

---

# Modelagem molecular da metaloproteinase leucurolisina-a isolada do veneno da serpente *Bothrops leucurus*

*Molecular modeling of metalloproteinase leucurolysin-a isolated from Bothrops leucurus snake venom*

Andressa Lavínia de Lima<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 a estrutura da leucurolisina-a, uma metaloproteinase não hemorrágica, por modelagem molecular. **Método** – A modelagem molecular foi realizada utilizando sequências de proteínas homólogas elucidadas experimentalmente, alinhamento das mesmas, determinação do modelo tridimensional e sua validação, segundo algoritmos de redes neurais. **Resultado** – A leuc-a é uma proteína de 202 aminoácidos, estável, de caráter básico. Com peso molecular estimado em 23019.28 Daltons, sua estrutura secundária é constituída por 35,64%  $\alpha$ -hélices e 26,24% folhas  $\beta$ . Seu modelo foi validado positivamente. **Conclusão** – Como uma SVMPs de classe P-I não hemorrágica, a leuc-a é potencialmente interessante no que condiz a aplicações terapêuticas como alternativa para uso medicinal em trombólise, distúrbios de coagulação envolvendo fibrina e dissolução de coágulos.

**Descritores:** Metaloproteinase; Leucurosilina-a; Modelagem molecular

## Abstract

**Objective** – Determine the structure of leucurolysin-a, a non-hemorrhagic metalloproteinase, by molecular modeling. **Method** – Molecular modeling was fulfilled with the search for sequences of homologous proteins elucidated experimentally, alignment of them, determination of the three - dimensional model and its validation, according to neural network algorithms. **Result** – Leuc-a is a stable, basic 202-amino acid protein. With an estimated molecular weight of 23019.28 Daltons, its secondary structure consists of 35.64%  $\alpha$ -helices and 26.24%  $\beta$ -sheets. His model was validated positively. **Conclusion** – As a non-hemorrhagic P-I class SVMP, leuc-a is potentially interesting in terms of therapeutic applications as an alternative for medicinal use in thrombolysis, coagulation disorders involving fibrin and clot dissolution.

**Descriptors:** Metalloproteinase; Leucurolysin-a; Molecular modeling

---

## Introdução

No Brasil, os acidentes com animais peçonhentos constituem um problema de saúde desde os mais remotos tempos. Sua ocorrência está, em geral, relacionada a fatores climáticos e aumento da atividade humana nos trabalhos no campo<sup>1</sup>. No Brasil, a fauna ofídica de interesse médico está representada pelos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*, onde as serpentes do gênero *Bothrops* compreendem cerca de 30 espécies e são as responsáveis por mais de 20.000 acidentes notificados anualmente ao Ministério da Saúde<sup>2</sup>. A serpente *Bothrops leucurus* (Jararaca de cauda branca) é uma importante representante deste gênero, tendo maior incidência no sudeste e nordeste, com preferências por climas úmidos a semi-úmidos<sup>3,4</sup>.

A leucurolisina-a (leuc-a), uma metaloproteinase de veneno de serpente (SVMPs) não hemorrágica de 23 kDa, é encontrada no veneno da víbora *Bothrops leucurus* e foi primeiramente purificada em 2005<sup>5</sup>. Esta metaloproteinase possui 202 resíduos de aminoácidos em cadeia polipeptídica contendo um N-terminal bloqueado e não glicosilado<sup>6</sup>. Como uma SVMPs da classe P-I, contém apenas o domínio metaloprotease que envolve o sítio catalítico, que parece estar envolvida na interação com diferentes substratos<sup>6</sup>.

Apresenta pH ótimo para atividade por volta de 7,0 atingindo atividade máxima entre 30-40<sup>o</sup> 5.

Embora seja contrária a outros venenos fibrinolíticos por sua ausência de atividade hemorrágica, talvez por diferenças sutis nos resíduos de superfície<sup>6</sup> ou por não ativar plasminogênio<sup>5</sup>, a leuc-a representa 45% do total de proteínas do veneno e devido a isso pode desempenhar a ruptura da membrana basal com desprendimento celular, provavelmente como resultado da atividade proteolítica sobre proteínas específicas<sup>7</sup>. Apresenta ainda grande impacto como anticoagulante através da hidrólise rápida da fibrina (dose-dependente) independente da ativação do plasminogênio à plasmina<sup>7</sup>, inibição da agregação plaquetária induzida por ADP de forma dose-dependente uma vez que o processo de agregação depende da ligação de plaquetas ao fibrinogênio, que é degradada pela metaloprotease<sup>5</sup>; indução a edema por aumento de permeabilidade vascular comprometendo paredes de vasos sanguíneos, comprovada em patas de ratos<sup>5</sup>, citotoxicidade das células endoteliais por atuar sobre moléculas da matriz extracelular<sup>5,7</sup>, além da capacidade de dissolver trombos de coágulos sanguíneos inteiros in vitro<sup>5,8</sup>. Uma vez que a Leuc-a é uma metaloproteinase, ela não é afetada por nenhum dos inibidores da serinoproteinase mas é rapidamente neutralizada e removida da circulação pela -macroglobulina<sup>5</sup>.

É sabido que a atividade farmacológica depende de um complexo de moléculas bioativas e os seus receptores, que dependem de um mecanismo de reconhecimento molecular que determina sua seletividade<sup>9</sup>. A nível experimental, o conhecimento da estrutura molecular com o uso da cristalografia em 3D permite determinar a arquitetura molecular de receptores e proteínas tornando possível o conhecimento preciso de suas estruturas, interações moleculares, assim como sua geometria e de características estruturais primordiais na compreensão da estrutura-atividade<sup>10</sup>. Esta metaloproteinase é potencialmente interessante, uma vez que pode ter aplicações terapêuticas como alternativa para uso medicinal em trombólise, dissolução de coágulos e distúrbios de coagulação envolvendo fibrina. O presente trabalho propõe a modelagem molecular por via comparativa da leucurolisina-a.

## Métodos

A sequência de aminoácidos da Leuc-a foi obtida pelo acesso ao Banco de dados proteicos disponível pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information) em formato FASTA, que representa a sequência de nucleotídeos ou aminoácidos usando códigos de uma única letra. Primeiramente, foi utilizado o programa ProtParam no ExPASy Server, ferramenta que permite a computação de vários parâmetros físicos e químicos, incluindo o peso molecular, o pI teórico entre outros.

A determinação das similaridades entre a proteína em pesquisa e sequências biológicas conhecidas utilizou o programa BLAST que calculou entre as estatísticas significativas 2 templates em destaque: 1) 3GBO (BmooMP -I da serpente *Bothrops moojeni*) com similaridade de 83%; e 2) 1ND1 (Bap1 da serpente *Bothrops asper*) com similaridade de 79%.

A estrutura secundária foi obtida pelo Software PSIPRED cedido pelo UCL – Department Of Computer Science bioinformatics group. Para a análise das cisteínas foi utilizada a ferramenta de bioinformática DiANNA (DiAminoacid Neural Network Application). Foi realizado ainda um estudo das estruturas secundárias destas proteínas, por intermédio de uma interface do PDB (Protein Data Bank). O alinhamento da estrutura secundária das duas proteínas com altos scores foi realizado utilizando o programa Cluster que revela regiões de similaridade que podem indicar relações funcionais, e/ou evolutivas. A modelagem foi realizada utilizando o servidor SWISS-MODEL, que permite a modelagem por homologia de estrutura de proteína totalmente automatizado e a visualização do modelo utilizou a ferramenta POLYVIEW-3D. O modelo foi validado através do programa Verify\_3D cedido pelo UCLA (Molecular Biology Institute) e o gráfico de Ramachandran obtido juntamente ao programa RAMPAGE classificando os resíduos na região permitida, região generosamente permitida e região proibida.

## Resultados

### Estrutura Primária

A estrutura primária de uma proteína descreve apenas o número e a sequência linear de aminoácidos que a constitui, sem considerar nenhum aspecto de conformação espacial, porém é de extrema importância, pois é ela quem determina sua função biológica. A sequência de aminoácidos da metaloproteinase leucurolisina-a foi representada na figura.1.

A predição dos parâmetros físico-químicos nos revela que a leuc-a possui ponto isoelétrico 6.85, demonstrando ser uma proteína de caráter básica. A figura. 2 compila os parâmetros físico-químicos mais relevantes:

Foi revelado ainda que a leuc-a se apresenta como uma proteína estável através da análise da estimativa da estabilidade da proteína onde obteve-se o índice de 26,31 (considerado estável sendo < 40). O índice alifático (volume relativo ocupado por cadeias laterais alifáticas de alanina, valina, isoleucina e leucina) se apresentou de 82,48 e a média de hidropatia foi de -0.338.

```

10      20      30      40      50      60
QQFSPRYIEL VVVADHGMFK KYNSNLNITR KVVHEMLNTV NGFFRSMMVD ASLVNLEVWS
70      80      90      100     110     120
KKDLIKVEKD SSKTLTSFGE WRERDLLPRI SHDHAQLLTV IVFDEETIGI AYTAGMCDLS
130     140     150     160     170     180
QSVAVVVDHS KKNLRVAVTM AHELGHNLGI RHDGNQCHCN APSCIMADTL SKGLSFEFSD
190     200
CSQNQYQTYL TKHNPQCILN KP

```

Figura 1. Estrutura primária da leuc-a

```

Fórmula: C 1009 H 1585 N 285 O 303 S 14
Número total de átomos: 3196
Composição atômica:
Carbono C 1009
Hidrogênio H 1585
Nitrogênio N 285
Oxygen O 303
Enxofre S 14
Número de aminoácidos: 202
Peso molecular: 23005.25
PI teórico: 6.85
Número total de resíduos carregados
negativamente (Asp + Glu): 22
Número total de resíduos carregados
positivamente (Arg + Lys): 21
Coeficientes de extinção:
Os coeficientes de extinção estão em unidades
-1 -1
de M cm , a 280 nm, medida em água.
Ext. coeficiente 24325
Abs 0,1% (= 1 g / l) 1,057, assumindo que todos
os pares de resíduos Cys formam cisteína
Ext. coeficiente 23950
Abs 0,1% (= 1 g / l) 1,041, assumindo que todos
os resíduos Cys são reduzidos

```

Figura 2. Parâmetros físico-químicos



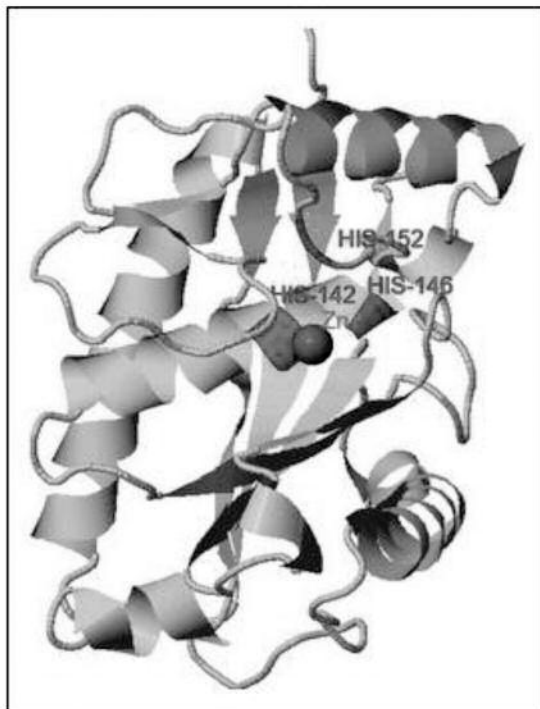


Figura 5. Estrutura 3D obtida da leuc-a

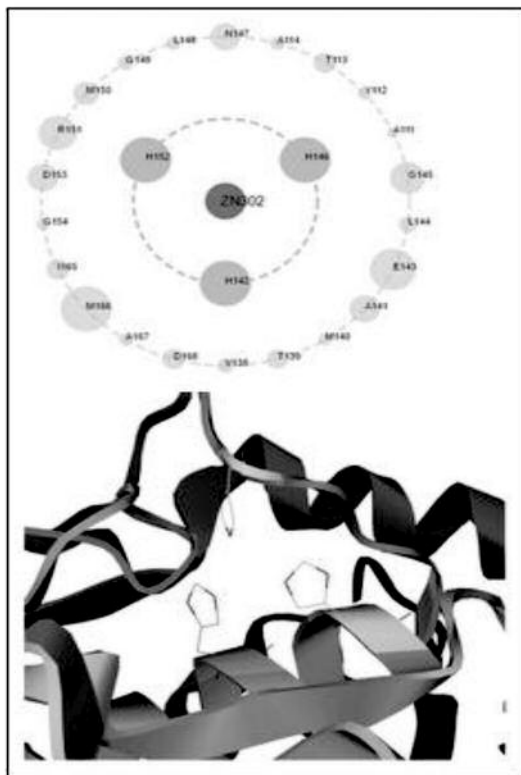


Figura 6. Sítio catalítico da leuc-a

O estudo da estrutura secundária foi realizado com as proteínas candidatas a template: a proteína BmooMpalpha-I apresenta similaridade da estrutura secundária de 352.443 bits enquanto a BaP-1 apresenta 335.109 bits.

A qualidade do modelo está diretamente ligada à identidade entre o modelo e as sequências de destino. Os modelos construídos com mais de 50% de similaridades de sequência são precisos o suficiente para aplicações de descoberta de medicamentos. Apesar da proteína BmooMpalpha-I apresentar maior similaridade, a mesma ainda carece de mais estudos sobre estrutura, portanto a proteína BaP1 foi utilizada como template.

A figura 5 e 6 apresentam ainda o ambiente de ligação do íon zinco. Todos os modelos cristalográficos de SVMP de classe P-I já descritos exibem em seu sítio catalítico um átomo de  $Zn^{2+}$  ligado a 3 moléculas de His e uma molécula de água.

A estimativa a qualidade sobre toda a estrutura e por resíduos com base em um único modelo (QMEAN) do modelo foi -2.30 e GMQE (estimativa da qualidade entre as propriedades do alinhamento do modelo-alvo expresso entre 0 e 1) igual a 0,86 indicando que o modelo obtido possui elevada confiabilidade. A verificação da estrutura terciária utilizando o Verify\_3D atribuiu um score de 98,51% com base em sua localização e ambiente (alfa, beta, loop, polar, não-polar, etc), por tanto se mostra um excelente modelo estrutural.

O gráfico de Ramachandran que representa a distribuição das conformações de esqueleto de aminoácidos nas estruturas da proteína se mostrou um modelo favorável, pois apresentou 98,5% de seus aminoácidos na sua

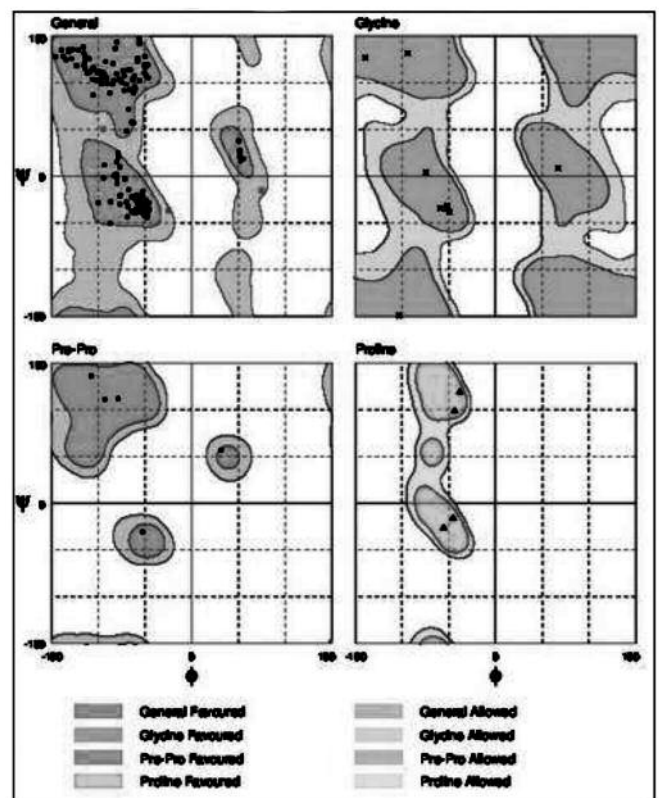


Figura 7. Gráfico de Ramachandran

área favorecida (necessário > 98%) e 3 glicinas em áreas desfavoráveis, explicado por sua ausência de cadeia lateral o que a torna menos conformacionalmente limitada do que os aminoácidos com cadeias laterais mais longas. O gráfico está representado na figura 7.

## Discussão

Os venenos de cobra são uma excelente fonte de moléculas, sendo encontradas uma mistura extraordinária de proteínas e fatores de dispersão. Para evitar danos a sua glândula, que reserva o veneno por várias semanas, a mesma possui um processo multifatorial que controla esta mistura letal para desengatar prontamente somente quando é necessário sua liberação. Entre as proteínas ativas no veneno, a metaloproteínase leuc-a desempenha um papel importante durante o envenenamento.

Apesar da leucurolisina-a ser desprovida de atividade hemorrágica, a mesma causa efeitos altamente deletérios, resultado de componentes tóxicos que podem atuar sinergicamente com a mesma. Segundo sugerido por Gremski et al. pode ser resultado da atividade direta em células endoteliais, ou devido a uma resposta indireta a ação proteolítica dos componentes da matriz extracelular. Já para Bello et al., seus efeitos estão provavelmente relacionados aos seus domínios de metaloproteínases e a alta similaridade de sequência entre as proteínas do grupo das SVMPs da classe I.

O potencial hemorrágico altamente variável das SVMP de P-I carece de novos estudos para testar as hipóteses e discernir as bases estruturais por trás de tal efeito, mas essas enzimas diferem em sua capacidade de hidrolisar as proteínas da membrana basal *in vitro* e, mais relevante, *in vivo*. Segundo Gutierrez et al. o colágeno tipo IV desempenha um papel importante na estabilidade da membrana basal, contribuindo para a estabilidade mecânica desta estrutura de matriz extracelular e há uma grande diferença na hidrólise do colágeno tipo IV pelas enzimas da classe I, o que sugere que a degradação deste importante componente da membrana basal é um ponto relevante para definir o mecanismo de ação tão variado das SVMPs hemorrágicas e não hemorrágicas.

## Conclusão

O presente trabalho revelou que a leucurolisina-a é uma metaloprotease de caráter básica, possuindo 202 aminoácidos em sua composição com 3199 átomos distribuídos na fórmula molecular  $C_{1009}H_{1585}N_{285}O_{303}S_{14}$ . A estrutura secundária foi compreendida possuindo 35,64% constituída por  $\alpha$ -hélices (Alpha Helix) e 26,24% por folhas  $\beta$  (Extended beta). A estrutura terciária foi resolvida utilizando como molde a também metaloprotease BaP1 onde a estrutura 3D apresentou alto score de confiabilidade, assim como o gráfico de Ramachandran, que apresentou 98,5% de seus aminoácidos em regiões favorecidas (alta confiabilidade >98%). Tendo em vista uma possível aplicação clínica de enzimas fibrinogenolíticas não hemorrágicas,

o estudo da leucurolisina-a abre um leque de fármacos que podem ser utilizados para tratamento de trombólise, terapia de dissolução de coágulos sanguíneos, além da inibição de enzimas que estão envolvidas na gênese de várias patologias associadas aos acidentes ofídicos, como a hemorragia e o edema.

## Referências

1. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed, Brasília: Funasa, 2001.
2. Ribeiro L.A, Jorge MT. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: Série de 3.139 casos. Rev Soc Bras Med Trop 1997;30(6):475-80.
3. Morais I C O. Estudo dos efeitos renais e mecanismos de morte celular induzidos pelo veneno da serpente *Bothrops leucurus* [dissertação de mestrado] Ceará: Universidade Federal; 2011.
4. Silva RML. Estudos farmacológicos do veneno de *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae) [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2001.
5. Bello CA, Hermogenes AL, Magalhães A, Veiga SS, Gremiski LH. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (White-tailed jararaca) snake venom. Biochimie. 2006; 88(2): 189-200.
6. Ferreira RN, Complete amino-acid sequence, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of leucurolysin-a, a nonhaemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2009;65(8): 798-801.
7. Gremski LH, Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a Metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. Toxicon. 2007;50(1):120-34.
8. Barrett A J. et al. Handbook of proteolytic enzymes. 3rd Ed Cambridge, 2013.
9. Barreiro E J, Rodrigues CR. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. Química Nova.1997;20(1).
10. COHEN, N.C. Guidebook on molecular modeling in drug design. San Diego: Academic Press, 1996.
11. Marino E M, Gladyshev V N. Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues. J Biol Chem. 2012. 287(7): 4419-425.
12. Vyas VK. Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. Indian JPharm Sci. 2012;74(1):1-17.

### Endereço para correspondência:

Alípio de Oliveira Carmo  
Universidade Paulista  
Rua Dr. Bacelar, 1212  
São Paulo-SP, CEP 04026-002  
Brasil  
e-mail: alipio.carmo@docente.unip.br

Recebido em 17 de janeiro de 2018  
Aceito em 11 de abril de 2018