratamento mais rigoroso, devemos impor que, além das coordenadas espaciais (cartesianas ou polares), a função de onda de um elétron contenha também as coordenadas de spin do referido elétron. A função assim construída é então chamada de spin-orbital molecular (SOM), sendo denotada por $\chi_k(\mu)$ (equação 8).

$$\chi_k(\mu) = \varphi_i(x^\mu, y^\mu, z^\mu) \eta_\kappa(S^\mu) \quad (8)$$

$$\text{onde } \eta_\kappa(S^\mu) = \begin{cases} \alpha^\mu & \uparrow \\ \beta^\mu & \downarrow \end{cases}$$

e o índice k designa diferentes spins moleculares. As funções de spin são denotadas por α e β , e obedecem às condições de ortonormalidade (JENSEN, 1999).

A função de onda eletrônica total para uma molécula com N elétrons em N spinorbitais é construída como um produto antissimétrico dos spin-orbitais moleculares (SOM) de forma a satisfazer o Princípio de Exclusão de Pauli (dois elétrons não podem ter todos os números quânticos iguais). A anti-simetria da função de onda pode ser alcançada através da sua construção a partir dos determinantes de Slater, conforme a equação 9 (LEACH, 2001):

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(1) & \chi_2(1) & \dots & \chi_N(1) \\ \chi_1(2) & \chi_2(2) & \dots & \chi_N(2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(N) & \chi_2(N) & \dots & \chi_N(N) \end{vmatrix} \quad (9)$$

Esta forma funcional é a mais simples para uma função de onda orbital que satisfaça o princípio da anti-simetria. O determinante de Slater é uma forma conveniente e concisa devido às propriedades especiais dos determinantes. As colunas representam funções de onda de elétrons únicos ou orbitais, enquanto as coordenadas eletrônicas se encontram ao longo das linhas. Trocando quaisquer duas colunas de um determinante, um processo que corresponde à troca de dois elétrons, troca-se o sinal do determinante preservando a propriedade anti-simétrica, pré-requisito indispensável para funções de onda de sistemas multieletrônicos. Se duas colunas são idênticas, correspondendo a dois elétrons de mesmo spin-orbital, o determinante é nulo (LEACH, 2001; JENSEN, 1999).

Esta simplificação da equação de Schrödinger envolve a separação das variáveis, ou seja, a função de onda de vários elétrons é substituída por um produto de funções de onda de um elétron. A aproximação mais simples, denominada Hartree-Fock, envolve o uso de um único determinante de produtos das funções de um elétron, os spin-orbitais (ou orbitais de spin). Cada spin-orbital é descrito como um produto de um termo espacial Ψ , função das coordenadas de um único elétron e referida como um orbital molecular, e um termo de spin α ou β , conforme descrito acima (ANTUNES *et al.*, 1999; OLIVEIRA, 2005). As equações de Hartree-Fock são obtidas impondo, para uma determinada função de onda, que a energia é sujeita à restrição de que os SOMs permaneçam ortonormais entre si. A condição de ortonormalidade é escrita em termos da integral de sobreposição, S_{ij} , entre os orbitais i e j (equação 10) (JENSEN, 1999; LEACH, 2001):

$$S_{ij} = \int \chi_i \chi_j d\tau = 0 \quad (10)$$

De acordo com o teorema variacional, a energia calculada a partir de uma função aproximada para a função de onda verdadeira será sempre maior que a energia verdadeira. Consequentemente, quanto melhor a função de onda, menor de energia. A primeira derivada da energia, δE , será igual a zero no mínimo. A aproximação de Hartree-Fock leva ao grupo de equações diferenciais acopladas (chamadas de equações de Hartree-Fock), considerando um elétron no SOM χ_i no campo dos núcleos e dos outros elétrons em seus SOMs fixos χ_j (equação 11) (LEACH, 2001):

$$f_i \chi_i = \sum_j \varepsilon_{ij} \chi_j \quad (11)$$

onde f_i é chamado operador de Fock, um hamiltoniano efetivo unieletrônico para um elétron do sistema multieletrônico, que depende do próprio orbital χ_i e assume-se como se cada elétron se movimentasse num campo fixo, provocado pelos núcleos e demais elétrons. Ao resolver estas equações obtém-se o conjunto de funções χ_i , e por sua vez a energia do estado eletrônico para cada geometria nuclear (ANTUNES *et al.*, 1999). A estratégia de resolução das equações de Hartree-Fock é chamada método do campo auto-consistente (SCF). O método SCF é iterativo, ao prosseguir refinando as soluções χ_i , com a energia eletrônica total se reduzindo até que a diferença entre dois ciclos não mude segundo um critério de convergência pré-estabelecido, alcançando-se a auto-consistência (SILVA, 2005).

O método Hartree-Fock calcula o produto antissimétrico Φ de spin-orbitais que minimizam a integral variacional, usando o hamiltoniano real. O método de cálculo Hartree-Fock constitui um método *ab initio*, como um cálculo do tipo SCF que fornece apenas uma aproximação à função de onda Hartree-Fock, pelo tamanho limitado do conjunto de bases. Pela forma restrita da Φ , o método Hartree-Fock não fornece a função de onda real (LEVINE, 1995).

Além dos métodos quanto-mecânicos *ab initio*, há os chamados semiempíricos. A maior parte do tempo gasto para realizar um cálculo como o colocado acima é utilizada no cálculo de integrais, já que a equação de Schrödinger é uma equação diferencial e sua solução requer integração. Para reduzir o trabalho computacional e o gasto de tempo, algumas destas integrais podem ser negligenciadas ou aproximadas (OLIVEIRA, 2005). Os métodos semiempíricos utilizam um hamiltoniano mais simples que o verdadeiro, usando dados empíricos (determinados experimentalmente) para assumir os valores de algumas integrais do cálculo. Os elétrons de camadas atômicas mais internas são tratados como um “caroço congelado”, considerando no cálculo apenas os elétrons pertencentes à camada de valência, visto que são estes os elétrons que participam mais efetivamente nas ligações químicas (LEACH, 2001; ROGERS, 2003). Além disso, nos cálculos com métodos semiempíricos é usado o conjunto de bases mínimo.

Os métodos semiempíricos foram desenvolvidos originalmente para moléculas orgânicas conjugadas, mas atualmente enquadram praticamente todos os tipos de moléculas. Boas estimativas de valores de entalpias de formação (ΔH_f°) em fase gasosa são possíveis através da escolha de um hamiltoniano adequado. Embora não seja tão preciso quanto o método *ab initio*, o método semiempírico é capaz de calcular propriedades químicas e físicas de moléculas e sistemas muito maiores. Mesmo com capacidade computacional comum, cálculos semiempíricos podem ser executados em um tempo adequado com sistemas contendo milhares de átomos (LEVINE, 1995; LEACH, 2001; OLIVEIRA, 2005).

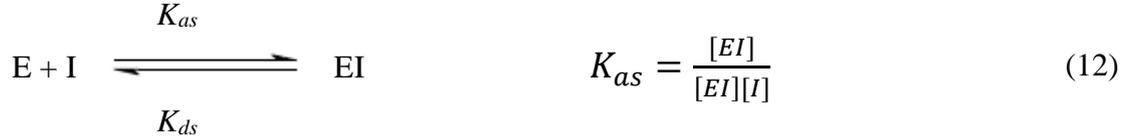
Os métodos semi-empíricos mais conhecidos e difundidos são o AM1 (*Austin model 1*) (DEWAR *et al.*, 1985), o RM1 (Modelo de Recife 1) (ROCHA *et al.*, 2006) e o PM3 (*Parameterized Model 3*) (STEWART, 1989) e os mais recentes, PM6 (*Parameterized Model 6*) (STEWART, 2007) e PM7 (*Parameterized Model 7*) (STEWART, 2013), todos disponíveis no programa Mopac2012 (Stewart Computational Chemistry), o qual foi utilizado neste trabalho, e também na versão atual, Mopac2016.

Estes métodos são baseados nos modelos Hartree-Fock (LEACH, 2001) com algumas simplificações para tornar o cálculo global mais simples. Foram introduzidos parâmetros empíricos, levando em consideração uma extensa variedade de dados experimentais, incluindo geometria de equilíbrio, calores de formação, momentos de dipolo e potencial de ionização.

O método AM1 está presente em vários programas para realização de cálculos quânticos. O método conta com a adição de uma função gaussiana para estabilizar as interações núcleo-núcleo, tornando possível a previsão de qual conformero é o mais estável. Porém, por ser um dos primeiros programas disponíveis para realização deste tipo de trabalho, este método conta com a parametrização de poucas estruturas diminuindo, assim, a acurácia de seus cálculos (STEWART, 2007). O método RM1 utiliza a mesma estrutura matemática do método AM1, porém foram incluídas novas parametrizações, contribuindo para uma significativa melhora da acurácia dos cálculos, com relação ao AM1. O método PM3 fornece menor faixa de erros que o AM1, principalmente para parâmetros como entalpias de formação (ΔH_f°), pois conta com uma melhora significativa das técnicas de parametrização (STEWART, 1990). No método PM6 foram introduzidos novos termos de parametrização, totalizando 70 elementos, com ênfase nos do uso em bioquímica, melhorando a base de cálculo e a confiabilidade dos resultados (STEWART, 2007). O mais recente, PM7, introduziu novos termos de parametrização e aproximações, sendo cerca de 10% mais preciso que o PM6 (STEWART, 2013).

2.8.3 Entalpia de interação

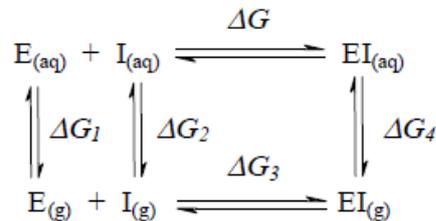
A interação entre enzima e inibidor pode ser representada pelo esquema abaixo, no qual a enzima (E) interage com o inibidor (I), gerando um complexo enzima/inibidor (EI). Esta interação gera uma constante de associação do complexo K_{as} (sentido direto), definida pela equação 12, e uma constante de dissociação do complexo K_{ds} (sentido inverso) (OLIVEIRA, 2005).



As constantes de associação e dissociação se relacionam com a variação de energia livre de Gibbs (ΔG) da reação de acordo com a equação a seguir (13), onde R é a constante de gases e T a temperatura do sistema:

$$\Delta G = -RT \ln K_{as} = RT \ln K_{ds} \quad (13)$$

Em sistemas em que se trata de inibição enzimática a constante de dissociação K_{ds} pode ser substituída pela constante de inibição enzimática K_i (constante de inibição enzimática (CHENG; PRUSOFF, 1973)). Considerando que enzimas ocorrem em meio aquoso e que a biofase é composta por mais de 60% de água, a variação da energia livre ΔG em água pode ser dividida, conceitualmente, nas etapas representadas a seguir (WANG *et al.*, 1994):



Sendo assim, a variação da energia livre total seria uma somatória das energias livres apresentadas em cada etapa, ou seja, a energia livre total seria obtida somando: $\Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_4$. Então, com a substituição da energia livre total ΔG na equação 13, teríamos: (WANG *et al.*, 1994; OLIVEIRA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006):

$$RT \ln K_i = \Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 + \Delta G_4 \quad (14)$$

Vários trabalhos sobre inibição enzimática tratam a mesma enzima com vários inibidores diferentes. Estes resultados gerariam um modelo teórico de inibição. Se dois inibidores A e B forem avaliados frente à mesma enzima, a equação 14 pode ser usada para determinar constantes relativas (WANG *et al.*, 1994). A equação 14, então, pode ser colocada da seguinte forma:

$$RT (\ln K_i^A - \ln K_i^B) = (\Delta G_1^A - \Delta G_1^B) + (\Delta G_2^A - \Delta G_2^B) + (\Delta G_3^A - \Delta G_3^B) + (\Delta G_4^A - \Delta G_4^B) \quad (15)$$

Se considerarmos que o primeiro termo do lado direito da equação 15 trata apenas da enzima, sem o inibidor, este termo se torna nulo, pois $\Delta G_1^A = \Delta G_1^B$. E se considerarmos que existe uma grande diferença entre o tamanho do ligante e o do receptor, a estrutura do ligante se torna desprezível, então, o termo ΔG_4^A é determinado essencialmente pela estrutura do

receptor, ou seja, $\Delta G_4^A \approx \Delta G_4^B$ (WANG *et al.*, 1994; OLIVEIRA, 2005). Simplificando a equação 15, temos:

$$RT (\ln K_i^A - \ln K_i^B) = (\Delta G_2^A - \Delta G_2^B) + (\Delta G_3^A - \Delta G_3^B) \quad (16)$$

Os termos de entropia e entalpia são os que determinam a energia livre de Gibbs, sendo que o sistema pode sofrer a influência da temperatura. Considerando a entropia e a entalpia no sistema e a influência da temperatura, o termo ΔG_3 pode ser subdividido em:

$$\Delta G_3^A - \Delta G_3^B = (\Delta H_3^A - \Delta H_3^B) - T(\Delta S_3^A - \Delta S_3^B) \quad (17)$$

A equação 16 pode ser modificada com a substituição dos novos termos obtidos na equação 17, obtendo uma nova equação:

$$RT (\ln K_i^A - \ln K_i^B) = (\Delta G_2^A - \Delta G_2^B) + (\Delta H_3^A - \Delta H_3^B) - T(\Delta S_3^A - \Delta S_3^B) \quad (18)$$

Considerando que uma das constantes (K_i^A ou K_i^B) for determinada experimentalmente ou conhecida, neste caso será considerado que K_i^B é conhecida, a outra constante poderá ser determinada a partir de dados teóricos, como demonstra a equação 19 a seguir:

$$RT \ln K_i^A = [(\Delta G_2^A - \Delta G_2^B) + (\Delta H_3^A - T\Delta S_3^A)] - [(\Delta H_3^B - T\Delta S_3^B) - RT \ln K_i^B] \quad (19)$$

Na nova equação, o segundo termo do lado direito da equação corresponde à uma constante. Isto faz com que $\ln k_i^A$ fique dependente do primeiro termo de forma linear. A interação enzima/inibidor, correspondente ao termo de entalpia (ΔH_3^A), pode ser calculado diretamente por vários métodos, inclusive por métodos semiempíricos, os quais são considerados excelentes métodos para determinação de entalpias de formação. Os métodos semiempíricos podem ser aplicados em sistemas que envolvam complexos enzima/inibidor, os quais podem conter centenas ou milhares de átomos, com cálculos rápidos e confiáveis, desde que os hamiltonianos sejam escolhidos adequadamente. Isto é possível por que estes métodos são baseados na determinação da distribuição eletrônica ao redor dos núcleos atômicos, permitindo a avaliação das ligações químicas que determinam a estrutura molecular do ligante, assim como as interações intermoleculares entre ligante/biomacromolécula (OLIVEIRA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006). O termo entálpico foi renomeado neste trabalho de ΔH_3 para ΔH_{int} , onde ΔH_{int} constitui a entalpia de interação entre os componentes do complexo ligante-sítio ativo, determinada através da equação:

$$\Delta H_{int} = \Delta H_{cpx} - (\Delta H_{sa} + \Delta H_{lig}) \quad (20)$$

sendo o termo ΔH_{cpx} correspondente à entalpia calculada para o complexo enzima/inibidor; o termo ΔH_{sa} , a entalpia calculada para o sítio ativo enzimático vazio, sem inibidor algum; e o termo ΔH_{lig} , a entalpia de formação do inibidor, todos em fase gasosa.

2.8.4 Docagem

Uma metodologia muito utilizada para avaliar as características moleculares envolvidas no reconhecimento biológico entre duas moléculas é o ancoramento (*docagem*), inicialmente proposta por Kuntz e colaboradores (1982). O programa de *docagem* usado neste trabalho, GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) (CCDC), permite realizar o

ancoramento do ligante com a proteína, rígida ou parcialmente flexível, buscando e classificando as várias orientações e conformações possíveis e otimizando a interação entre as duas moléculas.

O GOLD é um programa de ancoramento molecular que utiliza um algoritmo genético (GA) para produzir estruturas iniciais de complexos, que são então melhoradas utilizando-se operadores baseados na teoria da evolução Darwinina, como recombinações e mutações, ou seja, novas soluções são produzidas a partir de soluções progenitoras (WILLETT, 1995). O programa se utiliza de métodos estocásticos para a busca por orientações e conformações, as quais são classificadas por meio de funções de pontuação (KITCHEN *et al.*, 2004).

O algoritmo genético envolve 5 etapas: (1) a codificação das variáveis, consistindo na criação de possíveis soluções, os “cromossomos”, formados pelos arranjos ou orientações de uma molécula/ligante em relação à uma proteína/sítio ativo; (2) a criação da população inicial, a qual é constituída por vários cromossomos; (3) avaliação da resposta (aptidão), sendo calculada a partir dos valores atribuídos na formação dos “cromossomos”, determinando quais destes serão capazes de gerar a melhor resposta esperada, inferindo com qual probabilidade este cromossomo irá cruzar; (4) o cruzamento, que consiste em cruzar pares randômicos de cromossomos, dos quais serão obtidas novas gerações, as quais herdarão características dos “pais”; e (5) a mutação, que consiste da troca aleatória de informações contidas nos genes. Ao final, os descendentes com maior aptidão, ou seja, aqueles com melhores valores de ajuste ao seu ambiente (proteína), são selecionados para substituir os indivíduos menos aptos da geração anterior (COSTA-FILHO; POPPI, 1999; MORRIS *et al.*, 1998. JONES *et al.*, 1997). No programa GOLD, as etapas da GA seguem um desenvolvimento segundo a figura 18.

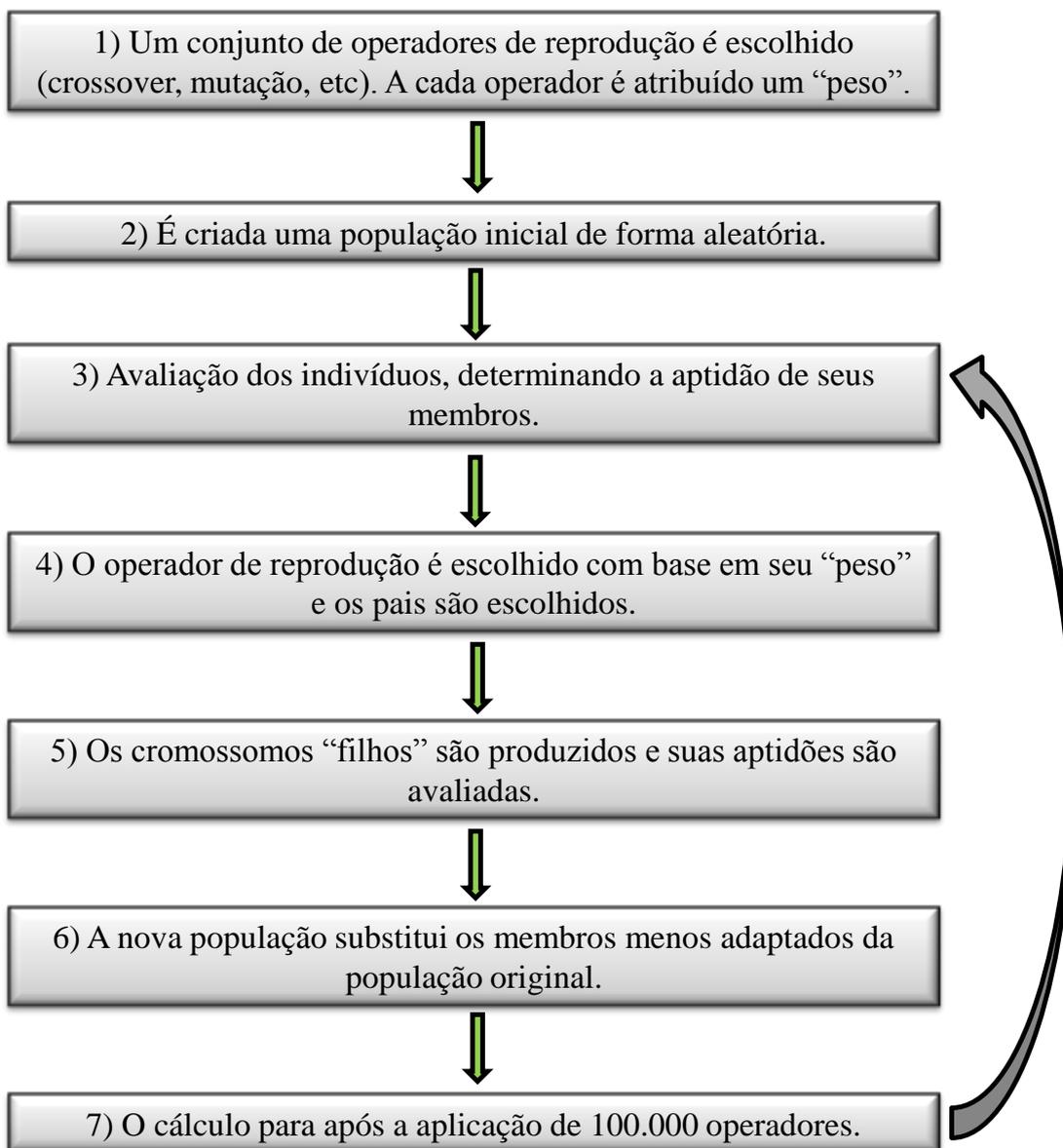


Figura 18: Esquema de GA utilizado pelo programa GOLD (CCDC). Adaptado de JONES *et al.*, 1997.

Para iniciar o cálculo, é necessário que seja definido o sítio de interação, que equivale a um raio de corte até o qual as interações ligante-proteína são consideradas. Inicialmente, define-se um ponto de origem, que pode ser através de coordenadas cartesianas, da indicação de um determinado átomo, ou mesmo pelo posicionamento de um resíduo, que deve ser centralizado em relação ao possível sítio de ligação. Em seguida, é necessário definir o tamanho do raio do sítio de interação, que deve englobar possíveis posicionamentos dos ligantes em estudo, para que todo o sítio de ligação seja pesquisado (JONES *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1995a,b). O tamanho máximo do sítio de interação é de 20 Å a partir do ponto de origem. Em outra etapa da preparação para o cálculo, todos os doadores e aceptores de ligações hidrogênio são identificados na superfície do sítio de interação (em relação à proteína e ao ligante), usando-se a caracterização SYBYL de tipos de átomos (CLARK *et al.*, 1989), com a adição dos “pares de elétrons solitários” aos aceptores, a uma distância de 1,0 Å. Os

grupos que participam de ligações hidrogênio, assim como todas as ligações simples acíclicas não-terminais do ligante, são marcadas como giratórias (JONES *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1995a,b).

A versão 5.1 do programa GOLD possui 4 funções para classificar as soluções do ancoramento, chamadas de funções de pontuação (ou de score): Goldscore (JONES *et al.*, 1997), Chemscore (ELDRIDGE *et al.*, 1997), ASP (MOOIJ *et al.*, 2005) e, o mais recente, ChemPLP (KORB *et al.*, 2009). A pontuação de cada solução (ou “pose”) é um número adimensional que varia de função para função e quanto maior for indica que melhor será a interação proteína-ligante prevista.

Cada função possui sua própria base de cálculo: A função Goldscore utiliza termos com interações de dispersão como Van der Waals e ligações hidrogênio para o complexo proteína/ligante. Além disso, a energia promovida pela tensão torsional do ligante e a energia interna do ligante são incluídas nos cálculos. A função Chemscore é uma função parametrizada em dados empíricos de dezenas de complexos com a afinidade de ligação conhecida. Esta função faz uma estimativa da diferença da energia livre após a interação com o ligante. O valor final é obtido adicionando termos para torsões internas e choques entre átomos, se opondo aos contatos que ficarem muito próximos e às conformações internas de alta energia. A função ASP (do inglês: *Astex Statistical Potential*) utiliza a informação sobre a frequência de interação entre os átomos dos ligantes e das proteínas obtida pela análise de estruturas ligante/proteína existentes no banco de dados PDB e esta informação é utilizada para gerar potenciais estatísticos. Dados como energias de ligações hidrogênio, raios e polarizabilidade atômica, potenciais de torção, direcionalidade de ligações hidrogênio são utilizados como parâmetros para construir a função. A função mais recente, ChemPLP, possui termos que priorizam a complementaridade proteína/ligante, particulares da função PLP (do inglês: *Piecewise Linear Potential*), além de adicionar termos que tratam das ligações hidrogênio e com metais, dependentes da distância e do ângulo, extraídas da função ChemScore. (LIEBESCHUETZ *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Os acidentes ofídicos constituem um problema de saúde pública de grande relevância mundial, pois podem levar indivíduos acometidos a sequelas permanentes e à morte. Atualmente, o número de acidentes ofídicos vem crescendo anualmente e o principal tratamento disponível, o soro anti-ofídico, enfrenta sérios problemas, que vão desde sua produção, distribuição, até reações de hipersensibilidade graves (GUTIERREZ *et al.*, 2015, ANDRADE-FILHO, 2015).

Gutierrez e colaboradores (2015) salientam sobre a necessidade de se buscar novas formas ou alternativas para o tratamento do acidente ofídico que contorne os problemas de produção e distribuição, além de inibir os efeitos tóxicos de forma mais efetiva, principalmente os locais, e que promova pouca ou, de preferência, nenhuma reação adversa no paciente.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver inibidores efetivos para uma metaloprotease presente na peçonha de *Bothrops pauloensis*, visto que esta classe de toxinas representa 30 a 75% da composição da peçonha (VALENTE *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2015) e pode induzir vários efeitos tóxicos nas vítimas, combinando métodos computacionais, incluindo modelagem comparativa de proteínas, estudos de docagem molecular e cálculos semiempíricos, com resultados de avaliação da atividade *in vitro* dos compostos com o intuito de se avaliar e selecionar os melhores ligantes. Para se alcançar este

objetivo, foram utilizados, inicialmente, compostos da biblioteca LaDMol-QM da UFRRJ pertencentes às classes das semicarbazonas e tiosemicarbazonas, sendo que, numa segunda etapa, buscou-se propor de forma racional modificações estruturais nos melhores ligantes com o objetivo de melhorar a interação com a metaloprotease presente na peçonha de *Bothrops pauloensis* e, em seguida, avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* destas na atividade inibitória sobre a toxina.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção das toxinas

As toxinas e a peçonha utilizadas neste trabalho foram cedidas pela Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, coordenadora do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Naturais do Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia. Foram utilizadas as toxinas isoladas BpMP-I (NAVES-DE-SOUZA *et al.*, 2012) e Botropoidina (GOMES *et al.*, 2015), além da peçonha de *Bothrops pauloensis*.

4.2 Compostos Sintéticos Utilizados

As estruturas dos compostos sintéticos usadas nos estudos de modelagem molecular, assim como amostras utilizadas nos estudos de avaliação de atividade *in vitro* e *in vivo*, foram cedidas pelo Prof. Dr. Arthur E. Kümmerle, do Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFRRJ.

4.3 Obtenção e Manutenção dos Animais Para os Ensaio Biológicos

Camundongos *Swiss* foram obtidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da UFU com água e suplemento alimentar “*ad libitum*”, a uma temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, luminosidade controlada e padrão sanitário convencional. Este projeto recebeu parecer favorável pelo Comitê de Ética e Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob Protocolo de nº 051/13.

4.4 Quantificação de Proteínas

A quantificação das proteínas foi determinada pelo método de Bradford, 1976. Cada amostra foi diluída em 100 μL de água deionizada e adicionada a 3 mL do reagente Bradford (100 mg de Coomassie Blue G, 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido fosfórico 85% e água desionizada suficiente para completar 1L de solução). Em seguida, foram feitas medições das absorbâncias no espectrofotômetro Ultrospec 1000 UV/Visível (Pharmacia Biotech) em comprimento de onda de 595 nm. Com os valores das absorbâncias construiu-se uma curva para determinação da concentração das proteínas, tomando como padrão uma curva de Soroalbumina Bovina.

4.5 Ensaio Enzimático

4.5.1 Atividade azocaseinolítica

A atividade azocaseinolítica foi determinada de acordo com Gomes e colaboradores (2011) com modificações. A azocaseína (1 mg/mL) foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,05 mol/L (pH 7.8) contendo 0,15 mol/L NaCl. 160 µL desta solução foi adicionada em cada poço de uma placa de poliestireno (96 poços). A reação foi iniciada com a adição de 45 µL da solução da enzima contendo 7,5 µg de enzima (massa mínima capaz de degradar 50% do substrato utilizado, previamente determinada por Naves-de-Souza e colaboradores (2012)), atingindo a concentração final de 7,3 µM. Após a incubação da solução a 37 °C por 30 min., a reação foi interrompida com a adição de 45 µL de 20% (m/v) do ácido tricloroacético (TCA). A placa, então, ficou descansando a temperatura ambiente por 30 min e, posteriormente, foi centrifugada a 3000 g por 20 min. O sobrenadante foi transferido para outra placa e a absorvância a 405 nm foi determinada e a atividade azocaseinolítica foi definida como uma unidade (U) para o aumento em 0,01 na absorvância em relação ao controle (salina).

4.6 Atividade Hemorrágica

O ensaio de atividade hemorrágica foi realizado segundo método descrito por Nikai e colaboradores (1984). Para este ensaio, a toxina BpMP-I foi substituída pela toxina Botropoidina (GOMES *et al.*, 2015), uma metaloprotease da classe P-III hemorrágica, já utilizada pelo grupo de pesquisa, visto que a BpMP-I não possui atividade hemorrágica por se tratar de uma metaloprotease P-I. A hemorragia foi induzida por injeções intradérmicas (i.d.) de diferentes doses da peçonha de *B. pauloensis* e da enzima *Botropoidina*, 10µg e 5µg, respectivamente, no dorso de camundongos Swiss machos (18-22g, n=4). Após três horas, os animais foram anestesiados com soluções de ketamina® 10% (0,05 ml/kg) + xilasina® 2% (0,025ml/kg) e posteriormente sacrificados. As peles foram removidas e a área hemorrágica foi medida utilizando-se um paquímetro de baixa pressão (CALIPER).

4.7 Ensaios de Inibição da Atividade Enzimática e Hemorrágica

Os ensaios de inibição da atividade enzimática foram realizados incubando-se previamente os compostos sintéticos, os quais foram suspensos em solução de acetronitrila a 50%, com a toxina BpMP-I por 60 min a 37° C e, imediatamente após, foi determinada a atividade enzimática. Foram utilizadas as proporções de 1:1, 1:5, 1:10 e 1:20 toxina/ligante (M/M) e a CI₅₀ (concentração mínima do ligante capaz de inibir 50% da atividade da enzima) foi determinada. Para os ensaios de inibição da atividade hemorrágica, os ligantes foram incubados previamente com a toxina Botropoidina ou com a peçonha de *B. pauloensis* por 60 min. a 37° C e imediatamente após, foi determinada a atividade hemorrágica. Foram utilizadas proporções de 1:1, 1:5, 1:10 ou 1:20 toxina/ligante ou peçonha bruta de *B. pauloensis* (Bp)/ligante (m/m). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e com n=3. A montagem dos gráficos, cálculos das médias e desvios padrões das médias foram realizadas com auxílio dos softwares Micrococal Origin e Sigma Plot. A determinação das significâncias entre as médias (análise de variância) e os testes de significância da diferença entre duas médias foram realizados utilizando-se o Teste t de Student, e os valores de P <0,001 e >0,1 foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

4.8 Análise Estatística

Todos os experimentos de atividade enzimática e biológica foram realizadas em triplicata com $n=3$. A montagem dos gráficos, cálculos das médias e desvios padrões das médias foram realizadas com auxílio dos softwares Micrococcal Origin e Sigma Plot. A determinação das significâncias entre as médias (análise de variância) e os testes de significância da diferença entre duas médias foram realizados utilizando-se o Teste t de Student, e os valores de $P < 0,001$ e $> 0,1$ foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram apresentados como média ou desvio padrão.

4.9 Alinhamento e Análise Filogenética

A sequência protéica da BpMP-I foi alinhada utilizando-se o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) com outras SVMPs. A análise filogenética foi realizada utilizando o mesmo programa pelo método “Neighborjoining” (NJ). Foram realizadas 1000 réplicas (árvores aleatórias) e aquela com maior consenso entre as sequências foi utilizada (LARKIN *et al.*, 2007; GOUJON *et al.*, 2010; McWILLIAM *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2015).

4.10 Modelagem Computacional

4.10.1 Construção do modelo 3D da metaloprotease

Foi utilizada a técnica de modelagem comparativa (modelagem por homologia). A sequência usada como molde para a montagem da BpMP-I (NAVES-DE-SOUZA *et al.*, 2012) foi a estrutura da BaPI (código do PDB 2W12 (LINGOTT *et al.*, 2009)), encontrada com a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), fornecida pelo servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) (ARNOLD *et al.*, 2006). Esta ferramenta procura por estruturas na base de dados ExNRL-3D (proveniente do PDB) a partir da sequência em pesquisa, para selecionar os moldes mais apropriados para a modelagem com o Swiss-Model. O molde compartilha de alto grau de identidade (79%) com a sequência-alvo, e sua estrutura tridimensional possui a melhor resolução encontrada (1,46 Å) dentre as sequências pesquisadas com a ferramenta BLAST.

4.10.2 Construção da estrutura das ligantes

As estruturas dos ligantes foram construídas e tiveram a energia minimizada pelo método PM3 (STEWART, 1989) com o auxílio do programa Spartan’08 (Wavefunction). As moléculas utilizadas neste estudo foram obtidas da quimioteca LaDMol-QM (Departamento de Química – UFRRJ), coordenado pelo Prof. Dr. Arthur E. Kümmerle, e têm sua estrutura básica apresentada na figura 18 com os substituintes apresentados na tabela 2.

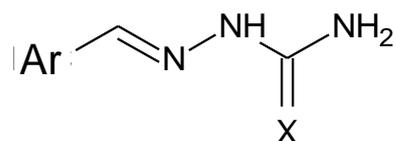


Figura 18: Estrutura básica das semi e tiosemicarbazonas utilizadas.

Tabela 2: Substituintes utilizados na estrutura básica representada na Figura 15.

Ligante	X	Ar
LDQM-IN-22	S	Fenil
LDQM-IN-23	S	4-OMe- Fenil
LDQM-IN-24	S	4-Cl-Fenil
LDQM-IN-25	S	3-OH,4-OMe- Fenil
LDQM-IN-26	S	2-Furanil
LDQM-IN-27	S	4-Br- Fenil
LDQM-IN-53	O	2,4-OH-Fenil
LDQM-IN-54	O	3-OH -Fenil
LDQM-IN-55	O	4-OH-Fenil
LDQM-IN-56	O	3-OH,4-OMe-Fenil
LDQM-IN-57	O	4-COOH-Fenil
LDQM-IN-58	O	4-OMe-Fenil
LDQM-IN-59	O	4-Cl-Fenil

4.10.3 Docagem Molecular

As moléculas foram utilizadas para os ensaios de docagem molecular com a toxina, no programa Gold 5.1 (CCDC), para identificação dos modos de interação mais prováveis. A função de pontuação, o resíduo de aminoácido a partir do qual se define a cavidade de interação e o raio da cavidade de interação para ancoramento dos ligantes foram escolhidos após experimentos de re-ancoramento do inibidor peptideomimético co-cristalizado com uma metaloprotease BaPI (Código PDB: 2W12).

4.10.4 Cálculos semi-empíricos

Os complexos com maiores pontuações foram reotimizados no programa MOPAC 2012 (Stewart Comput. Chem.) para obtenção de dados mais precisos da energia de interação. Para isso, os arquivos foram preparados fazendo-se um recorte do sítio de ligação dos complexos enzima/ligante obtidos por docagem molecular, incluindo todos os resíduos de amino ácidos com ao menos um átomo dentro um raio de 6,0 Å em torno do ligante, utilizando-se o programa RasMol 2.7.5 (BERNSTEIN, 2009). O modelo de trabalho inicial foi constituído dos resíduos Ser71, Leu75, Asp104, Gln105, Gln106, Thr107, Ile108, Gly109, Ile110, Ala111, Tyr112, Thr113, Ala124, Val125, Val126, Met127, His129, Arg135, Val136,

Ala137, Val138, Thr139, Met140, Ala141, His142, Glu143, His146, Asn147, Met150, His152, Asp153, Ser162, Cys163, Ile 164, Met165, Ala166, Ser167, Thr168, Ile169, Ser170, Lys171, Phe175, além do íon metálico Zn²⁺ (202), pertencente ao sítio catalítico. Logo após, foram adicionados átomos de hidrogênio à estrutura do recorte, usando-se o programa PyMOL (Delano Scientific LLC, 2006).

As otimizações das geometrias para minimização de energia foram feitas com o Hamiltoniano PM6 do programa MOPAC 2012, até uma norma de gradiente inferior a 1,0 kcal/Å ou rad. Durante as otimizações, os átomos das ligações peptídicas foram mantidos fixos no espaço. Os átomos de hidrogênio e todos os átomos das cadeias laterais e dos ligantes foram mantidos livres para que pudessem alcançar conformações de menor energia durante a minimização de cada sistema modelado. As palavras-chave utilizadas para a realização de cálculos foram as seguintes:

PM6 GRAD NOINTER MMOK EF CHARGE=n XYZ PDBOUT

PM6: Hamiltoniano

GRAD: Imprimir todos os gradients

NOINTER: Não imprimir as distâncias interatômicas

MMOK: Usar correlação de mecânica molecular em ligações CONH

EF: Usar rotina EF (*Eigenvector Following*) na pesquisa de mínimo de energia

CHARGE=n: Define a carga total n do sistema

XYZ: Realiza todas as operações geométricas utilizando coordenadas cartesianas.

PDBOUT: Cria um arquivo com extensão pdb com a estrutura calculada.

MOZYME: Utiliza o método de orbital molecular localizado para acelerar o SCF

Obs: apenas a palavra-chave CHARGE=n foi alterada de acordo com a carga total de cada estrutura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência da proteína de interesse, uma metaloprotease da peçonha de *Bothrops pauloensis*, a BpMP-I (NAVES-DE-SOUZA *et al.*, 2012), foi utilizada para buscar no banco de dados PDB uma sequência molde de outra proteína com estrutura cristalográfica resolvida. A estrutura cristalográfica com código no PDB 2W12, da metaloprotease BaPI (LINGOT *et al.*, 2009) complexada com um peptidomimético ((2*R*,3*R*)-N1-[(1*S*)-2,2-dimetil-1-(metilcarbamoil)propil]-N4-hidroxi-2-(2-metilpropil)-3-[[1,3-tiazol-2-il-carbonil)amino]metil}butanodiamida), foi utilizada como molde para a construção do modelo 3D da sequência da BpMP-I. O molde possui alto grau de identidade com a sequência alvo, 79%, e alto grau de similaridade, 89% (Figura 19). Possui, também, uma ótima resolução cristalográfica, 1,46 Å. Esta estrutura, então, foi escolhida como molde para a construção do modelo 3D da sequência de interesse para este trabalho.

```

QKFSPKYIELAVVADHGMFTKYNSNVNTIRTWVHEMVNSLNGFFRSMNVSDASLVNLEVWS 61
++FSP+YIELAVVADHG+FTKYNSN+NTIRT VHEM+N++NGF+RS++V A L NLEVWS
ERFSPRYIELAVVADHGIFTKYNSNLNTIRTRVHEMLNTVNGFYRSVDVHAPLANLEVWS 60

KKDLIKVEKDSSKTLTSFGEWREERDLLPRISHDHAQLLTIVFDQQTIGIAYTAGMCDPS 121
K+DLIKV+KDSSKTL SFGEWREERDLLPRISHDHAQLLT +VFD TIG AYT GMCDP
KQDLIKVQKDSSKTLKSFGEWREERDLLPRISHDHAQLLTAVVFDGNTIGRAYTGGMCDPR 120

QSVAVVMDHSSKKNIRVAVTMAHELGHNLGMDHD-DTCTCGAKSCIMASTISKGLSFEFSD 180
SV VV DHSK N+ VAVTMAHELGHNLG+ HD +C+CGAKSCIMAS +SK LS+EFSD
HSVGVVRDHSKNNLWVAVTMAHELGHNLGIHEDTGSCSCGAKSCIMASVLSKVLSEFSD 180

CSQNQYQTYVTKHNPQCILNKP 202
CSQNQY+TY+T HNPQCILNKP
CSQNQYETYLTNHNPNQCILNKP 202

```

Figura 19: Alinhamento das sequências da BpMP-I (NAVES-DE-SOUZA *et al.*, 2012) com a BaPI (LINGOT *et al.*, 2009) (PDB: 2W12) mostrando os resíduos conservados (79%) e a similaridade total das estruturas (89%). Em destaque estão os resíduos de histidina em vermelho, os quais coordenam o zinco no sítio catalítico, e o resíduo de glutamato em verde, essencial para a atividade catalítica.

As estruturas 3D das proteínas BpMP-I e BaPI superpostas estão mostradas na Figura 17A. Além de ter cobertura de 100% da estrutura, o modelo da BpMP-I gerado resultou em um valor de RMSD (raiz do desvio médio quadrático) de 0,24 Å e apresentou 99% dos aminoácidos fora das regiões não permitidas, conforme determinado pelo servidor *Rampage* (LOVELL *et al.*, 2012). Os dois únicos resíduos localizados nestas regiões, Thr156 e Cys157 (em destaque na Figura 20A), não participam do sítio catalítico (Fig. 20B) e, portanto, não interferem nos resultados de docagem e cálculo de otimização da estrutura dos complexos enzima/ligante.

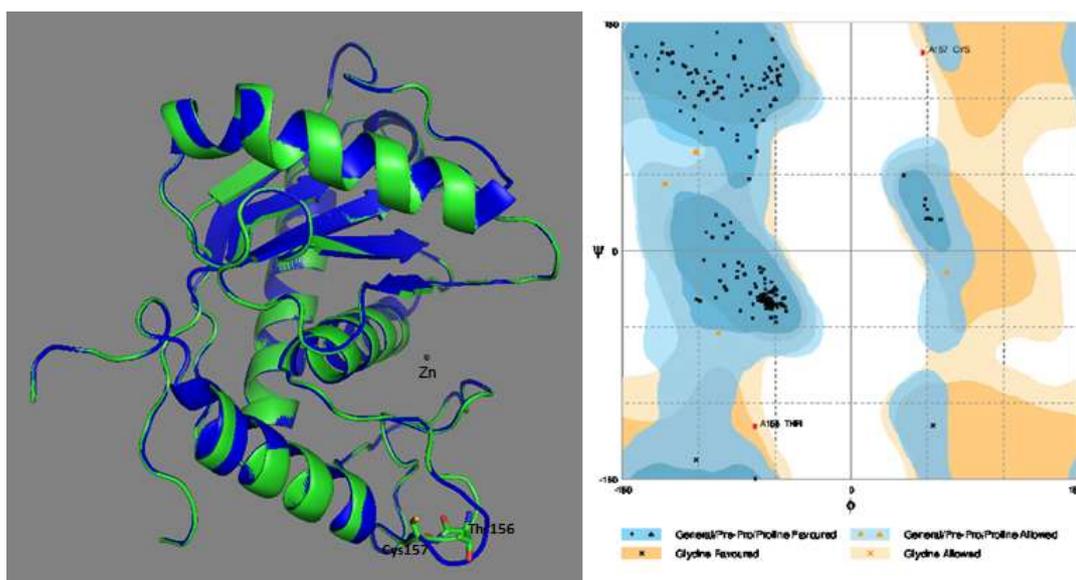


Figura 20: Validação do modelo teórico 3D da BpMP-I. A) Sobreposição das estruturas 3D da BpMP-I (azul) e da BaPI (verde); B) Gráfico Ramachandran do modelo da BpMP-I gerado pelo programa *Rampage* (LOVELL *et al.*, 2012) mostrando que 99% dos resíduos de aminoácidos estão na região permitida do gráfico.

Além disso, a validação do modelo da BpMP-I contou com a análise do gráfico de pontuação Z (Figura 21A) gerado pelo servidor SWISS-Model, baseado na função de pontuação QMEAN6 (*Qualitative Model Energy ANalysis*), uma combinação linear de seis descritores estruturais usando potenciais estatísticos: uma energia potencial para a geometria local do ângulo de torção de três resíduos de aminoácidos consecutivos (*Torsion*); dois potenciais dependentes da distância para interações atômicas, um para avaliar a energia de interação de todos os átomos do modelo (*All-Atom*) e outro para as interações no nível dos resíduos, baseado somente nos carbonos $C\beta$ (*CBeta*); o potencial de solvatação, que descreve o estado embebido (em meio a uma solução aquosa) dos resíduos de aminoácidos (*Solvation*); os 2 termos finais descrevem a concordância entre as estruturas secundárias preditas (a partir da sequência) e a calculada (*SS Agree*); e a concordância da acessibilidade do solvente (*ACC Agree*). O QMEAN6 para o modelo gerado foi de -2,28, dentro do aceitável para estruturas cristalizadas de mesmo tamanho, depositadas no banco de dados, conforme mostrado no gráfico de pontuação Z (Figura 21B).

Estimativas da qualidade local do modelo, baseado na função de pontuação QMEAN, podem ser vistas no gráfico "*Local Quality Estimate*". A cada resíduo é atribuída uma pontuação de confiabilidade entre 0 e 1, que descreve a semelhança esperada com relação à estrutura nativa (Figura 21C). Números mais altos indicam maior confiabilidade nos resíduos gerados no modelo (BANKERT *et al.*, 2011).

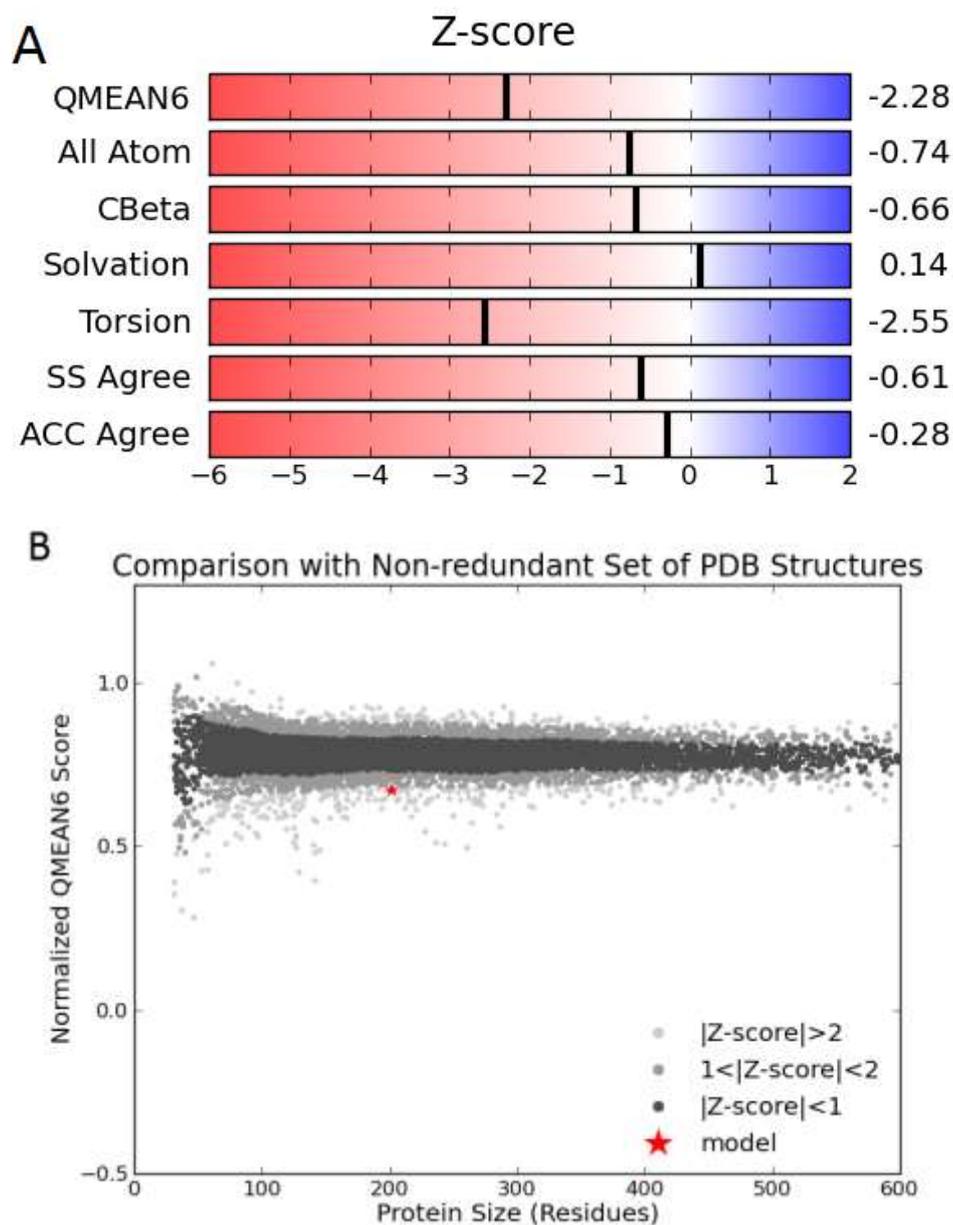


Figura 21: Validação do modelo teórico da BpMP-I. (A) O gráfico de pontuação Z foi gerado utilizando os resultados do QMEAN6, gerado a partir de 6 descritores estruturais: *CB*, *All Atom*, *Solvation*, *Torsion*, *SS Agree* e *ACC Agree*. (B) Comparação do modelo com estruturas cristalográficas não redundantes. (C) Estimativa de Qualidade Local (*Local Quality Estimate*) (Continua).

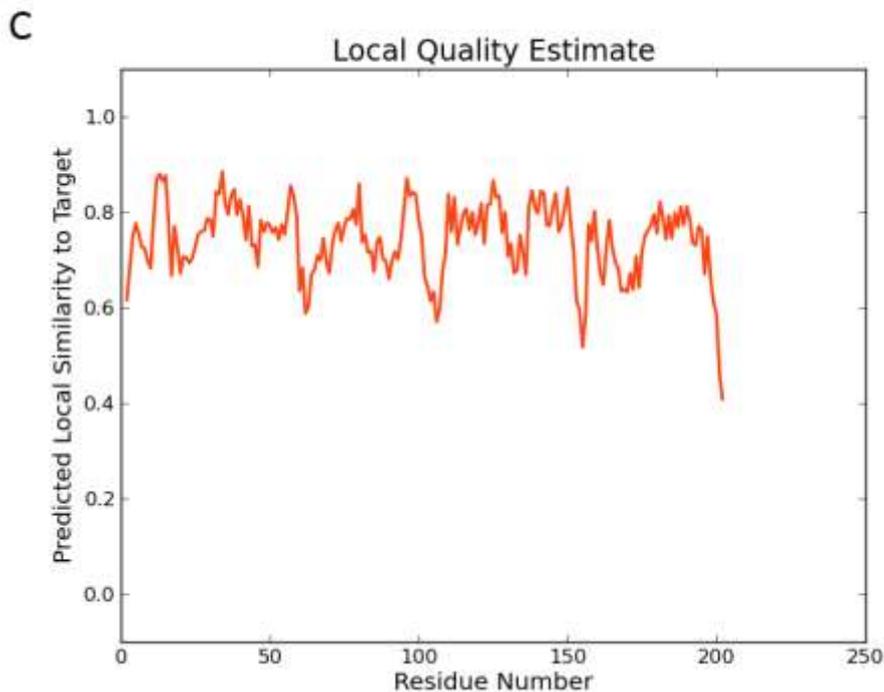


Figura 21: Continuação.

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que o modelo teórico 3D da toxina BpMP-I gerado pelo servidor SWISS-Model possui qualidade satisfatória. Este modelo foi utilizado nos estudos de docagem molecular e cálculos semiempíricos.

As semi e tiossemicarbazonas utilizadas neste trabalho foram ancoradas no sítio catalítico do modelo da BpMP-I, considerando-se um raio 6,0 Å para o sítio de interação, determinado a partir do átomo de nitrogênio Nε do resíduo de His142, que faz parte da tríade de coordenação do metal (zinco). A função de pontuação do programa GOLD 5.1 (CCDC) para realização da docagem foi escolhida após o experimento de re-docagem do inibidor co-cristalizado, o peptidomimético, com uma toxina homóloga, a mesma estrutura utilizada como molde (código PDB: 2W12) para construção do modelo 3D da BpMP-I. O resultado da re-docagem do inibidor utilizando a função de pontuação *GoldScore* obteve melhores resultados quando comparados com as outras funções. O RMSD (*Root Mean Square Deviation*) para a re-docagem foi de 0,4215 Å (Figura 22), sendo que para as funções ChemPLP, ChemScore e ASP os valores de RMSD obtidos foram de 0,6157, 1,274 e 1,119 Å, respectivamente. De fato, todos os valores estão melhores do que a resolução cristalográfica e podem ser considerados satisfatórios.

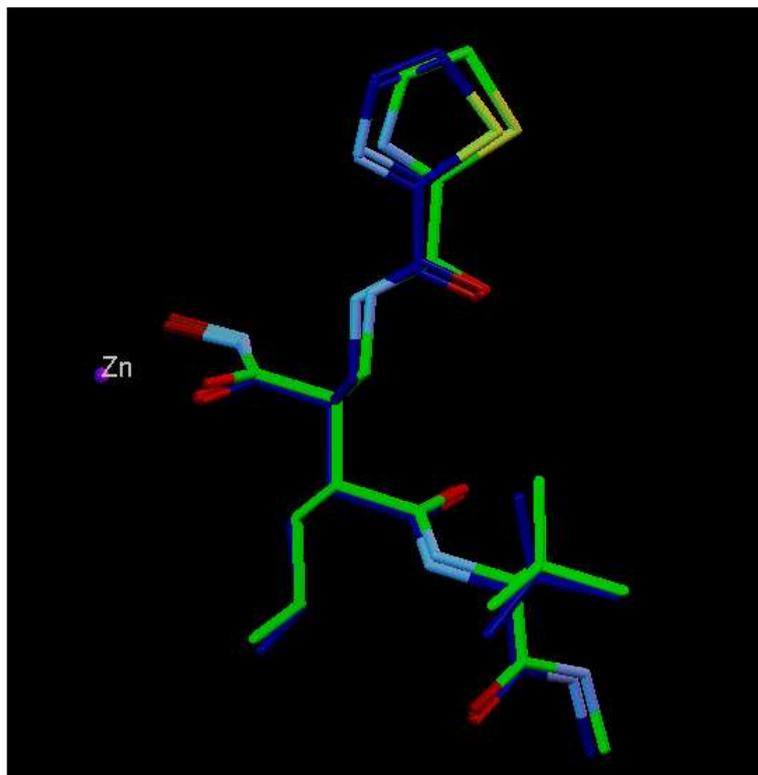
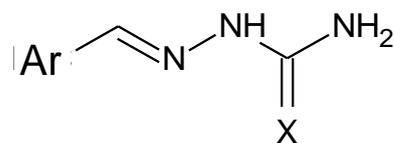


Figura 22: Comparação da estrutura original co-cristalizada (2W12) (carbonos em azul) com a da solução, com menor valor de RMSD segundo maior valor de pontuação (73,8), obtida pela função GoldScore durante re-docagem (carbonos em verde).

Definidos os parâmetros necessários como o local para docagem, tamanho do raio para a docagem e a função de pontuação com melhor capacidade de previsão da geometria de interação dos ligantes dentro do sítio catalítico da metaloprotease, o experimento de docagem foi conduzido com os ligantes (semi e tiossemicarbazonas, descritos na Tabela 2) no sítio catalítico da enzima BpMP-I. Os resultados da docagem com as pontuações atingidas por cada ligante utilizado estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Pontuações de docagem (função GoldScore) dos ligantes no sítio catalítico da enzima BpMP-I.



Ligante	X	Ar	Pontuação ^a
LDQM-IN-22	S	Ph	56,28
LDQM-IN-23	S	4-OMe-Ph	66,01
LDQM-IN-24	S	4-Cl-Ph	60,77
LDQM-IN-25	S	3-OH,4-OMe-Ph	53,46
LDQM-IN-26	S	Furano	50,35
LDQM-IN-27	S	4-Br-Ph	62,31
LDQM-IN-53	O	2,4-OH-Ph	49,01
LDQM-IN-54	O	3-OH -Ph	47,03
LDQM-IN-55	O	4-OH-Ph	47,80
LDQM-IN-56	O	3-OH,4-OMe-Ph	47,24
LDQM-IN-57	O	4-COOH-Ph	51,83
LDQM-IN-58	O	4-OMe-Ph	52,24
LDQM-IN-59	O	4-Cl-Ph	50,01

^a Valores de pontuação para a função GoldScore.

As maiores pontuações resultantes do experimento de docagem foram obtidas para as tiossemicarbazonas, ou seja, as moléculas que possuem um átomo de enxofre na estrutura. Como está mostrado na figura 23, o átomo de enxofre do melhor ligante previsto, LDQM-IN-23, se coordena com o íon Zn^{2+} . Esta interação parece ser a responsável pela melhor interação das tiossemicarbazonas em relação às semicarbazonas. Este fato pode ser explicado pela teoria de Pearson (PEARSON, 1963), a qual classifica ácidos e bases em duros e macios, sendo que ácidos duros teriam a tendência de interagir com bases duras e ácidos macios de interagir com bases macios. De acordo com a classificação de Pearson, o íon Zn^{2+} é considerado um ácido de Lewis de caráter limítrofe, mas em metaloenzimas ele é mais comumente associado a bases de caráter macio, como resíduos de cisteína e de histidina. Assim, o íon Zn^{2+} teria maior tendência de interação com o enxofre, uma base macia, presente nas tiossemicarbazonas. Já para o oxigênio presente nas semicarbazonas, que é uma base dura de acordo com Pearson, é prevista uma interação mais fraca com o íon metálico. Além disso, o enxofre se aproxima mais do zinco, ficando a uma distância de 1,89 Å, por ser um átomo com maior raio quando comparado com o oxigênio, o qual fica a 2,14 Å de distância, o que melhora a coordenação com o zinco (Figura 23).

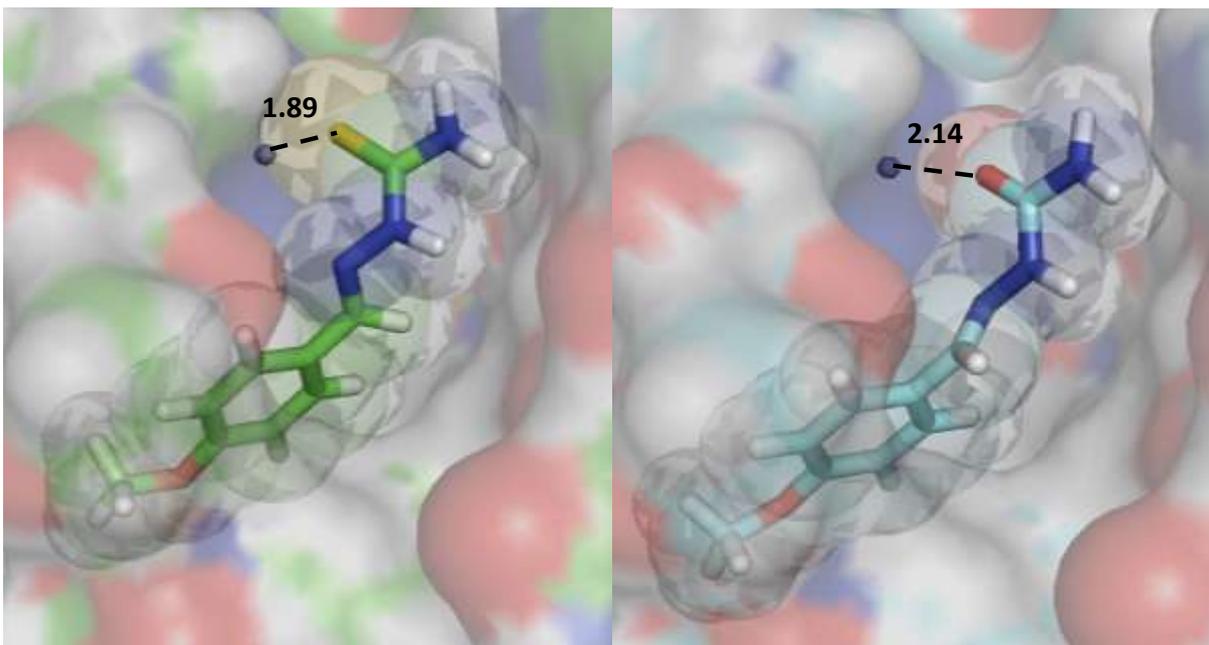


Figura 23: Moléculas LDQM-IN-23 (esquerda) e LDQM-IN-58 (direita) docadas no sítio catalítico da BpMP-I.

O substituinte no anel aromático do ligante possui menor relevância para a interação. Porém, a presença de substituintes na posição 4 do anel melhora a interação, elevando os valores das pontuações na docagem, como pode ser observado para os ligantes LDQM-IN-23, 24 e 27 com relação ao ligante não substituído LDQM-IN-22. A substituição realizada com o grupo metoxi (LDQM-IN-23) foi a que levou ao melhor resultado de docagem. Este grupo fica inserido em uma cavidade hidrofóbica, formada pelas cadeias laterais dos resíduos de Val139, Ile170 e Phe176 do sítio de interação, melhorando a interação enzima/inibidor (Figura 24). O ligante LDQM-IN-23 ainda realiza uma interação do tipo empilhamento- π entre seu anel aromático e o anel imidazólico do resíduo His142 e uma ligação de hidrogênio com a carbonila peptídica do resíduo Gly109 (Figura 24). Já o ligante LDQM-IN-25 foi a tiossemicarbazona que obteve o pior resultado de docagem (Tabela 3). Este resultado pode ser atribuído às duas substituições realizadas no anel aromático, o que pode causar impedimento estérico da molécula para sua inserção adequada na cavidade hidrofóbica do sítio de interação da enzima.

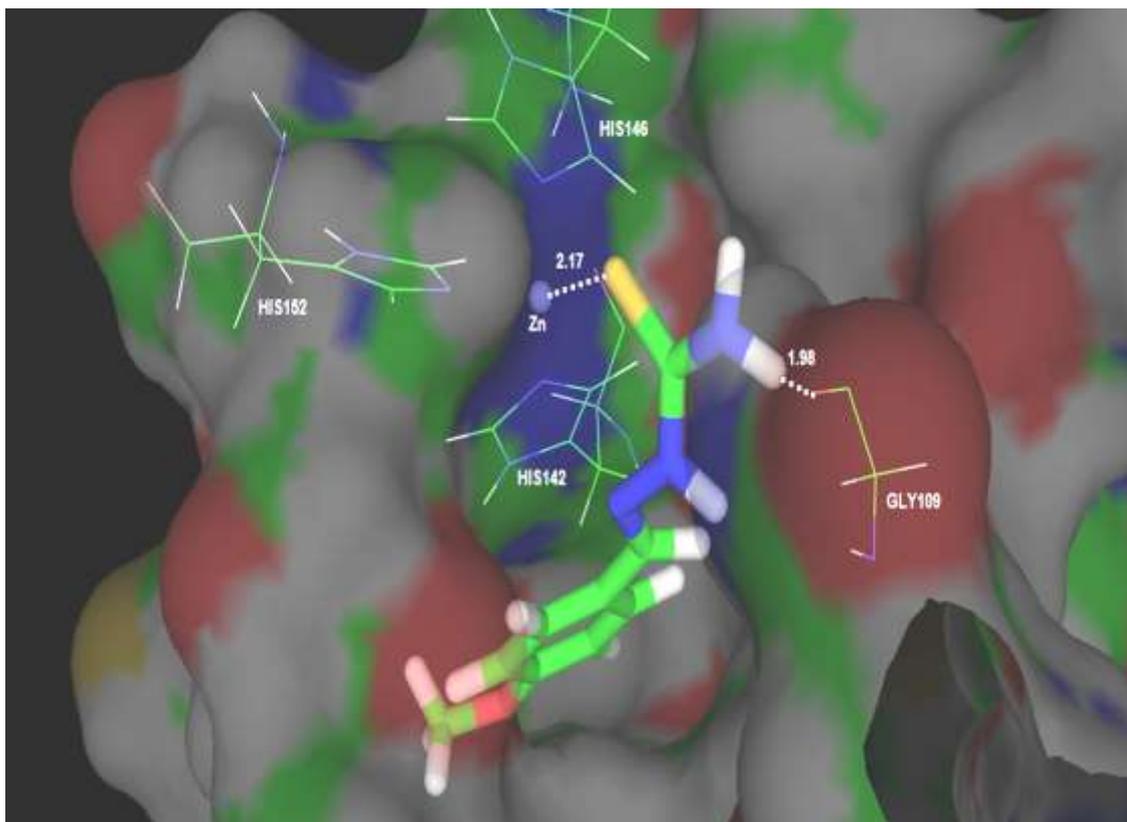


Figura 24: Interações obtidas para a molécula LDQM-IN-23 após o docagem no sítio catalítico da BpMP-I

Entretanto, devido às aproximações envolvidas nas funções de pontuação, as pontuações em geral são limitadas quanto à correlação com dados de atividade. Para se avaliar melhor as interações entre a BpMP-I e as tiossemicarbazonas, os complexos com as geometrias de interação mais favoráveis obtidas pela docagem foram submetidos à reotimização de suas estruturas através do método PM6 pelo programa MOPAC 2012 para se obter as respectivas geometrias de interação. Duas situações foram consideradas para a enzima antes da coordenação com os ligantes. Na primeira, o Zn^{2+} se encontra coordenado apenas com os anéis imidazólicos dos 3 resíduos de histidina do sítio ativo (Tabela 4). Os resultados da entalpia de interação dos ligantes (ΔH_{int}) para esta situação mostram que os valores ΔH_{int} foram favoráveis para todos os ligantes, exceto para o composto não substituído LDQM-IN-22, indicando que os ligantes substituídos são capazes de interações favoráveis com o sítio catalítico da enzima, em acordo com os resultados obtidos pela docagem e pela inibição de atividade enzimática.

Tabela 4: Valores das entalpias de interação das tiossemicarbazonas com a enzima BpMP-I obtidos após a otimização das estruturas pelo método PM6 (programa MOPAC 2012).

Ligante	$\Delta H_f(\text{Complexo})$ (kcal/mol)	$\Delta H_f(\text{enzima})$ (kcal/mol)	$\Delta H_f(\text{Ligante})$ (kcal/mol)	ΔH_{int}^* (kcal/mol)
LDQM-IN-22	-1570,58	-1642,04	69,21	2,25
LDQM-IN-23	-1556,75	-1522,41	27,79	-62,13
LDQM-IN-24	-1470,70	-1458,70	59,27	-71,27
LDQM-IN-25	-1587,31	-1519,50	-4,70	-63,11
LDQM-IN-26	-1562,40	-1522,82	38,55	-78,13
LDQM-IN-27	-1515,18	-1522,63	77,51	-70,06

* $\Delta H_{int} = \Delta H_f(\text{Complexo}) - [\Delta H_f(\text{enzima}) + \Delta H_f(\text{Ligante})]$

No entanto, esta situação pode estar superestimando a interação e levando a valores de ΔH_{int} excessivamente negativos, já que o íon Zn^{2+} não se encontra com sua camada de coordenação completa no sítio antes da coordenação dos ligantes. Assim, na segunda situação avaliada, o Zn^{2+} inicialmente foi preparado em um estado tetracoordenado, fazendo coordenações com os 3 resíduos de histidina e com uma molécula de água, que é deslocada para fora do sítio após coordenação com os ligantes (Tabela 5). Os resultados para a situação em que o ligante deve deslocar a molécula de água da enzima (Tabela 5) mostram que o processo se tornou agora entalpicamente desfavorável para todos os ligantes. Os resultados do segundo modelo sugerem que, excetuando-se possíveis efeitos entrópicos, as tiossemicarbazonas não devem se ligar muito fortemente com a enzima e não devem ser inibidores fortes.

Tabela 5: Valores das entalpias de interação das tiossemicarbazonas com a enzima BpMP-I contendo uma molécula de água, obtidos após a otimização das estruturas pelo método PM6 (programa MOPAC 2012).

Ligante	$\Delta H_f(\text{Complexo})$ (kcal/mol)	$\Delta H_f(\text{enzima-}$ $\text{água})$ (kcal/mol)	$\Delta H_f(\text{Ligante})$ (kcal/mol)	ΔH_{int}^* (kcal/mol)
LDQM-IN-22	-1570,58	-1748,10	69,21	54,01
LDQM-IN-23	-1556,75	-1735,62	27,79	96,77
LDQM-IN-24	-1470,70	-1658,03	59,27	73,75
LDQM-IN-25	-1587,31	-1692,34	-4,70	55,43
LDQM-IN-26	-1562,40	-1749,12	38,55	93,87
LDQM-IN-27	-1515,18	-1722,12	77,51	75,13

* $\Delta H_{int} = \Delta H_f(\text{complexo}) + \Delta H_f(\text{água}) - [\Delta H_f(\text{enzima-água}) + \Delta H_f(\text{ligante})]$, onde $\Delta H_f(\text{água}) = -54,31$ kcal/mol

Foi realizado uma triagem da atividade de inibição enzimática promovida pelos ligantes sobre a BpMP-I (Tabela 6). O Composto LDQM-IN-26 foi excluído destes resultados devido à influência de sua coloração sobre leitura de absorbância, gerando um falso positivo. Esta triagem mostrou que as tiossemicarbazonas possuem atividade inibitória modesta e que as semicarbazonas não foram ativas, para a dosagem avaliada (2500 μ M). Estes resultados corroboram os resultados de docagem, os quais evidenciaram que as tiossemicarbazonas possuem pontuações maiores que as semicarbazonas. Outros autores já haviam mostrado que as tiossemicarbazonas podem quelar metais presentes no sítio catalítico de enzimas (PAIVA *et al.*, 2014; RODRIGUES-ARQUELLES *et al.*, 1995; POPOVIC-BIJELIC *et al.*, 2011; BERALDO, 2004), justificando a perda da atividade enzimática.

Tabela 6: Resultados de determinação de inibição enzimática; valores obtidos para o ensaio de inibição de 50% da atividade enzimática (CI₅₀).

Ligante	CI ₅₀ (μM)	Ligante	CI ₅₀ (μM)
LDQM-IN-22	4.217,22	LDQM-IN-58	Inativo
LDQM-IN-23	3.011,68	LDQM-IN-57	Inativo
LDQM-IN-24	4.249,94	LDQM-IN-59	Inativo
LDQM-IN-25	3.412,50	LDQM-IN-53	Inativo
LDQM-IN-26	nd	LDQM-IN-55	Inativo
LDQM-IN-27	3.136,76	LDQM-IN-56	Inativo
		LDQM-IN-54	Inativo

O derivado LDQM-IN-23 foi o que obteve melhor resultado, quando comparado com os outros derivados testados. O menor valor da CI₅₀ (3.011,68 μM) corrobora os resultados obtidos na docagem, na qual este derivado obteve o maior valor de pontuação (66,01). Notavelmente, a ordem das pontuações de docagem e das atividades quase coincide, com exceção de LDQM-IN-24 e LDQM-IN-25, previstas como a terceira e a quinta mais ativas pela docagem, respectivamente, o inverso do obtido no ensaio enzimático. O mesmo não se observa para os dados calculados com o método semi-empírico: não há correlação entre os dados de ΔH_{int} e os dados de atividade para ambas situações avaliadas, o que sugere que a ordem das atividades é influenciada por efeitos entrópicos. No entanto, a atividade modesta observada sugere que a interação das tiossemicarbazonas com a enzima não é de fato muito favorável, o que está de acordo com os valores positivos de ΔH_{int} obtidos pelos cálculos com o segundo modelo semi-empírico.

A partir dos dados de inibição enzimática (concordantes com a previsão da docagem), foi escolhida a molécula LDQM-IN-23 como estrutura base para o planejamento de modificações estruturais, visando melhorar sua atividade inibitória. Apesar de ter um valor de CI₅₀ ainda muito alto, foi demonstrado experimentalmente que este ligante é capaz de inibir a enzima de fato. O ligante LDQM-IN-23 possui a maior pontuação de docagem, dentre os ligantes estudados, mas tem entalpia de interação desfavorável, quando se considera o deslocamento da água coordenada ao Zn²⁺. Sendo esta a provável razão da fraca inibição, caso se criem novos pontos de interação com a enzima, é esperado uma melhoria em ΔH_{int} e na atividade.

Foi realizado um estudo a partir da geometria de interação apresentada pelo ligante LDQM-IN-23 dentro do sítio catalítico (Figura 25). Esta análise indicou sítios de interação em potencial, direcionando as modificações propostas para este ligante. Adjacente ao sítio catalítico da toxina existe uma cavidade, cercada por resíduos polares e por grupos carbonila ou amino da cadeia polipeptídica, passíveis de serem utilizados para novas interações. Exemplos destes resíduos são a Gln106, Ile108 e a Ile169.

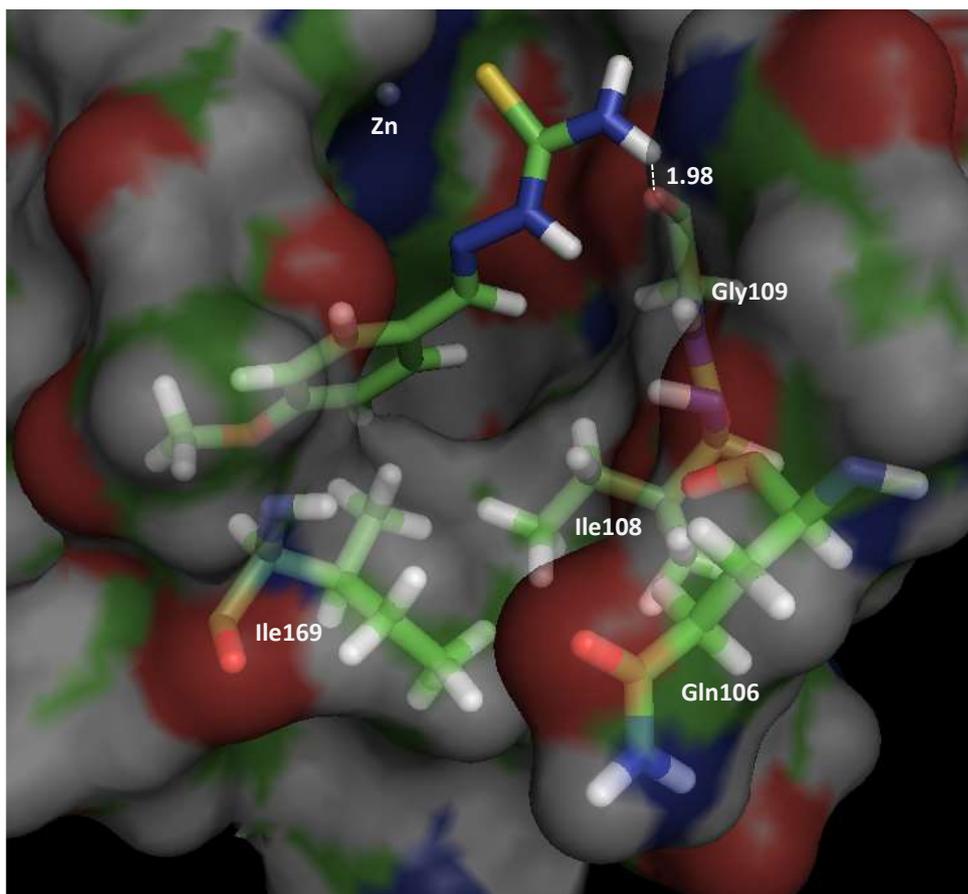


Figura 25: Cavidade adjacente ao sítio catalítico da toxina. Em destaque estão mostrados o ligante, interagindo com o Zn^{2+} e com a Gly109, e os resíduos para interações potenciais, Gln106, Ile108 e Ile169.

Foi aplicada a estratégia do planejamento racional pelo grupo, com a participação do Prof. Dr. Artur E. Kummerle (Dequim-ICE-UFRRJ), propondo-se a modificação estrutural do ligante LDQM-IN-23 com introdução de um grupo ácido carboxílico com diferentes espaçadores (2 e 3 metilenos) entre o anel aromático e o átomo de carbono imínico (Figura 26). Estas modificações foram com o intuito de promover uma possível interação do grupo ácido carboxílico com grupos dos resíduos polares presentes na cavidade.

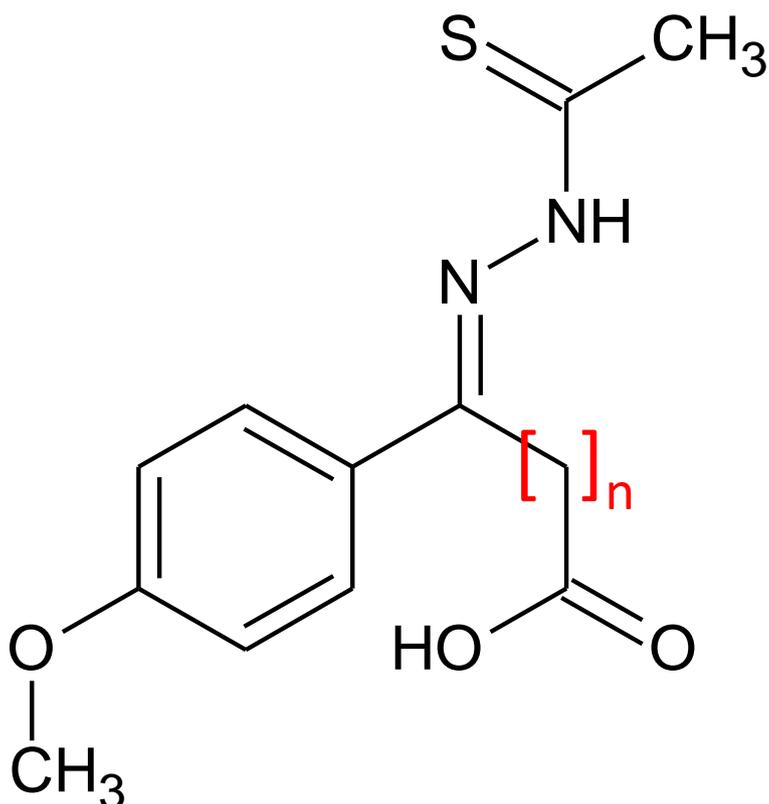


Figura 26: Modificação estrutural proposta para a molécula LDQM-IN-23. O espaçador “n” pode variar entre 2 e 3 carbonos, gerando as moléculas modificadas LDQM-IN-23b e LDQM-IN-23c, respectivamente.

As duas estruturas foram docadas (na forma carboxilato) no sítio catalítico da BpMP-I, utilizando o mesmo procedimento anterior, função de pontuação e padronizações para as demais moléculas já estudadas. As pontuações de docagem para as duas moléculas novas foram melhores, quando comparadas com a primeira série de moléculas, inclusive com a molécula original LDQM-IN-23 (Tabela 7).

Os melhores complexos, com a geometria de interação mais favorável, para os dois novos ligantes foram submetidos à otimização estrutural com o método semi-empírico PM6, também utilizando o mesmo procedimento e com as mesmas especificações utilizadas para os demais ligantes. Os valores da entalpia de interação para as moléculas modificadas se tornaram cerca de 65 e 86 kcal/mol mais favoráveis para LDQM-IN-23b e LDQM-IN-23c, respectivamente, quando comparados com os valores da molécula original. É esperado que uma melhora tão significativa em ΔH_{int} tenha um impacto positivo na estabilidade do complexo com a enzima e melhore a atividade inibitória. À medida que se aumenta o espaçador melhora a interação do ligante com a toxina, ou seja, o ligante com estrutura modificada racionalmente LDQM-IN-23c obteve melhores resultados de interação *in silico* quando comparada às demais moléculas (Tabela 7).

Tabela 7: Valores das pontuações de docagem (função GoldScore) e das entalpias obtidas após a otimização das estruturas pelo método PM6 (programa MOPAC 2012).

Ligante	Pontuação	$\Delta H_f(\text{Cpx})$ (kcal/mol)	$\Delta H_f(\text{enzima-água})$ (kcal/mol)	$\Delta H_f(\text{Lig})$ (kcal/mol)	ΔH_{int}^* (kcal/mol)
LDQM-IN-23	66,01	-1556,75	-1735,62	27,79	96,77
LDQM-IN-23b	71,50	-1762,41	-1726,44	-121,85	31,57
LDQM-IN-23c	73,17	-1771,80	-1718,54	-117,92	10,35

* $\Delta H_{\text{int}} = \Delta H_f(\text{complexo}) + \Delta H_f(\text{água}) - [\Delta H_f(\text{enzima-água}) + \Delta H_f(\text{ligante})]$, onde $\Delta H_f(\text{água}) = -54,31$ kcal/mol

A Figura 27 mostra os ligantes LDQM-IN-23b e LDQM-IN-23c docados no sítio catalítico da BpMP -I. O aumento da entalpia de interação da molécula LDQM-IN-23c (Figura 27b) em relação à molécula original LDQM-IN-23 é devido à interação via ligação hidrogênio do grupo carboxilato do ligante com o grupo amino peptídico do resíduo Ile169. Embora a molécula que contém o espaçador com 2 carbonos, LDQM-IN-23b (Figura 27a), também realize essa mesma interação, o maior espaçador da primeira permite uma melhor acomodação no sítio e o grupo tiossemicarbazona consegue estabelecer interações melhores com o íon Zn^{2+} e com a carbonila peptídica do resíduo Gly109. LDQM-IN-23b faz interações mais longas com o íon Zn^{2+} e com a carbonila peptídica do resíduo Ser167, o que pode explicar o valor menos favorável para a entalpia de interação.

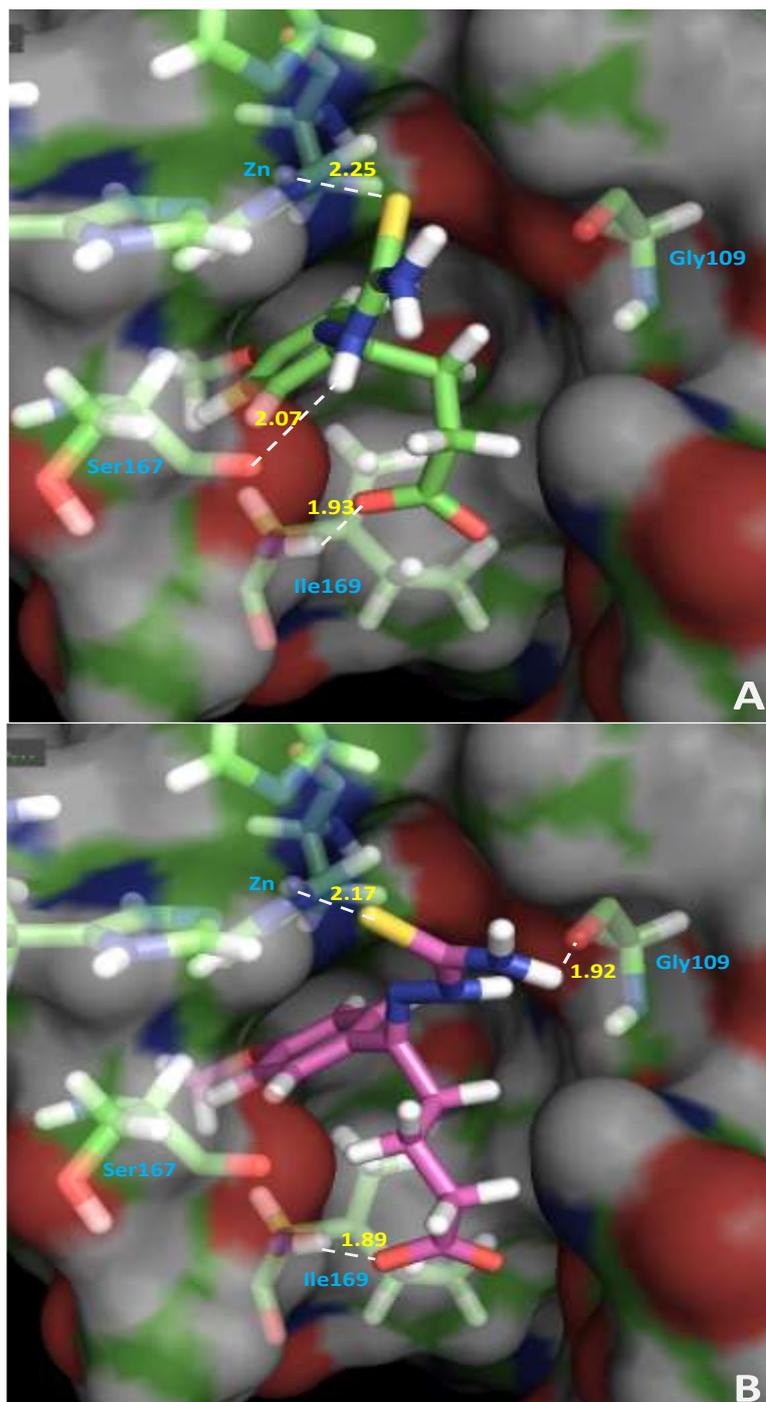


Figura 27: Resultados da docagem das moléculas modificadas racionalmente no sítio catalítico da toxina BpMP-I. Em destaque estão os principais resíduos envolvidos na interação com os ligantes LDQM-IN-23b (A) e 23c (B). Os marcadores para os nomes dos resíduos participantes mais o íon Zn^{2+} estão em azul, e as distâncias (em Å) entre átomos que possuem interações entre si foram marcados de amarelo.

O planejamento das modificações estruturais realizadas para o ligante LDQM-IN-23 se mostraram muito promissoras nos resultados de docagem e cálculos semi-empíricos. O grupo carboxilato adicionado à molécula com o espaçador possuindo 2 ou 3 carbonos levou a

resultados muito interessantes, melhorando a entalpia de interação e com excelentes geometrias de interação dentro do sítio catalítico da toxina.

De posse destes resultados, as moléculas modificadas LDQM-IN-23b e 23c foram sintetizadas no laboratório LadMol-QM sob a supervisão do Prof. Dr. Artur E. Kümmerle e utilizadas para realização de ensaios de inibição enzimática *in vitro* e ensaios biológicos.

Os resultados de inibição enzimática *in vitro* comprovaram os resultados obtidos pela docagem e com os cálculos semi-empíricos, ou seja, as moléculas modificadas foram mais eficientes em neutralizar a atividade enzimática da toxina BpMP-I, quando comparados com os resultados da molécula original, sendo que a molécula LDQM-IN-23c é mais ativa do que a LDQM-IN-23b (Tabela 8).

Tabela 8: Comparação dos valores de CI_{50} da estrutura LDQM-IN-23 e das estruturas com modificações planejadas racionalmete.

LIGANTE	CI_{50} (μ M)	Aumento da atividade
LDQM-IN-23	3011,68	-
LDQM-IN-23b	79,12	38X
LDQM-IN-23c	1,77	1.700,5X

A interação (ligação hidrogênio) promovida pelo grupo carboxilato, cuja introdução na molécula LDQM-IN-23 foi racionalmente planejada a partir dos resultados dos estudos de modelagem molecular, aumentou a energia de interação total entre enzima/inibidor, resultando em uma menor dose para inibição de 50% da atividade catalítica da enzima. Além disso, uma pequena modificação no espaçador, de 2 carbonos (LDQM-IN-23b) para 3 carbonos (LDQM-IN-23c), também melhorou a interação enzima/inibidor viabilizada pela melhor disposição deste dentro do sítio catalítico da enzima, com a coordenação do enxofre com o íon Zn^{2+} ficou com uma orientação mais favorável em relação á disposição desta interação para o outro inibidor. A ligação hidrogênio realizada pelo átomo de nitrogênio número 4 da tiossemicabazona (Figura 14) do segundo inibidor parece ser mais favorável devido à mior proximidade com o átomo de oxigênio do resíduo de Gli169 quando comparada com a ligação hidrogênio realizada pelo átomo de nitrogênio número 2 da tiossemicarbazona (Figura 14) do primeiro inibidor.

Comprovada a ação inibitória, mais ainda, a melhora da atividade de inibição dos ligantes modificados sobre a toxina BpMP-I, foi determinada a atividade biológica, a inibição da atividade hemorrágica para saber como seria o desempenho e o comportamento dos compostos *in vivo*. Foram testadas as inibições da atividade hemorrágica promovidas pelos inibidores modificados e pelo inibidor original, para comparação, sobre uma metaloprotease da classe PIII, a Botropoidina (GOMES *et al.*, 2015) e também sobre a peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*.

Os resultados mostraram que os três inibidores testados conseguem neutralizar a atividade hemorrágica promovida, tanto pela toxina isolada quanto pela peçonha bruta. Pode ser observado na figura 28 que houve redução de aproximadamente 55-60% da atividade hemorrágica induzida pela Botropoidina quando inibida com os inibidores LDQM-IN-23 e 23b, respectivamente, na proporção de 1:20 toxina/inibidor (m/m). Apesar de não haver diferença significativa entre as reduções dos tamanhos dos halos hemorrágicos promovidas

pelos ligantes mencionados acima, a intensidade e a concentração do halo, quando da inibição por LDQM-IN-23, é muito maior ou mais significativa, em comparação com o halo formado após a inibição promovida por LDQM-IN-23b, o qual é menos intenso, mais disperso no tecido epitelial. Assim, pode-se concluir que o ligante LDQM-IN-23b é mais ativo para a inibição da atividade hemorrágica promovida pela Botropoidina quando comparado com o ligante LDQM-IN-23. A inibição promovida por LDQM-IN-23c foi ainda melhor, praticamente 100% (Fig. 28): pode-se observar que não há a formação do halo hemorrágico quando a toxina é inibida por este composto.

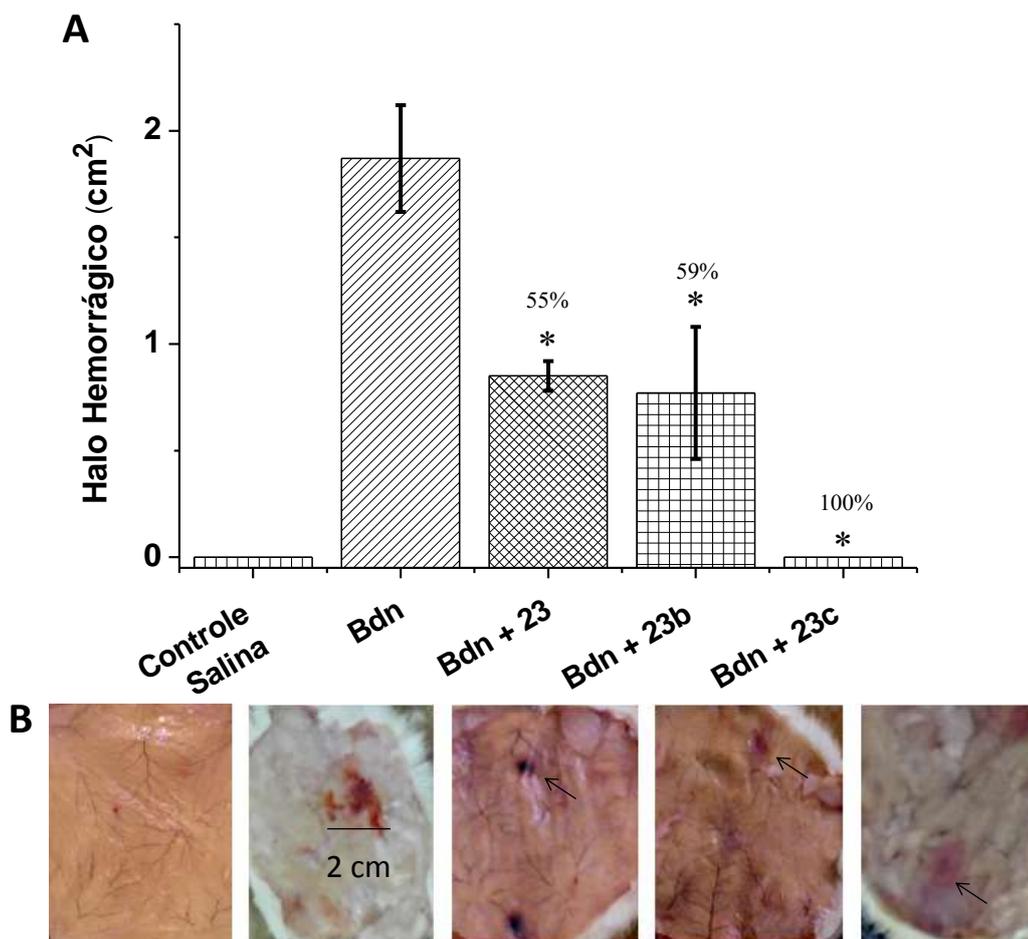


Figura 28: Ensaio de inibição promovido pelos ligantes LDQM-IN-23, 23b e 23c sobre a atividade hemorrágica induzida pela toxina isolada Botropoidina (Bdn) (GOMES et al., 2015) na proporção de 1:20 (m/m) toxina/ligante. A) Porcentagem de inibição da atividade hemorrágica; B) Figuras ilustrando cada tratamento realizado. O controle negativo foi realizado com salina (NaCl 0,9%). Controle positivo: Botropoidina isolada (Bdn). Bdn + 23: toxina isolada mais o ligante LDQM-IN-23. Bdn + 23b: Toxina isolada mais o ligante LDQM-IN-23b. Bdn + 23c: toxina isolada mais o ligante LDQM-IN-23c. Foi utilizada a mesma sequência para A e B. Os resultados são mostrados como a média \pm desvio padrão (n=4) em triplicata. * Resultados estatisticamente significativos com relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

Estes ligantes também foram testados contra a peçonha bruta (PB) de *Bothrops pauloensis*. A inibição da atividade hemorrágica ocorreu para os três ligantes testados (Figura

29). Para os ligantes LDQM-IN-23 e 23b, houve uma aparente inversão do potencial de inibição, ou seja, o primeiro ligante foi mais ativo quando comparado com o segundo. Este resultado pode estar relacionado com o fato de que a peçonha bruta ser composta por vários tipos de proteínas, inclusive vários tipos de metaloprotease com várias isoformas (RODRIGUES *et al.*, 2015). A molécula LDQM-IN-23 pode se encaixar melhor nos sítios das outras SVMPs, inibindo um número maior de toxinas desta classe quando comparado com o ligante LDQM-IN-23b. Já o ligante LDQM-IN-23c consegue inibir totalmente a atividade da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* para a dose testada, confirmando ser o melhor inibidor dentre os avaliados. Além disso, a atividade de inibição sobre a peçonha bruta mostra que este inibidor é capaz de se ligar efetivamente a outras toxinas da classe das SVMPs sendo, portanto, um excelente inibidor de SVMP.

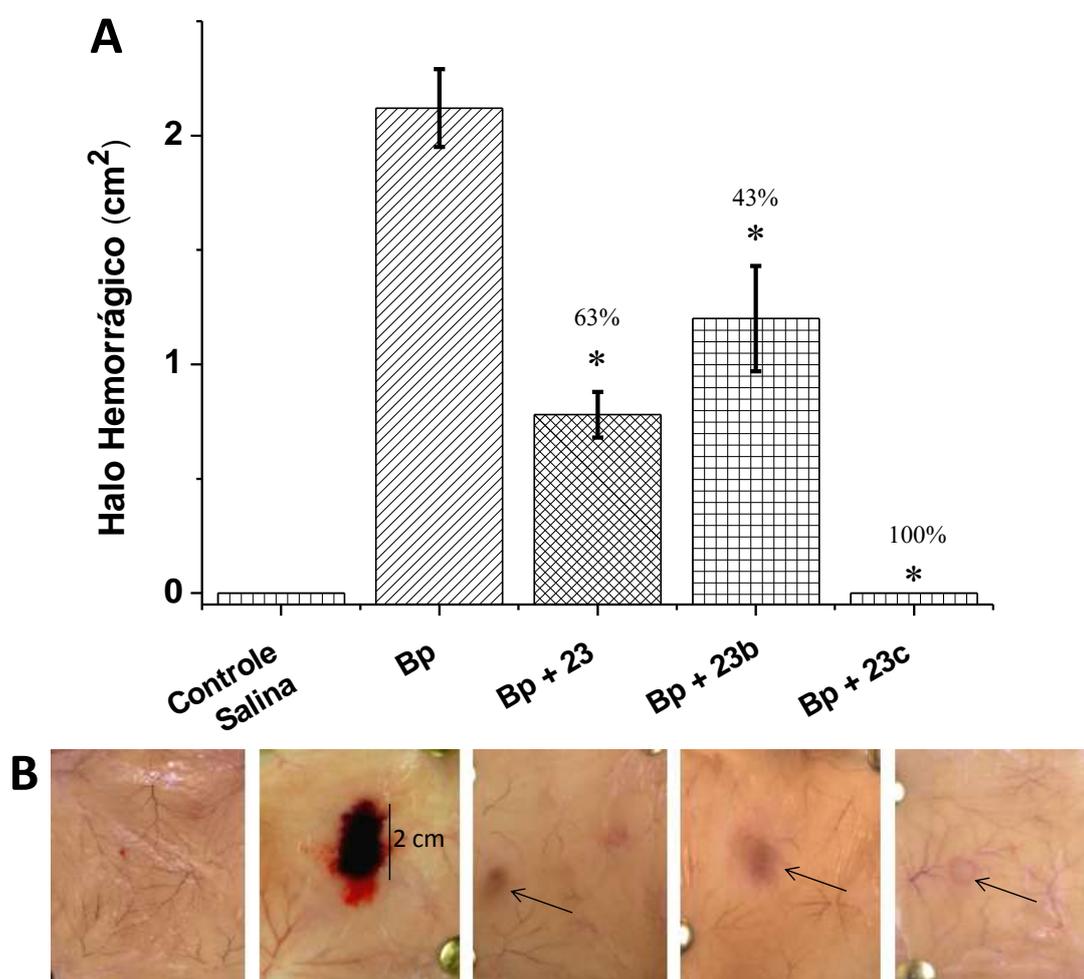


Figura 29: Ensaio de inibição promovido pelos ligantes LDQM-IN-23, 23b e 23c sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* (Bp) na proporção de 1:20 (m/m) Bp/ligante. A) Porcentagem de inibição da atividade hemorrágica; B) Figuras ilustrando cada tratamento realizado. O controle negativo foi realizado com salina (NaCl 0,9%). Controle positivo: Bp de *Bothrops pauloensis*. Bp + 23: Bp mais o ligante LDQM-IN-23. Bp + 23b: Bp mais o ligante LDQM-IN-23b. Bp + 23c: Bp mais o ligante LDQM-IN-23c. Foi utilizada a mesma sequência para A e B. Os resultados foram mostrados como a média \pm desvio padrão (n=4) em triplicata. * Resultados estatisticamente significativos com relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

Como a molécula LDQM-IN-23c é a mais ativa para inibição da atividade hemorrágica dentre as moléculas testadas, foi realizado um novo ensaio de inibição da atividade hemorrágica induzido pela peçonha de *B. pauloensis* no intuito de verificar se a inibição induzida pela molécula seria dose-dependente. A figura 30 mostra que esta molécula já promove inibição da atividade hemorrágica na menor dose testada (1:1 m/m) com aproximadamente 41% de inibição. Esta porcentagem de inibição aumenta com o aumento da dose, sendo de aproximadamente 84% da dose de 1:5 (m/m) e com inibição total da formação do halo hemorrágico na dose de 1:10 (m/m).

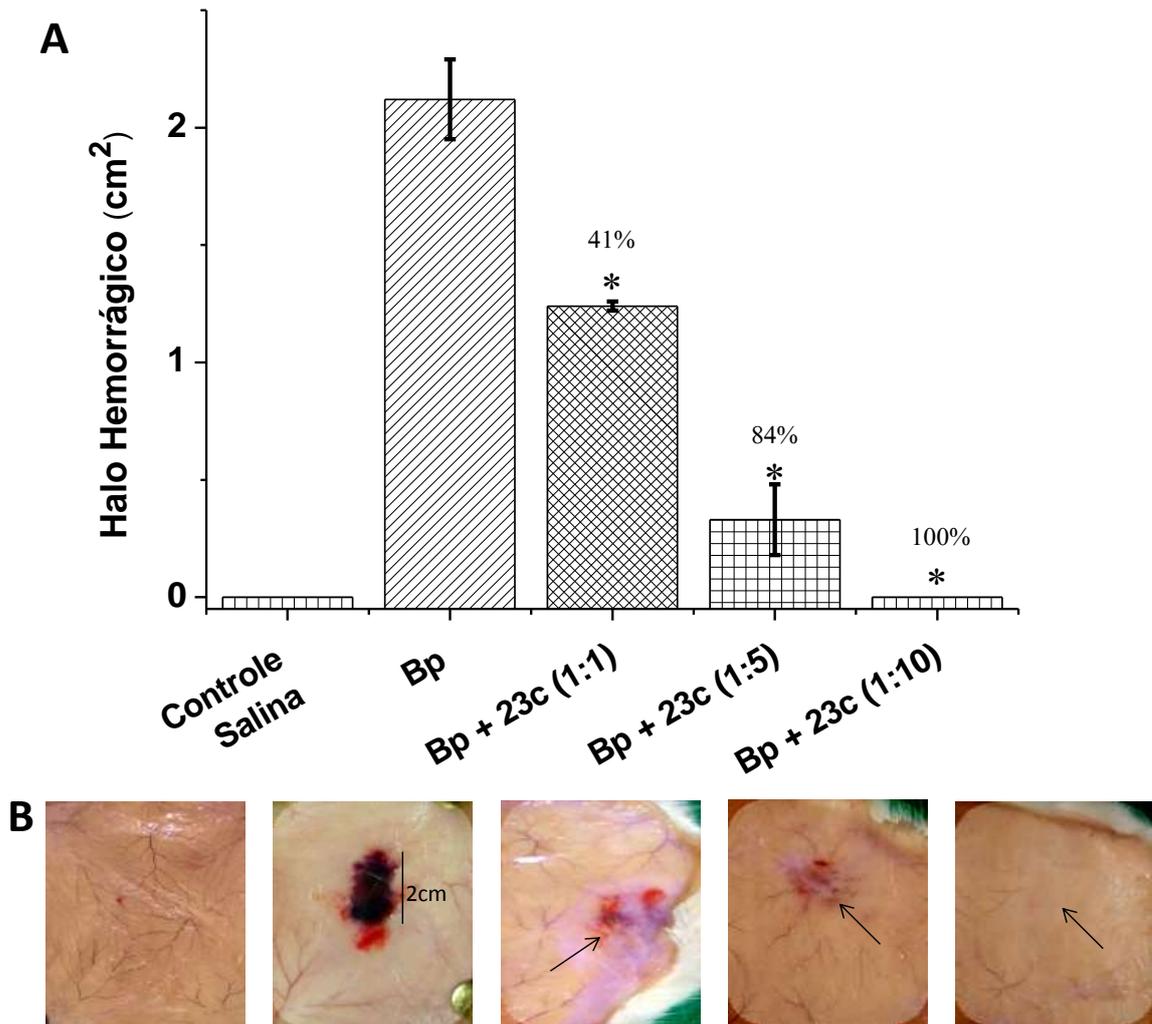


Figura 30: Ensaio de inibição promovido pelo ligante LDQM-IN-23c sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* (Bp) nas proporções de 1:1, 1:5 e 1:10 (m/m) Bp/ligante. A) Porcentagem de inibição da atividade hemorrágica; B) Figuras ilustrando cada tratamento realizado. O controle negativo foi realizado com salina (NaCl 0,9%). Controle positivo: Bp de *Bothrops pauloensis*. Bp + 23c: Bp mais o ligante LDQM-IN-23. Foi utilizada a mesma sequência para A e B. Os resultados foram mostrados como a média \pm desvio padrão (n=4) em triplicata. * Resultados estatisticamente significativos com relação ao controle negativo (p<0,05).

Estes resultados mostram que o ligante LDQM-IN-23c consegue inibir efetivamente as SVMPs presentes na peçonha de *B. pauloensis*. Mesmo sendo construído a partir de um planejamento com base no sítio catalítico da BpMP-I, uma metaloprotease do tipo P-I e não hemorrágica (já que só possui o domínio metalo), este inibidor consegue se ligar no sítio catalítico das SVMPs do tipo P-II e P-III (FOX;SERRANO, 2008) (toxinas hemorrágicas) inibindo-as efetivamente.

A inibição de outras SVMPs presentes na peçonha de *B. pauloensis* decorre do fato de que esta classe de toxinas possuem o sítio catalítico altamente conservado (STÖCKER; BODE, 1995). Isto permite ao ligante fazer basicamente as mesmas interações daquelas realizadas no sítio catalítico da BpMP-I, a partir do qual foi planejada. Claro que pode haver algumas substituições de alguns resíduos de aminoácidos dentro de cada sítio catalítico, porém, estas substituições parecem não afetar significativamente a interação desta molécula com as toxinas.

Estes resultados chamaram bastante a atenção para o fato de que a molécula LDQM-IN-23c pode interagir com outras SVMPs diferentes daquela para qual foi planejada. Então, resolveu-se realizar um estudo de interação por modelagem molecular para as tiossemicarbazonas já testadas, além das moléculas modificadas LDQM-IN-23b e 23c, para SVMPs presentes na peçonha de outras serpentes, diferentes em espécie e gênero, da família Viperidae.

A sequência da BpMP-I foi alinhada utilizando o banco de estruturas protéicas PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Foram escolhidas 7 sequências de SVMP depositadas, utilizando critérios para seleção com base na identidade, resolução cristalográfica e grau de parentesco da espécie de serpente a qual pertence a SVMP selecionada. As 7 sequências utilizadas serão identificadas pelo código de depósito no PDB: 4Q1L (*Bothrops leucurus*), 2W12 (*Bothrops asper*), 3GBO (*Bothrops moojeni*), 1HTD (*Crotalus atrox*), 3AIG (*Crotalus adamanteus*), 1BUD (*Deinagkistrodon acutus*) e 4J4M (*Protobothrops mucrosquamatus*) (LINGOTT *et al.*, 2009; AKAO *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 1994; GOMIS-RUTH *et al.*, 1998; GONG *et al.*, 1998; CHOU *et al.*, 2013).

Analisando o alinhamento da BpMP-I com as outras SVMPs, pode-se observar que o sítio catalítico destas toxinas é altamente conservado, com os três resíduos de histidina (His142, His146 e His152, com variações) que se coordenam com o íon Zn^{2+} , conservados em todas as sequências e com a maioria dos outros resíduos do sítio de ligação, **HEXXHXXGXXH+M** (HEGE; BAUMANN, 2001 dissertação; BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKER, 1993; GOMIS-RÜTH, 2003) também conservados (Figura 31). Isto sugere que os inibidores testados neste trabalho, principalmente LDQM-IN-23c, poderiam interagir com sítios catalíticos de outras SVMPs, mesmo sendo SVMP's de diferentes espécies, gêneros ou, até, famílias de serpentes.

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

1BUD:A|PDBID|      ----FQRYMEIVIVVDHSMVRKKNYNGSDSIKAWVYEMINTITESYSYLKIDISLSGLEIW
4J4M:A|PDBID|      QQRFPQRYVMLAIVADHGMVTKYSGNSSAITTRVHQMVSHVTEMYSPLNIAITLSLLRIW
2W12:A|PDBID|      -ERFSPRYIELAVVADHGIFTKYNSNLNITIRRVHEMLNTVNGFYRSVDVHAPLANLEVW
3GBO:A|PDBID|      ---FSPRHIELVVVADHGMFKKYNSNLNITIRKWVHEMVNSMNGFYRSVDVTASLANLEVW
BpMP-I|            QQKFSPKYIELAVVADHGMFTKYNSNVNTIRTWVHEMVNSLNGFFRSMNVDAASLVNLEVW
4Q1L:A|PDBID|      -QQFSPRYIELVVVADHGMFKKYNSNLNITIRKWVHEMLNTVNGFFRSMNVDAASLVNLEVW
1HTD:A|PDBID|      -QNLQORYIELVVVADHRVFMKYNSDLNITIRRVHEIVNFINGFYRSLNIIHVSLTDLEIW
3AIG:A|PDBID|      -ENLPORYIELVVVADRRVFMKYNSDLNITIRRVHEIVNINEFYRSLNIRVSLTDLEIW
                   ::: :*:.*: :. **... . *  *:::.. :. : :.: * **:*

1BUD:A|PDBID|      SGKDLIDVEASAGNTLKSFGEWRAKDLIHRISHDNAQLLTATDFDGATIGLAYVAMCNP
4J4M:A|PDBID|      SSKDLITVQSDSSVTLGSGFDWRKVVLLSQAHDCAFNLNTATALDDSTIGLAYSNGMCDP
2W12:A|PDBID|      SKQDLIKVQKDSKTLKSFGEWRERDLLPRISHDHAQLLTAVVFDGNTIGRAYTGGMCDP
3GBO:A|PDBID|      SKKDLINVQKDSRETLLKSFGEWRERDLLPRISHDNAQLLTTIVFDGHVIGRAFTGGMCDP
BpMP-I|            SKKDLIKVEKDSKTLTSGFEWRERDLLPRISHDHAQLLTTIVFDQQTIGIAYTAGMCDP
4Q1L:A|PDBID|      SKKDLIKVEKDSKTLTSGFEWRERDLLPRISHDHAQLLTVIVFDEETIGIAYTAGMCDL
1HTD:A|PDBID|      SNEDQINIQSASSDTLNFAEWRETDLLNRKSHDNAQLLTAIELDEETLGLAPLGTMCDP
3AIG:A|PDBID|      SGQDFITIQSSSNTLNSFGEWREVRLLTRKRHDNAQLLTAINFEGKII GKAYTSSMCNP
                   * : * * : : : * * : * : * * : * : * * * * . : : : * *   ** :

1BUD:A|PDBID|      KRSVGVIQDHSVNRVLAITLAHEMAHNLGVSHDEGSCSCGGKSCIMSPSISDETIKYFS
4J4M:A|PDBID|      KFSVGLVQDHSNVFMVAVTMTHELGHNLGMAHDE-AGGCACSSCIMSPPAASSGPKLFS
2W12:A|PDBID|      RHSVGVVRDHSKNNLWVAVTMAHELGHNLGIHHDGTGSCSCGAKSCIMASVLSKVLSYEFS
3GBO:A|PDBID|      RHSVGVVMDHSPKNLQVAVTMAHELGHNLGMHHDGNQCHCDAASCIMADSLSQVLSYEFS
BpMP-I|            SQSVAVVMDHSPKNLRVAVTMAHELGHNLGMDHD-DTCTCGAKSCIMASTISKGLSFEFS
4Q1L:A|PDBID|      SQSVAVVMDHSPKNLRVAVTMAHELGHNLGMRHDGNQCHCNAAPSCIMADTLKGLSFEFS
1HTD:A|PDBID|      KLSIGIVQDHSPINLLMGVTMAHELGHNLGMEHDGKDCLRGASLCIMRPGLTKGRSFEFS
3AIG:A|PDBID|      RSSVGIVKDHSPINLLVAVTMAHELGHNLGMEHDGKDCLRGASLCIMRPGLTPGRSFEFS
                   * : : : * * *   : : : : * * : * * * : * *   * * *   :   * *

1BUD:A|PDBID|      DCSYIQCRDYISKENPPCILN--
4J4M:A|PDBID|      DCSKDDYQTFLTNTNPQCILNAP
2W12:A|PDBID|      DCSQNQYETYLTNHNPOCILNKP
3GBO:A|PDBID|      DCSQNQYQTYLTKHNPOCILNEP
BpMP-I|            DCSQNQYQTYVTKHNPOCILNKP
4Q1L:A|PDBID|      DCSQNQYQTYLTKHNPOCILNKP
1HTD:A|PDBID|      DDSMHYYERFLKOYKPOCILNKP
3AIG:A|PDBID|      DDSMGYYQKFLNQYKPOCILNKP
                   * *   . : : : : * * * * *

```

Figura 31: Análise comparativa da sequência primária de aminoácidos da proteína madura BpMP-I. Foi realizado o alinhamento com o domínio metalo (catalítico) de outras SVMPs da mesma família de serpentes (Viperidae). Em cinza estão marcados os resíduos de histidina, os quais fazem parte do sítio catalítico, além do resíduo de metionina (*met-turn*). O símbolo (*) representa resíduos de aminoácidos conservados em todas as sequências analisadas. O hífen representa gaps introduzidos nas sequências para maximizar o alinhamento.

As estruturas cristalográficas destas toxinas foram, então, utilizadas para a docagem das tiossemicarbonas em seus sítios catalíticos. Os resultados da docagem mostraram que estes inibidores possuem pontuações para a docagem no sítio catalítico das SVMPs muito próximos aos valores obtidos para o ancoramento no sítio catalítico da BpMP-I, para todos os ligantes testados (Tabela 7). Os valores das pontuações seguiram, ainda, a mesma tendência observada para os valores obtidos para a BpMP-I, sendo que os ligantes modificados, LDQM-

IN-23b e 23c, obtiveram maiores pontuações quando comparados com os ligantes originais, com o primeiro ligante tendo pontuação menor que o segundo, com exceção para a toxina 3AIG, na qual a pontuação do ancoramento foi maior para o ligante LDQM-IN-23b.

Tabela 7: Pontuações de docagem (GoldScore) dos ligantes no sítio catalítico das SVMPs.

Ligante	Pontuação ^a			
	BpMP-I	2W12	4Q1L	3GBO
LDQM-IN-22	56,28	54,27	56,31	55,45
LDQM-IN-23	66,01	61,70	63,94	63,16
LDQM-IN-24	60,77	57,53	60,09	58,83
LDQM-IN-25	53,46	61,81	63,46	60,75
LDQM-IN-27	62,31	61,32	61,32	60,16
LDQM-IN-23b	71,50	66,28	75,49	70,57
LDQM-IN-23c	73,17	69,68	79,76	73,88

Ligante	Pontuação ^a			
	1HTD	3AIG	1BUD	4J4M
LDQM-IN-22	54,47	54,12	54,35	52,46
LDQM-IN-23	61,89	62,00	54,63	58,87
LDQM-IN-24	58,07	57,33	57,30	56,69
LDQM-IN-25	63,81	64,02	54,55	59,49
LDQM-IN-27	59,61	60,52	57,85	58,19
LDQM-IN-23b	71,84	72,9	62,40	65,19
LDQM-IN-23c	72,28	72,6	64,87	66,83

^a Valores de pontuação para a função GoldScore; números em negrito indicam os valores mais elevados.

Houve uma diminuição dos valores das pontuações para todos os ligantes, inclusive os modificados, para as SVMPs 1BUD e 4J4M. Este resultado pode ser devido ao fato de que estas toxinas possuem menor grau de identidade com a BpMP-I (52,31% e 52,74% de identidade, respectivamente) e, ainda, menor grau de parentesco, ou seja, são mais distantes quando analisadas filogeneticamente (Figura 32). Isto resulta em maior quantidade de resíduos de aminoácidos não idênticos entre as toxinas, o que pode gerar problemas para a interação dos ligantes dentro do sítio catalítico das toxinas. A análise do sítio catalítico da toxina 1BUD mostra que esta possui 4 resíduos de aminoácidos (HEMAHNLGVSH) diferentes quando comparado com o sítio catalítico da BpMP-I (HELGHNLGMDH), o que pode explicar os piores resultados da docagem naquela toxina. Já para a toxina 4J4M (HELGHNLGMAH), existe apenas a substituição de um resíduo de aminoácido, Asp por Ala. Porém, o resultado inferior desta toxina quando comparado com o resultado de ancoramento para a BpMP-I pode ser devido á substituição de outros resíduos, dentro do sítio de interação do ligante com a toxina.

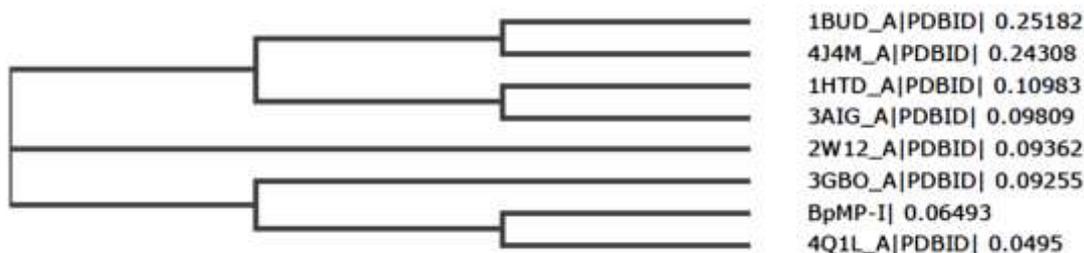


Figura 32: Análise filogenética molecular da sequência da BpMP-I com outras sequências similares de SVMPs depositadas no PDB pelo método neighbor-joining. Foram consideradas as sequências das proteínas na forma madura. A maior distância das sequências das toxinas 1BUD e 4J4M com relação à BpMP-I evidencia o menor grau de parentesco.

O sítio de ligação ao substrato também pode ser responsável pela diferença de interação dos ligantes sobre a BpMP-I e sobre a 1BUD. Nota-se, na figura 33, que as duas toxinas possuem diferenças em alguns resíduos de aminoácidos, os quais podem provocar impedimentos estéricos. Como pode ser observado, os resíduos Thr171 na 1BUD (verde) e Phe175 na BpMP-I (azul) ocupam a mesma região no sítio de ligação ao substrato, porém, Thr171 restringe mais o sítio, diminuindo a cavidade do mesmo e dificultando a acomodação do ligante. Com isso, a ligação de hidrogênio do grupo carboxilato do ligante com o resíduo Ile169 fica prejudicada, reduzindo a interação do ligante LDQM-IN-23c com a toxina 1BUD quando comparado com a BpMP-I. Esta ideia é reforçada pelo fato de que a pontuação da docagem para o ligante que não possui substituição no anel aromático, LDQM-IN-22, é bastante semelhante entre as toxinas, já que, neste caso, o impedimento estérico promovido pelo resíduo Thr171 na toxina 1BUD seria minimizado.

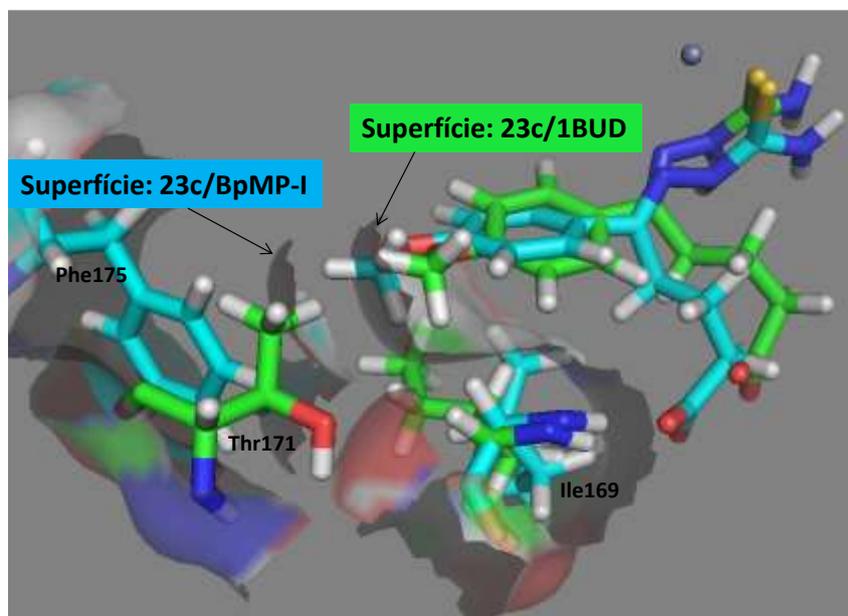


Figura 33: Sítio de interação ao substrato das toxinas BpMP-I (azul) e 1BUD (verde). Em destaque estão os resíduos Phe175 e Ile168 da BpMP-I e Thr171 e Ile169 da 1BUD, além do ligante LDQM-IN-23c: em azul para a BpMP-I e verde para a 1BUD. A superfície de van der Waals dos resíduos em destaque e do ligante também foi mostrada.

Mesmo com estes impedimentos estéricos, os quais promovem uma diminuição da interação do ligante modificado com a toxina 1BUD quando comparado com a interação deste com a BpMP-I, os valores de pontuação obtidos para aquele complexo mostram que o ligante pode interagir efetivamente com a toxina, visto que os valores estão próximos para dos valores obtidos para LDQM-IN-23 docado no sítio original da BpMP-I.

Estes resultados mostram que a molécula planejada racionalmente, LDQM-IN-23c, seria um ótimo protótipo de inibidor universal da atividade tóxica induzida por SVMP, sendo necessários alguns ajustes para alguns casos específicos. Além disso, este inibidor pode ser utilizado para estudos mais detalhados dos sítios catalíticos destas toxinas, visando à produção de novos inibidores, mais potentes contra o maior número de SVMP possível.

Além disso, a inserção do grupo carboxilato na molécula original, LDQM-IN-23, deveria aumentar a hidrofiliabilidade do composto modificado LDQM-IN-23c, melhorando sua solubilidade em água, com relação à molécula original. O grupo carboxila inserido, quando no pH da corrente sanguínea, ficaria em sua forma desprotonada, melhorando sua solvatação pela água e aumentando sua solubilidade, visto que este grupo funcional possui um *pKa* calculado nesta molécula (disponível em: epoch.uky.edu/ace/public/pKa.jsp) de 4,2. Este grupo também melhoraria sua interação molecular com o sítio catalítico das SVMPs, como foi mostrado ao longo deste trabalho. Em uma provável administração oral desta molécula, esta molécula estaria em sua forma protonada até a sua absorção intestinal, o que facilitaria sua absorção através da passagem deste pela membrana plasmática de forma passiva (ELIEZER; FRAGA, 2015).

Outro parâmetro muito utilizado para avaliar a farmacabilidade de ligante com atividade biológica é o seu coeficiente de partição (P) entre fase aquosa e fase orgânica. O coeficiente de partição pode ser definido pela razão entre a concentração desta substância dissolvida na fase orgânica e sua concentração na fase aquosa, em um sistema que se encontra em equilíbrio dividido em dois compartimentos (Figura 34A). Dessa forma, as substâncias que apresentarem um maior coeficiente de partição são mais lipofílicas e podem, então, atravessar a membrana plasmática na absorção. De acordo com Barreiro e Fraga (2015), substâncias com esta característica apresentam um melhor perfil farmacológico. Ainda de acordo com estes autores, os valores do logaritmo do coeficiente de partição (logP) também está relacionado com a atividade biológica (Figura 34B). Substâncias com valores de logP entre 1 e 3 possuem propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas ideais, cujo incremento ou redução leva à redução da atividade biológica.

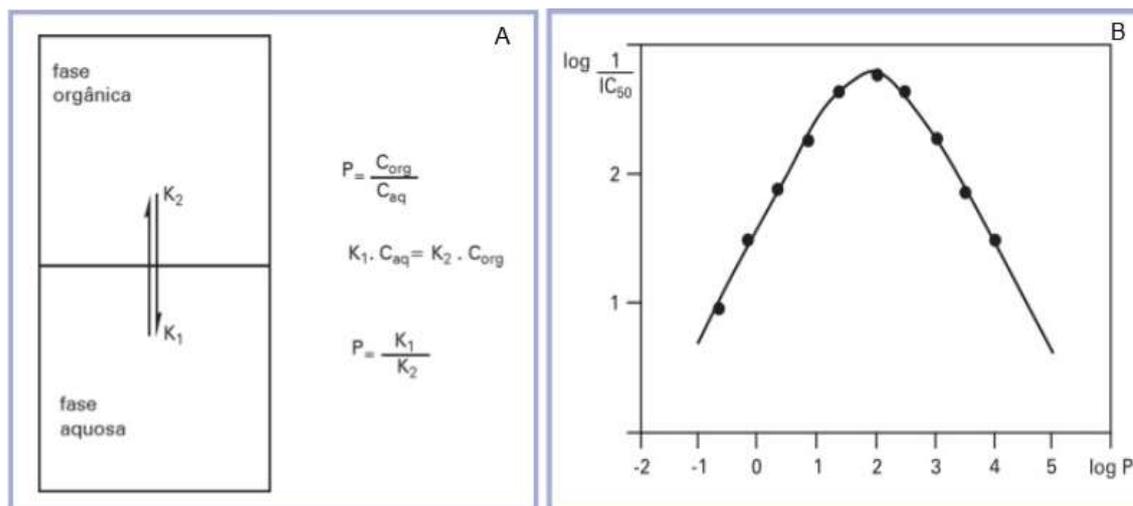


Figura 34: A) Determinação do coeficiente de partição (P) de um soluto. B) Modelo bilinear usado para descrever as correlações entre a atividade biológica e a lipofilicidade de uma série de fármacos congêneres. (Adaptado de: BARREIRO; FRAGA, 2015).

O LogP teórico da molécula LDQM-IN-23c, calculado pelo programa ACD/ChemSketch (freeware) é de 1,51, indicando que esta molécula possui um coeficiente de partição dentro da faixa ideal, mostrando que esta pode ser uma boa candidata à fármaco para o tratamento de acidentes ofídicos. Este valor de LogP é um pouco mais baixo quando comparado com o valor obtido para a molécula original LDQM-IN-23, o qual é 1,98, mas continua dentro da faixa ótima de LogP. Além disso, os outros fatores, como pKa (já discutido neste trabalho) e o tamanho da molécula (281 Da), associado com o valor de logP, colocam esta molécula num patamar muito promissor em relação á utilização desta como protótipo para o desenvolvimento de um fármaco capaz de inibir a atividade tóxica de SVMP.

6 CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

6.1 Conclusões

Neste trabalho foi possível construir através da modelagem comparativa um modelo 3D da metaloprotease presente na peçonha de *Bothrops pauloensis* baseado no molde da estrutura cristalográfica da BaPI (2W12). O modelo foi validado utilizando-se vários parâmetros de qualidade, como o gráfico de Ramachandran, o RMSD e o QMEAN6, resultando em um modelo inédito e de boa qualidade para realização deste trabalho.

Uma série de moléculas, semi e tiossemicarbazonas, foram ancoradas no sítio catalítico do modelo da BpMP-I e os resultados indicaram que as tiossemicarbazonas devem possuir maior afinidade pelo sítio catalítico quando comparadas com as semicarbazonas.

A atividade *in vitro* de inibição enzimática promovida pelas semi e tiossemicarbazonas foi avaliada, sendo que as tiossemicarbazonas foram moderadamente ativas e as semicarbazonas foram inativas, corroborando os resultados obtidos pela docagem.

Cálculos semiempíricos realizados com os complexos gerados pela docagem das tiossemicarbazonas no sítio catalítico da toxina mostraram que estas moléculas apresentam entalpia de interação positiva, assumindo que o processo envolve o deslocamento de uma molécula de água coordenada ao íon Zn^{2+} do sítio catalítico. Combinados com os dados de

atividade, estes resultados sugerem que o processo de inibição deve ser controlado por efeitos entrópicos.

A CI_{50} de cada tiossemicarbazonas foi definida (com excessão do derivado LDQM-IN-26) e, juntamente com os resultados de docagem, mostrou-se que o derivado com o substituinte *p*-metoxi-fenila (LDQM-IN-23) da série inicial tem a estrutura mais adequada para a inibição da enzima, pois possui menor CI_{50} e maiores valores de pontuação de ancoramento.

A partir destes resultados a molécula LDQM-IN-23 foi selecionada e, juntamente com uma análise cuidadosa do modo de interação previsto teoricamente com o sítio catalítico da toxina, foram propostas modificações estruturais, incluindo um grupo carboxilato com diferentes espaçadores, 2 e 3 grupos metilenos, gerando as moléculas modificadas LDQM-IN-23b e 23c, respectivamente. Os métodos de docagem e semiempíricos mostraram que as moléculas modificadas possuem um melhor perfil de interação com o sítio catalítico da toxina, com relação à molécula original.

Após a síntese destas novas moléculas, estas foram testadas para a atividade de inibição enzimática, resultando numa menor dose de inibição, principalmente para a molécula LDQM-IN-23c, aumentando a atividade em aproximadamente 1700 vezes, com relação à molécula original.

Estas moléculas, original e modificadas, foram testadas para a atividade hemorrágica, *in vivo*. Estas moléculas conseguiram inibir a atividade hemorrágica promovida, não só por uma metaloprotease isolada, a Botropoidina, mas também inibiram a atividade hemorrágica promovida pela peçonha de *Bothrops pauloensis*, sendo que a molécula LDQM-IN-23c também foi mais ativa quando comparada com as outras moléculas testadas.

Foram retiradas do PDB estruturas de várias metaloproteases contidas na peçonha de espécies e gêneros diferentes. Estas estruturas foram utilizadas para realizar a docagem das tiossemicarbazonas sobre o sítio catalítico destas toxinas, e os resultados mostraram que estas moléculas, principalmente a LDQM-IN-23c, podem interagir efetivamente com o sítio catalítico destas toxinas.

A modificação estrutural planejada de uma tiossemicarbazona resultou em uma molécula, a LDQM-IN-23c, capaz de neutralizar a atividade enzimática, *in vitro*, e biológica (hemorrágica), *in vivo*, promovida por toxinas isoladas e pela peçonha bruta de serpente. Além disso, testes preliminares, *in silico*, sugerem que esta molécula seria capaz de interagir com o sítio catalítico de outra metaloprotease presentes em peçonhas de serpentes de espécies e gêneros diferentes, sendo, portanto, uma molécula com potencial terapêutico universal para a atividade tóxica promovida por metaloproteases de peçonha de serpentes. O valor do logP desta molécula está dentro de uma faixa ideal para utilização deste como protótipo para fármaco visando o tratamento dos acidentes ofídicos.

Pode-se concluir que este trabalho gerou um modelo 3D teórico de uma metaloprotease, a BpMP-I, inédito de ótima qualidade e, principalmente, um composto líder com grande potencial inibitório sobre a principal atividade tóxica promovida por metaloproteases sobre a vítima de acidentes ofídicos. Este composto e seus derivados são candidatos muito promissores como protótipo para o desenvolvimento de fármacos com potencial terapêutico para acidentes ofídicos, cuja patente foi requerida e depositada pelos autores (Anexo 1).

6.2 Perspectivas

Através do planejamento de modificações estruturais foi criada o composto LDQM-IN-23c, com maior atividade de inibição em relação ao composto original. Com base nestas estruturas modificadas, novas modificações estão sendo planejadas e posteriormente sintetizadas com o intuito de se obter derivados com atividade ainda maiores.

A atividade das tiossemicarbazonas e semicarbazonas será testada sobre peçonhas de espécies diferentes, além de serem testadas, também, sobre outras classes de toxinas, como as PLA₂.

Novos trabalhos foram propostos em conjunto com outros grupos de trabalho para avaliar a atividade destas moléculas sobre células tumorais, visto que já é relatado na literatura que esta classe de moléculas podem possuir atividade anti-tumoral, e sobre parasitas como *Leishmania sp.*

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACD/ChemSketch, Freeware version, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2015.

AKAO, P. K.; TONOLI, C. C.; NAVARRO, M. S.; CINTRA, A. C.; NETO, J. R.; ARNI, R. K.; MURAKAMI, M. T. Structural studies of BmooMPalpha-I, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, v. 55, p. 361-368, 2010.

AKAO, P. K. Caracterização biofísica e estrutural da metaloproteinase não-hemorrágica do veneno de *Bothrops moojeni* e da endo- β -glicanase de *Bacillus subtilis*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

ALBUQUERQUE, N. H.; COSTA, T. B. G.; CAVALCANTI, M. L. F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpentes do gênero *Bothrops* notificados no estado da Paraíba. **Rev. de Biol. e Ciên. da Terra**, v. 5, n. 1, 1º sem., 2004.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J.. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **1990**, 215, pp 403-410.

AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations on Neotropical pit-vipers. **Contributions of Harvard Institute of Tropical Biology and Medicine**, v. 2, p. 1-64, 1925.

ANDRADE-FILHO, A. Análise clínico-epidemiológica de casos de ofidismo atendidos em um hospital público estadual de Minas Gerais de 2003 a 2012. **Dissertação de Mestrado**, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2015.

ANTUNES, A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. F.; RAGI, R.; BAGNATO, V. S. Método de Hartree-Fock: dois exemplos analiticamente solúveis. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 21, p. 221-232, 1999.

ANTUNES, T. C.; YAMASHITA, K. M.; BARBARO, K. C.; SAIKI, M. SANTORO, M. L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, p. 1443-1458, 2010.

APTE, S. S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. **Journal Biological Chemistry**, v. 284, p. 31493-31497, 2009.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, vol. 22, p. 195-201, 2006.

ATKINS, P. W.; PAULA, J. **Físico-Química**. 7ªed., vol. 2, Rio de Janeiro (RJ): LTC Editora, 2004, 620 p.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3ª Ed., Porto Alegre (RS): ArtMed, 2015, 608 p.

BECKER, A.B.; ROTH, R.A. Identification of glutamate 169 as the binding third zinc residue in proteinase III, a member of the family of insulin-degrading enzymes. **Biochemistry Journal**, v. 292, p. 137-142, 1993.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual proteins structure models. **Bioinformatics**, v. 27, p. 343-350, 2011.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, p. 461-471, 2004.

BERNARD, P.; SCIOR, T.; DIDIER, B.; HIBERT, M.; BERTHON, J. Y. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A2 inhibitors. **Phytochemistry**, v. 58, p. 865-874, 2001.

BERNSTEIN, H. J. README: RasMol 2.7.5. 2009. available at: <http://www.openrasmol.org/software/rasmol/>. Acessado em 04/2016.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 252-258, 2014.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, p.325-372, 1994.

BLOBEL, C.P. Metalloprotease- disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. **Cell**, v. 90, 589-592, 1997.

BODE, W.; GOMIS-RUTH, F.X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, v. 331, p. 134-140, 1993.

BORDOLI, L.; KIEFER, F.; ARNOLD, K.; BENKERT, P.; BATTEY, J.; SCHWEDE, T. Proteins structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nat. Protoc.**, v. 4, p. 1-13, 2009.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRAHMA, R. K.; McCLEARY, R. J. R.; KINI, R. M.; DOLEY, R. Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. **Toxicon**, v. 93, p. 1-10, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/1-Casos-Ofidismo-2000-2015.pdf>>. Acessado em 02/2016b.

BRASIL, Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_peconhentos.pdf>. Acessado em 02/2016a.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

CADLE, J. E. Phylogenetic relationships among vipers: immunological evidence. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE Jr., E. D. (Eds). **Biology of the pitvipers**, Texas: Selva, p. 41-48, 1992.

CAL, E.; OBAYA, A.J.; LLAMAZARES, M.; GARABAYA, C.; QUESADA, V.; LÓPEZ-OTÍN, C. Cloning, expression analysis and structural characterization of seven novel human ADAMs a Family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domain. **Gene**, v. 283, 49-62, 2002.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1736-1743, 2009.

CAMPBELL, J. A., LAMAR, W. W. 2004. The venomous reptiles of Latin American. Ithaca-New York, Comstock, v.2, 870p.

CANTAÑEDA, I. C. H.; PEREAÑES, J. A.; JIOS, J. L. Substituted thiobenzoic acid *S*-benzyl as potential inhibitors of a snake venom phospholipase A₂: Synthesis, spectroscopic and computational studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1028, p. 7-12, 2012.

CAVASOTTO, C. N.; PHATAK, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Drug Discovery Today**, v. 14, p. 676-683, 2009.

CERDÀ-COSTA, N.; GOMIS-RÜTH, F.X. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. **Protein Science**, v. 23, p.123 – 144, 2014.

CHENG, Y.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. **Biochem. Pharmacol.**, v. 22, p. 3099-3108, 1973.

CHOU, T. L.; WU, C. H.; HUANG, K. F.; WANG, A. H. Crystal structure of a Trimeresurus mucrosquamatus venom metalloproteinase providing new insights into the inhibition by endogenous tripeptide inhibitors. **Toxicon**, v. 71c, p. 140-146, 2013.

CLARK, D. E.; KRAMER, R. D.; van OPDENBOSCH, N. Validation of the general-purpose TRIPOS 5.2 force-field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, p. 982-1012, 1989.

CORONADO, M.A.; MORAES, F.R.; ULLAH, A.; MASSOD, R.; SANTANA, V.S.; MARIUTTI, R.; BROGNARO, H.; GEORGIEVA, D.; MURAKAMI, M.T.; BETZEL, C.; ARNI, R.K. Three-dimensional structures and mechanisms of snake venom serine proteinases, metalloproteinases, and phospholipase A₂s. **Toxinology**, v. 17, p. 1-25, 2014.

COSTA, F. L. S.; RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 725-735, 2009.

COSTA, J. O.; FONSECA, K. C.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; SANTOS-FILHO, N. A.; SOARES, A. M.; ARANTES, E. C.; HIRAYAMA, S. N. S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, p. 1365-1377, 2010.

COSTA-FILHO, P. A.; POPPI, R. J. Algoritmo genético em química. **Química Nova**, v. 22, p. 405-411, 1999

COTRIM, C. A.; OLIVEIRA, S. C. B.; DIZ-FILHO, E. B. S.; FONSECA, F. V.; BALISSERA-JR, L.; ANTUNES, E.; XIMENES, R. M.; MONTEIRO, H. S. A.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; TOYAMA, D. O.; TOYAMA, M. H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A₂. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, p. 9-16, 2011.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; MENEZES, J. B.; HERING, S. E. Reações de hipersensibilidade imediata após uso intravenoso de soros antivenenos: valor prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmicos. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, p. 115-122, 1991.

DENNIS, E. A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **TiBS**, v. 22, p. 1-2, 1997.

DESSEN, A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A₂. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 40-47, 2000.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, p. 107, p. 3902-3909, 1985.

ELDRIDGE, M. D.; MURRAY, C. W.; AUTON, T. R.; PAOLINI, G. V.; MEE, R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 11, p. 425-445, 1997.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617-640, 2009.

FERNANDES, W.; ABE, A. S. An eletrophoretic approach to the relationships among the subspecies of the lancehead *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae). **Zool. Anz.**, v. 226, p. 195-201, 1991.

FERREIRA, F. B.; GOMES, M. S. R.; NAVES-DE-SOUZA, D. L.; GIMENES, S. N. C.; CASTANHEIRA, L. E.; BORGES, M. H.; RODRIGUES, R. S.; YONEYAMA, K. A. G.; BRANDEBURGO, M. I. H.; RODRIGUES, V. M. Molecular cloning and pharmacological properties of na acidic PLA₂ flrom *Bothrops pauloensis*, snake venom. **Toxins**, v. 5, p. 2403-2419, 2013.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters**, v. 275, p 3016-3030, 2008.

FRANCISCHETTI, I. M. B.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; CARLINI, C. R. and GUIMARAES, J. A. *Bothrops* sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 119c, p. 21-29, 1998.

FREITAS, M. A.; GENO, P. W.; SUMMER, L. W.; COOKE, M. E.; HUDIBURG, S. A.; OWNBY, C. L.; KAISER, I. I.; ODELL, G. V. Citrate is a major component of snake venoms. **Toxicon**, v. 30, p. 461-464, 1992.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. Developing Bioinformatics Computer Skills. **O'Reilly Media Inc.**, Sebastopol, CA, Estados Unidos, 1 Ed., 2001, 427 p.

GIMENES, S. N. C.; FERREIRA, F. B.; SILVEIRA, A. C. P.; RODRIGUES, R. S.; YONEYAMA, K. A. G.; SANTOS, J. I.; FONTES, M. R. M.; BRITES, V. L. C.; SANTOS, A. L. Q.; BORGES, M. H.; LOPES, D. S.; RODRIGUES, V. M. Isolation and biochemical characterization of a γ -type phospholipases A₂ inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. **Toxicon**, v. 81, p. 58-66, 2014.

GOMES, M. S. R.; NAVES-DE-SOUZA, D. L.; GUIMARÃES, D. O.; LOPES, D. S.; MAMEDE, C. C. N.; GIMENES, S. N. C.; ACHÊ, D. C.; RODRIGUES, R. S.; YONEYAMA, K. A. G.; BORGES, M. H.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of *Bothropoidin*: the first haemorrhagic

metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. **J. Biochem.**, v. 157, p. 137-149, 2015.

GOMES, M. S. R.; QUEIROZ, M. R.; MAMEDE, C. C. N.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOUSA, M. V.; AQUINO, E. N.; CASTRO, M. S.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 153, p. 290-300, 2011.

GÖMIS-RUTH, F. X. Structural aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. **Molecular Biotechnology**, v. 24, p.157 – 2002, 2003.

GOMIS-RÜTH, F.X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. **The Journal Biological Chemistry**, v. 23, p. 15353-15357, 2009.

GÖMIS-RUTH, F.X.; BOTELHO, T.O; BODE, W. A stadad orientation for metallopeptidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 157-163, 2012.

GOMIS-RUTH, F. X.; MEYER, E. F.; KRESS, L. F.; POLITI, V. Structures of adamalysin II with peptidic inhibitors. Implications for the design of tumor necrosis factor alpha convertase inhibitors. **Protein Sci.**, v. 7, p. 283-292, 1998.

GONG, W.; ZHU, X.; LIU, S.; TENG, M.; NIU, L. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zing metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus*. **Journal Mol. Biol.**, v. 283, p. 657-668, 1998.

GOUJON, M.; MCWILLIAM, H.; LI, W.; VALENTIN, F.; SQUIZZATO, S.; PAERN, J.; LOPEZ, R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 695-699, 2010.

GRAMS, R.; HUBER, R.; KRESS, L. F.; MORODER, L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinase by a cysteine switch-like mechanism. **Federation of European Biochemical Societies FEBS Letters**, v. 335, p. 76-80, 1993.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714-2723, 1997.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **Electrophoresis**, v. 30, p. 162-173, 2009.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. 2003. **Efectos locales en el envenenamiento ofídico em América Latina**, p. 310-323. *In*: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD-JR. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Savier, FAPESP, 480 p.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915–931, 2003.

GUTIERREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841 – 850 , 2000.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LÉON, G.; ALAPE-GIRÓN, A.; FLOREZ-DÍAZ, M.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 165-182, 2009a.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 958-975, 2009b.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y. Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective?. **Toxicon**, v. 55, p. 166-170, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M.; WATTELL, D. A.; WILLIAMS, D. J.; JENSEN, S.; BROWN, N.; CALVETE, J. J.; HARRISON, R. A. The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: The way forward. **PLOS Neglected tropical Diseases**, v. 7, p. 1-3, 2013.

GUTIERREZ, J. M.; WARRELL, D. A.; WILLIAMS, D. J.; JENSEN, S.; BROWN, N.; CALVETE, J. J.; HARRISON, R. A. The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: The way forward. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, p. 1-3, 2015.

HEGE, T. E.; BAUMANN, U. The conserved methionine residue of the metzincins: a site-directed mutagenesis study. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, n. 2, p. 181-186, 2001.

HERPETOLOGIA, Sociedade Brasileira (SBH). Lista das espécies de répteis brasileiros. Disponível em: < www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>. Acessado em 01/2016.

HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases. **FEBS Letters**, v. 354, p. 1-6, 1994.

HOWES, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; LAING, G. D. Neutralization of the haemorrhagic activities of viperine snake venoms and venom metalloproteinases using synthetic peptide inhibitors and chelators. **Toxicon**. v. 49, p. 734-739, 2007.

ISBISTER, G. K.; BROWN, S. G.; MacDONALDO, E.; WHITE, J.; CURRIE, B. J. Current use of Australian snake antivenoms and frequency of immediate-type hypersensitivity reactions and anaphylaxis. **Medical Journal of Australia**, v. 188, p. 473-476, 2008.

JANEIRO-CINQUINI, T. R. F.; CARDOSO Jr., R. P; ABE, A. S.; SEGURA, O. P. Agrupamento de serpente do gênero *Bothrops* pelos caracteres do hemipênis (Serpentes: Viperidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 24, 1987, Juiz de Fora. **Livro de Resumos XIV Congresso Brasileiro de Zoologia**, Juiz de Fora: UFMG, p. 358, 1987.

- JENSEN, F. **Introduction to Computational Chemistry**. West Sussex: John Wiley & Sons, 1999, 429 p.
- 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. 254, p. 43-53, 1995a.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 9, p. 532-549, 1995b.
- 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, p. 727-748, 1997.
- KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; SOARES, A. M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; GIULIATI, S.; FARIA-JR., M.; XAVIER, M. A. S.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I-gene expression profile of highly expressed phospholipase A₂. **Biochimie**, v. 86, p. 211-219, 2004.
- KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N. de; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; AVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; SILVA, H. J. de. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Medicine**, v. 5, p. 01-14, 2008.
- KAWAGUCHI, N.; XU, X.; TAJINA, R. ADAM 12 protease induces adipogenesis in transgenic mice. **The American Journal of Pathology**, v. 160, p. 1895-1903, 2002.
- KIEFER, F.; ARNOLD, K.; KÜNZLI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 387-392, 2009.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.
- KINI, R.M.; EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disitegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, p. 265-293, 1992.
- KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews in Drug Discovery**, v. 3, p. 935-949, 2004.
- KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, p. 65-106, 1987.

- KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T.E. Empirical scoring function for advanced proteinligand docking with plants. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, p. 84-96, 2009.
- KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. J.; LANGRIDGE, R.; FERRIN, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, p. 269-288, 1982.
- LAING, D. G.; CLISSA, P. B.; THEAKSTON, R. D. G.; MOURA, D. A. S.; TAYLOR, M. J. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloprotease-induced skin necrosis. **European Journal Immunology**, v.33, p 3458-3463, 2003.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.
- LEACH, A. R. **Molecular Modeling: Principles and Applications**. 2^aed. New Jersey: Prentice Hall, 2001, 744 p.
- LEVINE, I. N. **Physical Chemistry**. 4^aed. Singapore: McGraw Hill International Editions, 1995, 901 p.
- LI, W.; COWLEY, A.; ULUDAG, M.; GUR, T.; MCWILLIAM, H.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; LOPEZ, R. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 580-584, 2015.
- LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 26, p. 737-748, 2012.
- LINGOTT, T.; SCHLEBERGER, C.; GUTIERREZ, J. M.; MERFORT, I. High-Resolution crystal structure of the snake venom metalloproteinase BaP1 complexed with a peptidomimetic: Insight into inhibitor bindin. **Biochemistry**, v. 48, p. 6166-6174, 2009.
- LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ARENDAL, W. B.; BAKKER, P. I. W.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure validation by C-alpha geometry: phi, psi and C-beta deviation. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 50, p. 437-450, 2012.
- MACHADO, T. **Filogenia molecular das espécies de Bothrops do grupo neuwiedi (Serpentes, Viperidae)**. 2010. p. 26. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.
- MASUDA, S.; MURAKAMI, M.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; KUDO, I. Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A2 enzymes in several human tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1736, p. 200-210, 2005.

MATRISIAN, L. M. The matrix degrading metalloproteinases. **BioEssay**, v. 14, p 455-463, 1992.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochemica et Biophysica Acta: BBA**, v. 1477, 146-156. 2000.

MACKERROW, J. H. Human fibroblast collagenase contains an amino acid sequence homologous to the zinc-binding site of Serratia proteases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 5943-5943, 1987.

MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; COWLEY, A. P.; LOPEZ, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 597-600, 2013.

MENDES, M. M.; VIEIRA, S. A. P. B.; GOMES, M. S. R.; PAULA, V. F.; ALCÂNTARA, T. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SANTOS, J. I.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; RODRIGUES, V. M. Triacetyl *p*-coumarate: Na inhibitor of snake venom metalloproteinases. **Phytochemistry**, v. 86, p. 72-82, 2013.

MOCHIZUKI, S.; OKADA, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. **Cancer Science**, v. 98, p. 521-527, 2007.

MOOIJ, W. T. M.; VERDONK, M. L. General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. **Proteins: Structure, function and Bioinf.**, v. 61, p. 272-287, 2005.

MORRIS, G. M.; GOODSSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, p. 1639-1662, 1998

MOURA-DA-SILVA, A.M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr. Pharmaceut. Des.** v. 28, p. 2893-2905, 2007.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 4, 128-135, 2008.

NAVES-DE-SOUZA, D. L.; GOMES, M. S. R.; FERREIRA, F. B.; RODRIGUES, R. S.; ACHÊ, D. C.; RICHARDSON, M.; BORGES, M. H.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 161, p. 102-109, 2012.

NEIVA, M.; ARRAES, F. B. M.; SOUZA, J. V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; PRIETO-DA-SILVA, A. R. B.; WALTER, M. E. M. T.; BRIGIDO, M. M.; YZMANE, T.; LÓPEZ-LOZANO, J. L.; ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper

Bothrops atrox venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**, v. 53, p. 427-436, 2009.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 231, p. 309-319, 1984.

NUNES, D. C. O.; FRANCO, P. S.; RODRIGUES, V. M.; MENDES, M. M. Aspectos clínico-epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil: Estudo retrospectivo. **Biosci. J.**, v. 30, p. 1942-1951, 2014.

NUÑES, V.; CID, P.; SANZ, L.; TORRE, P. D. L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 57-58, 2009.

OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRADEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; ALCANTARA, T. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. M. Insights of Local Tissue Damage and Regeneration Induced By Bnsp-7, a Myotoxin Isolated from *Bothrops (Neuwiedi) Pauloensis* Snake Venom. **Toxicon**, v. 53, p. 560-569, 2009.

OLIVEIRA, F. G.; SANT'ANNA, C. M. R.; CAFFARENA, E. R.; DARDENNE, L. E.; BARREIRO, E. J. Molecular docking study and development of an empirical binding free energy model for phosphodiesterase 4 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 6001-6011, 2006.

OLIVEIRA, F. G.; SANT'ANNA, C. M. R.; CAFFARENA, E. R.; DARDENNE, L. E.; OLIVEIRA, F. G. Estudo do perfil de interação de fosfodiesterase 4 com seus inibidores. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ, 2005.

PAIVA, R. O.; HNEIPP, L. F.; GOULAR, C. M.; ALBUQUERQUE, M. A.; ECHEVARRIA, A. Antifungal activities of thiosemicarbazones and semicarbazones against mycotoxicogenic fungi. **Ciênc. Agrotec. Lavras**, v. 38, p. 531-537, 2014.

PARKINSON, C. L.; CHIPPINDALE, P.; CAMPBELL, J. Multigene analyses of pitviper phylogeny with comments on their biogeographical history. In: SCHUETT, G. W.; HOGGREN, M.; DOUGLAS, M. E.; GREENE, H. W. (Eds.). **Biology of the vipers**. Utah: Eagle Mountain, p. 93-110, 2002.

PEARSON, R. G. Hard and Soft acids and bases. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 3533-3539, 1963.

PESANTES, O. S.; FERNANDES, W. Afinidade de *Bothrops erythromelas* aferida através da eletroforese do plasma e da morfologia do hemipênis (Serpentes: Viperidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 26, 1989, João Pessoa. **Livro de Resumos XVI Congresso Brasileiro de Zoologia**, João Pessoa: UFPB, p. 74-75, 1989.

POLITI, A.; DURDAGI, S.; MOUTEVELIS-MINAKAKIS, P.; KOKOTOS, G.; MAVROMOUSTAKOS, T. Development of accurate binding affinity predictions of novel

renin inhibitors through molecular docking studies. **Journal of Mol. Grap. And Modell.**, v. 29, p. 425-435, 2010.

POPOVIC-BIJELIC, A.; KOWOL, C. R.; LIND, M. E.; LUO, J.; HIMO, F.; ENYEDY, E. A.; ARION, V. B.; GRASLUND, A. Ribonucleotide reductase inhibition by metal complexes of triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone): a combined experimental and theoretical study. **J. Inorg. Biochem.**, v. 105, p. 1422-1431, 2011.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. **Science**, v. 296, 2183-2185, 2002.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V. Inter-specific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

RAMACHANDRAN, G. N.; SASISKEHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 283-256, 1968.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloprotease-structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative biochemistry and Physiology – parte C**, v. 142, p. 328-346, 2006.

RAWLINGS, N. D.; WALLER, M.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 503-509, 2014.

ROCHA, G. B.; FREIRE, R. O.; SIMAS, A. M.; STEWART, J. J. RM1: a reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. **J. Comput. Chem**, v. 27, p. 1101-1111, 2006

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 153-165, 2007.

RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F. P. P.; DE-LA-TORRE, P.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; RODRIGUES, V.M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2707-2720, 2012.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochem. and Physiol.** v. 121, p. 215–222, 1998.

RODRIGUES, V. M.; LOPES, D. S.; CASTANHEIRA, L. E.; GIMENES, S. N. C.; NAVES-DE-SOUZA, D. L.; ACHE, D. C.; BORGES, I. P.; YONEYAMA, K. A. G.; RODRIGUES,

R. S. *Bothrops pauloensis* snake venom toxins: The search for new therapeutic models. **Cueent Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 670-684, 2015.

RODRIGUEZ-ARGUELLES, M. C.; BELICCHI, F. M.; GASPARRI, F. G.; PELIZZI, C.; TARASCONI, P.; ALBERTINI, R.; DALL'AGLIO, P. P.; LUNGI, P.; PINELLI, S. 2,6-diacetylpyridine bis (thiosemicarbazones) zinc complexes: synthesis, structure, and biological activity. **J. Inorg. Biochem.**, v. 15, p. 157-175, 1995.

ROGERS, D.W. **Computational Chemistry Using the PC**. 3rded. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc., 2003. 349p.

SANTOS, A. C. S.; SANT'ANNA, C. M. R. 20-hydroxyecdysone receptor ligand domain: 1. A semiempirical study of dibenzoylhydrazines selectivity. **Journal of Molecular Structure**, v. 585, p. 61-68, 2002.

SANTOS-FILHO, O. A.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, p. 253-259, 2003.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SEARLE, M. S.; WILLIAMS, D. H. The cost of conformational order: entropy changes in molecular associations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 10690-10697, 1992.

SEARLE, M. S.; WILLIAMS, D. H.; GERHARD, U. contributions in the estimation of binding constants: residual motions and consequences for amide-amide hydrogen bond strengths. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 10697-10704, 1992.

SILVA, V.X. da, 2004. The *Bothrops neuwiedi* complex, p.410-422. In Campbell, J.A. & Lamar, W.W. (ed.). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock, Ithaca, London.

SILVA, G. R.. Estudo da reativação da acetilcolinesterase inibida por organofosforados: análise conformacional da molécula de HI-6 e simulação da reação de desfosforilação. **Dissertação de Mestrado**, Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, 2005.

SILVA, V. X.; RODRIGUES, M. T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, n. 1, p. 45-90, 2008.

SILVEIRA, P. V.; NISHIOKA, P. South American rattlesnake bite in a Brazilian teaching hospital. Clinical and epidemiological study of 87 cases, with analysis of factors predictive of renal failure. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 562-564, 1992.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The Expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1488, p. 1-19, 2000.

SLACK, B. E.; MAS, L. K.; SEAH, C. C. Constitutive shedding of amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor- α converting enzyme. **Biochemistry Journal**, v. 357, 787-794, 2001.

SOUZA, J. R. F.; MONTEIRO, R. Q.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**, v. 39, p. 787-792, 2001.

SPRINGMAN, E. B.; ANGLETON, E. L.; BIRKEDAL-HANSEN, H.; VAN-WART, H. E. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys 73 active-site zinc complex in latency and "cysteine switch" mechanism for activation. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 1, p. 364-368, 1990.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods. II Applications. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, p. 221-264, 1989.

STEWART, J. J. MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 4, p. 1-105, 1990

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, p. 1173-1213, 2007.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **J. Mol. Model**, v. 19, p. 1-32, 2013.

STOCKER, K. Compositions of venoms snakes. In: **Medical use of snake proteins**, p. 33-56, 1990.

STOCKER, K.; FISCHER, H.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon**, v. 20, p. 265-273, 1982.

STÖCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 5, p. 383-390, 1995.

STÖCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F.X.; McKAY, D.B.; BODE, W. The metzincins – Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Science**, v. 4, p. 823-840, 1995.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta: BBA**, v. 1824, p. 164-176, 2012.

TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Proteases that induce hemorrhage, in: G.S. Bailey (Ed.) **Enzymes from Snake Venom**, Alake, Colorado, p. 11-38, 1998.

TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, U. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 42, p. 947-962, 2003.

TERRA, R. M. S.; PINTO, A. F. M.; GUIMARÃES, J. A.; FOX, J. W. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology. **Toxicon**, v. 54, p. 836-844, 2009.

TU, A. T. Snake venoms: General background and composition. In: **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**, p. 1-19, 1988.

VALE, L. H. F.; MENDES, M. M.; FERNADES, R. S.; COSTA, T. R.; HAGE-MELIM, L. I. S.; SOUSA, M. A.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FRANCA, S. C.; SILVA, C. H. T. P.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Protective effect of *Schizolobium parahyba* flavonoids against snake venoms and isolated toxins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2566-2577, 2011.

VALENTE, R. H.; GUIMARÃES, P. R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; SOARES, M. R.; CHAPEAUROUGE, A.; TRUGILHO, M. R. O.; LÉON, I. R.; ROCHA, S. L. G.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; WERMELINGER, L. S.; DUTRA, D. L. S.; LEÃO, L. I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B.; PERALES, J.; DOMONT, G. B. *Bothrops insularis* venomomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 241-255, 2009.

VILLALTA-ROMERO, F.; GORTAT, A.; HERRERA, A. E.; ARGUEDAS, R.; QUESADA, J.; MELO, R. L.; CALVETE, J. J.; MONTERO, M.; MUTILLO, R.; RUCAVADO, A.; GUTIERREZ, J. M.; PÉRES-PAYA, E. Identification of new snake venom metalloproteinase inhibitors using compound screening and rational peptide design. **ACS Med. Chem. Lett.**, v. 3, p. 540-543, 2012.

WADOOD, A.; ALI, S. A.; SATTAR, R.; LODHI, M. A.; UI-HAQ, Z. A novel pharmacophore model to identify leads for simultaneous inhibition of anti-coagulation and anti-inflammatory activities of snake venom phospholipase A₂. **Chem Biol. Drug Des.**, v. 79, p. 431-441, 2012.

WANG, S.; MILNE, G. W. A.; NICKLAUS, M. C.; MARQUEZ, V. E.; LEE, J.; BLUMBERG, P. M. Protein kinase C modeling of the binding site and prediction of binding constants. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 1326-1338, 1994.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 77-88, 2010.

WHITE, J. Snake venom and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951-967, 2005.

WILLETT, P. Genetic algorithms in molecular recognition and design. **Trends Biotechnol.**, v. 13, p. 516-521, 1995.

WOLFSBERG, T. G.; STRAINGHT, P. D.; GERENA, R. L. ADAM, a widely distributed and developmentally regulate gene family encoding membrane proteins with A Disintegrin And Metalloprotease domain. **Dev Biology**, v. 169, 378-383, 1995.

WÜSTER, W.; THORPE, R. S.; SALOMAO, M. G.; THOMAS, L.; PUORTO, G.; THEAKSTON, R. G. D.; WARRELL, D. A. Origin and phylogenetic position of the Lesser

Antilean species of *Bothrops* (Serpentes, Viperidae): biogeographical and medical implications. **Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. Zool.**, v. 68, n. 2, p. 101-106, 2002.

ZHANG, D.; BOTOS, I.; GOMIS-RUTH, F. X.; DOLL, R.; BLOOD, C.; NJOROGI, F. G.; FOX, J. W.; BODE, W.; MEYER, E. F. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (from d). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 8447-8451, 1994.

ZHANG, T.; OZBIL, M.; BARMAN, A.; PAUL, T.J.; BORA, R.P.; PRABHAKAR, R. Theoretical Insights into the functioning of metallopeptidases and their synthetic analogues. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, p. 192-200, 2015.

ANEXOS

Anexo 1



01/09/2016

870160048524

12:46



00.000.2.2.16.0695338.3

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 020255 8

Relatório Descritivo

“CRIAÇÃO DE INIBIDORES DE METALOPROTEASES PARA O TRATAMENTO DE VÍTIMAS DE ACIDENTES OFÍDICOS”

- 1- Acidentes ofídicos são um problema de saúde pública considerado negligenciado pela Organização Mundial de Saúde, que afeta principalmente populações pobres em países tropicais e subtropicais. Embora o número exato de acidentes ofídicos que ocorrem no Mundo todo seja desconhecido, estima-se que cerca de 5 milhões de pessoas são picadas por cobras anualmente, com até 2,5 milhões de envenenamentos [Rabies and envenomings: a neglected public health issue. Report of a consultative meeting, World Health Organization, Geneva, 10 January 2007, p14]. Pelo menos 100.000 pessoas morrem como resultado de picadas de serpentes a cada ano, com cerca de três vezes esse número em amputações e outras deficiências permanentes causados por acidentes ofídicos [Chippaux, J. P. *Bull. World Health Organization*, 1998, 76, 515-524. Kasturiratne, A. *et al.*, The global burden of snake bite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths, *PLoS Medicine*, 5, e218, 2008]. Os trabalhadores rurais e as crianças são as mais afetadas. As crianças muitas vezes sofrem efeitos mais graves do que os adultos, devido à sua massa corporal menor. Este tipo de lesão é frequentemente encontrado em comunidades rurais pobres em países de baixa e média renda, onde os sistemas de saúde são mais frágeis e os recursos médicos escassos ou praticamente inexistentes.
- 2- O veneno de serpentes produz vários efeitos tóxicos, que variam desde danos no tecido local até manifestações sistêmicas, que podem resultar em morte. A principal forma de tratamento para os

acidentes ofídicos é o uso de soro antiofídico (SAO). Uma limitação no uso do SAO para o tratamento de acidentes ofídicos é que não é simples obter um produto com qualidade adequada. Primeiramente, é necessária a obtenção de imunógenos (venenos de serpente) com boa qualidade, o que exige níveis elevados de capacitação técnica e de investimento de recursos nos países onde esses acidentes são comuns, que não raramente são países pobres. Além disso, nesses países, há falta muitas vezes de capacidade reguladora para o controle da produção de SAO, o que torna insuficiente a avaliação de suas qualidade e adequação. Em muitos locais, a má regulação combinada com uma distribuição inadequada levam a uma perda de confiança por parte dos médicos, gestores de saúde e pacientes nos SAO disponíveis.

- 3- No entanto, mesmo em pacientes tratados com SAO de qualidade adequada acontecem comumente complicações locais, tais como a necrose de tecidos moles e síndrome compartimental [Lopoo, J. B. *et al.* Treating the snakebitten child in North America: a study of pit viper bites. *J. Pediatr. Surg.* 33, 1593-1595, 1998]. O tratamento cirúrgico se torna necessário em certos casos. Abordagens cirúrgicas para acidentes ofídicos podem variar, por exemplo, desde o desbridamento cirúrgico no local da picada até fasciotomia e amputação de membro [Johnson C. A. Management of snakebite. *Am. Fam. Physician* 44, 174-180, 1991; Chattopadhyay, A. *et al.* Surgical implications of snakebites. *Indian J. Pediatr.* 71, 397-399, 2004]. Além das consequências sociais, as amputações têm efeitos econômicos nas famílias e comunidades rurais onde esses acidentes ocorrem com mais frequência, já que muitas vezes incapacitam pessoas para o trabalho que antes faziam.
- 4- Diante deste quadro, a produção de fármacos com ação antiofídica pode ser uma alternativa bastante interessante para reduzir as deficiências no tratamento e as consequências destas para os

pacientes que sofreram acidentes ofídicos. Fármacos podem ser produzidos com menores custos, em locais onde há uma boa capacidade de produção instalada e de regulamentação, sendo posteriormente transportados para os locais onde há sua demanda. Mesmo que não seja possível obter substâncias que substituam integralmente o SAO, a combinação do uso do SAO com os fármacos poderia aumentar as chances de sobrevivência das vítimas e diminuir os danos teciduais no local da picada, reduzindo o número de intervenções cirúrgicas e amputações. [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/>]

- 5- O veneno de serpentes contém uma mistura complexa de proteínas e polipeptídeos. A maior parte das proteínas tem atividade enzimática, destacando-se as hidrolases digestivas, oxidases de *L*-amino ácidos, fosfolipases, pró-coagulantes do tipo trombina, serina-proteases do tipo calicreína e as metaloproteases.
- 6- As metaloproteases presentes no veneno de serpentes são enzimas dependentes de zinco, que apresentam ambientes de ligação de zinco altamente semelhantes. Algumas metaloproteases induzem hemorragia, afetando diretamente os vasos sanguíneos, principalmente capilares. Aparentemente, estas enzimas são capazes de clivar, de uma forma altamente seletiva, as ligações peptídicas dos principais componentes da membrana basal, afetando assim a interação entre a membrana basal e as células endoteliais. Como consequência, essas células sofrem uma série de alterações morfológicas e funcionais *in vivo*, provavelmente associadas a fatores biofísicos hemodinâmicos. Eventualmente, lacunas são formadas em células endoteliais através das quais ocorre o extravasamento. Além de hemorragia, metaloproteases de veneno induzem lesão muscular esquelética, mionecrose, o que parece ser secundário à isquemia que se segue no tecido muscular como consequência da hemorragia e diminuição da perfusão. A

ruptura de microvasos também prejudica a regeneração do músculo esquelético, sendo, portanto, responsável pela fibrose e perda de tecido permanente após picadas de cobra. Além disso, as metaloproteases de veneno participam na degradação dos componentes da matriz extracelular e desempenham um papel importante na resposta inflamatória local proeminente que caracteriza envenenamentos ofídicos. Devido ao seu papel na patogênese da lesão do tecido local, metaloproteases de veneno de cobra constituem alvos relevantes para o desenvolvimento de inibidores que podem complementar antivenenos na neutralização dos efeitos descritos [Gutiérrez J.M., Rucavado, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82, 841-850, 2000]

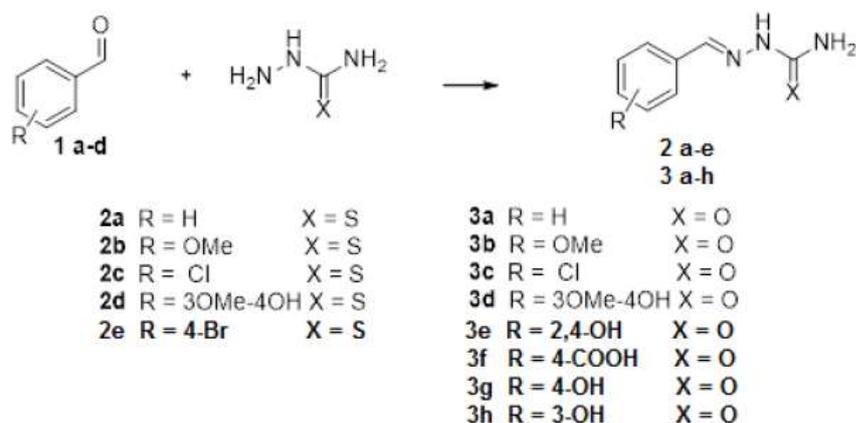
- 7- Na presente invenção é descrita a criação de compostos inéditos da classe das tiosemicarbazonas, que apresentam ação inibitória sobre uma metaloprotease presente no veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*, verificada *in vitro*, e eficácia comprovada *in vivo* contra hemorragias induzidas em camundongos pelo veneno da mesma serpente, um dos efeitos comumente observados em indivíduos que sofreram acidentes ofídicos e que em muitos casos pode levar a amputações dos membros afetados. A espécie *B. pauloensis* é localizada em parte das regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, pertencendo à subfamília Crotalinae da família Viperidae, a principal responsável por acidentes ofídicos no país.
- 8- No processo descrito por esta invenção, os compostos foram planejados racionalmente através do uso de métodos computacionais. Para tanto, foi utilizada a técnica da docagem molecular para se identificar o provável modo de interação de compostos protótipos com um modelo de uma metaloprotease de *B. pauloensis*. A partir das estruturas obtidas, foram propostas

modificações estruturais com o objetivo de aumentar a potência destes compostos como inibidores de metaloproteases.

9- Os estudos realizados e resultados obtidos serão apresentados na forma de tópicos:

9.1. Síntese dos Inibidores

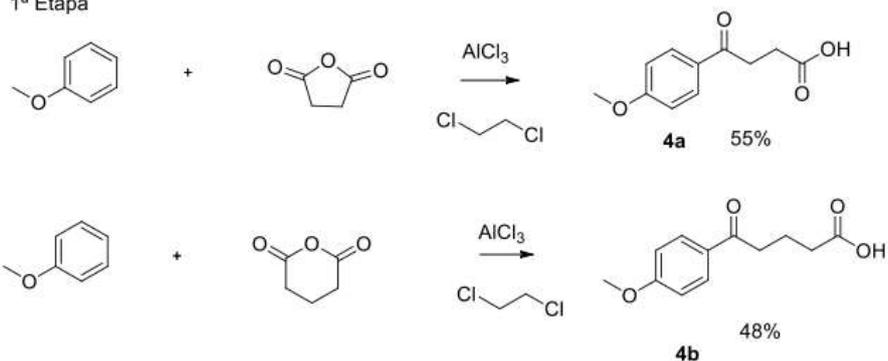
1ª Série



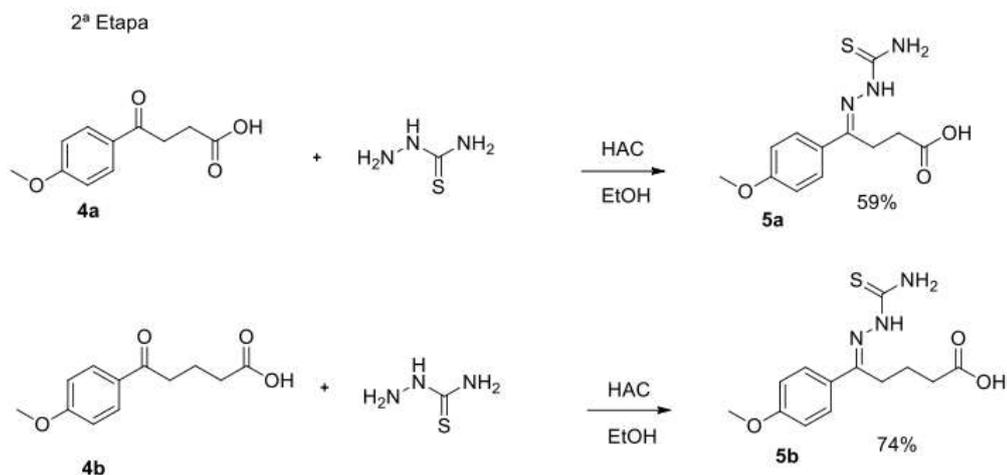
A síntese da 1ª série consistiu em uma reação de condensação dos aldeídos com tiosemicarbazida ou semicarbazida. Em um balão volumétrico adicionou-se 1 eq de aldeído e em seguida 1,05 eq de hidrazida, solubilizados em 10 mL de etanol. A mistura reacional permaneceu em refluxo por aproximadamente 10 horas, e após resfriamento a temperatura ambiente a solução foi vertida em gelo para ocasionar a precipitação. O produto foi filtrado sob pressão reduzida e o mesmo foi lavado com etanol. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada com revelador de fluoresceína, e os produtos obtidos foram avaliados por técnicas de espectroscopia ^1H -RMN que demonstraram pureza adequada.

2ª Série

1ª Etapa



Na 1ª etapa da síntese dos compostos da 2ª série, foram adicionados solvente e cloreto de alumínio (1,1 eq) a um balão de 2 L de fundo redondo equipado com um dinamômetro *terap*, tubo de guarda, e funil de adição, contendo uma solução de anidrido succínico (0,7 mmol) em etileno dicloreto. A massa de reação foi arrefecida sob agitação a 15°C. O composto aromático (0,7 mmol) foi adicionada gota a gota à mistura reacional acima, mantendo-se a mesma temperatura. A mistura reacional foi agitada durante 3-4 h à temperatura ambiente; a reação foi monitorada utilizando-se TLC e, após a conclusão da reação, a massa foi vertida numa mistura de 1 kg de gelo e 100 mL de ácido clorídrico concentrado, sob agitação. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com éter.



Na 2ª etapa, adicionou-se tiosemicarbazida (1,2 eq) a soluções de 1eq de **4a** e de **4b** em etanol. A mistura reacional permaneceu em refluxo por aproximadamente 6 horas, ocorrendo formação de subprodutos em ambas as reações. A solução da reação de formação de **5a** foi vertida em gelo e o precipitado formado foi lavado com etanol gelado apresentando-se como único cromóforo em cromatografia de camada delgada e avaliações espectroscópicas (¹H-RMN) demonstraram formação do produto.

Da mistura reacional para formação do produto **5b** precipitou uma massa branca, com formação de subprodutos. A mesma foi filtrada e lavada com etanol gelado. Mesmo após lavagem observou-se a permanência de subprodutos, realizando-se então purificação em coluna cromatográfica (DCM-Metanol), obtendo-se elevada pureza após esta etapa.

9.2. Modelagem Molecular

A metaloprotease utilizada neste estudo, identificada na peçonha de *Bothropoides pauloensis* e denominada BpMP-I, foi isolada anteriormente [NAVES-DE-SOUZA, D. L. *et al.* Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. *Comparative Biochem. Physiol., Part B*, 161, 102-109, 2012.]. Devido à

ausência de estruturas cristalográficas de BpMP-I para serem usadas nos estudos de docagem molecular, foi inicialmente construído um modelo tridimensional da toxina, utilizando-se o método de modelagem comparativa disponibilizado no servidor Swiss-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>). O molde usado foi a estrutura cristalográfica da toxina BaPI (Código de depósito no *Protein Data Bank*: 2W12), da espécie *Bothrops asper*, que apresenta um ótimo valor de resolução cristalográfica, 1,46 Å [ARNOLD, K. *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201, 2006]. A análise dos parâmetros de qualidade do modelo obtido demonstrou sua adequação para uso nas etapas posteriores.

As estruturas das séries 1 e 2 foram desenhadas e otimizadas com o método PM3 do programa Spartan'14 (Wavefunction, Inc.). Para a docagem na enzima, foi utilizado o programa GOLD 5.2 (CCDC) com a função de pontuação GoldScore [LIEBESCHUETZ, J. W.; COLE, J. C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 26, 737-748, 2012]. Após análise dos resultados encontrados com a série 1, foram propostas e avaliadas modificações estruturais nas tiosemicarbazonas que levaram a um aumento do número de interações com resíduos de amino ácidos localizados no sítio de interação com a enzima, gerando a série 2. Os complexos enzima-ligante com as maiores pontuações no procedimento de docagem tiveram suas estruturas reotimizadas pelo método PM6 [STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J. Mol. Model.*, 19, 1-32, 2013] disponível no programa MOPAC 2012 (Stewart Computational Chemistry), para posterior cálculo da entalpia de interação, um parâmetro teórico usado como critério para se avaliar o nível de interação das substâncias com a enzima.

Substâncias com entalpias de interação mais favoráveis com uma enzima são provavelmente melhores ligantes desta enzima. A figura 1 mostra o composto com a entalpia de interação mais favorável da série 2, **5b**, e suas principais interações no sítio ativo da enzima BpMP-I, identificadas de acordo com o procedimento de modelagem molecular descrito. Na figura, os átomos de nitrogênio são representados em azul, os de hidrogênio em branco, os de oxigênio em vermelho, o de zinco em cinza e o de enxofre em amarelo; os átomos de carbono da proteína estão em verde e os do ligante estão em violeta. Este composto foi também o mais ativo nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, conforme descrito a seguir.

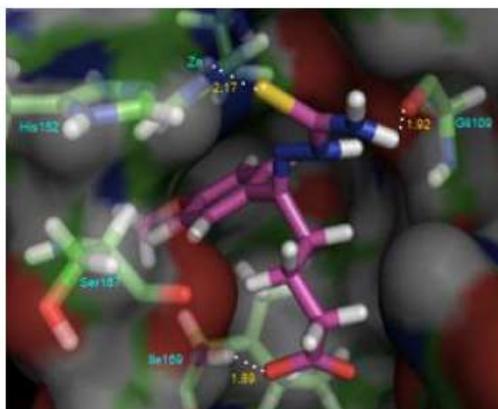


Figura 1

9.3. Ensaio de inibição enzimática

A toxina purificada BpMP-I foi dissolvida em NaCl 0,9% e quantificada pelo método desenvolvido por Bradford [BRADFORD, M. M., Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254, 1976.]. A atividade azocaseinolítica foi determinada de acordo com Gomes e colaboradores [GOMES, M. S. R. *et al.* Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 153, 290-300, 2011] com modificações. A azocaseína (1 mg/mL) foi dissolvida em

tampão Tris-HCl 0,05 mol/L (pH 7,8) contendo 0,15 mol/L NaCl. 160 μ L desta solução foi adicionada em cada poço de uma placa de poliestireno (96 poços). A reação foi iniciada com a adição de 45 μ L da solução da enzima contendo 7,5 μ g de enzima (massa mínima capaz de degradar 50% do substrato utilizado, previamente determinada por Naves-de-Souza e colaboradores (2012)). Após a incubação da solução a 37 °C por 30 min., a reação foi interrompida com a adição de 45 μ L de 20% (m/v) do ácido tricloroacético (TCA). A placa, então, fica descansando a temperatura ambiente por 30 min. e posteriormente, centrifugada a 3000 G por 20 min. A absorvância do sobrenadante a 405 nm foi determinada e a atividade azocaseinolítica foi definida como uma unidade (U) para o aumento em 0,01 na absorvância em relação ao padrão. Os ensaios de inibição foram realizados incubando-se previamente os compostos sintéticos com a toxina por 30 min a 37°C e, imediatamente após, foi realizada a atividade enzimática. Para os ensaios de inibição da atividade enzimática, foram utilizadas as proporções de 1:1, 1:5, 1:10 e 1:20 toxina/composto (M/M). A CI_{50} foi definida como a concentração capaz de inibir 50% da atividade caseinolítica promovida pela BpMP-I. A tabela 1 mostra os resultados de inibição enzimática obtidos.

Tabela 1: Atividade inibitória (CI_{50}) dos compostos sintetizados sobre a enzima BpMP-I

Ligante	X	R	Y	CI_{50} (μ M)
2a	S	H	H	4.217,22
2b	S	4-OMe	H	3.011,68
2c	S	4-Cl	H	4.249,94
2d	S	3-OH,4-OMe	H	3.412,50
2e	S	4-Br	H	3.136,76
3b	O	4-OMe	H	Inativo
3c	O	4-Cl	H	Inativo
3d	O	3-OH,4-OMe	H	Inativo
3e	O	2,4-OH	H	Inativo

3f	O	4-COOH	H	Inativo
3g	O	4-OH	H	Inativo
3h	O	3-OH	H	Inativo
5a	S	4-OMe	CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	79,12
5b	S	4-OMe	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	1,77

9.4. Ensaio de Inibição da Atividade Hemorrágica

Este ensaio foi realizado segundo método descrito na literatura [Nikai, T., Mori, N., Kishida, M., Sugihara, H., Tu, A.T., Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake), *Arch. Biochem. Biophys.* 231, 309-319, 1984]. A hemorragia foi induzida por injeções intradérmicas (i.d.) de diferentes doses da peçonha de *B. pauloensis* e da enzima BpMP-I (10µg e 50µg, respectivamente) no dorso de camundongos Swiss machos (18-22g, n=4). Após três horas, os animais foram anestesiados com soluções de ketamina® 10% (0,05mL/kg) + xilasina® 2% (0,025mL/kg) e posteriormente sacrificados. As peles foram removidas e a área hemorrágica foi medida utilizando-se um paquímetro de baixa pressão (CALIPER). O potencial anti-hemorrágico do inibidor foi determinado como a porcentagem de inibição da atividade hemorrágica.

10- Como ilustração da ação dos compostos, a figura 2 mostra os resultados do ensaio de inibição promovido pelos ligantes agora denominados LDQM-IN-23 (2a acordo com a Tabela 1), LDQM-IN-23b (5a) e LDQM-IN-23c (5b) sobre a atividade hemorrágica induzida pela metaloenzima isolada Botropoidina (Bdn) na proporção de 1:20 (m/m) toxina/ligante. Em (A), está representada a porcentagem de inibição da atividade hemorrágica (halo hemorrágico); em (B), imagens ilustrando cada tratamento realizado. O controle negativo foi realizado com salina (NaCl 0,9%) e controle positivo foi a Botropoidina isolada (Bdn). Bdn + 23 representa a toxina isolada mais o ligante LDQM-IN-23 (2a). Bdn + 23b representa a toxina isolada mais o ligante LDQM-IN-23b (5a). Bdn +

23c representa a toxina isolada mais o ligante LDQM-IN-23c (5b). Foi utilizada a mesma sequência em (A) e (B). Os resultados são mostrados como a média \pm desvio padrão (n=4) em triplicata. O asterisco indica resultados estatisticamente significativos com relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

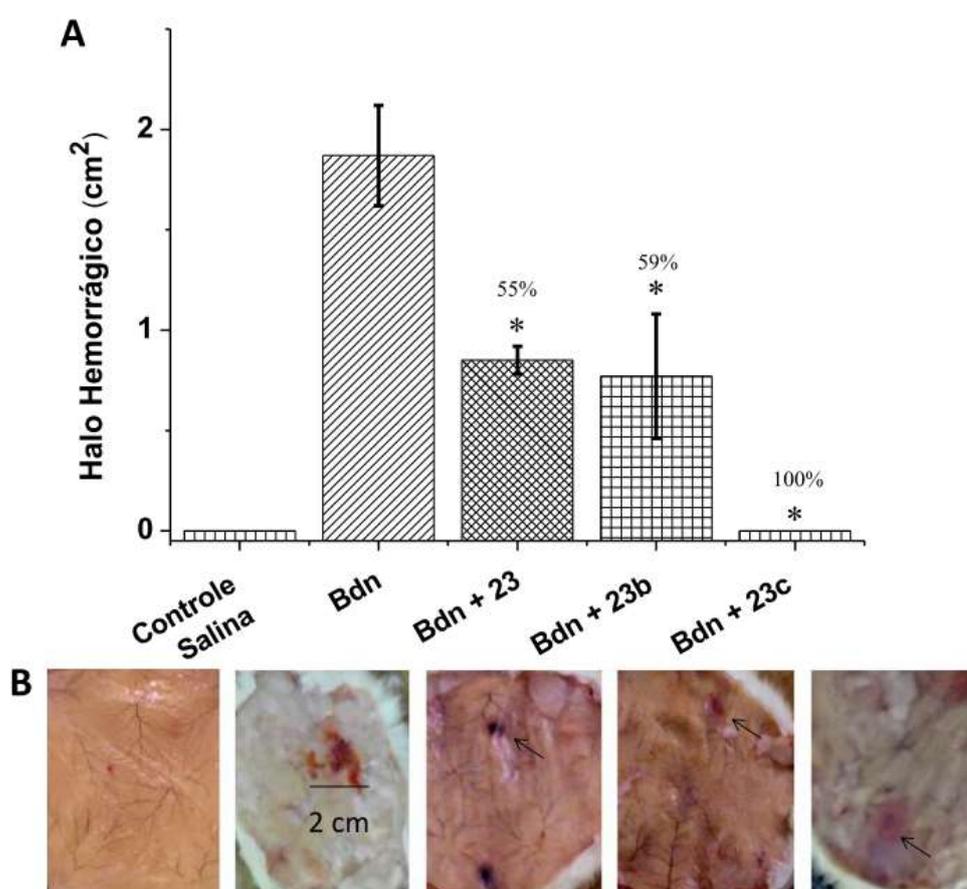


Figura 2

11- Na sequência, a figura 3 mostra o ensaio de inibição promovido pelos ligantes LDQM-IN-23 (2a), LDQM-IN-23b (5a) e LDQM-IN-23c (5b) sobre a atividade hemorrágica induzida pela peçonha bruta de *Bothropoides pauloensis* (Bp) na proporção de 1:20 (m/m) Bp/ligante. Em (A) é mostrada a porcentagem de inibição da atividade hemorrágica,

medida como halo hemorrágico (em cm^2). Em (B) são mostradas figuras ilustrando cada tratamento realizado. O controle negativo foi realizado com salina (NaCl 0,9%). O controle positivo foi a peçonha bruta de *Bothropoides pauloensis*. Bp + 23 representa Bp mais o ligante LDQM-IN-23. Bp + 23b representa Bp mais o ligante LDQM-IN-23b. Bp + 23c representa Bp mais o ligante LDQM-IN-23c. Foi utilizada a mesma sequência para A e B. Os resultados são mostrados como a média \pm desvio padrão (n=4) em triplicata. O asterisco indica resultados estatisticamente significativos com relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

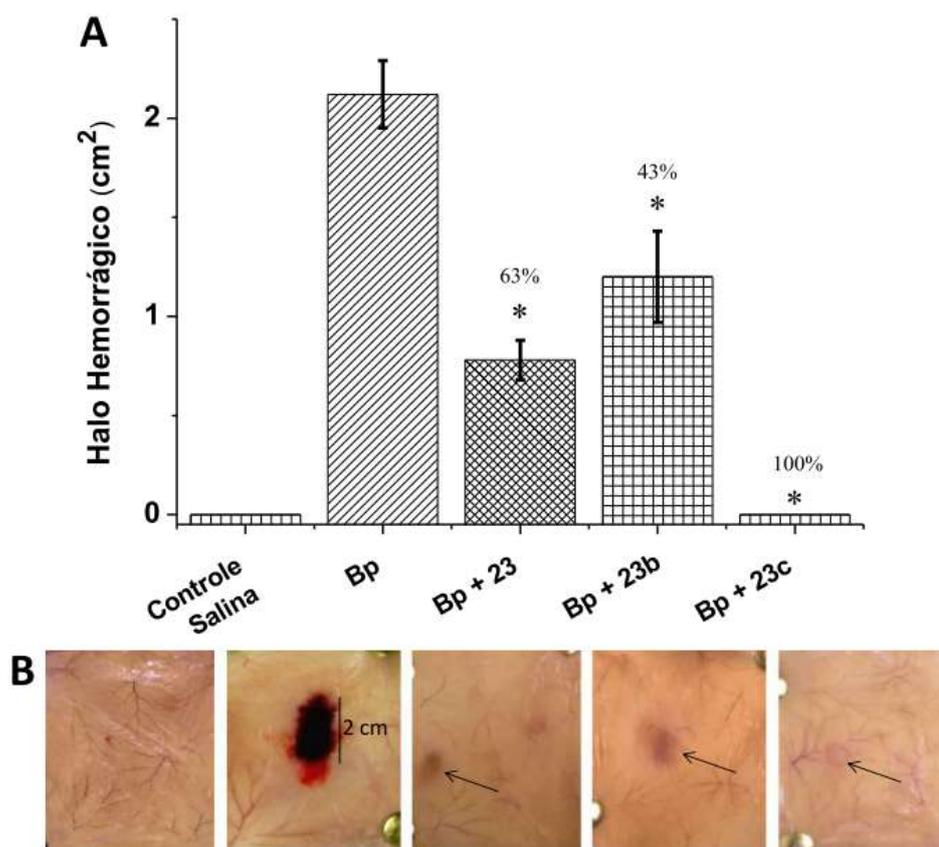


Figura 3

12- A Figura 4 mostra a inibição dose-dependente da atividade hemorrágica do veneno de *Bothropoides pauloensis* (Bp) causada pelo composto mais ativo da série, LDQM-IN-23c (5b). Duas MDH (doses mínimas hemorrágicas) de Bp foram injetadas por via intradérmica na região dorsal de ratos. Depois de 150 min, os animais foram sacrificados, as suas peles foram removidas e o halo hemorrágico foi então medido. Os ratos de controle receberam solução salina (NaCl a 0,9%; m / v). Em (A) é apresentado o gráfico da área do halo hemorrágico (em cm²) em função do tratamento do animal; há uma redução dose-dependente do halo em função da concentração do composto LDQM-IN-23c (5b). Em (B) são mostradas imagens ilustrando cada tratamento realizado, na mesma sequência apresentada em (A). As razões usadas foram 1:1, 1:5 e 1:10 Bp:LDQM-IN-23c (5b) (w / w). Os resultados são apresentados como média ± DP (n = 4). O asterisco indica que os resultados são estatisticamente significativos com relação ao controle negativo (p<0,05).

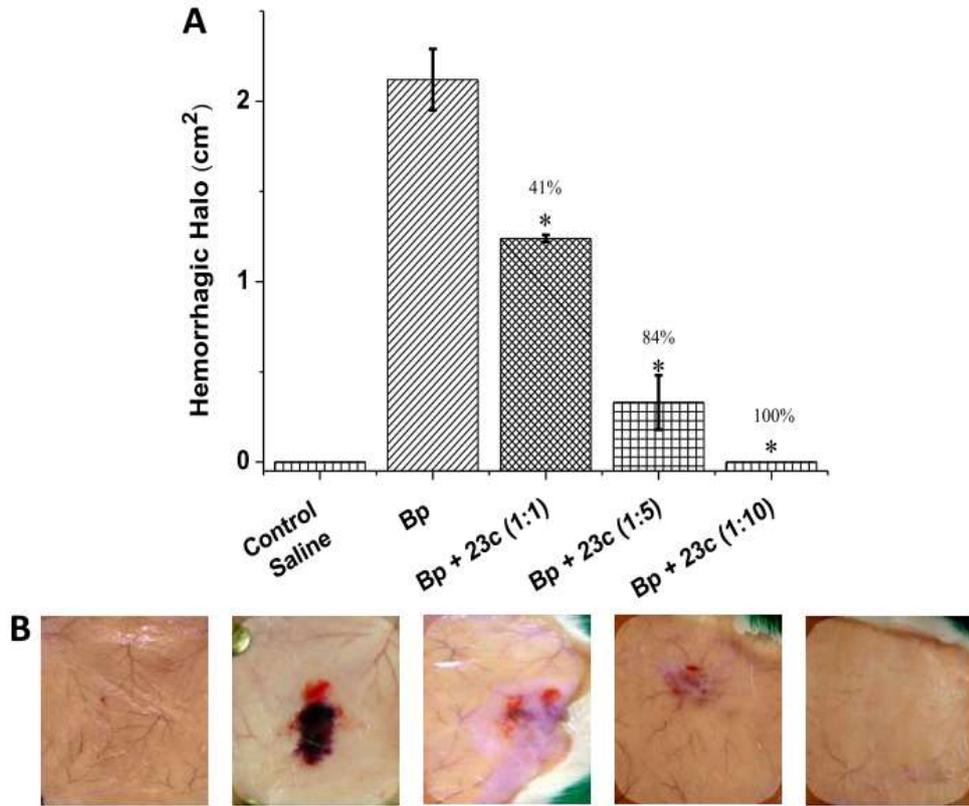


Figura 4

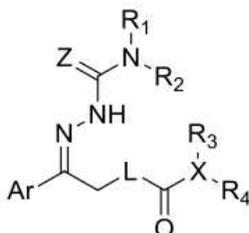
RESUMO

“CRIAÇÃO DE INIBIDORES DE METALOPROTEASES PARA O TRATAMENTO DE VÍTIMAS DE ACIDENTES OFÍDICOS”

Pelo menos 100.000 pessoas morrem como resultado de picadas de serpentes a cada ano, com cerca de três vezes esse número em amputações e outras deficiências permanentes. A principal forma de tratamento para os acidentes ofídicos é o soro antiofídico, mas este apresenta algumas limitações, como a produção de custo elevado e pouco efeito sobre complicações locais, tais como a necrose de tecidos moles e síndrome compartimental. Diante deste quadro, a produção de fármacos com ação antiofídica pode ser uma alternativa bastante interessante para reduzir as deficiências no tratamento atual e as consequências destas para as vítimas de acidentes ofídicos. As metaloproteases presentes no veneno de serpentes induzem hemorragia, afetando diretamente os vasos sanguíneos. Na presente invenção é descrita a criação de compostos inéditos da classe das tiosemicarbazonas, que apresentam ação inibitória sobre uma metaloprotease, presente no veneno da serpente *Bothropoides pauloensis*, verificada *in vitro*. Houve eficácia comprovada *in vivo* contra hemorragias induzidas em camundongos pelo veneno da mesma serpente, um dos efeitos comumente observados em indivíduos que sofreram acidentes ofídicos e que em muitos casos pode levar a amputações dos membros afetados. No processo descrito por esta invenção, os compostos foram planejados racionalmente através do uso de métodos computacionais.

REIVINDICAÇÕES

- 1- CRIAÇÃO DE INIBIDORES DE METALOPROTEASES PARA O TRATAMENTO DE VÍTIMAS DE ACIDENTES OFÍDICOS, caracterizado por apresentar a estrutura geral abaixo, na qual **Ar** pode ser um anel aromático ou heteroaromático de 4 a 7 membros, constituído de carbonos, podendo conter 1 ou mais átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre e, opcionalmente, os átomos de carbono podem conter substituintes como halogênios, grupos alquila substituídos com átomos de nitrogênio, enxofre ou halogênios, grupos alcoxila, anéis aromáticos ou heteroaromáticos e grupos amino não substituídos, monossubstituídos ou dissubstituídos por substituintes alquila, arila ou heteroarila;



- 2- CRIAÇÃO DE INIBIDORES DE METALOPROTEASES PARA O TRATAMENTO DE VÍTIMAS DE ACIDENTES OFÍDICOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por apresentar **Z** como um átomo de enxofre, oxigênio ou nitrogênio não substituído ou monossubstituído por substituintes alquila, arila ou heteroarila;
- 3- CRIAÇÃO DE INIBIDORES DE METALOPROTEASES PARA O TRATAMENTO DE VÍTIMAS DE ACIDENTES OFÍDICOS, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por apresentar **R₁** e **R₂** como cadeias alquílicas lineares de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente contendo um ou mais heteroátomos como oxigênio, nitrogênio e enxofre, ou como cadeias alquílicas de 1 a 10 átomos de carbono, ramificadas ou substituídas por grupos alquila, arila,

heteroarila, hidroxila, amina, tiol, éter, nitrila e halogênios, ou como anéis aromáticos ou heteroaromáticos de 4 a 7 membros, constituídos de carbonos, podendo conter 1 ou mais átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre;

- 4- CRIAÇÃO DE INIBIDORES DE METALOPROTEASES PARA O TRATAMENTO DE VÍTIMAS DE ACIDENTES OFÍDICOS, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por apresentar **R₃** e **R₄** como cadeias alquílicas lineares de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente contendo 1 ou mais heteroátomos como oxigênio, nitrogênio e enxofre, ou como cadeias alquílicas de 1 a 10 átomos de carbono, ramificadas ou substituídas por grupos alquila, arila, heteroarila, hidroxila, amino, tiol, éter, nitrila e halogênios, assim como anéis aromáticos ou heteroaromáticos de 4 a 7 membros, constituídos de carbonos, podendo conter um ou mais átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre;
- 5- CRIAÇÃO DE INIBIDORES DE METALOPROTEASES PARA O TRATAMENTO DE VÍTIMAS DE ACIDENTES OFÍDICOS, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por apresentar **X** como oxigênio ou nitrogênio não substituído, monossustituído ou dissustituído por substituintes alquila, arila ou heteroarila e, adicionalmente, seus sais farmacologicamente aceitáveis, solvatos, amidas, ésteres, *N*-óxidos, formas químicas semelhantes a estas protegidas quimicamente e pró-fármacos;
- 6- CRIAÇÃO DE INIBIDORES DE METALOPROTEASES PARA O TRATAMENTO DE VÍTIMAS DE ACIDENTES OFÍDICOS, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por apresentar **L** como constituído por cadeias alquílicas lineares de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente contendo 1 ou mais heteroátomos como oxigênio, nitrogênio e enxofre, ou como cadeias alquílicas de 1 a 10 átomos de carbono, ramificadas por grupos alquila, hidroxila, amino, tiol, éter, nitrila e halogênios.

Structure Based Discovery of First Metalloproteinase BpMP-I Inhibitors for the Treatment of Hemorrhage Caused by Snakebites.

Francis B. Ferreira[§], Thiago P. Moreira[§], Dayane L. N. Souza[‡], Veridiana M. R. Ávila[‡], Arthur E. Kümmerle[§], Carlos Mauricio R. Sant'Anna[§].

[§]Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFRRJ, Seropédica, RJ, Brazil.

[‡]Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, Uberlândia, MG, Brazil.

KEYWORDS: Snakebites, metalloproteinase inhibitors, thiosemicarbazones, molecular docking.

ABSTRACT: The venoms of snakes are composed by many toxins which are responsible for various toxic effects including intense pain, bleeding disorders and local tissue damage caused by hemorrhage and necrosis. The snake venom metalloproteinases (SVMPs) are proteolytic zinc-dependent enzymes acting in different hemostatic mechanisms. In this work, we use a structure based molecular modeling strategy for the rational design, by means of a homology 3D model of a SVMP isolated from *Bothropoides pauloensis* venom, followed by synthesis and *in vitro* evaluation of new thiosemicarbazones as the first inhibitors of the *B. pauloensis* SVMP. Besides being effective for the SVMP inhibition, two molecules were shown to be effective also *in vivo*, inhibiting hemorrhage caused by the *B. pauloensis* whole venom.

Snakebites, a public health problem affecting especially populations in rural areas of tropical countries, are considered by WHO a neglected disease. In Brazil, snakes from the bothropic and bothroptic genus (Viperidae) are the major causative agents of snakebites, accounting for about 80% of them (Brazil, 2012). The venoms of snakes are composed by many toxins which are used for immobilizing, killing, and digesting their prey (Sajevic, 2011). These toxins are responsible for various toxic effects including intense pain, bleeding disorders and local tissue damage caused by hemorrhage and necrosis that can ultimately lead to permanent disability and may result in limb amputation (Gutierrez et al., 2010a).

Although animal-derived antivenom sera have proved highly effective in the neutralization of systemic effects, they are only partially effective in reverting the local pathological alterations induced by snake venoms. Consequently, it has been suggested that specific inhibitors of enzymes present in the venoms may represent an improvement for the treatment of snakebites (Gutierrez et al., 1999). The snake venom metalloproteinases (SVMPs) (EC 3.4.24) are proteolytic enzymes acting in different hemostatic mechanisms (Tanjoni et al., 2010). The main effect induced by SVMPs is hemorrhage, an

effect caused by degradation and disruption of the capillary basement membrane leading to edema, myonecrosis and reduced ability to regenerate muscle tissue (Markland, Swenson, 2013).

In recent years, SVMPs have been exhaustively studied and their structure and mechanism of action have been determined (Markland; Swenson, 2013). They are zinc-dependent proteins characterized by a large molecular mass spectrum (20 to 110 kDa), which are classified into three groups, PI to PIII, according to the number of structural domains present in their structures (Fox and Serrano, 2008).

The development of effective SVMP inhibitors may be beneficial for the treatment of victims of snakebites, resulting in a significant overall reduction in local tissue damage after the envenoming. Furthermore, the development of inhibitors to specific toxins present in snake venoms could be the first step towards an alternative to principal treatment for ophidian envenoming, the animal-derived antivenom sera. Besides the low effectiveness on snakebite area, there are many other problems with the anti-venom sera, ranging from the inadequate distribution of sera (Gutierrez et al., 2010b) to hypersensitivity reactions caused by them (Bucarety, 2002; Thiansookon, 2008).

There is a need for new strategies for the development of molecules with inhibitory potential against toxins from snakes and with little or no collateral effects, as well for the elucidation of their mechanism of action (Perales, 2005). Therefore, this work is focused on the use of molecular modeling strategies for the rational design, followed by synthesis and evaluation of new substances for the inhibition of metalloproteinase toxins present in *Bothropoides pauloensis* venom, a species

responsible for snakebites in Brazil's Southeast and Midwest regions.

Giving the importance of the Zn^{II} ion for the catalytic mechanism of metalloproteinases, our initial proposal was the synthesis of a series of low molecular weight molecules containing semicarbazone and thiosemicarbazone groups, which could be useful as Zn-chelating candidates, as previously described (Paiva et al., 2014; Gambino, 2004).