

APROXIMACIÓN *IN SILICO* A LA ESTRUCTURA 3D DE LA PROTEÍNA ANTIVENENO DM64 DE LA ZARIGÜEYA (MAMMALIA: MARSUPIALIA: DIDELPHIDAE)

Por

Juan-Fernando Duque-Osorio*, Adalberto Sánchez*,
Leonardo Fierro* & Rafael Santiago Castaño*

Resumen

Duque-Osorio, J-F., A. Sánchez, L. Fierro & R. S. Castaño: Aproximación *In silico* a la Estructura 3D de la Proteína Antiveneno DM64 de la Zarigüeya (Mammalia: Marsupialia: Didelphidae). Rev. Acad. Colomb. Cienc. **33**(126): 103-123, 2009. ISSN 0370-3908.

Los accidentes por mordeduras de serpientes venenosas producen más de 50 mil muertes al año, particularmente en los trópicos donde se han convertido en un problema de salud pública. Estos accidentes producen, entre otros síntomas, hemorragias (SVMPs), mionecrosis (PLAs) y dolor, y las seroterapias convencionales son solo parcialmente efectivas y pueden producir efectos inmunes adversos. Por todo esto, recientemente se están investigando proteínas antiveneno naturales de mamíferos [DM43 (antihemorrágica) y DM64 (antimiotóxica) de la zarigüeya] que han demostrado ser más efectivas. Adicionalmente las SVMPs y PLAs venenosas tienen sus contrapartes endógenas normales no venenosas (MMPs y PLAs), y cuando el balance entre estas últimas y sus inhibidores se rompe, se producen patologías como: artritis, arterioesclerosis, asma, diabetes, choques sépticos, neoplasias, inflamaciones, psoriasis, reumatismo, etc. Por todo esto se hizo una aproximación *in silico* y por homología a la estructura 3D de DM64, con el sistema Swiss Model-Deep View. Además de obtener un modelo similar al previamente logrado por otro grupo para DM43, este proceso permitió estandarizar esta técnica de modelamiento de proteínas como una herramienta muy útil en nuestro medio por su eficiencia y bajo costo (SM-DV se puede utilizar gratuitamente).

Palabras clave: *Didelphis*, modelo por homología estructural, proteínas antiveneno de mamíferos (PLIs, anti-SVMP, DM64, DM43), Swiss Model-Deep View, veneno de serpientes (PLAs, SVMPs), Viperidae.

* Grupo de Biología Integrativa, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Cali-Colombia. Correo electrónico: juanferduque@gmail.com.

Abstract

Venomous snake bite accidents produce more than 50 thousand deaths each year, particularly in the tropics where these accidents have become a public health problem. Ophidic accidents produce, amongst other symptoms, hemorrhages (SVMPs), myonecrosis (PLAs) and pain, and conventional serotherapies are only partially effective and can produce immune adverse effects. Hence natural antivenom proteins from mammals are being investigated [DM43 (antihemorrhagin) and DM64 (antimytotoxic) from opossum serum (Marsupialia: Didelphis)] which have demonstrated to be more effective. Additionally, venomous PLAs and SVMPs have their normal non-venomous endogenous counterparts (MMPs and PLAs), and when the balance between the latter and their inhibitors is broken, the following pathologies can occur: arthritis, arteriosclerosis, asthma, diabetes, septic shocks, neoplasias, inflammations, psoriasis, etc. It's because of all these reasons, that an approximation to the 3D structure of DM64 was made here, with *in silico* homology methods, using the Swiss Model-Deep View system. Besides obtaining a similar model to that previously published by another group for DM43, the work presented here allowed the standardization of the SM-DV modeling technique as a very useful tool in our countries, given its efficiency and low costs (SM-DV is freely available).

Key words: Mammal antivenom proteins (PLIs, anti-SVMP, DM64, DM43), *Didelphis*, structural homology model, Swiss Model-Deep View, veneno de serpientes (PLAs, SVMPs), Viperidae.

Abreviaciones

(En su Mayoría Provenientes del Inglés): **3D** (tridimensional), **α 1BG** (α 1B-Glico Proteína), **aa** (Aminoácido), **ADN** (Acido Des-oxi-ribo-Nucleico), **BB** (Backbone: Esqueleto Proteico), **CL** (Cadena Lateral Aminoácida), **D** (Domnio), **DM** [grupo de proteínas antiveneno de serpientes extraídas de mamíferos, cuyos miembros típicos son aquellas extraídas de la Zarigüeya (Mammalia: Marsupialia: Didelphidae: *Didelphis marsupialis*): **DM40, 43, 64**], **EHA** (Enlace de Hidrógeno Apropiado), **EM** (Energy Minimization: Minimización de la energía de un modelo), **EMBL** (European Molecular Biology Laboratory: <http://www.embl.org/>), **FSIG** (Familia Supergen de las Inmunoglobulinas), **FQD** (Fix Quick and Dirty: Protocolo de arreglo de CLs en Deep View); **HL** (Homología), **MMPs** (Matrix Metallo-Proteases), **NCBI** (National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, USA: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), **PDB** (Tipo de Archivo o Base de Datos: Protein Daba Bank: <http://www.pdb.org/>), **PLAs** (Phospholipases A), **PLIs** (Phospholipase Inhibitors), **RMSD** (Root Mean Square Distance: Raíz de la Desviación Cuadrática Media: Mide que tan desviadas están la coordenadas de un modelo por homología, con respecto a sus plantillas experimentales), **SD** (Steepest Descent: Protocolo de minimización de energía de un modelo), **SVMPs** (Snake Venom Metallo-Proteases), **SMART** (Software: Simple Modular Architectural Research Tool: <http://smart.embl.de/>), **SM-DV** (Swiss Model - Deep View: Sistema de modelamiento de proteínas por homología *in silico*, utilizado en este trabajo: <http://swissmodel.expasy.org/>).

Introducción

Las mordeduras de serpientes producen daño tisular local y sistémico en forma de hemorragias, edema, mionecrosis y dolor (**Duque-Osorio et al.**, 2007; **Neves-Ferreira et al.**, 1997, 2000; **Thwin & Gopalakrishnakone**, 1998). De los cinco millones de accidentes ofídicos que suceden anualmente en el mundo, 50 mil son fatales, especialmente en los trópicos donde los accidentes con serpientes de la familia Viperidae son un problema de salud pública (**Gold et al.**, 2002; **Lizano et al.**, 2003; **Mattison**, 1995; **Perales & Domont**, 2002). Una de las formas convencionales de manejar el accidente ofídico es emplear inmunoglobulinas obtenidas de animales insensibilizados con los venenos o toxinas extraídas de las serpientes (**Hains & Broady**, 2000; **Lizano et al.**, 2003; **Neves-Ferreira et al.**, 1997, 2000; **Pérez & Sánchez**, 1999; **Soares et al.**, 2003; **Thwin & Gopalakrishnakone**, 1998; **Weissenberg et al.**, 1991). Pero en la búsqueda de moléculas inhibitorias más específicas, recientemente se ha visto un gran interés en estudiar la resistencia de algunos mamíferos al veneno de las serpientes (**Domont et al.**, 1991; **Duque-Osorio et al.**, 2007; **Martínez et al.**, 1999; **Pérez & Sánchez**, 1999), como se reporta para varios marsupiales (**Perales et al.**, 1994; **Melo & Suarez-Kurtz**, 1988; **Neves-Ferreira et al.**, 1997; **Soares et al.**, 1997) y algunos placentarios, como "insectívoros" (Eulipotyphla: **Omori-Satoh et al.**, 2000), roedores (**Biardi et al.**, 2000; **Martínez et al.**, 1999; **Domont et al.**, 1991) y carnívoros (**Qi et al.**, 1994). En la zarigüeya (Mammalia: Marsupialia: *Didelphis*) se han encontrado α 1B-glicoproteínas (miembros de la Familia Supergen de

las Inmunoglobulinas: FSIG) con actividad antiveneno de serpientes, como DM43 (Catanese & Kress, 1992; Jurgilas *et al.*, 2003; Neves-Ferreira *et al.*, 1997, 2000, 2002; Soares *et al.*, 1997), DM64 (Rocha *et al.*, 2002), DM40 (Neves-Ferreira *et al.*, 2000). De éstas, DM40 y DM43 son antihemorrágicas y DM64 es antimiotóxica, actuando estas proteínas contra los dos efectos principales del veneno de serpientes (Chippaux & Goyffon, 1998; Pérez & Sánchez, 1999): hemorragias (SVMPs) y mionecrosis (PLAs).

Las PLAs (Gutiérrez & Ownby, 2003; Hains *et al.*, 2000, 2001; Lomonte *et al.*, 2003; Núñez *et al.*, 2001; Ohno *et al.*, 2003; Ownby *et al.*, 1998) y hemorragias (SVMPs: Bjarnason & Fox, 1994; Gutiérrez & Rucavado, 2000; Jia *et al.*, 1996; Kamiguti *et al.*, 1996, 1998; Matsui *et al.*, 2000) venosas tienen sus contrapartes endógenas normales no venenosas (PLAs y MMPs) en la mayoría de animales, y muchas condiciones patológicas son, en parte, el resultado de la disrupción del balance natural entre PLAs y MMPs, y sus inhibidores: artritis, arteriosclerosis, asma, diabetes, choques sépticos, neoplasias, procesos inflamatorios, psoriasis, y condiciones oftálmicas, ortopédicas y periodontales (Pérez & Sánchez, 1999; Soares *et al.*, 2003; Thwin *et al.*, 2000). Entonces, el estudio de los componentes principales de los venenos de serpientes (PLAs y SVMPs) y de sus moléculas inhibitoras, tiene un doble interés para la medicina (Duque-Osorio *et al.*, 2007). De forma indirecta teniendo en cuenta las patologías nombradas (Hains & Broady, 2000). De forma directa, el estudio de los venenos de serpientes y sus inhibidores es médicamente interesante, porque se necesita desarrollar esquemas terapéuticos más eficientes, ya que se ha demostrado que los PLIs y anti-SVMP naturales son más efectivos que las terapias convencionales por inmunoglobulinas, y estas últimas pueden producir efectos inmunes no deseados (Hains & Broady, 2000; Lizano *et al.*, 2003; Neves-Ferreira *et al.*, 1997, 2000; Pérez & Sánchez, 1999; Soares *et al.*, 2003; Thwin & Gopalakrishnakone, 1998; Weissenberg *et al.*, 1991).

Por ello en el trabajo que se expone a continuación, se hizo una aproximación *in silico* y por homología (basado en proteínas cuya estructura 3D esté establecida por métodos experimentales) a la estructura 3D de DM64, con el sistema Swiss Model-Deep View (SM-DV; Guex & Peitsch, 1997; Guex *et al.*, 2008; Kaplan & Littlejohn, 2001; Schwede *et al.*, 2003). Además de haber permitido la obtención de un modelo similar al previamente logrado por homología también para DM43 por Neves-Ferreira *et al.* (2002), el proceso que a continuación se resume permitió estandarizar la técnica de modelamiento de proteínas con SM-DV

como una herramienta muy útil en nuestro medio por su eficiencia y bajo costo, dado que este sistema se puede utilizar gratuitamente.

Métodos

Para el modelamiento *in silico* de DM64 con SM-DV se realizaron los siguientes procedimientos, basados en las revisiones y tutoriales hechos por: Contreras-Moreira & Bates (2002); Contreras-Moreira *et al.* (2002); Guex & Peitsch (1997); Guex *et al.* (1999); Guex *et al.* (2008); Kaplan & Littlejohn (2001); Peitsch (2002); Pruess & Apweiler (2003); Rhodes (2000, 2008); Schwede *et al.* (2000); Schwede *et al.* (2003). Además de ser por homología, el modelo logrado en este trabajo es *in vacuo*. Se reporta el comando utilizado en DV entre paréntesis después del subtítulo, cuando sea el caso:

División de DM64 en Regiones con el Programa EMBL/SMART: La única secuencia aminoacídica de DM64 (gi 21309806) existente hasta la fecha en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se descargó y se sometió a EMBL/SMART (<http://smart.embl.de/>) Letunic *et al.*, 2004; Schultz *et al.*, 1998) el cual, comparando con la estructura conocida para proteínas contenidas en varias bases de datos [entre otras: su propia base de datos dominios, Pfam, SCOP, NRBD (base de datos no redundante que incluye a: SWISSPROT, PDB, PIRONLY)] detecta qué tipo dominios contiene la proteína sometida. La detección de los dominios de una proteína es el primer paso para su modelamiento por homología (Contreras-Moreira & Bates, 2002) pues las proteínas multidominio siguen siendo un problema para los programas de modelamiento comparativo (Contreras-Moreira *et al.*, 2002).

Modelos preliminares: Teniendo en cuenta las regiones de DM64 identificados por EMBL/SMART se dividió la proteína DM64 en cinco grupos de regiones y los mismos se sometieron por separado a en el sitio web de SM. Se utilizó el "First Approach Mode" (modalidad que hace parte del Swiss Model Workspace), por medio del cual SM identifica y alinea automáticamente la secuencia problema con todo(s) el(los) péptido(s) y/o proteína(s) con estructuras 3D experimentales conocidas que tengan un mínimo de 25% de homología con la proteína a modelar (Schwede *et al.*, 2003). Estas estructuras experimentalmente serán las plantillas de modelamiento (tabla 3) con las cuales se realiza un modelo preliminar para cada grupo de regiones (cinco en total). Los modelos llegan al usuario por email en forma de un archivo de extensión pdb, visualizable en el programa Deep View (DW), el cual debe ser instalado localmente. En otras palabras, el proceso de modelamiento como tal no se realiza en el computador local del usuario,

pues los modelos son logrados por SM. Esta es la razón principal por la cual este sistema de modelamiento no requiere una infraestructura informática sofisticada. Lo que se hace localmente es la visualización y pulimiento superficial de los modelos con DV.

Resometimiento de cada modelo a SM desde DV en modalidad de optimización (Swiss Model: Submit Modelling Request): En contraste a lo hecho en el párrafo anterior de este protocolo (First Approach Mode) en este punto se resometieron a SM los modelos obtenidos anteriormente, ahora en modalidad optimizada desde DV, lo cual permite corregir errores de alineamiento que pudieron haber quedado incorporados en los modelos preliminares (Schwede *et al.*, 2000; Schwede *et al.*, 2003). Hasta acá, todos los procedimientos son realizados de forma automática por SM. Sin embargo hay una parte del modelamiento automático que vale la pena resaltar, y es la modelación de los bucles (loops) no conservados, pues éstas son las estructuras que más varían entre proteínas (en este caso entre la proteína problema y sus plantillas experimentales de modelamiento) por lo cual son un contribuyente mayor de imprecisión en un modelo (Schwede *et al.*, 2000). Las coordenadas de la plantilla experimental de modelamiento no pueden ser usadas para modelar inserciones o deleciones de estas plantillas con respecto a la proteína problema. Para modelar esas partes, SM construye, con la ayuda del Programa de Restricciones Espaciales (CSP por sus siglas en Inglés), un ensamblaje de fragmentos compatibles con las estructuras vecinas. De estos, el mejor bucle es escogido de acuerdo a un puntaje que toma en cuenta energía del campo de fuerza, impedimentos estéricos e interacciones favorables como formación de enlaces de hidrógeno. En aquellos casos en que el CSP no proporcione una solución satisfactoria, se busca en una biblioteca de bucles derivada de estructuras experimentales para encontrar fragmentos compatibles (Schwede *et al.*, 2003). Todo esto que ha sido expuesto sobre la modelación de bucles, es realizado también automáticamente por SM, pero se incluye aquí porque esta parte de los métodos tiene relevancia con respecto a lo expuesto en la sección de discusión. Los procedimientos que siguen son mas superficiales, pero requieren mas intervención del usuario.

Pulimiento en DV de cada modelo: Cada uno de los cinco modelos fueron pulidos localmente en DV, de la siguientes dos formas: Arreglo de Cadenas Laterales [Seleccionar: amino acidos (aa) chocantes (Select aa making clashes), aa chocantes con el esqueleto (aa making clashes with Backbone), cadenas sin enlaces de Hidrógeno apropiados (sidechains lacking proper H-Bonds) | Herramientas (Tools): Arreglar Cadenas Seleccionadas (Fix

Selected Side Chains): Arreglar Rápido y Sucio (Fix Quick and Dirty: FQDs)] y la Minimización de Energía [Herramientas (Tools: Energy Minimisation). Este proceso es llevado a cabo por los cálculos que *in vacuo* realiza el campo de fuerza Gromos 96 (Gunsteren *et al.*, 2009; Scott *et al.*, 1999; <http://www.igc.ethz.ch/gromos>) incorporado en DV. Este campo de fuerza permite medir [en Kilojoules por mol (KJ/mol)] y minimizar la energía potencial de la estructura (Rueda-Borrego, 2005; Scott *et al.*, 1999), reparando geometrías distorsionadas (Guex *et al.*, 2008) por medio de la reacomodación de ciertos átomos de aminoácidos (aa) y así lograr que el modelo se acerque más a la realidad. El cálculo y minimización de energía requiere que el extremo amino-terminal de cada modelo (y después de la proteína completa) sea protonado, adicionandose un grupo HHT, mientras que al extremo carboxi-terminal se le agrega un oxígeno (grupo OXT). Esto es hecho automáticamente por DV. De acuerdo a las pruebas y recomendaciones de los tutoriales (Guex *et al.*, 2008; Rhodes, 2008), se hicieron rondas de FQDs y “Steepest Descent” (SDs) en cantidades diferentes, de modo que cada modelo llegue a un mínimo local de energía. Cada minimización de energía se hizo con todos los aa seleccionados en el Panel de Control de DV.

Ensamblaje de los modelos: El primer paso para lograr este objetivo fue la extracción de cada uno de los cinco modelos de sus plantillas experimentales, pues DV no está maximizado para trabajar con proteínas multidominio con varias plantillas. Una vez lograda la extracción de los cinco modelos, los mismos fueron pre-ensamblados por medio del comando Ajustar Moléculas desde la Selección (Fit: Fit Molecules from Selection) y ensamblados con el comando Editar: Crear Capa Fusionada (Edit: Create Merged Layer), de acuerdo al siguiente orden:

- R1-2 + R2-5 = R1-5 | R3-7 + R6-8 = R3-8 | R8-10
- R1-5 | R3-8 + R8-10 = R3-10
- R1-5 + R3-10 = R1-10

El pre-ensamblaje de las parejas de modelos fue logrado gracias a los fragmentos de aminoácidos que tenían en común. Por ejemplo el final de R1-2 tiene una región de sobreposición idéntica (secuencialmente hablando) a la del comienzo de R2-5. Estas regiones en común o fragmentos de solapamiento sirvieron para pre-ensamblar parejas de modelos. En cambio el ensamblaje de cada una de las parejas se hizo teniendo en cuenta un solo fragmento de solapamiento [el que más coincidencias tenía (antes de su extracción) con su plantilla(s)], pues DV no fusiona en una sola capa dos fragmentos de solapamiento. En resumen es

un proceso que involucra la extracción de los modelos de sus plantillas, después de lo cual sigue el pre-ensamblaje con el cual se logra posicionar un modelo con respecto al otro gracias a la coincidencia atómica posicional que se puede lograr entre los fragmentos de solapamiento. Y el ensamblaje como tal consiste en que los dos modelos sean fusionados en una sola capa (layer) para lo cual se excluye el fragmento de solapamiento que menos coincidencias mostraba con sus plantillas [esto se determina de acuerdo a los alineamientos entre cada modelo y sus plantillas, los cuales están disponibles como Material Suplementario (<http://sites.google.com/site/juanferduque/dm64-3d-in-silico-suplemento>)]. Cuando se repite este proceso de acuerdo al anterior orden, se logra una aproximación al ensamblaje completo de la proteína DM64 completa (5 dominios), así DV no esté maximizado para trabajar con proteínas multidominio.

Pulimiento de toda la subunidad (cinco dominios) de DM64: Siguiendo los mismos procedimientos hechos para cada modelo se pulió localmente el modelo completo obtenido utilizando los comandos Herramientas (Tools): Arreglar Cadenas Seleccionadas (Fix Selected Side Chains: FQD) y Herramientas (Tools): Minimización de Energía (EM). La cantidad de rondas FQDs y EMs (SDs) realizadas se evaluó por medio de ensayo-error de modo que se lograra la menor cantidad de cadenas laterales problemáticas y el mínimo de energía potencial posible, respectivamente.

Mediciones adicionales: Se midió la RMSD con el comando Ajustar: Calcular RMSD (Fit: Calculate RMSD): Root Mean Square Distance = Raíz de la Desviación Cuadrática Media. Esta medida se refiere a la distancia entre los átomos del modelo logrado y aquellos de las

plantillas experimentales. Por diferencia en la cantidad de átomos DV no pudo calcular la distancia de todos los átomos de cada modelo vs. sus plantillas. Se pudo calcular la distancia entre Carbonos Alfa (CA), y átomos del esqueleto de las proteínas (Backbone: BB). Estos cálculos fueron hechos por aparte para cada uno de los modelos de los cinco dominios de DM64, pues estos no pudieron ser ensamblados con sus plantillas respectivas, por lo cual la RMSD total de DM64 fue calculada como un promedio total (tabla 8).

También se midieron los ángulos interdominio. Neves-Ferreira *et al.* (2002) reportan un ángulo interdominio para DM43, pero no explican como lo miden, y tampoco se encontraron otras referencias que aclaren este punto. Es más, según Lehtinen *et al.* (2004), al menos para el caso de los ángulos interdominio de los dominios repetidos consensuales cortos adyacentes (SCR), la comparación de los ángulos reportados ha sido difícil porque las metodologías de cálculo son diferentes y pobremente documentadas. Se midieron entonces estos ángulos con DV, teniendo en cuenta tres puntos para cada ángulo, de acuerdo metodología ilustrada en la figura 1: Carbono α del último amino-ácido de la última hebra que preceda el bucle que forma la articulación (C α E405 en ejemplo de figura 1), carbono alfa del aminoácido más tangencial del bucle que forma la articulación (C α L408 en ejemplo de figura 1) y carbono alfa del primer aminoácido de la primera hebra que sigue después del bucle articular (C α T412 en ejemplo de figura 1). Este ejemplo corresponde a la articulación entre el cuarto y quinto dominio del modelo de DM64 logrado aquí. Se siguió la misma metodología aún en los casos en que los dominios quedaron modelados inconexamente. Los resultados de las mediciones de estos ángulos se reportan en la tabla 9.

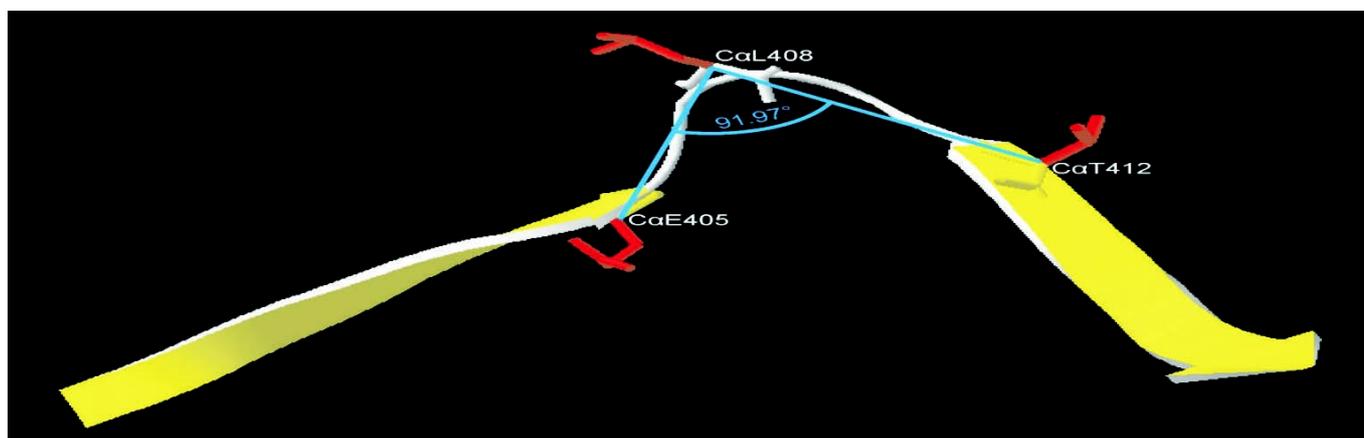


Figura 1. Metodología para la Medición de los Ángulos Articulares Interdominio. Medidos teniendo en cuenta tres carbonos (C α) de acuerdo a metodología expuesta en el párrafo anterior. Bucle en gris claro, hebras en amarillo, cadenas laterales en rojo, y ángulo articular interdominio en azul.

Resultados

División de DM64 en Regiones con el Programa EMBL/SMART: Se abordó la distribución de los dominios de DM64, reconociendo este programa las siguientes regiones (figura 2), a partir de la secuencia aminoacídica de DM64 (gi 21309806: anexo 6.1) tomada del NCBI:

Por lo tanto de acuerdo a EMBL/SMART, DM64 tendría cuatro dominios tipo Ig y no cinco como lo sugieren **Rocha et al.** (2002). Para corroborar esto, se sometieron al programa EMBL/SMART la secuencia aminoacídica más completa de ?1BG encontrada y la única secuencia aminoacídica de DM43 (gi 24954693) disponible en NCBI [datos mostrados en Material Suplementario (<http://sites.google.com/site/juanferduque/dm64-3d-in-silico-suplemento>)], evidenciándose el mismo fenómeno: SMART no reconoce el segundo dominio Ig de estas proteínas, al contrario de que lo es reportado en la literatura (**Neves-Ferreira et al.**, 2002; **Rocha et al.**, 2002), por lo cual se considera esto como algo consistente que permite seguir tomando a DM64 como una proteína de cinco dominios tipo Ig.

Modelos preliminares: Después de varias pruebas, obtuvieron cinco modelos preliminares correspondientes las siguientes regiones (figura 2, tabla 1 y 2): 1-2, 2-5, 3-7, 6-8 y 8-10. La secuencia de cada modelo y su posición en la secuencia total es mostrada la tabla 2, la cual fue hecha fusionando los datos emanados de SMART (figura 2 y tabla 1), secuencia aminoacídica de DM64 y porciones

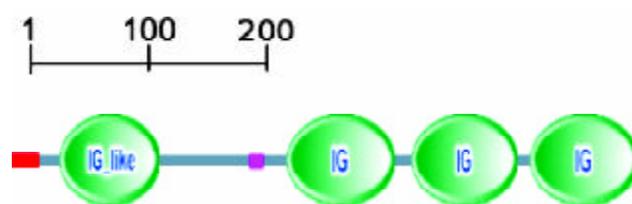


Figura 2. Distribución de los Dominios de DM64 Según EMBL/SMART. La secuencia aminoacídica de DM64 (gi: 21309806; Anexo 6.1) tomada del NCBI se sometió al programa SMART el cual, comparando con la estructura conocida para proteínas contenidas en la base de datos del EMBL, detectó estos dominios en DM64. Los óvalos representan dominios IG o tipo IG pero no pretenden representar ningún tipo de estructura 3D. La escala numérica representa cantidad y posiciones aminoacídicas. Estas posiciones son especificadas en la tabla 1.

modeladas por SM. No se tuvo en cuenta la región 1 emada por SMART porque la misma corresponde al péptido señal el cual se cliva durante la maduración de la proteína (**Cooper**, 2000), por lo cual DM64 se modeló sin estos aminoácidos. Este hecho se ve reflejado en la reenumeración aminoacídica llevada a cabo en la tabla 1.

En la tabla 3 se encuentra la lista y bibliografía de los modelos experimentales utilizados como plantillas por SM para modelar a DM64. Las plantillas experimentales usadas por SM son todas las estructuras experimentales disponibles en Protein Data Bank, que tenían al menos un 25% de homología (**Schwede et al.**, 2003) con DM64. Estas plantillas experimentales corresponden a receptores del sistema inmune, como podría esperarse de la filogenia

Tabla 1. Posiciones en la Secuencia Aminoacídica de DM64 (gi 21309806) según EMBL/SMART. La información emanada por SMART en las primeras dos columnas, y la reenumeración hecha después de descartar el péptido se señala en las últimas dos columnas.

Posiciones aminoacídicas según SMART	Tipo de región/dominio según SMART	Regiones utilizadas en este trabajo	Posiciones aminoacídicas sin péptido señal
1 a 23	Péptido Señal (PS)		
24 a 38	Región Desconocida (RD)	1	1 a 15
39 a 118	Dominio tipo Inmunoglobulina (Dominio Tipo Ig)	2	16 a 95
119 a 189	RD	3	96 a 166
190 a 202	Región de complejidad baja	4	167 a 179
203 a 220	RD	5	180 a 197
221 a 307	Dominio Ig	6	198 a 284
308 a 319	RD	7	285 a 296
320 a 405	Dominio Ig	8	297 a 382
406 a 414	RD	9	383 a 391
415 a 502	Dominio Ig	10	392 a 481

Tabla 2. Regiones Correspondientes a los Cinco Modelos Preliminares Emanados de SM.D: Dominio; Ig: Inmunoglobulina; RCB: Región de Complejidad Baja; RD: Región Desconocida. Los aminoácidos subrayados corresponden a las regiones modeladas por SM y en negrita las regiones de sobreposición entre los cinco modelos (Regiones: 1-2, 2-5, 3-7, 6-8 y 8-10).

Región	Inicio	Aminoácidos	Final
1	RD	1 LLAMETTPRL WIETE	15
2	D1 (Ig)	16 SPSTPWTNVT LQCVATNTEA LSFQLWKDGE LLSTLPPMGL VGKFSLGPVT DDNRGLYRCR ILMFENTWTS PSEPVEVTGK	95
3	D2 (RD)	96 EPLPAPLLRA DPGPWILHGL ETKLHCQGV LGMIFDLYQE GEQEPVRSRSH TPGTEATFIV NNTGNYSCLY R	166
4	RCB	167 APAPASSVNS APS	179
5	RD	180 ETIHVVIPDL LPKPDFHI	197
6	D3 (Ig)	198 <u>YDNQVIRPGD SVTFGCWGRF SGLFKLFDK GQEVFVKQS SKDPKHIFYE LTALGPEDGG KYSCRFRFRN GPPIWSEDSK QLELVLT</u>	284
7	RD	285 <u>TETLAKPSLS VE</u>	296
8	D4 (Ig)	297 <u>POETVISRGT KVTMRCQGAQ PNKVFLLKK GSPGHTLVLS SPESHVDFVL PNILSYDTGN FSCLYVQTEA PFAGSORSED VEIRVE</u>	382
9	RD	383 <u>GLLPKPTLH</u>	391
10	D5 (Ig)	392 PVHPVVAQGR DAILHCSGKI PNAHFQLFKD GEHEELEVSV LPIDDHAVNF LLKNINRQQG GKYRCRYTTR EDPILESEMS DPaelQVTQQ	481

Tabla 3. Modelos Experimentales Usados por SM como Plantillas para Modelar las Cinco regiones de DM64. Los siguientes datos fueron obtenidos del NCBI a partir los códigos de las plantillas visibles en la ventana de alineamiento de DV. Con estos códigos, y buscando en la base de datos de proteínas del NCBI, se pueden obtener datos adicionales de cada estructura, como su bibliografía, secuencia, etc. En la primera columna de esta tabla se incluyen las regiones de DM64 modeladas (tabla 2) para clarificar que plantillas fueron utilizadas por SM-DV en cada uno de los cinco modelos. Se calcularon básicamente dos clases de homología (HL): estricta y promedio. El % de HL estricta de cada región con cada plantilla está entre paréntesis debajo del código de cada plantilla. A estos % de HL estricta de cada plantilla se sacó un promedio para cada región. Este resultado está indicado por \bar{x} en la primera columna. En la misma columna está indicado por X_i el porcentaje de HL estricta de cada región con todas sus plantillas a la vez. Al final de la tabla se muestran los totales de homología estricta (promedio de X_i s) y promedio (promedio de \bar{x} s). Los porcentajes de HL de cada región con sus plantillas fueron hallados analizando los alineamientos emanados por DV en el programa MEGA [Molecular Evolutionary Genetic Analysis versión 3.1 (Kumar *et al.*, 2004): <http://www.megasoftware.net/>].

Región de DM64 (% HL)	Código (% HL)	Definición
R1-2 ($X_i=32.73\%$) ($\bar{X}=32.73\%$)	1o11A (32.73%)	Cadena A, Región Extracelular del Receptor Humano NKp46.
	1p6fA (32.73%)	Cadena A, Estructura del Receptor de Citotoxicidad Natural Humano NKp46.
R2-5 ($X_i=27.1\%$) ($\bar{X}=28.22\%$)	1efxD (27.1%)	Cadena D, Estructura de un Complejo entre Receptor de Células Asesinas Humano KIR2DL2 y Ligando MHC Clase 1 HLA-Cw3.
	1efxE (28.97%)	Cadena E, Estructura de un Complejo entre Receptor de Células Asesinas Humano KIR2DL2 y Ligando MHC Clase 1 HLA-Cw3.
	2dliA (27.1%)	Cadena A, Receptor de Células Asesinas para Inmunoglobulinas 2DL2, Forma Trigonal.
	2dl2A (28.97%)	Cadena A, Receptor de Células Asesinas para Inmunoglobulinas 2DL2.
	1b6u (28.97%)	Estructura Cristalográfica del Receptor Inhibitorio de Células Asesinas Humanas KIR2DL3 Específico para Alelos Relacionados con HLA-Cw3.

Continuación Tabla 3. Modelos Experimentales Usados por SM como Plantillas para Modelar las Cinco regiones de DM64.

Región de DM64 (% HL)	Código (% HL)	Definición
R3-7 ($X_i = 15.87\%$) ($\bar{X} = 22.86\%$)	1uctA (22.75%)	Cadena A, Estructura Cristalográfica del Fragmento Extracelular del Receptor I Fc Alpha (Cd89).
	1ow0C (22.22%)	Cadena C, Estructura Cristalográfica del FcaRI Humano Ligado a IgA1-Fc.
	1ow0D (22.75%)	Cadena D, Estructura Cristalográfica del FcaRI Humano Ligado a IgA1-Fc.
	1ovzA (22.22%)	Cadena A, Estructura Cristalográfica del FcaRI Humano
	1ugnA (24.34%)	Cadena A, Estructura Cristalográfica de Lir1.02, uno de los Alelos de Lir1.
R6-8 ($X_i = 14.2\%$) ($\bar{X} = 25.44\%$)	1ollA (28.4%)	Cadena A, Región Extracelular del Receptor Humano NKp46.
	1p6fA (28.4%)	Cadena A, Estructura del Receptor de Citotoxicidad Natural Humano NKp46.
	2gw5A (24.85%)	Cadena A, Estructura Cristalográfica de Lir-2 (Ilt2) en 1.8: Diferencias de Lir-1 (Ilt2) en Regiones Implicadas en el Enlace del Homólogo MHC U18 del Citomegalovirus Clase I.
	2d3vA (22.49%)	Cadena A, Estructura Cristalográfica del Receptor A5 tipo Ig de Leucocitos (Lilra5LIR9ILT11).
	1p7qD (23.08%)	Cadena D, Estructura Cristalográfica de Hla-A2 Ligado a Lir-1, Un Hospedero y un Receptor MHC Viral
R8-10 ($X_i = 10.87\%$) ($\bar{X} = 25.87\%$)	1g0xA (29.89%)	Cadena A, Estructura Cristalográfica del Dominio de Enlace de Lir-1 (ILT2).
	2d3vA (22.28%)	Cadena A, Estructura Cristalográfica del Receptor A5 tipo Ig de Leucocitos (Lilra5LIR9ILT11).
	1ugnA (27.72%)	Cadena A, Estructura Cristalográfica de Lir1.02, uno de los Alelos de Lir1.
	1p7qD (27.17%)	Cadena D, Estructura Cristalográfica de Hla-A2 Ligado a Lir-1, Un Hospedero y un Receptor MHC Viral
	1b6u (22.28%)	Estructura Cristalográfica del Receptor Inhibitorio de Células Asesinas Humanas KIR2DL3 Específico para Alelos Relacionados con HLA-Cw3.
20.15% Homología Total Estricta (Promedio de X_is)		
27.02% Homología Total Promedio (Promedio de \bar{X}s)		

de la FSIG, esquematizada por Hood *et al.* (1985) en la cual se ve que las 7 IBGs (que incluyen las proteínas tipo DM) pertenecen al linaje del receptor Poli-Ig. Si SM no utilizó más plantillas, es que porque no habían más estructuras experimentales que cumplieran los requisitos nombrados.

Resometimiento de cada modelo a SM desde DV en modalidad de optimización: Cada modelo y sus plantillas fueron sometidos a SM desde DV para ser optimizado. Después de varias pruebas, quedo claro que resometer, en modalidad optimizada, cada modelo más de una vez a SM no mejora el mismo, sino que esto incluso introduce gaps inútiles que podrían rebajar la calidad del modelo; por lo cual los siguientes son los resultados de una optimización para cada modelo, reportados en la tabla 4.

Pulimiento en DV de cada modelo: Cada modelo fue mejorado por medio del arreglo de la disposición de cadenas laterales problemáticas y de minimización de energía. El arreglo de cadenas laterales aumenta el número de cho-

ques, pero si se compara el número total de cadenas laterales problemáticas (choques + CLs sin enlaces de H apropiados) iniciales y finales (Tabla 5), se podrá ver que este número total disminuye después de los FQDs. Y disminuirá aún más con las minimizaciones de energía. Los resultados del arreglo de cadenas laterales y de la minimización de energía se reportan en las tablas 5 y 6, respectivamente.

Ensamblaje de los modelos: De acuerdo al orden de apareamiento explicado en métodos, se logró el siguiente modelo preliminar (figura 3), cuyos parámetros quedan expuestos en la tabla 7.

Pulimiento de toda la subunidad (cinco dominios) de DM64: Haciendo los mismos arreglos hechos para cada modelo se obtuvieron los siguientes resultados al utilizar los comandos Tools: Fix Selected Side Chains: Quick and Dirty y Tools: Energy Minimización (EM) en el modelo completo.

Tabla 4. Resultados de Una Optimización de Cada Modelo en SM. Cadena lateral (CL), Coincidencias se refiere a aminoácidos idénticos con plantilla(s): * modelo con una plantilla; ** modelo con cinco plantillas.

Item	R1-2	R2-5	R3-7	R6-8	R8-10
Aminoácidos con choques	22	0	0	0	0
Aminoácidos con choques esqueléticos	7	0	0	0	0
CLs sin Enlaces H Apropriados	47	46	61	65	58
Coincidencias	36*	29**	30**	24**	20**
Pulimiento: →	Una Optimización en SM				
Aminoácidos con choques	0	0	0	0	0
Aminoácidos con choques esqueléticos	0	0	0	0	1
CLs sin Enlaces H Apropriados	31	34	54	55	56
Coincidencias	36*	29**	30**	24**	20**

Tabla 5. Resultados del Arreglo de las Cadenas Laterales (CLs). CLs arregladas con el protocolo Fix Quick and Dirty (FQD). Aminoácidos (aa), Esqueleto proteico (BB: Backbone), Enlace de Hidrógeno Apropriado (EHA). Energía medida como el campo de fuerza en Kilojoules/mol.

Item	R1-2	R2-5	R3-7	R6-8	R8-10
aa con choques	0	0	0	0	0
aa con choques BBs	0	0	0	0	1
CLs sin EHAs	31	34	54	55	56
Energía	679.497	-1,366.442	-412.846	4,716.173	2,303.241
Pulimiento: →	3 FQDs				
aa con choques	4	2	11	4	8
aa con choques BBs	1	1	3	5	4
CLs sin EHAs	21	22	35	35	30
Energía	977,081.813	14,733.434	108,348.258	127'203,744	94,335.961

Tabla 6. Resultados de la Minimización de Energía. Aminoácidos (aa), Esqueleto proteico (BB: Backbone), Cadena lateral (CL), Enlace de Hidrógeno Apropriado (EHA). Minimización de Energía hecha con rondas de Steepest Descent (SD) y medida como el campo de fuerza en Kilojoules/mol.

Item	R1-2	R2-5	R3-7	R6-8	R8-10
aa con choques	4	2	11	4	8
aa con choques BBs	1	1	3	5	4
CLs sin EHAs	21	22	35	35	30
Energía	977,081.813	14,733.434	108,348.258	127'203,744	94,335.961
Pulimientos: →	41 SDs	14 SDs	45 SDs	44 SDs	41 SDs
aa con choques	0	0	0	0	0
aa con choques BBs	0	1	0	0	0
CLs sin EHAs	20	49	31	38	35
Energía	-6.019	-8.163	7.898	-0.216	13.064

Tabla 7. Resultados del Arreglo de Cadenas Laterales (CLs) en toda la Subunidad de DM64 (cinco Dominios, R1-10). CLs arregladas con el protocolo Fix Quick and Dirty (FQD). Aminoácidos (aa), Esqueleto proteico (BB: Backbone), Enlace de Hidrógeno Apropriado (EHA).

Item	R1-10
aa con choques	53
aa con choques BBs	23
CLs sin EHAs	95
Pulimiento: →	2 FQDs
aa con choques	32
aa con choques BBs	15
CLs sin EHAs	82
Pulimiento: →	52 SDs
aa con choques	0
aa con choques BBs	0
CLs sin EHAs	82
Energía	-94.565

Mediciones adicionales: Se reportan en la tabla 8 las RMSDs del modelo DM64 con respecto a sus plantillas experimentales. Y en la tabla 9 se reportan los resultados de las mediciones angulares.

Otros métodos de evaluación de un modelo, disponibles desde DV incluyen: colorear el mismo de acuerdo a los Factores B (índice de aa más móviles o inestables), Energía de Enhebramiento (razonabilidad de la ubicación de un aa de acuerdo a su tipo y ambiente) y Accesibilidad. Estos métodos de evaluación gráfica se incluyen como Material Suplementario (<http://sites.google.com/site/juanferduque/dm64-3d-in-silico-suplemento>). Además Swiss Model incluye programas de evaluación como Anolea, Verify 3D y QMEAN. Este último programa, entre otros indicadores, emite un potencial de solvatación, por lo cual junto con la herramienta de colorear por accesibilidad, pueden ser útiles de cara a hacer simulaciones con modelos explícitos o implícitos de solvatación. No se utilizaron estos y otros programas de evaluación disponibles en Swiss Model porque éste es un modelo preliminar, y porque uno de los objetivos principales era compararlo globalmente con aquel logrado por *Neves-Ferreira et al.* (2002) para DM43, tarea que se logró como se verá a continuación en la Discusión. Por todo esto, la evaluación hecha del modelo de DM64 aquí presentado por medio de la RMSD y la Energía Potencial con el Campo de Fuerza GROMOS96, fue suficiente, por ahora. Teniendo en cuen-

Tabla 8. RMSDs entre los Carbonos Alfa (CAs) y Átomos del Esqueleto (BBs) de los Cinco Fragmentos Modelados de DM64 y sus Plantillas. Al final de esta tabla, en negrita, están los promedios de cada columna y el promedio total. Los códigos de cada plantilla y su bibliografía son explicados en la tabla 5.

Región de DM64 (RMSD Promedio en Å)	Plantilla Experimental (RMSD Promedio en Å)	Átomos Involucrados: RMSD en Å
R1-2 (0.73)	1ollA (0.72)	CAs: 0.7 BBs: 0.73
	1p6fA (0.73)	CAs: 0.71 BBs: 0.74
R2-5 (1.87)	1efxD (1.67)	CAs: 1.66 BBs: 1.67
	1efxE (1.81)	CAs: 1.81 BBs: 1.81
	2dliA (1.8)	CAs: 1.81 BBs: 1.79
	2dl2A (2.19)	CAs: 2.2 BBs: 2.17
R3-7 (2.23)	1b6u (1.9)	CAs: 1.92 BBs: 1.87
	1uctA (1.35)	CAs: 1.35 BBs: 1.34
	1ow0C (1.68)	CAs: 1.68 BBs: 1.67
	1ow0D (2.48)	CAs: 2.47 BBs: 2.49
	1ovzA (2.45)	CAs: 2.45 BBs: 2.45
R6-8 (2.3)	1ugnA (3.2)	CAs: 3.21 BBs: 3.19
	1ollA (1.81)	CAs: 1.82 BBs: 1.8
	1p6fA (1.78)	CAs: 1.78 BBs: 1.77
	2gw5A (2.72)	CAs: 2.73 BBs: 2.70
	2d3vA (2.1)	CAs: 2.12 BBs: 2.07
R8-10 (2.38)	1p7qD (3.08)	CAs: 3.1 BBs: 3.05
	1g0xA (1.57)	CAs: 1.56 BBs: 1.58
	2d3vA (2.73)	CAs: 2.76 BBs: 2.7
	1ugnA (2.08)	CAs: 2.08 BBs: 2.07
	1p7qD (2.86)	CAs: 2.86 BBs: 2.85
	1b6u (2.65)	CAs: 2.66 BBs: 2.63
Rango entre 0.72 y 3.2 Å RMSD		

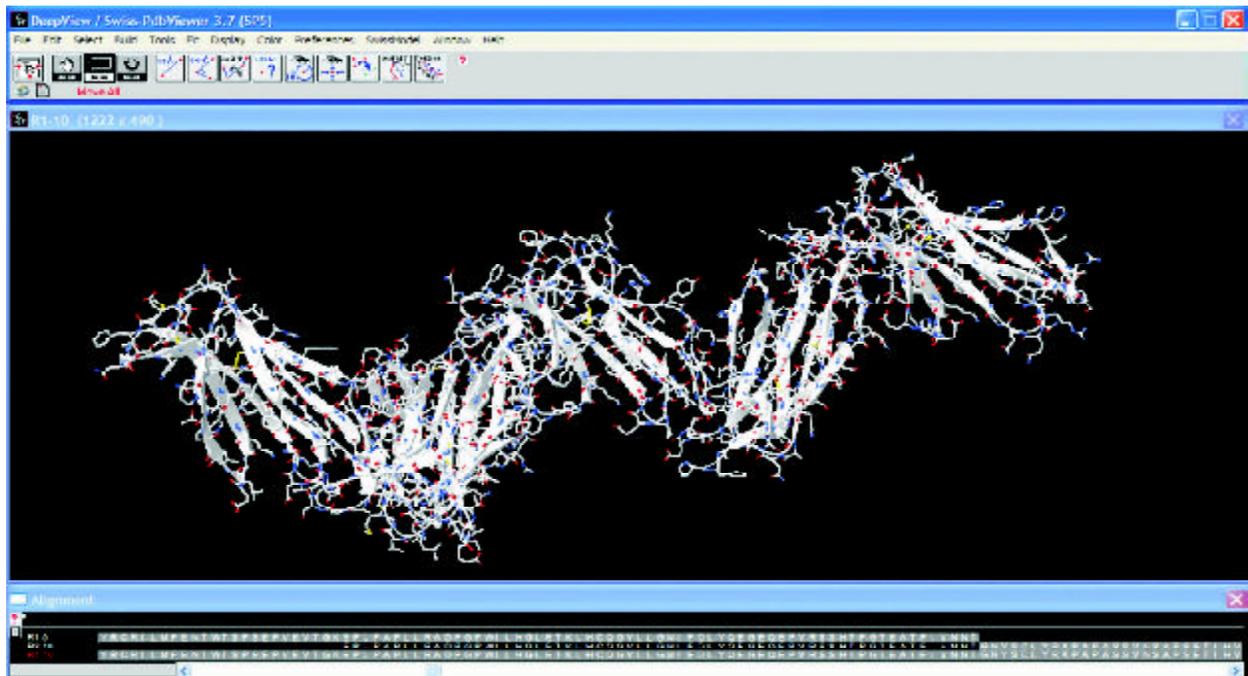


Figura 3. Ensamblaje de las Regiones 1-5 y 3-10. Después de pre-ensamblar estas dos regiones con sus zonas de sobreposición (EPLP....VNNT), en la ventana inferior (Alignment), se utiliza el comando Edit: Create Merged Layer, para ensamblar las dos regiones, y lograr un modelo compuesto de izquierda a derecha por los Ds: 1, 2, 3, 4 y 5 de DM64. Modelo renderizado con cadenas laterales.

Tabla 9. Ángulos Articulares Interdominio del Modelo de DM64 reportados en grados (°)

D1-D2	103.42
D2-D3	108.26
D3-D4	119.12
D4-D5	91.97
Rango	91.97 a 119.12

ta todo esto y el hecho de que el último paso en el proceso de modelamiento, es la evaluación del modelo (Schwede *et al.*, 2003), se incluye el nombrado Material Suplementario.

Discusión y conclusiones

Homologías entre DM64 y plantillas de modelamiento:

El porcentaje total promedio de homología entre DM64 y las plantillas asignadas por SM fue de 27.02% HL promedio (promedio de \bar{X}_s) y solo del 20.15% de HL estricta (promedio de X_s). Todos estos porcentajes están por debajo de lo recomendado para hacer modelos por homología *in silico*, pues por ejemplo Guex *et al.* (1999) dicen que errores de alineamiento aparecen cuando el modelo y sus plan-

tillas tienen una homología menor del 40%. Entonces aunque homologías tan bajas no son recomendables para modelar una proteína por homología *in silico*, hay varios hechos que le dan validez al modelo reportado en esta investigación: con homologías comparables se modeló una proteína íntimamente relacionada con DM64, es decir el modelo de DM43 logrado por Neves-Ferreira *et al.* (2002). El otro hecho es haber logrado el modelo de DM64, pues si la homología hubiera sido tan baja como para no hacer un modelo, al menos aproximado, SM no hubiera devuelto los cinco fragmentos modelados, pues de acuerdo a Schwede *et al.* (2003) el proceso de modelamiento automático es llevado a cabo cuando al menos hay una homología del 25% entre el fragmento a modelar y al menos una de las plantillas experimentales. Otro resultado que le da credibilidad al modelo preliminar de DM64 presentado es su fuerza potencial (-94.565 KJ/mol), pues si bien no se encontraron referencias que indiquen que validez le da este valor al modelo logrado aquí, Kopp & Schwede (2004) dicen que en la base de datos de estructuras 3D de proteínas modeladas por homología, Swiss Model Repository, solo se incluyen modelos con un mínimo de 40% de homología con sus plantillas, 45 residuos o más y menos de 200 KJ/mol de fuerza potencial. Exceptuando el primer criterio, los otros

dos son cumplidos por el modelo de DM64 presentado aquí. Otro resultado que le da validez al modelo presentado es que a grandes rasgos la distribución de bucles y hebras β logrados para DM64 se corresponden a los presentados por DM43 por *Neves-Ferreira et al.* (2002). Con respecto a esto último se incluye la figura 4 para nutrir la discusión del modelo logrado aquí, y poder comparar la distribución de estructuras secundarias entre las dos proteínas. El sistema utilizado (SM-DV) y la baja homología de DM64 con las plantillas experimentales usadas explican las limitaciones del modelo logrado en este trabajo.

Sitios putativos de N-glicosilación de DM64: Según *Rocha et al.* (2002) el componente glicosilado de DM64 corresponde al 15% de su masa. De acuerdo a estos autores los posibles sitios de N-glicosilación de DM64 (cajas amarillas en figura 4) son: 23, 156, 160, 356. DM43 tiene un porcentaje de glicosilación de 21% y contiene la misma cantidad (cuatro) de sitios putativos de glicosilación que DM64. De todo esto se puede concluir que DM43 tiene un componente en carbohidratos más denso que DM64, lo cual deja abierta la posibilidad de relacionar este hecho con sus diferencias funcionales. Sin embargo también cabe

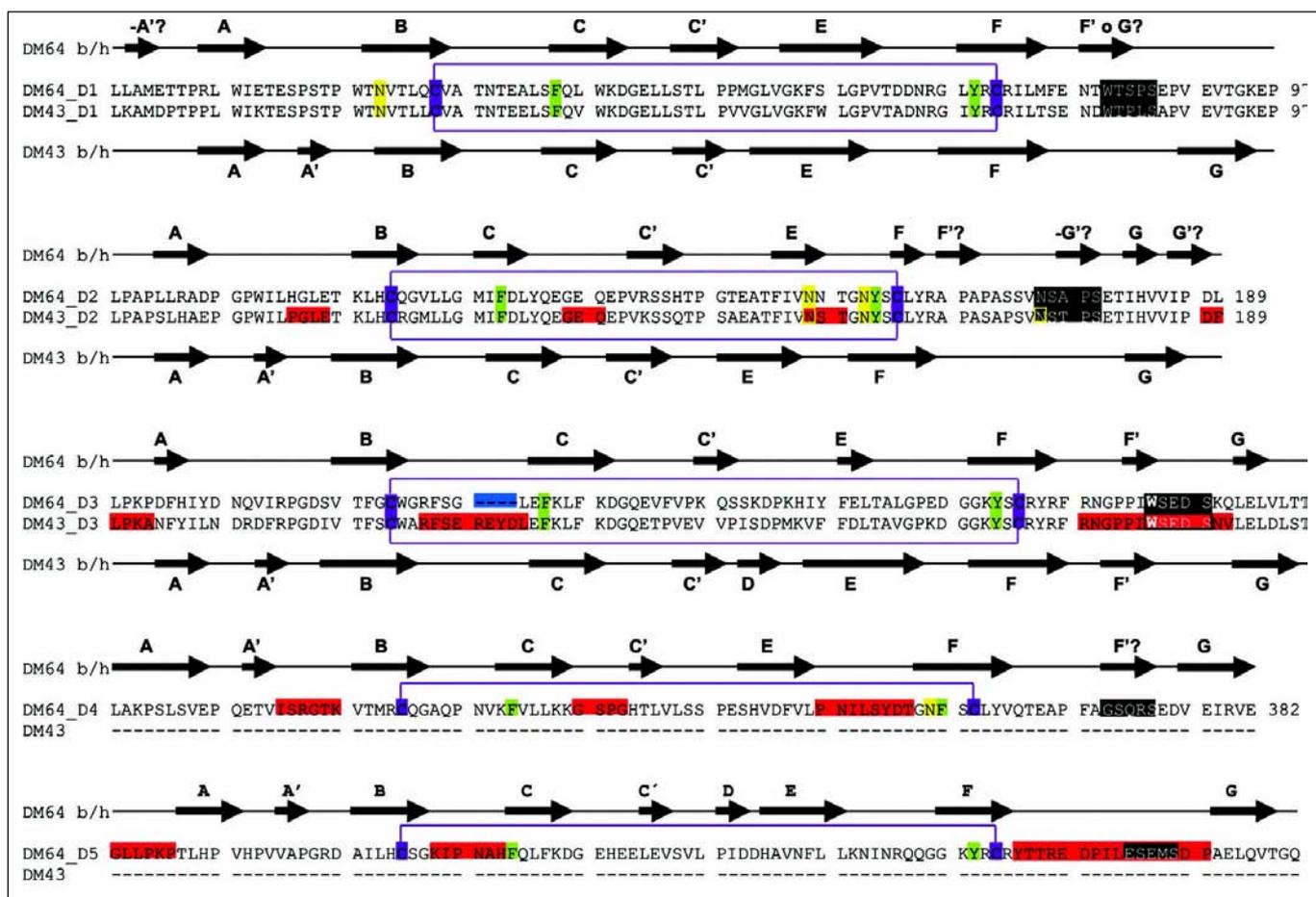


Figura 4. Alineamiento de DM43 y DM64. Este alineamiento fue exportado de MEGA/Clustal-W siguiendo los datos de estructura secundaria de *Rocha et al.* (2002) y *Neves-Ferreira et al.* (2002), para DM64 y DM43, respectivamente, y etiquetado en MS Word. En cajas amarillas los sitios de N-glicosilación, de los cuales hace parte el sitio N175 (marco amarillo) de DM43, el cual también conforma el comienzo a la segunda caja degenerada de triptófano de esta última proteína. Las cisteínas y los puentes disulfuro que forman están denotados en violeta. Los aminoácidos aromáticos conservados [Fenilalanina (F) y Tirosina (Y)], típicos del pliegue Ig, están demarcados por cajas verdes. Se señalan las cajas degeneradas de triptófano en cuadros negros. Un gap en DM64, que según *Rocha et al.* (2002) estaría explicando parte de las diferencias funcionales entre DM64 y DM43, está demarcado en una caja azul. Las flechas indican las hebras β (letras A a la G), asignadas para DM64 por SM-DV. Entre estas flechas se encuentran los bucles, denotados por líneas más delgadas. Esta distribución de bucles/hebras (b/h) quedó plasmada para DM64 en la figura 7. Las hebras de DM64 para las cuales no se pudo establecer una correspondencia inequívoca con las DM43 están acompañadas de ?. El menos (-) se refiere a una hebra prima (') que está antes de la hebra correspondiente principal (sin ').

preguntar porque el sitio 175 de DM64 (principio de la caja degenerada de triptófano del segundo dominio) no lo incluyen **Rocha *et al.*** (2002) como uno de glicosilación putativa, dado que alinea con una asparagina correspondiente en DM43 (N175), que fue incluida por **Neves-Ferreira *et al.*** (2002) como posible sitio de glicosilación de esta última proteína.

En la figura 5 se ve como se ubican los sitios de N-glicosilación que tiene DM64 en el modelo logrado aquí. Como se puede ver en esta figura, las cadenas laterales de las Asparaginas que constituyen estos sitios, están orientadas hacia la parte exterior de cada dominio, como era esperado. Por lo tanto, este es otro hecho que le ayuda a dar validez al modelo presentado en este trabajo. Los Dominios (D) 3 y 5 de DM64 no tienen sitios de glicosilación según los mismos autores y por ende no fueron incluidos en esta figura.

Puentes disulfuro y aminoácidos aromáticos conservados, típicos del pliegue Ig: Al igual que DM43, DM64

tiene dos residuos de Cisteína (cajas violeta en figura 13) entre los hebras B y F de cada dominio, que estarían formando el clásico puente disulfuro inter-lámina del pliegue de las inmunoglobulinas, y que les estarían brindando a las proteínas de la FSIG estabilidad estructural (**Neves-Ferreira *et al.***, 2002). Para el caso de DM64 estos puentes se extienden entre (violeta en figura 4) las cisteínas 28-74 en el primer Dominio (D), 121-163 en el segundo D, 213-261 en el tercer D, 312-359 en el cuarto D, y 407-456 en el quinto D, siguiendo a **Rocha *et al.*** (2002). Además de esto, y al igual que en DM43 y α 1BG (**Neves-Ferreira *et al.***, 2002; **Rocha *et al.***, 2002), DM64 contiene los aminoácidos aromáticos [Fenilalanina (F) y Tirosina (Y)] en posiciones conservadas, lo cual es típico del pliegue Ig (residuos en verde en figura 4).

Cajas de triptófano y articulación D2-D3: Al igual que DM43 y α 1BG (**Neves-Ferreira *et al.***, 2002), DM64 también presenta una caja degenerada de triptófano WSXWS en cada uno de sus cinco dominios (**Rocha *et al.***, 2002). Este motivo secuencial se encuentra entre las hebras F y G de los

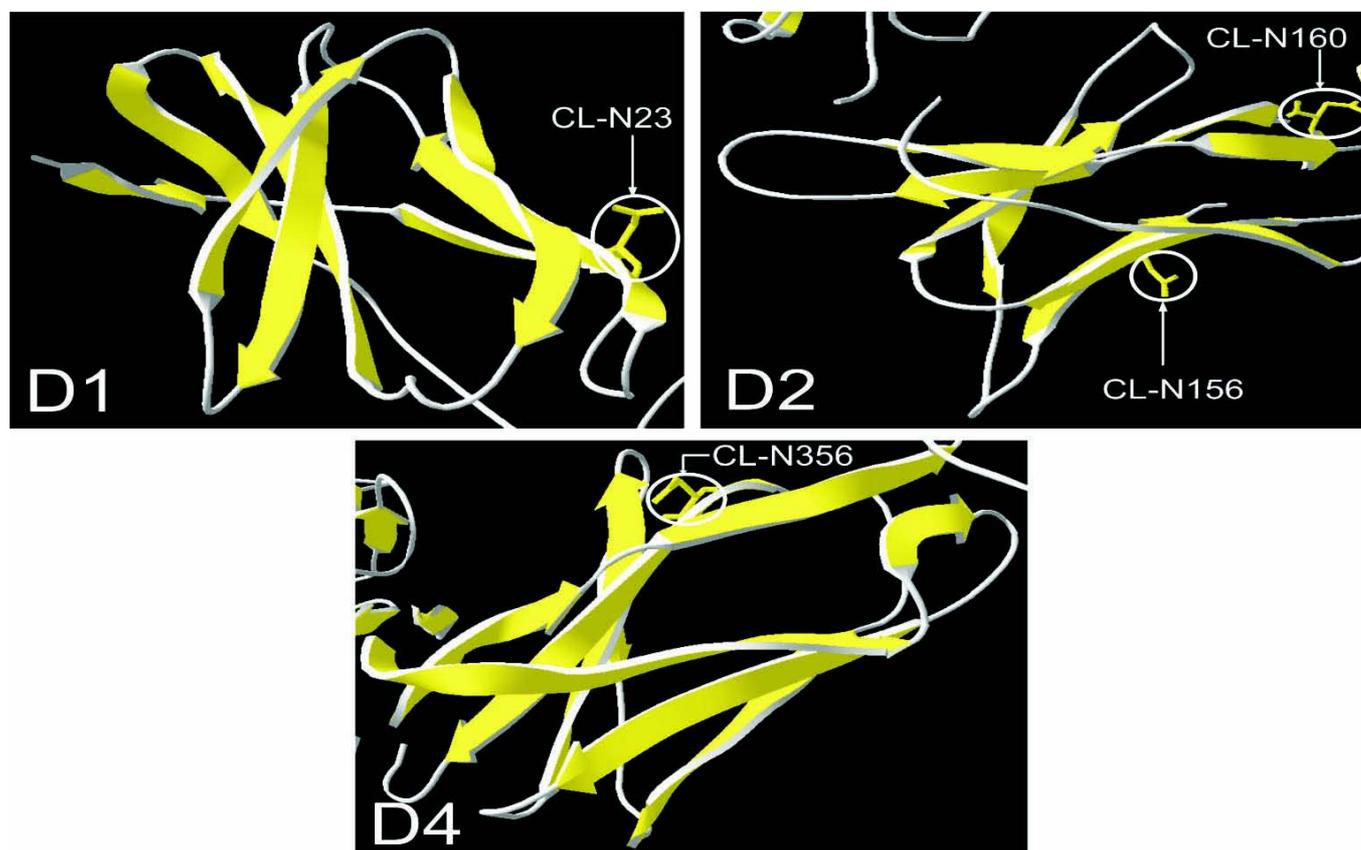


Figura 5. Ubicación de los sitios de N-glicosilación de DM64. Se seleccionaron en DV las cadenas laterales (CLs) de las Asparaginas (N) que según **Rocha *et al.*** (2002) constituirían los sitios de glicosilación de DM64.

tres dominios de DM43 y entre las hebras F y G de los dominios (D) 2, 3, 4 y 5 del modelo de DM64 presentado aquí. En cuanto al D1 de DM64, no se pudo identificar inequívocamente las hebras F y G, pero presuntivamente se puede decir que en este dominio, la caja degenerada de triptófono también se encuentra entre estas dos hebras. Las cajas degeneradas de triptófono de DM64 se caracterizan por tener serina (S) o treonina (T) en su segunda y quinta posición y son las siguientes (Rocha *et al.*, 2002; figura 4): WTSPS (posición 83 a 87 en el primer dominio), NSAPS (175 a 179 en el segundo dominio), WSEDS (272 a 276 en el tercer dominio), GSQRS (370 a 374 en el cuarto dominio), y ESEMS (467 a 471 en quinto dominio). De estas cinco cajas degeneradas de DM64, las tres primeras están relacionadas con las encontradas en los tres dominios de DM43. Según Neves-Ferreira *et al.* (2002) la caja de triptófono más auténtica es aquella ubicada al final del tercer dominio de DM43. El triptófono (W276) que incluye esta caja podría estar estabilizando la aguda articulación de 60° que resulto en este caso. Esta articulación aguda estabilizada por un W de una caja de triptófono degenerada es típica de las KIRs (Bottino *et al.*, 1995; Moretta *et al.*, 1996) y receptores hematopoyéticos [los cuales incluyen a los receptores de hormona de crecimiento y de prolactina (Bazan 1990; de Vos *et al.*, 1992; Somers *et al.*, 1994)], pero diferente a aquella vista en inmunoglobulinas, las cuales generalmente presentan un ángulo articular más abierto (Neves-Ferreira *et al.*, 2002). En el caso de DM64 este mismo triptófono corresponde al residuo W272 y, al igual que en DM43, está hacia el final del tercer dominio de DM64 pero tridimensionalmente también se acerca a la articulación del segundo y tercer dominio de DM64 (figura 6).

Al igual que para DM43 no se encontraron otros triptófonos relevantes que estuvieran estabilizando otras articulaciones interdominio en DM64. Una diferencia que hay resaltar entre los modelos de DM43 y DM64, es que para esta última se hallaron ángulos interdominio de 108.26° (tabla 9), los cuales son más abiertos que los 60° reportados por Neves-Ferreira *et al.* (2002) para la articulación del segundo y tercer dominio de DM43. Esta discrepancia se podría explicar por diferencias entre la metodología de medición de ángulos, la cual no es explicada por Neves-Ferreira *et al.* (2002). Otra posibilidad es que DM64 realmente tenga ángulos interdominio más abiertos, como es típico de las inmunoglobulinas y que este triptófono interdominio sea un motivo común con ciertas proteínas como las KIRs (Bottino *et al.*, 1995; Moretta *et al.*, 1996) y receptores hematopoyéticos (Bazan 1990; de Vos *et al.*, 1992; Somers *et al.*, 1994) pero que no necesariamente esté estabilizando un ángulo interdominio agudo.

Análisis de la estructura terciaria del modelo de DM64: Los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (FSIG), como es caso de α 1BG, DM43 y DM64, están compuestos por dominios de origen evolutivo común (Hood *et al.*, 1985) de aproximadamente 100 residuos. Cada dominio tiene de 7 a 10 hebras β (A a G) que forman dos láminas β antiparalelas empacadas cara a cara en cada dominio con una topología y conectividad típica (Halaby *et al.*, 1999; Harpaz & Chothia, 1994). Cada proteína miembro de la superfamilia puede variar en su función, localización, cantidad, longitud y tipo de enlaces entre las hebras β (Halaby & Mornon, 1998; Harpaz & Chothia, 1994).

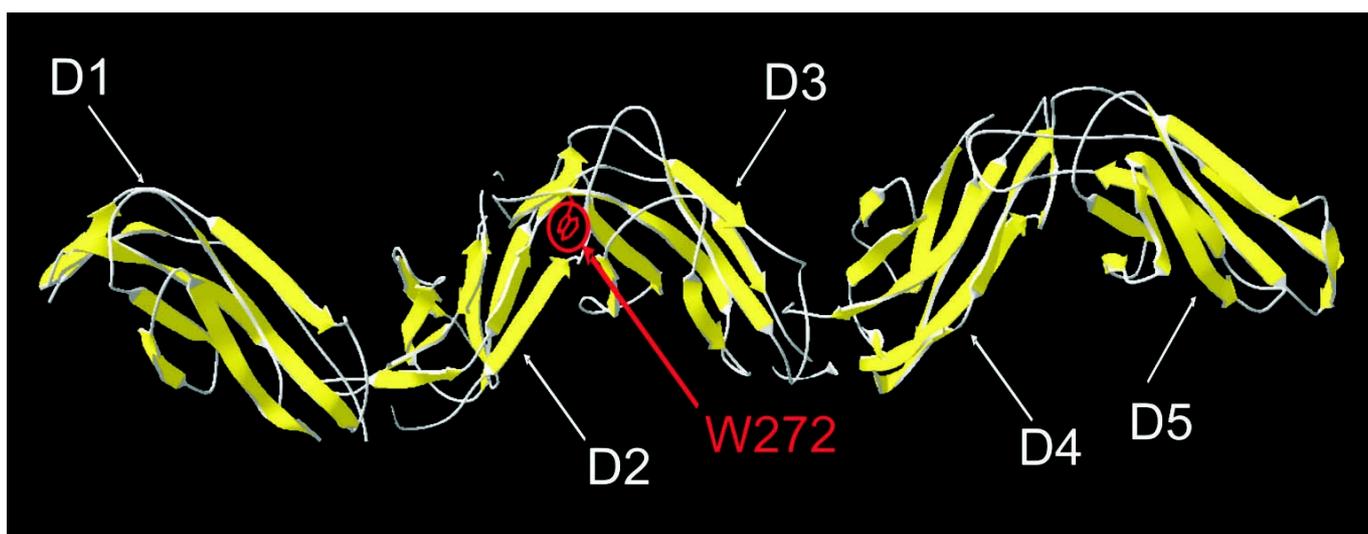


Figura 6. Triptófono W272 de DM64. Este triptófono, como su contraparte en DM43 (W276, figura 16), estaría ayudando a estabilizar la articulación del Dominio 2 (D2) con D3, según Neves-Ferreira *et al.* (2002).

En el caso de DM43, Neves-Ferreira et al. (2002) reportan que los tres dominios de esta proteína tienen un pliegue de Inmunoglobulinas (Ig) tipo I, en el cual cada hebra A primordial está dividida en hebras A (primera lámina β) y A' (segunda lámina β). Este tipo de pliegue Ig-I fue propuesto por Harpaz & Chotia (1994) como un modelo intermedio entre dominios tipo Ig-V (variable) y Ig C1 (constante). Otra de las características de este tipo de pliegue es no tener hebra C'' y solo tener una hebra C' corta. Según los mismos autores (Harpaz & Chotia, 1994) al pliegue Ig-I también pertenecen moléculas de adhesión y receptores celulares, como lo son la mayoría de plantillas usadas para modelar DM43 (Neves-Ferreira et al., 2002) y DM64 (tabla 3). Teniendo en cuenta las esquematizaciones de Halaby & Mornon (1998) y la caracterización del pliegue Ig-I hecha por Harpaz & Chotia (1994), la distribución de las hebras en cada dominio de proteínas como DM43 (Neves-Ferreira et al., 2002) y DM64 (figura 13) sería la siguiente:

- 1ra lámina β : Hebras A, B, D y E
- 2da lámina β : A', C, C', F y G

En términos generales entonces DM43 y DM64 se ajustan al esquema anterior. Para el caso de DM43 la única excepción a este esquema es la presencia de una hebra F' en el tercer dominio (Neves-Ferreira et al., 2002). De una forma menos exacta, el modelo de DM64 también se ajusta

a la caracterización del pliegue Ig-I de Harpaz & Chotia (1994): sus dos últimos dominios tienen una hebra A dividida en hebra A como tal y hebra A' y posee también hebras C' de pocos aminoácidos, al igual que lo que sucede en DM43.

Diferencias funcionales entre DM64 y DM43: Una diferencia importante entre DM43 (Neves-Ferreira et al., 2002) y DM64 (Rocha et al., 2002), es que la segunda (al igual que α 1BG) tiene un gap de cuatro amino-ácidos (a partir del residuo 220 de DM64) en un loop del tercer dominio que se cree contiene una de las regiones responsables para el enlace de hemorraginas por parte de DM43, por lo cual este gap podría explicar en parte la no actividad antihemorrágica de DM64. Con respecto a esto Neves-Ferreira et al. (2002) dicen que por analogía a los receptores de hormona de crecimiento (de Vos et al., 1992) y prolactina (Somers et al., 1994), bucles del segundo y tercer dominio de DM43 podrían estar formando la superficie de enlace para hemorraginas. Más exactamente serían los bucles que en DM43 conectan las hebras (residuos): A' con B (113-116), C con C' (136-138) y E con F (156-158) en el segundo dominio; el bucle interdominio (188-193); los bucles que conectan las hebras B con C (216-224), y F con G (270-282) en el tercer dominio (residuos rojos en figura 4).

Pero la diferencia más importante entre DM64 y DM43, es que la primera presenta dos dominios extra, carboxiterminalmente, lo cual podría sugerir, según Rocha et al. (2002),

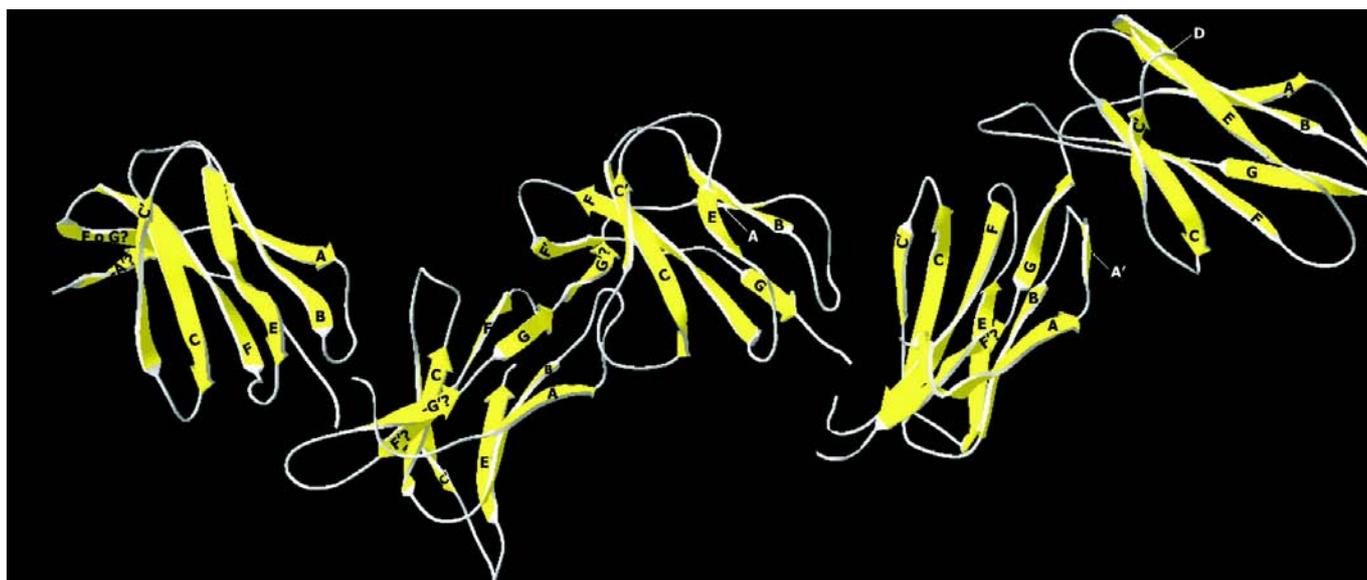


Figura 7. Modelo de DM64 logrado aquí con el sistema SM-DV. Renderizado sin cadenas en laterales, y etiquetado en Corel Draw 12. Aquellas hebras β demarcadas con ? serán discutidas como parte de las limitaciones de un modelo de baja resolución como este. De izquierda a derecha los dominios (D): D1, D2, D3, D4 y D5. Las etiquetas corresponden a las hebras esquematizadas en la figura 4.

que la región anti-miotóxica de DM64 está localizada en estos dos dominios. Teniendo en cuenta la homología que muestran entre sí los dominios de las proteínas de la FSIG (Hood *et al.*, 1985), las altas homólogías entre DM43 y DM64 y las similitudes observadas en este trabajo, se puede decir que los tres primeros dominios de DM43 son homólogos a los tres primeros dominios de DM64 y que los últimos dos dominios de las dos proteínas también son homólogos.

Se podría entonces hacer una especulación fundada en todo lo anterior, en el sentido de preguntarse cuales son los sitios de enlace con la miotoxina de DM64. No es muy aventurado entonces decir que los sitios de enlace con la toxina en DM64 son aquellos que unen las mismas hebras putativas de DM43, pero en los dominios cuatro y cinco de DM64. Es decir, los sitios de enlace con la miotoxina en DM64 podrían ser los bucles que unen las hebras (residuos): A' con B (302 a 307), C con C' (327 a 330), y E con F (347 a 354) en el cuarto dominio; el bucle interdominio (383 a 388); y los bucles que unen las hebras B con C (410 a 415), y F con G (458 a 473) en el quinto dominio (residuos rojos en Figura 4). Esta propuesta se esquematiza en la figura 8.

Siguiendo el mismo razonamiento presentado, se podría hacer también una propuesta sobre los sitios de homodimerización de DM64. Según Neves-Ferreira *et al.* (2002), en DM43 estos sitios serían un parche de aminoácidos hidrofóbicos principalmente de las hebras B y E. Por lo tanto, en DM64 los sitios de homodimerización corresponderían principalmente a residuos hidrofóbicos de las hebras B (A403, I404, L405, C407, G409) y E (H437, A438, V439, F441, L442, L443) del quinto dominio (cadenas laterales azules en figura 8).

Cuestiones evolutivas entre DM64 y DM43: Repetidamente se ha venido diciendo que las proteínas miembros de la FSIG surgen por duplicación de dominios homólogos de aproximadamente 100 amino ácidos (Alberts *et al.*, 2002; Hood *et al.*, 1985). De acuerdo a esto, cuando Rocha *et al.* (2002) comparan a DM64 con DM43, dejan implícito que la primera proteína descende de la última. Esto ciertamente es plausible, pero hay datos que muestran lo contrario. Por ejemplo la α 1BG humana, proteína de cinco dominios, muestra alta homología con el receptor Poli-IgR (Ishioka *et al.*, 1986). ¿Estaría esto indicando que las proteínas tipo DM pertenecen al linaje Poli-IgR de la FSIG? Para relacio-

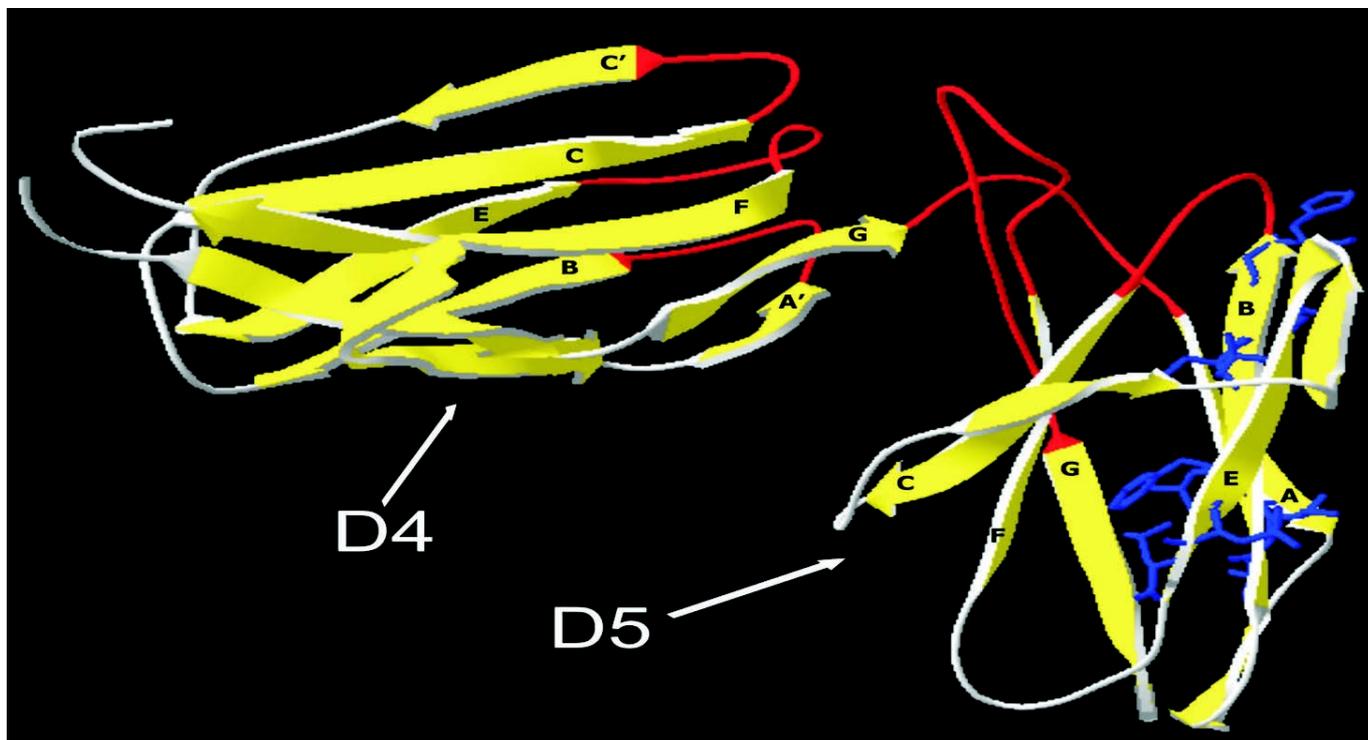


Figura 8. Putativos sitios de enlace con la miotoxina y sitios de homodimerización de DM64. De acuerdo a las homólogías mostradas entre DM64 y DM43, y siguiendo los datos reportados para esta última proteína por Neves-Ferreira *et al.* (2002), se proponen, para DM64, los sitios putativos de enlace con la miotoxina (bucles en rojo), y parte de la superficie de homodimerización (cadenas laterales en azul).

nar esta pregunta con lo que sigue, será que α 1BG se puede tomar como una proteína generalizada dentro del grupo DM y hacer el papel de outgroup en una filogenia de este grupo? Además de estas cuestiones hay que tener en cuenta las similitudes halladas entre los D2 y D3 de DM43, y los D4 y D5 de DM64. ¿No estaría todo esto indicando que una proteína como DM43 desciende de una proteína de cinco dominios como DM64 o α 1BG, vía la pérdida de los primeros dominios para llegar a ser una proteína de tres dominios? Esto ciertamente iría en contra de lo que dicen **Rocha et al.** (2002), pero también hay que tener en cuenta que es evolutivamente más parsimonioso, pues solo implicaría la pérdida de dominios aminoterminales y la mutación de ciertos amino ácidos, particularmente aquellos del sitio de enlace con la toxina. El otro escenario (el que tácitamente indican **Rocha et al.**, 2002), implicaría que se parte de una proteína de tres dominios, tipo DM43 y que está por duplicación de dominios, termina teniendo cinco. El problema de este escenario es que implicaría el traslado del sitio de enlace con la toxina de los bucles ubicados entre el segundo y tercer dominio, a aquellos ubicados entre el cuarto y quinto dominio, lo cual a todas luces es menos parsimonioso que el escenario propuesto en este trabajo. Para soportar parcialmente el escenario propuesto aquí, hay que recordar que aunque **Hood et al.** (1985) dicen que en la evolución de los miembros de una familia como la FSIG predominante se da duplicación de dominios, nos recuerda también que además se da: mutación, duplicación, delección e inserción de exones, genes o incluso familias génicas completas. Es más **Nei et al.** (1997) llaman a esto el modelo de nacimiento (duplicación) y muerte (delección) de genes en la evolución de familias multigen, dentro de lo cual enmarcan a la FSIG. Esto deja suficientes posibilidades para que también se dé supresión de dominios, como en el escenario evolutivo alternativo que se propone aquí.

Limitaciones del modelo de DM64 presentado aquí: Sin embargo, hay que tener presente que el sistema SM-DV produce modelos preliminares, y como tal, el modelo de DM64 generado en esta investigación tiene varias limitaciones, una de las cuales es la recuperación de hebras sospechosas (? en figura 4). Teniendo en cuenta la alta homología entre DM64 y DM43, es muy posible que las hebras β del modelo presentado aquí no equiparables con las correspondientes de DM43, demuestren limitantes de modelamiento propias de del sistema SM-DV. Estas hebras β de DM64 que se salen de la caracterización del pliegue Ig-I (**Harpaz & Chothia**, 1994; **Neves-Ferreira et al.**, 2002) son: en el primer dominio -A'?, F' o G'?; en el segundo dominio F'?, -G'?' y G'?'; y en el cuarto dominio F'?. Teniendo en cuenta esto, los dominios de DM64 cuyas hebras β mostraron mejor correspondencia con las de DM43, fue-

ron los tres últimos, pero particularmente el cuarto y el quinto, pues estos dos fueron los únicos dominios para los cuales se recuperó inequívocamente una hebra A' típica del pliegue Ig tipo I. Hay que aclarar que se compararon las hebras β de los primeros tres dominios de DM64 con los correspondientes de DM43, y los últimos dos dominios de DM64 fueron comparados respectivamente con el segundo y tercer dominio de DM43, teniendo en cuenta que las proteínas de la FSIG pueden evolucionar por duplicación de dominios homólogos (**Hood et al.**, 1985). La Compación del cuarto y quinto dominio de DM64 con el segundo y tercero de DM43, mejoró ostensiblemente la identificación de hebras que al principio parecían dudosas en el modelo de DM64. Es muy posible entonces que estas parejas de dominios sean homólogos (D4 de DM64 con D2 de DM43, y D5 de DM64 con D3 de DM43). Es curioso que los dominios aminoterminales de DM64 modelados aquí, son los que muestran mayores homologías con sus plantillas experimentales (tabla 3), pero también son aquellos para los cuales se recuperaron más hebras dudosas, sucediendo lo contrario para los dominios carboxiterminales.

Otra de las limitaciones del modelo de DM64 presentado en esta investigación es su baja resolución, tomado este concepto como la cantidad de datos utilizados para determinar una estructura (**Rhodes**, 2000) y medida aquí, entre otros indicadores, como la identidad secuencial entre el modelo problema (DM64) y sus plantillas (% homología), y como la desviación de las coordenadas de los átomos del modelo problema con respecto a sus plantillas experimentales (precisión medida en Å RMSD). Según **Guex & Peitsch** (2009) un modelo puede ser considerado impreciso si sus coordenadas atómicas no están dentro de 0.5 Å RMSD (Raíz de la Desviación Cuadrática Media) del control experimental, que en este caso son las plantillas explicadas en la tabla 3. De acuerdo a la tabla 8, el modelo de DM64 presentado aquí muestra un rango de desviación de 0.72 a 3.2 Å RMSD de las plantillas. Esta baja precisión se explica por la baja homología entre DM64 y sus plantillas (< 30%, tabla 3), pues según **Rhodes** (2000) aún modelos con homologías del 30-50% con sus plantillas, muestran RMSDs de hasta 1.5 Å.

Además del sistema usado (SM-DV), razones por las cuales el modelo obtenido es de baja resolución incluyen: que el programa de modelamiento no logró un modelo que alinease bien con las plantillas (o estas plantillas experimentales fueron logradas a partir de proteínas que estaban enlazadas a algún sustrato, mientras el modelo logrado aquí no) o que durante la minimización de energía, las coordenadas del modelo se desviaron de las coordenadas de las plantillas, lo cual irónicamente puede reducir la precisión del modelo, pero a la vez mejorarlo (**Rhodes**, 2000). Y esto

no sería exclusivo para el proceso de minimización de energía, pues durante el proceso de pulimiento de los modelos, se observó que por ejemplo el arreglo de cadenas laterales que presentaran choques con otros átomos de la proteína, aumentaba la energía potencial, es decir, iba en contra de lo logrado por el proceso de minimización de energía (por eso este se dejó de último). De todo esto se concluye que, solo tomando dos parámetros como son precisión y energía potencial (interacciones atómicas problemáticas), el arreglar cualquiera de los dos, empeora el otro. Al final todo esto apunta a que el modelo, por más que se pule, no puede sobrepasar las limitaciones del sistema utilizado (SM-DV), y el producto final (modelo por homología *in silico*) no puede ser mejor que las plantillas experimentales sobre el cual está basado (Guex & Peitsch 2009).

Sin embargo, estos modelos de “Baja Resolución”, los cuales tienen una homología menor del 70% con sus plantillas, pueden ayudar a: racionalizar experimentos de mutagénesis dirigida encaminados en la identificación de un residuo esencial para un determinado proceso de reconocimiento y enlace con algún sustrato, en la aproximación a la dilucidación de la función de una proteína o en la construcción de estructuras supramoleculares (Contreras-Moreira *et al.*, 2002; Guex & Peitsch, 1997). También se podría decir que un modelo de baja resolución como el presentado aquí es útil para objetivos de docencia, y para servir como modelo borrador que pueda ser mejorado en sistemas más elaborados.

Recomendaciones y futuros desarrollos con respecto a DM64: Se recomienda entonces que el modelo preliminar de DM64 logrado en este trabajo, sea mejorado con sistemas de mayor resolución como Insight II o Modeller 9 de Accelrys (<http://www.accelrys.com/products/>), o Modeller (Sali, 2009). Una vez mejorado el modelo, el paso a seguir podría ser probar los putativos sitios de enlace de DM64 con las miotoxinas, lo cual se puede hacer utilizando la técnica de Docking en softwares como Insight II.

La profundización de estudios como el presentado con respecto a DM64 puede ayudar a desarrollar terapias anti-ofídicas más efectivas y seguras que las actuales (Hains & Broady, 2000; Lizano *et al.*, 2003; Neves-Ferreira *et al.*, 1997, 2000; Pérez & Sánchez, 1999; Soares *et al.*, 2003; Thwin & Gopalakrishnakone, 1998; Weissenberg *et al.*, 1991) y a solucionar patologías en las cuales estén involucrados desbalances entre PLAs y PLIs como asma, choques sépticos, inflamación, artritis (Soares *et al.*, 2003; Thwin *et al.*, 2000). DM64 supone además un interés combinado (Duque-Osorio *et al.*, 2007: terapias anti-ofídicas y patologías mencionadas), pues esta proteína es capaz de

neutralizar los efectos miotóxicos de las II PLA₂s (Lizano *et al.*, 2003) sin afectar su actividad enzimática (Rocha *et al.*, 2002), por lo cual sería posible usarla para tratar estos efectos de los venenos de vipéridos, sin afectar el funcionamiento de las PLA₂s endógenas del paciente (Perales & Domont, 2002), lo cual también la hace prometedora para el desarrollo de medicamentos anti-inflamatorios. Por todo esto, el estudio de proteínas como DM64, además de ser científicamente interesante, también tienen un buen potencial de utilidad práctica médica (Duque-Osorio *et al.*, 2007).

Y como colofón final se confirma entonces la utilidad del sistema SM-DV como herramienta para la producción de modelos preliminares de proteínas por homología *in silico*, a un bajo costo en términos de infraestructura informática, pues SM-DV es una herramienta gratuita que funciona con computadores corrientes. Todo esto hace de este sistema una muy buena opción para ayudar al desarrollo de la bioinformática en nuestros países.

Material suplementario

El presente artículo es un derivado del informe final del trabajo de grado de MSc del autor principal (Juan-Fernando Duque-Osorio: JFDO). La versión completa de este trabajo de grado se puede ver en la dirección del Material Suplementario (<http://sites.google.com/site/juanferduque/dm64-3d-in-silico-suplemento>). En este documento, y entre otros datos adicionales, el lector podrá ver los alineamientos de los modelos problemas con sus plantillas experimentales (tablas 6 a la 10 de la sección de Resultados) y en la sección de Anexos podrá ver las secuencias y demás datos relacionables con el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) de las proteínas: DM64, DM43 y α 1BG. Como se dejó entrever al final la sección de Mediciones Adicionales de los Resultados, el otro documento incluido dentro del Material Suplementario es el ejercicio de evaluación gráfica hecha sobre el modelo, usando algunas de las opciones que para tal fin ofrece Deep View. Este documento es introducido por la explicación a los principales criterios usados para la evaluación de un modelo como el presentado en este trabajo.

Agradecimientos

El autor principal le agradece a su familia por el apoyo, y particularmente a su padre, el Dr. Álvaro Duque Donoso (quien murió un mes después de haberse obtenido el grado de MSc por parte de JFDO), y quien siempre le inculcó a sus hijos un grandísimo amor por el estudio. JFDO le agradece a sus amigos más cercanos por haber servido de apoyo y distracción durante los momentos más estresantes de esta MSc. Al

Dr. John Fredy Vallejo y a su personal médico de la clínica Imbanaco de Cali, quienes con su increíble esfuerzo salvaron la vida de JFDO en 2002 durante un insuceso colónico que interrumpió el curso de esta MSc por algunos años. A nuestros superiores y compañeros de la Escuela de Ciencias Básicas Médicas de Univalle, por el apoyo dado durante esta MSc. A los profesores Leonardo R. Lareo (Grupo de Bioinformática, Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana-Bogotá), Pedro A. Moreno (Grupo de Bioinformática, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle) y Heiber Cárdenas (Grupo de Ecogenética y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle) quienes fueron los jurados de este trabajo de grado, y quienes lo mejoraron ostensiblemente con sus correcciones. Al profesor Gale Rhodes de la Universidad de Southern Maine-USA por haber respondido preguntas claves sobre el modelamiento de proteínas *in silico* por homología. A N. Guex, M.C. Peitsch y T. Schwede por haber desarrollado una herramienta tan adecuada como Swiss Model-Deep View, para aquellos que no somos expertos en el modelamiento de proteínas. Y finalmente se le agradece al Evaluador anónimo contactado por la revista ACCEFYN, quien con sus correcciones y sugerencias ayudó a mejorar sensiblemente este artículo.

Bibliografía

- Alberts B., Johnson A. Lewis J., Raff M., Roberts K. & P. Walter.** 2002. *The Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York, USA.
- Bazan J.F.** 1990. Structural Design and Molecular Evolution of a Cytokine Receptor Superfamily. *PNAS* 87: 6934-6938.
- Biardi J.E., Coss R.G. & D.G. Smith.** 2000. California Ground Squirrel (*Spermophilus beecheyi*) Blood Sera Inhibits Crotalid Venom Proteolytic Activity. *Toxicon* 38(5): 713-721.
- Bjarnason, J.B. & J.W. Fox.** 1994. Hemorrhagic Metalloproteinases from Snake Venoms. *Pharmac. Ther.* 62(3): 325-372.
- Bottino C., Vitale M., Pende D., Biassoni R. & A. Moretta.** 1995. Receptors for HLA Class I Molecules in Human NK Cells. *Seminars in Immunology* 7: pp 67-73.
- Catanese J.J. & L.F. Kress.** 1992. Isolation from Opossum Serum of a Metalloproteinase Inhibitor Homologous to Human α 1B-glycoprotein. *Biochemistry* 31: 410-418.
- Chippaux J.P. & Goyfon M.** 1998. Venoms, Antivenoms and Immunotherapy. *Toxicon* 36(6):823-846.
- Contreras-Moreira B., Fitzjohn P.W. & P.A. Bates.** 2002. Comparative Modelling: An Essential Methodology for Protein Structure Prediction in the Post-Genomic Era. *Applied Bioinformatics* 1(4): 177-190.
- Contreras-Moreira B. & P.A. Bates.** 2002. Domain Fishing: A First Step in Protein Comparative Modelling. *Bioinformatics* 18(8): 1141-1142.
- Cooper G.M.** 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. Second Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- de Vos A.M., Ullsch M. & A.A. Kossiakoff.** 1992. Human Growth Hormone and Extracellular Domain of its Receptor: Crystal Structure of the Complex. *Science* 255: 306-312
- Domont G.B., Perales J. & H. Moussatche.** 1991. Natural Anti-Snake Venom Proteins. *Toxicon* 29(10):1183-94.
- Duque-Osorio J.F., Sánchez A., Fierro L., Garzón S. & R.S. Castaño.** 2007. Venenos de Serpientes y Moléculas Antiveneno. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Físicas Exactas y Naturales (ACCEFYN)* 31(118): 109-137.
- Gold B.S., Dart R.C. & R.A. Barish.** 2002. Bites of Venomous Snakes. *N. Engl. J. Med.* 347: 347 - 356.
- Guex N. & M.C. Peitsch.** 1997. *SWISS-MODEL* and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18 (15): 2714-2723.
- Guex N. & M.C. Peitsch.** 2009. Principles of Protein Structure, Comparative Protein Modelling and Visualisation. [publicación en línea]. Disponible desde Internet en: <<http://swissmodel.expasy.org/course/course-index.htm>> [con acceso el 06-May-2009].
- Guex N., Diemand A. and M.C. Peitsch.** 1999. Protein Modelling for All. Elsevier *TIBS* 24: 364-367.
- Guex N., Diemand A., M.C. Peitsch & T. Schwede.** 2008. The Swiss Institute of Bioinformatics Presents Deep View (Swiss PDB Viewer). [publicación en línea]. Disponible desde Internet en: <<http://swissmodel.expasy.org/spdbv/>> [con acceso el 06-May-2009].
- Gunsteren W.F., Billeter S.R., Eising A.A., Hünenberger P.H., Krüger P., Mark A.E., Scott A.M. & I.G. Tironi.** 2009. Biomolecular Simulation: The Gromos Manual. [publicación en línea]. Disponible desde Internet en: <<http://www.igc.ethz.ch/GROMOS/manual>> [con acceso el 06-May-2009].
- Gutiérrez J.M. & A. Rucavado.** 2000. Snake Venom Metalloproteinases: Their Role in the Pathogenesis of Local Tissue Damage. *Biochimie* 82(9-10): 841-50.
- Gutiérrez J.M. & C.L. Ownby.** 2003. Skeletal Muscle Degeneration Induced by Venom Phospholipases A₂: Insights Into the Mechanisms of Local and Systemic Myotoxicity. *Toxicon* 42(8): 915-931.
- Hains P.G. & K.W. Broady.** 2000. Purification and Inhibitory Profile of Phospholipase A₂ Inhibitors from Australian Elapid Sera. *Biochem J* 346: 139-146.
- Hains P.G., Sung K.L., Tseng A. & K.W. Broady.** 2000. Functional Characteristics of a Phospholipase A₂ Inhibitor from *Notechis ater* Serum. *J Biol Chem* 275: 983-991.
- Hains P.G., Nield B., Skuloski S., Dunn R. & K. Broady.** 2001. Sequencing and Two-dimensional Structure Prediction of a Phospholipase A₂ Inhibitor from the Serum of the Common Tiger Snake (*Notechis scutatus*). *J Mol Biol* 312: 875-884.
- Halaby D.M. & J.P.E. Mornon.** 1998. The Immunoglobulin Superfamily: An Insight on Its Tissue, Species, and Functional Diversity. *J Mol Evol* 46: 389-400.
- Halaby D.M., Poupon A. & J.P. Mornon.** 1999. The Immunoglobulin Fold Family: Sequence Analysis and 3D Structure Comparisons. *Protein Engineering* 12(7): 563 - 571.

- Harpaz Y. & C. Chothia.** 1994. Many of the Immunoglobulin Superfamily Domains in Cell Adhesion Molecules and Surface Receptors Belong to a New Structural Set Which is Close to that Containing Variable Domains. *J Mol Biol* 238: 528-539.
- Hood L., Kronenberg M. & T. Hunkapiller.** 1985. T Cell Antigen Receptors and the Immunoglobulin Supergene Family. *Cell* 40: 225-229.
- Ishioka N., Takahashi N. & F.W. Putnam.** 1986. Amino Acid Sequence of Human Plasma α -1B-glycoprotein: Homology to the Immunoglobulin Supergene Family. *PNAS* 83: 2363-2367.
- Jia L.G., Shimokawa K., Bjarnason J.B. & J.W. Fox.** 1996. Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Function and Relationship to the ADAMs Family of Proteins. *Toxicon* 34(11-12): 1269-1276.
- Jurgilas P.B., Neves-Ferreira A.G.C., Domont G.B. & J. Perales.** 2003. PO41, a Snake Venom Metalloproteinase Inhibitor Isolated From Philander Opossum Serum. *Toxicon* 42: 621-628.
- Kamiguti A.S., Hay C.R., Theakston R.D. & M. Zuzel.** 1996. Insights into the Mechanism of Haemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases. *Toxicon* 34(6): 627-642.
- Kamiguti A.S., Zuzel M. & R.D. Theakston.** 1998. Snake Venom Metalloproteinases and Disintegrins: Interactions With Cells. *Braz J Med Biol Res* 31(7): 853-62.
- Kaplan W. & T.G. Littlejohn.** 2001. Swiss-PDB viewer (Deep View). Briefings in Bioinformatics 2(2): 195-197.
- Kopp J. & T. Schwede.** 2004. The SWISS-MODEL Repository of Annotated Three-Dimensional Protein Structure Homology Models. *Nucleic Acids Research* 32: D230-D234.
- Kumar S., Tamura K. & M. Nei.** 2004. MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings in Bioinformatics 5:150-163.
- Lehtinen M.J., Meri S. and T.S. Jokiranta.** 2004. Interdomain Contact Regions and Angles Between Adjacent Short Consensus Repeat Domains. *J. Mol. Biol.* 344(5): 1385-1396.
- Letunic I., Copley R.R., Schmidt S., Ciccarelli F.D., Doerks T., Schultz J., Ponting C.P. & P. Bork.** 2004. SMART 4.0: Towards Genomic Data Integration. *Nucleic Acids Research* 32: D142-D144.
- Lizano S., Domont G. & J. Perales.** 2003. Natural Phospholipase A_2 Myotoxin Inhibitor Proteins from Snakes, Mammals and Plants. *Toxicon* 42: 963-977.
- Lomonte B., Ángulo Y. & L. Calderón.** 2003. An Overview of Lysine-Phospholipase A_2 Myotoxins from Crotalid Snake Venoms and their Structural Determinants of Myotoxic Action. *Toxicon* 42(8): 885-901.
- Martínez R.R., Pérez J.C., Sánchez E.E. & R. Campos.** 1999. The Antihemorrhagic Factor of the Mexican Ground Squirrel, (*Spermophilus mexicanus*). *Toxicon* 37: 949-954.
- Matsui T., Fujimura Y. & K. Titani.** 2000. Snake Venom Proteases Affecting Hemostasis and Thrombosis. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 146-156.
- Mattison C.** 1995. The Encyclopedia of Snakes. Facts on Life, Inc. New York. 256 pp.
- Melo P.A. & G. Suarez-Kurtz.** 1988. Release of Sarcoplasmic Enzymes from Skeletal Muscle by *Bothrops jaracussu* venom: Antagonism by Heparin and by the Serum of South American Marsupials. *Toxicon* 26:87-95.
- Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Biassoni R., Mingari M.C. & L. Moretta.** 1996. Receptors for HLA Class-I Molecules in Human Natural Killer Cells. *Annu Rev Immunol* 14:619-648.
- Nei M., Gu X. & T. Sitnikova.** 1997. Evolution by the Birth-and-Death Process in Multigene Families of the Vertebrate Immune System. *PNAS* 94: 7799-7806.
- Neves-Ferreira A.G.C., Perales J., Ovadia M., Moussatché H. & G.B. Domont.** 1997. Inhibitory Properties of the Antibiothropic Complex from the South American Opossum (*Didelphis marsupialis*) Serum. *Toxicon* 35(6): 849-863.
- Neves-Ferreira A.G.C., Cardinale N.; Rocha S.L.G., Perales J. & G.B. Domont.** 2000. Isolation and Characterization of DM40 and DM43, Two Snake Venom Metalloproteinase Inhibitors from *Didelphis marsupialis* Serum. *Biochim Biophys Acta* 1474: 309-320.
- Neves-Ferreira A.G.C., Perales J., Fox J.W., Shannon J.D., Makino D.L., Garratt R.C. & G.B. Domont.** 2002. Structural and Functional Analyses of DM43, a Snake Venom Metalloproteinase Inhibitor from *Didelphis marsupialis* Serum. *J Biol Chem* 277: 13129-13137.
- Núñez C.C., Ángulo Y. & B. Lomonte.** 2001. Identification of the Myotoxic site of the Lys49 Phospholipase A_2 from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* Snake Venom: Synthetic C-terminal Peptides from Lys49, but not from Asp49 Myotoxins, Exert Membrane-damaging Activities. *Toxicon* 39(10): 1587-1594.
- Ohno M., Chijiwa T., Oda-Ueda N., Ogawa T. & S. Hattori.** 2003. Molecular Evolution of Myotoxic Phospholipases A_2 from Snake Venom. *Toxicon* 42(8): 841-854.
- Omori-Satoh T., Yamakawa Y. & D. Mebs.** 2000. The Antihemorrhagic Factor, Erinacin, from the European Hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a Metalloprotease Inhibitor of Large Molecular Size Possessing Ficolin/Opsonin P35 Lectin Domains. *Toxicon* 38(11): 1561-1580.
- Ownby C.L., Colberg T.R. & H.S. Selistre-de-Araujo.** 1998. Phospholipase A_2 Toxins: Diversity in Structure and Function. 12th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. *Toxicon* 36(9):1219-1232.
- Peitsch M.C.** 2002. About the Use of Protein Models. *Bioinformatics* 18 (7): 934-938.
- Perales J., Moussatche H., Oliveira B., Marangoni S. & G.B. Domont.** 1994. Isolation and Partial Characterization of an Antibiothropic Complex From Serum of South American Didelphidae. *Toxicon* 32: 1237-1249.
- Perales J. & G.B. Domont.** 2002. Are Inhibitors of Metalloproteinases, Phospholipases A_2 and Myotoxins Members of the Innate Immune System?. Pp: 435-455 *En: Menéz A. (ed.). Perspectives in Molecular Toxinology.* John Wiley & Sons. 485 pp.
- Pérez J.C. & E.E. Sanchez.** 1999. Natural Protease Inhibitors to Hemorrhagins in Snake Venoms and Their Potential use in Medicine. *Toxicon* 37(5): 703-28.
- Pruess M. & R. Apweiler.** 2003. Bioinformatics Resources for *In Silico* Proteome Analysis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 4 (2003): 231-236.

- Qi Z.Q., Yonaha K., Tomihara Y. & S. Toyama.** 1994. Characterization of the Antihemorrhagic Factors of Mongoose (*Herpestes edwardsii*). *Toxicon* 32(11): 1459-1469.
- Rhodes G.** 2000. Judging the Quality of Macromolecular Models: A Glossary of Terms from Crystallography, NMR, and Homology Modeling. [publicación en línea]. Disponible desde Internet en: <<http://spdbv.vital-it.ch/TheMolecularLevel/ModQual/>> [con acceso el 06-May-2009]
- Rhodes G.** 2008. Molecular Modeling for Beginners: Tutorial For Deep View (Swiss-PdbViewer). Disponible desde Internet en: <<http://spdbv.vital-it.ch/TheMolecularLevel/SPVTut/>> [con acceso el 06-May-2009]
- Rocha S.L.G., Lomonte B., Neves-Ferreira A.G.C., Trugilho M.R.O., Junqueira-de-Azevedo I.L.M., Ho P.L., Domont G.B., Gutiérrez J.M. & J. Perales.** 2002. Functional Analysis of DM64, an Antimyotoxic Protein with immunoglobulin-like Structure from *Didelphis marsupialis* serum. *Eur J Biochem* 269: 6052-6062.
- Rueda-Borrego M.** 2005. Estudio Teórico Sobre la Influencia del Solvente en la Estructura y Dinámica del ADN. Universidad de Barcelona, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. [publicación en línea]. Disponible desde Internet en: <http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0629106-135551/MRB_TESIS.pdf> [con acceso el 06-May-2009].
- Sali A.** 2009. Modeller: A Program for Comparative Protein Structure Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. [publicación en línea]. Disponible desde Internet en: <<http://salilab.org/modeller/>> [con acceso el 06-May-2009].
- Scott W.R.P., Hünenberger P.H., Tironi I.G., Mark A.E., Billeter S.R., Fennen J., Torda A.E., Huber T., Krüger P. & W.F. van Gunsteren.** 1999. The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package. *J Phys Chem A* 103(19):3596-3607.
- Schultz J., Milpetz, F., Bork, P. & C.P. Ponting.** 1998. SMART, a Simple Modular Architecture Research Tool: Identification of Signalling Domains. *PNAS* 95(11): 5857-5864.
- Schwede T., Diemand A., Guex N. & M.C. Peitsch.** 2000. Protein Structure Computing in the Genomic Era. *Res Microbiol* 151: 107-112.
- Schwede T., Kopp J., Guex N. & Peitsch M.C.** 2003. SWISS-MODEL: An Automated Protein Homology-Modeling Server. *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3381-3385.
- Soares A.M., Rodrigues V.M., Borges M.H., Andriao-Escarso S.H., Cunha O.A., Homs-Brandeburgo M.I. & J.R. Giglio.** 1997. Inhibition of Proteases, Myotoxins and Phospholipases A₂ from Bothrops Venoms by the Heteromeric Protein Complex of *Didelphis Albiventris* Opossum Serum. *Biochem Mol Biol Int* 43(5): 1091-1099.
- Soares A.M., Marcussi S., Stábeli R.G., França S.C., Giglio J.R., Ward R.J. & E.C. Arantes.** 2003. Structural and Functional Analysis of BmjMIP, a Phospholipase A₂ Myotoxin Inhibitor Protein from *Bothrops moojeni* plasma. *Biochem Biophys Res Comm* 302:193-200.
- Somers W., Ultsch M., De Vos A.M. & A.A. Kossiakoff.** 1994. The X-Ray Structure of A Growth Hormone-Prolactin Receptor Complex. *Nature* 372(6505): 478-81.
- Thwin M.M. & P. Gopalakrishnakone.** 1998. Snake Envenomation and Protective Natural Endogenous Proteins: A Mini Review of Recent Developments. *Toxicon* 36(11): 1471-1482.
- Thwin M.M., Gopalakrishnakone P., Kini R.M., Armugam A. & K. Jeyaseelan.** 2000. Recombinant Antitoxic and Anti-inflammatory Factor from the Nonvenomous Snake *Python reticulatus*: Phospholipase A₂ Inhibition and Venom Neutralizing Potential. *Biochemistry* 39: 9604-9611.
- Weissenberg S., Ovadia M., Fleminger G. & E. Kochva.** 1991. Antihemorrhagic Factors from the Blood Serum of the Western Diamondback Rattlesnake *Crotalus atrox*. *Toxicon Volume* 29(7): 807-818.

Recibido: marzo 3 de 2008.

Aceptado para su publicación: diciembre 3 de 2008

