

---

# Determinação da estrutura da giroxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por modelagem molecular

Structure determination of isolated gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom by molecular modeling

Vinícius Augusto Rosa da Silva<sup>1</sup>, Patrícia Moriguchi<sup>1</sup>, Alípio de Oliveira Carmo<sup>2</sup>, Juliano Rodrigo Guerreiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Curso de Farmácia da Universidade Paulista, Sorocaba-SP, Brasil; <sup>2</sup>Curso de Farmácia da Universidade Paulista, São Paulo-SP, Brasil.

---

## Resumo

**Objetivo** – Determinar estrutura básica e modelagem molecular por via comparativa da giroxina, uma serinoprotease trombina símile isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus*. **Métodos** – As análises de similaridade de estrutura primária e secundária foram geradas através de sistemas logarítmicos e probabilísticos de modo a encontrar um molde proteico da mesma família da giroxina com capacidade de servir de molde para gerar estruturas tridimensionais comparativas da proteína selecionada. **Resultados** – A giroxina é uma proteína com 241 aminoácidos, de caráter ácido, instável e de melhor ação em meio aquoso. Possui um peso molecular de 26.1kDa e 6 prováveis pontes de dissulfeto. **Conclusões** – A giroxina é uma proteína trombina símile com ação na dissolução de coágulos e seu estudo estrutura-atividade pode trazer novos fármacos para embolias pulmonares, infartos cardíacos e trombose de membros baixos. Novos estudos observam a interação da giroxina com receptores PAR-1 de astrócitos o que pode indicar uma nova classe de medicamentos para tratamento de síndromes neurodegenerativas, tais como a síndrome de Parkinson.

**Descritores:** Modelagem; Giroxina

## Abstract

**Objective** – To determine basic structure and molecular modeling by comparative means of gyroxin, a serinoproteases trombine-like isolated from the *Crotalus durissus terrificus* venom. **Methods** – Analysis of similarity of primary and secondary structures generated through logarithmic and probabilistic systems to find a protein model of the same family with capacity to be used as template to create tridimensional comparative structures of the selected protein. **Results** – The gyroxin is a 241 aminoacids protein, of acid qualities, instable and have better activity in water solutions. It has 26.1kDa of molecular weight and 6 probable disulfide bonds. **Conclusions** – Gyroxin is a trombine-like protein acting to dissolve blood clots and her structure-activity study may bring new drugs to treat pulmonary embolism, cardiac arrest and lower members thromboses. New studies appoint the interaction between gyroxin and PAR-1 astrocytes receptors who may indicate a new class of neurodegeneratives syndromes drugs, such as Parkinson's syndrome.

**Descriptors:** Modeling; Gyroxin

---

## Introdução

A *Crotalus durissus terrificus* é uma serpente peçonhenta da família das *viperidae* e seu maior representante são as cascavéis do gênero *Crotalus durissus*. Tais animais possuem a capacidade de produzir biomoléculas em certas glândulas de seu corpo que possui efeitos nocivos à tecidos ou sistemas fisiológicos de terceiros e são capazes de introduzi-los em suas presas através de estruturas inoculadoras. Geralmente, tais venenos possuem uma variedade de compostos em sua formulação sendo as principais de origem proteica, que possuem a capacidade de funcionar como neurotoxinas, indutores ou inibidores enzimáticos, vasoativos citotoxinas, cardiotoxinas, desintegrinas e proteases<sup>1</sup>. Ainda podem alterar a homeostasia corporal interferindo na cascata de coagulação, na função plaquetária, na estabilidade ou funcionamento da fibrina e na integridade vascular<sup>2</sup>.

A giroxina é uma proteína que compõem o veneno da *Crotalus durissus terrificus* e foi descrita por Barrio 1961<sup>3</sup> e posteriormente isolada por Barrabin *et al.* 1978<sup>4</sup>, é uma enzima trombina símile com ação indutora de coágulos pertencente ao grupo das serino-

proteases<sup>1</sup>. As serinoproteases são em geral enzimas catalíticas que clivam ligações peptídicas onde uma serina é o aminoácido nucleofílico no sítio ativo, sendo encontradas nos venenos de serpentes, vírus, bactérias e em eucariotos<sup>5</sup>. Nos seres humanos as serinoproteases agem como fatores de coordenação na digestão, sistema imune, reprodução e coagulação sanguínea, fazendo parte da superfamília de peptidases S1A – subfamília da quimiotripsina<sup>6</sup>. Ainda a giroxina é conhecida por atividades esterásicas<sup>7</sup>, por induzir efeitos motores, tais como espasmos, opistonia, arreflexias, imobilidade<sup>8</sup>, alterações do senso de equilíbrio culminando na síndrome de rolamento em barril, onde o animal executa giros em seu próprio eixo longitudinal, aparentemente devido à convulsões de origem central, como sugerido por eletroencefalogramas<sup>8-9</sup>. A ação enzimática da giroxina causa a clivagem do fibrinopeptídeo A de cadeia alfa<sup>10</sup> transformando fibrinogênio em fibrina<sup>11</sup> resultando em monômeros de fibrina polimerizadas em cadeias instáveis mais propensas à ação de agentes fibrinolíticos<sup>12</sup> podendo ser este o motivo da incapacidade de coagulação sanguínea por pacientes picados por estas serpentes<sup>13</sup>.

O mecanismo de ação destas enzimas passou a ser mais bem estudado em meados dos anos 70 devido à possibilidade de usar tais compostos em doenças trombóticas ou como anticoagulantes, por causa de sua ação trombina símile. Estas enzimas possuem o efeito de induzir a dissolução de coágulos em embolias pulmonares, infartos cardíacos e trombozes de membros baixos<sup>14</sup>. Além disto, possui ação também sobre o controle da pressão arterial, do ciclo celular, da angiogênese e de processamento de antígenos devido à sua atuação sobre os receptores PAR (*Protease-Activated Receptors*). Estudos *in vivo* comprovaram a ação vasodilatadora da gioxina com participação dos receptores ativados por proteinases, da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase e do óxido nítrico. Também revelou-se sua ação de agregação plaquetária e alteração momentânea na permeabilidade da barreira hematoencefálica<sup>15</sup>. A gioxina também foi capaz de causar interferências na ação das trombinas e ações agonistas aos receptores PAR-1 em astrócitos<sup>9</sup>, o que pode fornecer novos fármacos para doenças neurodegenerativas, tais como a Síndrome de Parkinson.

É sabido que a atividade de enzimas e proteínas em geral é devido à sua conformação estrutural, o que lhe confere a capacidade de conectar-se com um receptor ou ligante e causar, durante a interação entre ambos, uma resposta biológica através do qual pode-se estudar e racionalizar os fatores que regem esta relação de estrutura-atividade<sup>16</sup>. Deste modo, conhecer a estrutura tridimensional de uma proteína, seus sítios de ligação, seus possíveis ligantes, os efeitos desencadeados no que concerne à sua relação estrutura-atividade e características bioquímicas fornece um acervo de informações que podem ser usadas para desvendar mecanismos de ação, elucidar processos fisiológicos e até mesmo desenvolver novos fármacos através de desenvolvimento de drogas por programas computacionais<sup>17</sup>.

O presente artigo propõe a modelagem molecular por via comparativa da gioxina através do cristal da AhV\_TL-I, uma enzima glicosilada trombina símile da *Agkistrodon halys*, objetivando o estudo estrutural da gioxina, pretendendo contribuir para o estudo mais aprofundado desta enzima que pode futuramente abrir um leque gigantesco de novos fármacos, com dinâmica para doenças trombóticas, doenças cardíacas, coagulopatias, doenças hipertensivas, viroses, alguns tipos de tumores, como coadjuvantes para medicamentos de difícil passagem pela barreira hematoencefálica e Síndrome de Parkinson.

## Métodos

A sequência primária da proteína gioxina isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* foi obtida através do banco de dados de domínio público NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), podendo ser acessado por via do link (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/164664999?report=fasta>). A proteína foi obtida em formato FASTA para posterior análise.

A cadeia primária da gioxina foi estudada primeiramente por via do Protparam, pelo servidor ExPasy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam>), de modo a se determinar o peso molecular, ponto isoelétrico teórico, número de cada aminoácido na cadeia, composição e número atômico, número de resíduos carregados positiva e negativamente, coeficiente de extinção, índices e instabilidade e índices alifáticos.

Para se identificar sequências primária homólogas à gioxina utilizou-se a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) por via do website NCBI que pode ser acessado em: (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); os resultados registraram duas proteínas com alto índice de similaridade, sendo estas: a) Estrutura cristalina da AhV\_TL-I, enzima trombina símile, da *Agkistrodon halys* (4E7N) com 73,19% de similaridade; e b) Estrutura cristalina do ativador de proteína C da *Agkistrodon contortrix contortrix* (2AIP) com 75,76% de similaridade.

Para analisar similaridade entre as estruturas secundárias da gioxina e posteriormente fazer a análise da gioxina em relação à uma proteína selecionada como possível molde de modelagem, isto é, um template, foi-se utilizado um BLAST de estruturas secundárias via HNN (*Hierarchical Neural Network*), que pode ser acessado por via do link ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_hnn.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_hnn.pl)) e cujos dois principais resultados foram: a) Enzima trombina símile (4E7N) da *Agkistrodon halys*, com um score de 333,96 e 73% de identidade; e b) Enzima defibrase trombina símile (3S69) da *Gloydius saxatilis*, com um score de 329,23 e 65% de identidade.

A análise das cisteínas para formação de pontes de dissulfeto foi feito através do webserver DiANNA 1.1 do laboratório de biologia molecular do Colégio de Boston. O programa utiliza-se de um logaritmo comparativo com o qual analisa as probabilidades de determinadas ligações dentre cisteínas e calcula as principais interações fornecendo um gráfico probabilístico com as melhores posições para as formações de pontes de dissulfeto.

Para modelar por via comparativa a estrutura terciária da gioxina utilizaram-se os programas de modelagem por homologia do Swissmodel (Arnold *et al.*, 2006). O SWISS-MODEL funciona baseado no nível de similaridade existente entre a proteína-alvo e o molde selecionado e alinhado por via de um BLAST. Imagens e representações de estruturas secundárias e terciárias foram geradas através do *Accelrys Discovery Studio 4.1*. A estrutura terciária foi predita usando modelagem comparativa através do template PDB-4E7N e a energia do modelo proteico foi minimizada pelo Deep-View do SWISS-MOD. A estrutura tridimensional da gioxina foi analisada e comparada por via NCBI-VAST com a enzima trombina símile da *Agkistrodon halys*.

A validação estrutural dos números resíduos em posições favoráveis foi feito através do Procheck<sup>12</sup> gerando

o gráfico de Ramachandran através do servidor RAM-PAGE, podendo ser acessado via (<http://www.cryst.bioc.cam.ac.uk/rampage/>).

## Resultados e Discussão

### Estrutura Primária

A pesquisa inicial no banco de dados da NCBI forneceu a seguinte cadeia de aminoácidos, em formato FASTA para a proteína giroxina a qual está apresentada na Figura 1.

```
>gyroxin b1.7
MVLIRVLANLLILQLSYAQKSELVIGGDECNINEHRLLAIVYTN
SSQCAGTLINQEWVLTAAHCDGENMDIYLGVHNESVQYDDE
EGRVAAEKFFCLSSRNNTKWDKDIMLIRLNIPVRNSTHIAPLSL
PSSPPSVGVCRVMGWGTITSPNETYPDVPHCANINLFDYEV
CLAAYPEFGLPATSRITLCAGIQGGKDTGSGSDSGGLICNGQF
QGIVSWGDNPCAQHPKALYTKVLDDETEWVQSIAGNTAVTC
PP
```

Figura 1. Sequência primária em modelo FASTA da giroxina isolada do veneno de cascavel

O formato FASTA nos fornece a estrutura primária da proteína, isto é, a informação sobre a sequência de aminoácidos de determinada molécula sem levar ainda em consideração sua estrutura secundária. Também levamos em consideração que os dezoito primeiros aminoácidos da sequência são peptídeos de sinal (*signal peptide*) cuja função não é relevante na ação da proteína.

Os resultados preliminares da análise da giroxina por via do ProtParam nos revela que a cadeia proteica possui 241 aminoácidos e possui um peso molecular de 26.158,3 Daltons. O ponto isoelétrico teórico – pH onde a molécula não carrega nenhuma carga elétrica – é 4,70 indicando tratar-se de uma molécula ácida ( $pI < 7$ ). O número de resíduos carregados negativamente (Asp + Glu) é 27; e os carregados positivamente (Arg + Lys) é 14. A molécula possui um total de 3599 átomos e sua fórmula molecular é  $C_{1142}H_{1767}N_{311}O_{364}S_{15}$ . O tempo de meia vida estimado é 0,8 horas (reticulócitos mamíferos, *in vitro*), 10 horas (em leveduras, *in vivo*) e 10 horas (*Escherichia coli*, *in vivo*). O índice de instabilidade é 42,73, classificando a proteína como instável. O índice alifático foi mensurado em 81,33, considerado um valor positivo para aumentar a termoestabilidade da proteína. A hidropaticidade estimada é de -0,195, um valor muito baixo que indica melhor interação da giroxina em meio aquoso<sup>18</sup>. O coeficiente de extinção é 280 nm, de modo a favorecer a análise de proteínas que absorvem a luz mais intensamente neste comprimento em relação à outras substâncias. O coeficiente de extinção da giroxina abrange de 40170 À 39420 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> em 280 nm em água. O estudo do coeficiente de extinção pode ser particularmente útil no que concerne o estudo das interações proteína-proteína e proteína-ligante em solução.

### Estrutura Secundária

As análises preliminares da estrutura secundária da giroxina foi feita através de *Hierarchical Neural Network* ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_hnn.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_hnn.pl)) catalogado como UNK\_930990. A estrutura secundária da proteína concerne às interações moleculares realizadas pela cadeia principal e podem apresentar formações conhecidas como alfa-hélices e folhas-beta. As principais formações secundárias encontradas estão dispostas na Figura 2.

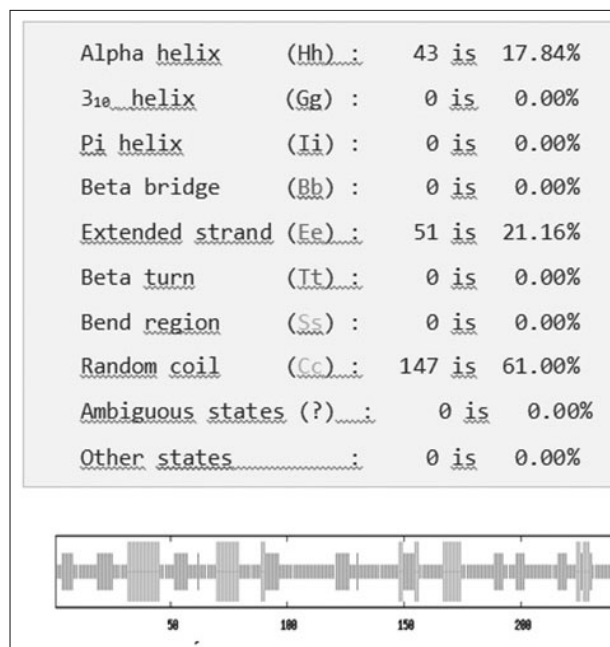


Figura 2. Índice das estruturas secundárias da giroxina

Os resultados revelam que a estrutura secundária da giroxina é predominantemente composta de "random coils" (conformações poliméricas onde as subunidades de monômeros estão orientadas aleatoriamente enquanto que ainda ligadas à estruturas adjacentes) compondo 61% de sua estrutura; por folhas-beta estendidas (extended strand), formando 21,16% de sua conformação; e por alfa-hélices (Alpha-Helix) em 17,84% de sua estrutura.

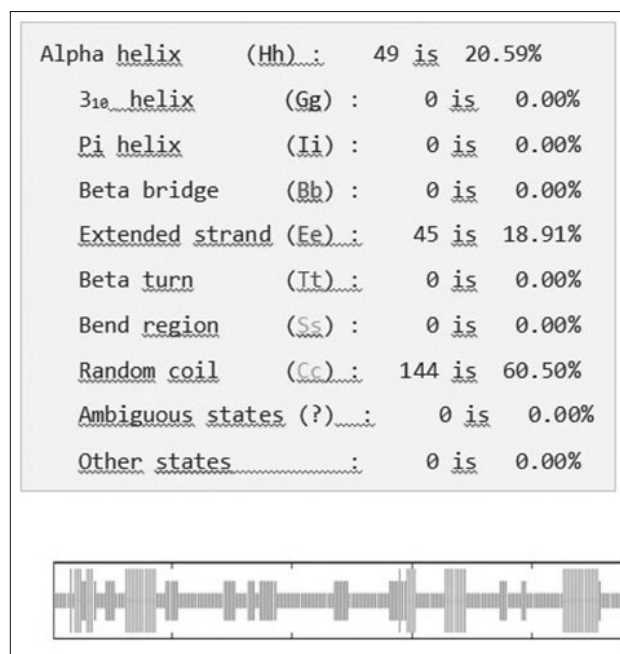
A modelagem tridimensional da giroxina foi feita utilizando-se do programa de modelagem por homologia do SWISS-MODEL. A estrutura 3D da proteína gerada pelo SWISS-MODEL é baseada no nível de similaridade entre a cadeia de aminoácido que se deseja modelar e a cadeia de aminoácidos e estruturas secundárias e terciárias da proteína molde. A análise e a comparação da proteína alvo com uma possível proteína molde são feitas através de um logaritmo de alinhamento chamado BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Concomitantemente foram gerados através do logaritmo HNN (*Hidden Neural Network*) comparações de similaridade de estruturas secundárias com objetivo de achar o melhor molde para a modelagem da giroxina. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 1.

**Tabela 1. Escores e taxas de similaridade estrutural primária e secundária entre as gioxina e três possíveis mol-des estruturais**

Proteína	Escore Primário	Escore Secundário	ID do Molde
Enzima Trombina – Símile de veneno	73,19%	334,0	4E7N_A
Ativador de Proteína C	75,76%	327,3	2AIQA
Serinoprotease Glicosada	65,67%	311,2	1OP0.1_A

Como pode ser observado, a proteína 4E7N apresenta uma semelhança de cadeia primária de 73,19% com a gioxina. Apesar da 2AIQ\_A apresentar um percentual maior, ela carece de uma pontuação maior no que concerne à análise de semelhança entre estruturas secundárias. Deste modo, a proteína escolhida para ser usada como molde é a 4E7N\_A. Um estudo da estrutura secundária da 4E7N\_A foi feita e os resultados estão na Figura 3.



**Figura 3. Índice de estruturas secundárias da proteína 4E7N**

### Análise das Pontes de Cisteínas

Para analisar a presença e a ligação de pontes de dissulfeto, foi rodado um algoritmo de análise combinatória capaz de calcular as probabilidades e selecionar dentre estas as possíveis ligações entre cisteínas e escolher as mais prováveis formações de pontes entre estas. As análises de probabilidades de ligação estão dispostas no Quadro 1.

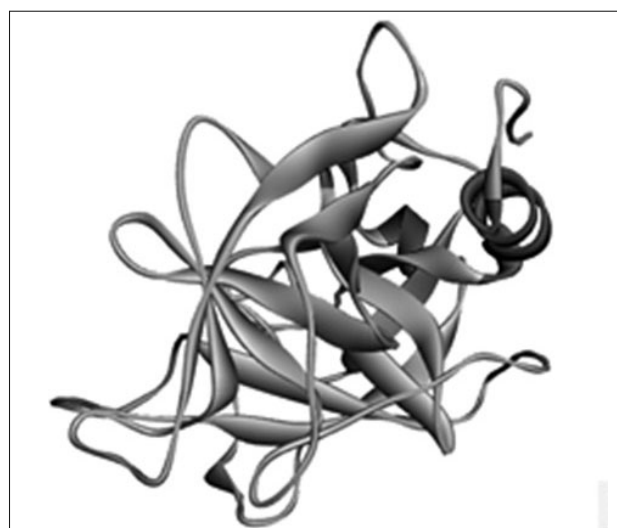
Os resultados obtidos sugerem que a gioxina apresenta 6 pontes de cisteínas sendo elas: C13-C239, C31-47, C79-C144, C123-C193, C155-C172, C183-C208.

Sequência	Ligação das Cisteínas	Escore
13-239	IGGDECNINEH - NTAVTCPPXXX	0,999
31-47	TNSSQCAGTLI - LTAAHCDGENM	0,999
79-144	AEKFFCLSSRN - PDVPHCANINL	0,997
123-193	VGSVCRVMGW - GGSUCNGQFQ	0,999
155-172	FDYEVCLAAYP - TSRTLCAIQIQ	0,999
183-208	GKDTCGSDSG - GDNPCAQPHK	0,998
123-239	VGSVCRVMGW - NTAVTCPPXXX	0,790
13-144	IGGDECNINEH - PDVPHCANINL	0,525

**Quadro 1. Padrão de conectividade das cisteínas**

### Estrutura Terciária

A estrutura terciária foi modelada por via de homologia utilizando-se do PDB-4e7n retirado do Protein Data Bank. O modelo foi gerado por via do SWISS MOD PRO II do ExPasy resultando na seguinte estrutura molecular, que resultou em um score de -1,76 na escala QMEAN4 (valor que indica a confiabilidade da estrutura proteica). A Figura 4 apresenta as regiões de folhas- $\beta$  e  $\alpha$ -hélices.



**Figura 4. Modelo estrutural da gioxina**

Com o modelo apresentado realizou-se a análise pelo Gráfico de Ramachandran que diz respeito à validação estrutural tridimensional da gioxina. Para tal foi executado o PROCHECK com objetivo de construir um Gráfico de Ramachandran. Este gráfico nos fornece a localização dos resíduos de aminoácidos e faz uma análise quanto à localização favorável ou desfavorável dos mesmos (Figura 5).

Como podemos observar a validação por via do PROCHECK mostrou resultados positivos quanto ao modelo gerado. Modelos analisados por difração de raios-X geralmente apresentam 98% de resíduos em regiões favoráveis, nosso modelo apresentou 95,7% destes valores.

Todos os resíduos, com exceção de um, estão em áreas permitidas ou favorecidas. O mais importante, todavia é a observação de que todas as serinas estão localizadas em zonas favorecidas, o que confirma a estrutura tridimensional do modelo como confiável, isto é, tratando-se de uma serinoprotease é muito importante que todas as serinas estejam localizadas nestas regiões favorecidas – o que aumenta consideravelmente a confiabilidade do modelo – e apenas uma prolina, de todos os aminoácidos, apareceu em uma área externa.

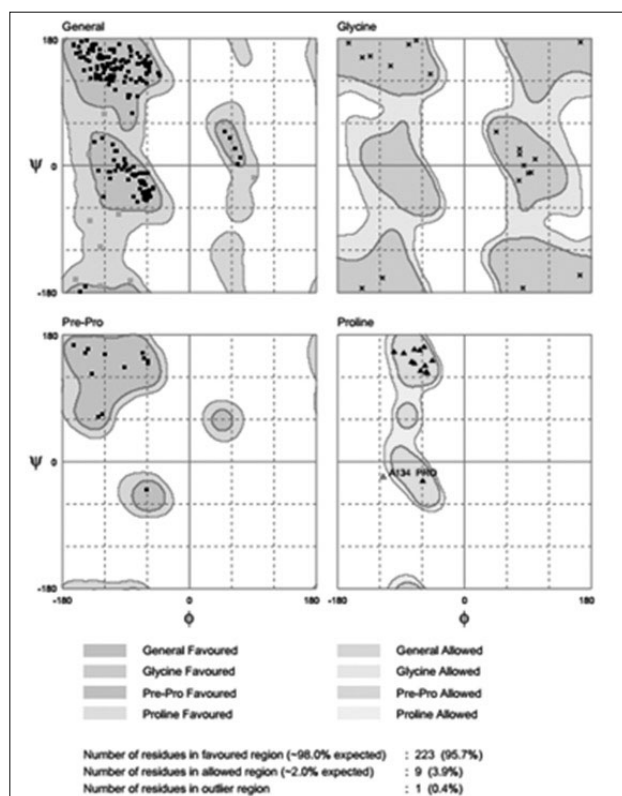


Figura 5. Gráfico de Ramachandran

## Conclusão

O presente trabalho concluiu que a gioxina é uma molécula de caráter ácido, com cerca de 26,5 kDa de peso molecular, possui 3599 átomos em sua estrutura, possui melhor interação em meio aquoso e é considerada uma molécula instável. A proteína-molde selecionada foi a enzima glicosilada trombina-símile do veneno da *Agkistrodon halys*.

O modelo gerado foi validado positivamente e possui uma estrutura tridimensional confiável, segundo as análises conformacionais do PROCHECK. O estudo da gioxina e sua ação em coágulos pode fornecer uma nova gama de fármacos para tratamento de embolias pulmonares, trombose de membros inferiores, infartos cardíacos, síndromes neurodegenerativa e outros transtornos hematológicos.

## Referências

- Matsui T, Fujimura Y, Titani K. "Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis." *Biochim Biophys Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000; 1477(1-2):146-56.
- Braud S, Bon C, Wisner A. "Snake venom proteins acting on hemostasis." *Biochimie*. 2000;82(9):851-9.
- Barrio A. Gyroxin, a new neurotoxina of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol. Latinoamer*. 1961;(11)224.
- Barrabin H. Isolation and characterization of Gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: Rosemberg P. Tosius: animals, plant and microbiol. New York: Pergamon Press; 1978. p.113-33.
- Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. "Evolutionary families of peptidase inhibitors." *Biochem J*. 2004;378(Pt3):705-16.
- Page MJ, Di Cera E. "Serine peptidases: classification, structure and function." *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(7-8):1220-36.
- Alexander GJ. "Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme." *Toxicon*. 1988; 26:953-60.
- Ruiz de Torrent RM, Bongiovanni B, Leiva LC, Evangelista de Duffard AM, Rodríguez JP, Acosta de Pérez OC, et al. Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (preliminary study). *Toxicon*. 2007; 50(1):144-52.
- Yonamine CM. "Clonagem de serino proteases do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* e expressão da gioxina em célula de mamífero." (dissertação de mestrado). São Paulo: JPEN; 2007.
- Raw I. "Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*." *Braz J Med*. 1985;19:333-8.
- Franco, Rendrik F. "Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise." *Medicina*. 2001;34:229-37.
- Koh YS, Chung KH "Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. *Toxicon*. 2001;39(4):555-60.
- Bucarety F. Snakebites by *Crotalus durissus* Ssp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2002;44(3):133-8.
- Rawlings ND. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J*. 2004;378(3):705-16.
- Silva JAA. Mediação dos receptores ativados por proteases (PARs) em atividades biológicas da gioxina (tese de doutorado). São Paulo: IPEN; 2009.
- Arroio A. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Quim Nova*. 2010; 33(3):694-9.
- McKinney JD. The practice of structure activity relationships (SAR) in toxicology. *Toxicol Sci*. 2000;56(1):8-17.
- Laskowski RA. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst*. 1993; 26:283-91.

## Endereço para correspondência:

Vinícius Augusto Rosa da Silva  
Rua Sérgio Labarca, 29 – Jardim Santa Rosália  
Sorocaba-SP, CEP 18095-590  
Brasil

Recebido em 1 de agosto de 2016  
Aceito em 14 de setembro de 2016