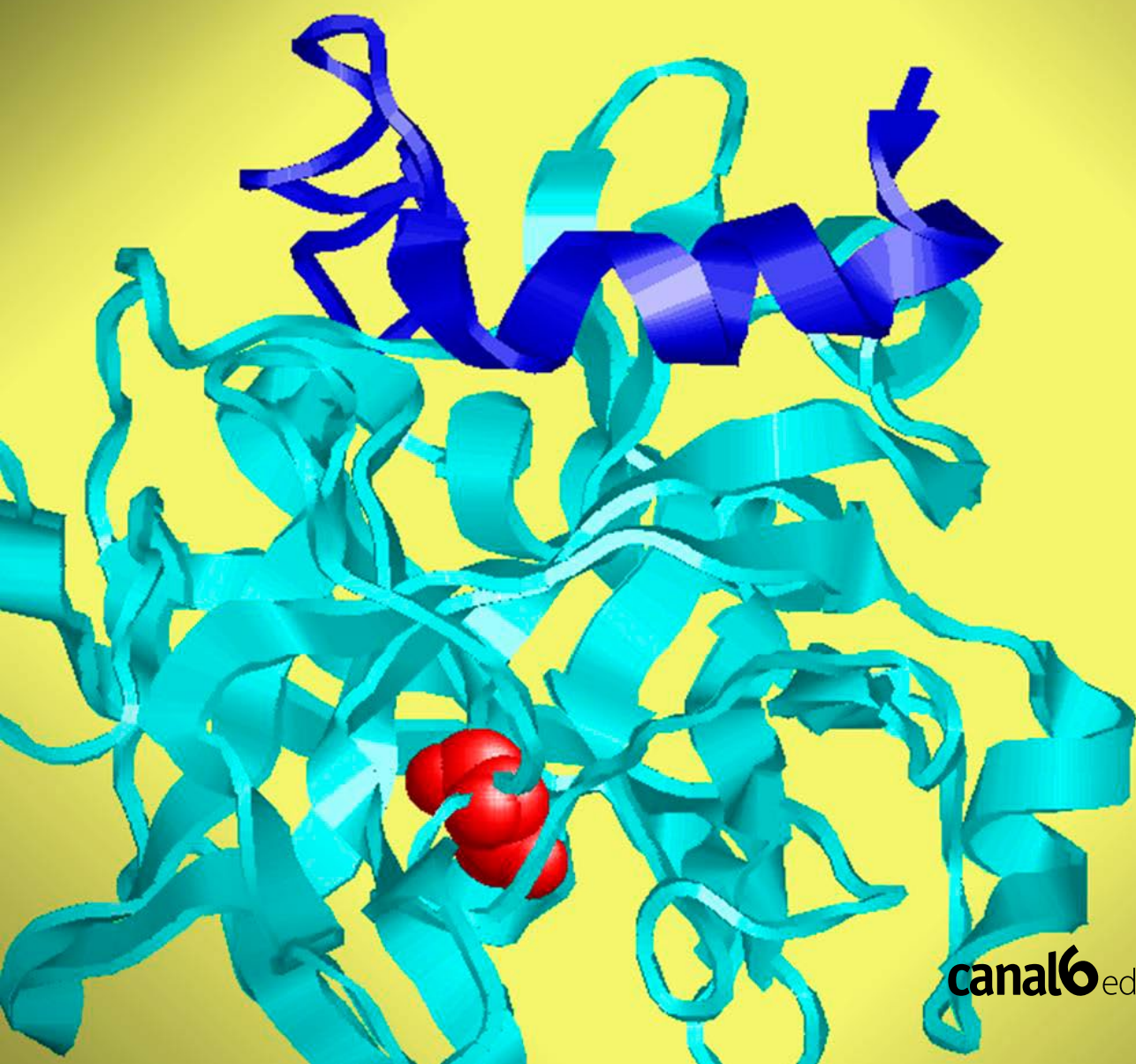


# Trombina

Precursos, ligantes e inibidores

Angélica Alves Pinheiro  
Renato Massaharu Hassunuma



# Trombina

Precursos, ligantes e inibidores

**Angélica Alves Pinheiro**

*Aluna de Graduação do Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado da  
Universidade Paulista – UNIP, campus Bauru*

**Renato Massaharu Hassunuma**

*Professor Titular do Curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Paulista – UNIP, campus Bauru*

**1ª Edição / 2018**  
**Bauru,SP**

**canal6** editora

© Renato Massaharu Hassunuma.

**Conselho Editorial:**

PROFA. MA. ELIANE PASSARELLI VIEIRA  
*Universidade Paulista – UNIP, campus Bauru*

BIOMÉDICA KELLY COLUSSI PINHEIRO PRECIPITO  
Biomédica Especialista em Reprodução Humana Assistida pela Associação Instituto Sapientiae

PROFA. DRA. MICHELE JANEGITZ ACORCI VALÉRIO  
*Universidade Paulista – UNIP, campus Bauru*

PROFA. DRA. PATRÍCIA CARVALHO GARCIA  
*Universidade Paulista – UNIP, campus Bauru*

**Capa:**

Figura desenvolvida a partir do arquivo 1ppb.pdb referente a trombina humana, determinada por técnica de difração de raios X em resolução de 1,92 Å.

**Design:**

Renato Massaharu Hassunuma

**canal6** editora

Rua Machado de Assis, 10-35  
Vila América | CEP 17014-038 | Bauru, SP  
Fone/fax (14) 3313-7968 | [www.canal6.com.br](http://www.canal6.com.br)

CIP – Brasil. Catalogação na Publicação

---

P654t

Trombina: precursores, ligantes e inibidores / Angélica Alves Pinheiro e Renato Massaharu Hassunuma. - Bauru: Canal 6, 2018.

Inclui bibliografia

56 f. : il. color.

ISBN: 978-85-7917-482-7

1. Bioquímica. 2. Bioinformática.  
3. Trombina. I. Pinheiro, Angélica Alves. II. Hassunuma, Renato Massaharu. III. Título.

---

CDD: 547  
CDU: 577.1

## Dedicatória

### De Angélica Alves Pinheiro

Dedico este livro ao **Prof. Dr. Renato Massaharu Hassunuma**, Professor Titular da Universidade Paulista – UNIP, campus Bauru, que tornou possível a publicação deste *e-book*, e também por sua orientação e incentivo. Também dedico ao **Dr. Marcelo Bernadini Antunes**, hematologista e supervisor técnico do Centro de Oncologia do Hospital Estadual de Bauru - SP (HEB), por sua dedicação em meu tratamento.

### De Renato Massaharu Hassunuma

Dedico este livro ao **Prof. Aziz Kalaf Filho**, digníssimo diretor da Universidade Paulista – UNIP, campus Bauru e ao **Prof. Dr. Rafael Campanelli Mortari**, pelo apoio oferecido no desenvolvimento deste *e-book*.

# Agradecimentos

## De Angélica Alves Pinheiro

Profa. Dra. Ariadne de Andrade Costa, Profa. Dra. Andréa Maria Antunes, Profa. Adriana Maria Silva, Gerson Luiz Alves Pinheiro, Dr. Luís Gustavo Ducati, Mércia Silvana Reghine Alves Pinheiro e Profa. Dra. Teresa Cristina de Barros.

## De Renato Massaharu Hassunuma

Angélica Alves Pinheiro, Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi, Prof. Dr. Aguinaldo Robinson de Souza e Profa. Ma. Patrícia Kubo Fontes.

## Dos autores

Agradecemos a Dra. Patrícia Carvalho Garcia, a Profa. Dra. Michele Janegitz Acorci Valério, a Profa. Ma. Eliane Passarelli Vieira e a Biomédica Kelly Colussi Pinheiro Precipito, por comporem o Conselho Editorial deste livro e pelas suas valiosas contribuições.

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Trombina</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Tríade catalítica</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>Exosítio I</b>	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>Exosítio II</b>	<b>20</b>
<b>6</b>	<b>Protrombina</b>	<b>24</b>
<b>7</b>	<b>Pré-trombina-1</b>	<b>28</b>
<b>8</b>	<b>Pré-trombina-2</b>	<b>32</b>
<b>9</b>	<b>Fibrinogênio</b>	<b>36</b>
<b>10</b>	<b>Ligação da trombina com o fibrinogênio</b>	<b>40</b>
<b>11</b>	<b>Ligação da trombomodulina com a trombina</b>	<b>44</b>
<b>12</b>	<b>Ligação do hirulog com a trombina</b>	<b>48</b>
<b>13</b>	<b>Ligação da estafilocagulase com a trombina</b>	<b>52</b>

# 1 Introdução

Este livro teve como objetivo principal realizar uma análise estrutural da trombina, e seus precursores protrombina, pré-trombina-1 e pré-trombina-2, bem como, as ligações da trombina com o fibrinogênio, a trombomodulina, a hirudina e a estafilocagulase.

Para realizar estas análises foram utilizados arquivos PDB obtidos gratuitamente no site Protein Data Bank (Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Os códigos apresentados (PDBids) referem-se aos arquivos PDB utilizados para produzir as imagens no software RasMol.

A partir da seleção dos arquivos PDB, foi utilizado o software RasMol 2.7.4.2 para o desenvolvimento de scripts para gerar as imagens presentes no livro. Este programa computacional pode ser obtido gratuitamente no site Home Page for RasMol and OpenRasMol (Disponível em: <http://www.openrasmol.org/>).

Este programa computacional permite a utilização de diferentes comandos interativos por meio da Janela RasMol Command Line. Mais informações sobre os comandos utilizados neste programa podem ser encontrados no Manual do RasMol (Disponível em: <http://www.csb.yale.edu/userguides/graphics/rasmol/rasmol.pdf>).

Os resultados apresentados são resultantes do Projeto de Iniciação Científica da aluna de graduação Angélica Alves Pinheiro do Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado da Universidade Paulista – UNIP, campus Bauru, sob orientação do Prof. Dr. Renato Massaharu Hassunuma, Professor Titular do Curso de Ciências Biológicas.

## 2 Trombina

Código PDB: 1PPB

A trombina ou fator IIa é uma importante enzima que participa do processo de coagulação sanguínea, o qual envolve vários fatores de coagulação e outras substâncias. Sua função principal é a conversão de fibrinogênio em fibrina, mas também age sobre os fatores V, VIII e XIII (Fenton, 1981; Trombina, 2014).

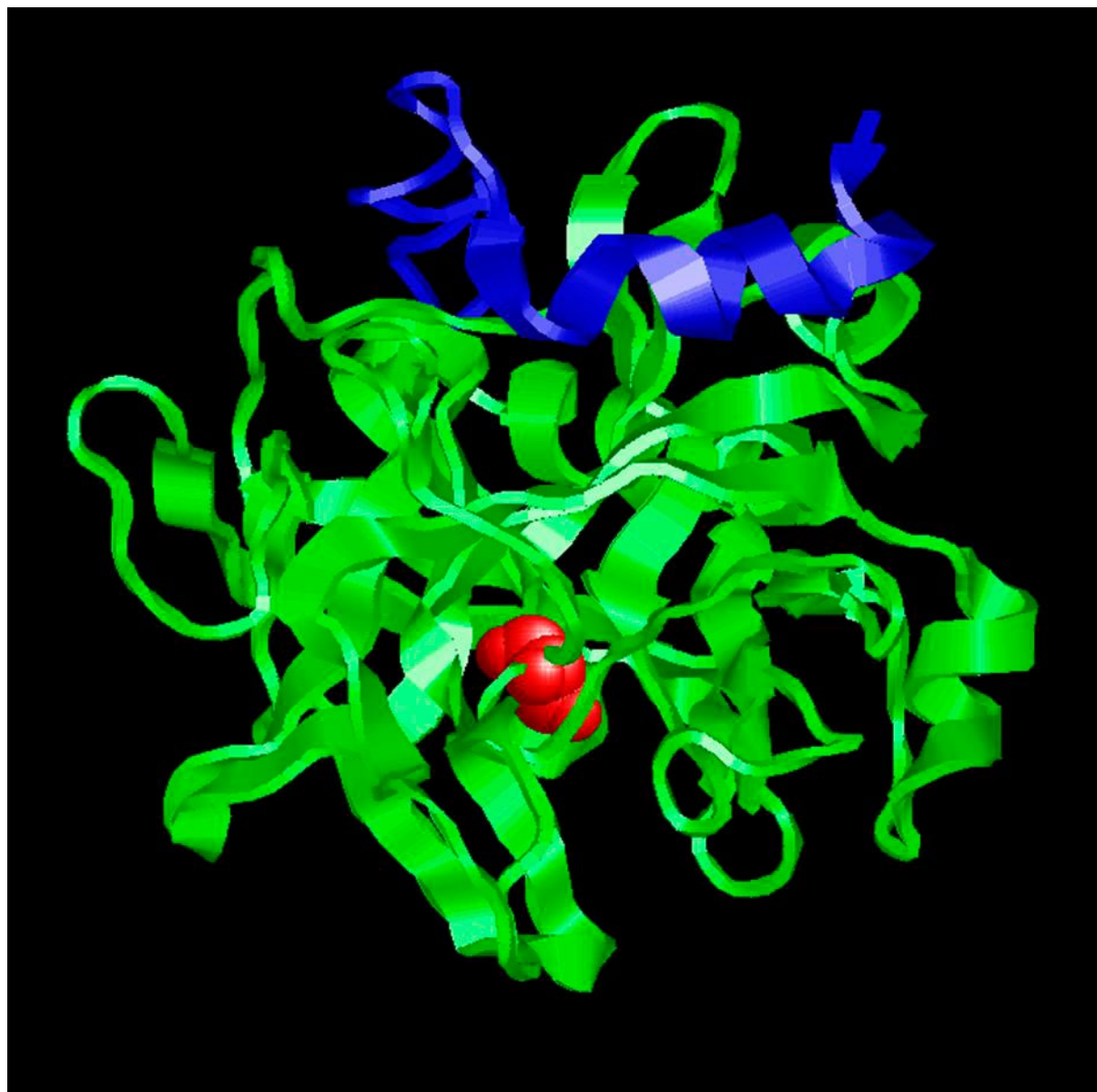
A trombina é classificada como uma serino protease, pois utiliza um único resíduo de serina ativada no sítio de ligação para hidrolisar ligações peptídicas de um determinado substrato. Embora uma serino protease possa apresentar mais de um resíduo de serina, apenas um dos resíduos é cataliticamente ativo e participa da hidrólise da ligação peptídica (Schultz, Leibman, 2000). Na trombina, esse resíduo corresponde à serina 195 (Solomons, 2011).



Na figura 1, observa-se a trombina representada no Modo *Cartoons*. Esta enzima está constituída por duas cadeias: a subunidade maior, representada em verde (*green*), e a subunidade menor, representada em azul (*blue*). Está representado também o resíduo serina 195 no Modo *Spacefill* e em vermelho (*red*).

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 1PPB.pdb e está apresentado no quadro 1.



Figura 1 – Trombina



Legenda de cores		
Estrutura	Cor	Amostra de cor
Subunidade maior	Verde ( <i>green</i> )	
Subunidade menor	Azul ( <i>blue</i> )	
Serina 195	Vermelho ( <i>red</i> )	

## Quadro 1 - Script desenvolvido para trombina

```
load 1ppb.pdb
wireframe off
cartoons
select *l
colour blue
select *h
colour green
select ser195
spacefill
colour red
rotate x 140
rotate y -20
translate y 4
zoom 150
```

## Referências

Fenton JW II. Thrombin specificity. Ann NY Acad Sci [Internet]. 1981 [citado 2017 jul. 23];370:468-95. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1981.tb29757.x/abstract>.

Schultz RM, Leibman MN. Proteínas II: Relações estrutura-função nas famílias de proteínas. In: Devlin TM. Manual de Bioquímica com correlações clínicas. 4 ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda; 2000. cap. 3, p. 71-104.

Solomons TWG. Organic chemistry. 10th ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2011.

Trombina [Internet]. 2014. [citado 2017 jul. 23]. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Trombina>.

## 3 Tríade Catalítica

Código PDB: 1PPB

Na trombina, o sítio ativo da molécula é formado por um conjunto de três resíduos de aminoácidos, denominados conjuntamente de tríade catalítica. Um dos resíduos corresponde à serina 195, que caracteriza a trombina como uma serinoprotease, conforme descrito no Capítulo 2 – Trombina. Além deste resíduo, constituem a tríade catalítica os resíduos de histidina 57 e aspartato 102 (Solomons, 2011).

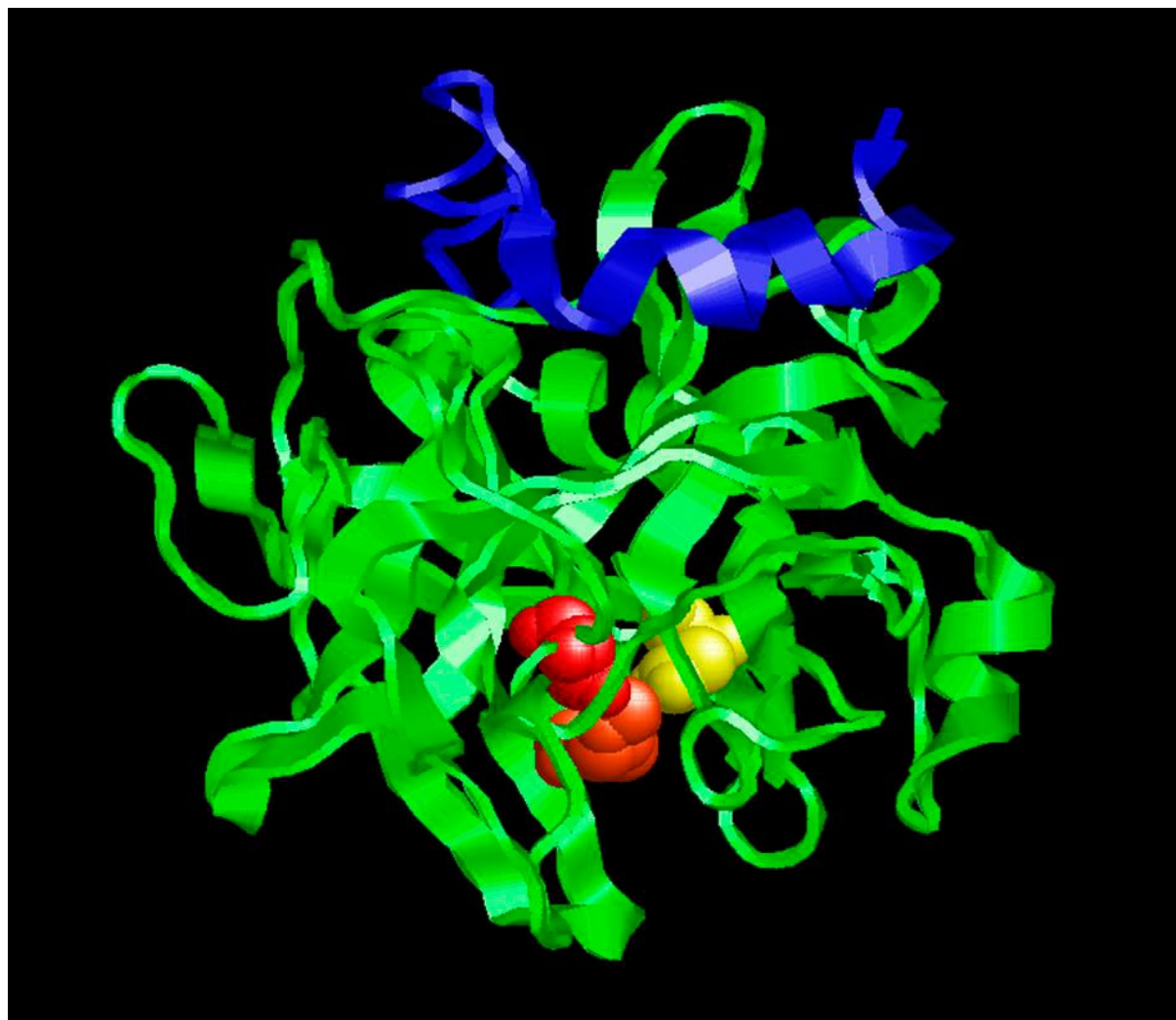
Além da tríade catalítica, existem duas outras regiões importantes de ligação: o exosítio I e o exosítio II, que serão descritos posteriormente nos Capítulos 4 e 5. Desta forma, a maioria dos inibidores da trombina pode ser classificada de acordo com os possíveis sítios de ligação: (1) inibidores que se ligam exclusivamente ao sítio ativo, (2) inibidores que se ligam ao sítio ativo e ao exosítio 1, (3) inibidores que se ligam ao sítio ativo e ao exosítio 2 e (4) inibidores que se ligam exclusivamente ao exosítio 1 (Tsiang, Jain, Dunn, Rojas, Leung, Gibbs, 1995).






Na figura 2, observa-se a trombina representada no Modo *Cartoons*, sendo a subunidade maior representada em verde (*green*) e a subunidade menor representada em azul (*blue*). Os resíduos que compõem a tríade catalítica estão representados no Modo *Spacefill*, sendo o resíduo de aspartato 102 apresentado em amarelo (*yellow*), histidina 57 em vermelho alaranjado (*redorange*) e serina 195 em vermelho (*red*).

Nesta figura, observa-se também que os três resíduos estão localizados numa região mais profunda da molécula, numa área denominada de bolsão hidrofóbico (Solomons, 2011).

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 1PPB.pdb e está apresentado no quadro 2.

Figura 2 – Tríade catalítica



Legenda de cores		
Estrutura	Cor	Amostra de cor
Subunidade maior	Verde ( <i>green</i> )	
Subunidade menor	Azul ( <i>blue</i> )	
Aspartato 102	Amarelo ( <i>yellow</i> )	
Histidina 57	Vermelho alaranjado ( <i>redorange</i> )	
Serina 195	Vermelho ( <i>red</i> )	

## Quadro 2 - Script desenvolvido para tríade catalítica

```
load 1ppb.pdb
wireframe off
cartoons
select *l
colour blue
select *h
colour green
select asp102
spacefill
colour yellow
select his57
spacefill
colour redorange
select ser195
spacefill
colour red
rotate x 140
rotate y -20
translate y 4
zoom 150
```

## Referências

Solomons TWG. Organic chemistry. 10th ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2011.

Tsiang M, Jain AK, Dunn KE, Rojas ME, Leung LLK, Gibbs CS. Functional mapping of the surface residues of human thrombin. J Biol Chem [Internet]. 1995 [citado 2018 fev. 12];270(28):16854-63. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/270/28/16854.long>.

## 4 Exosítio I

Código PDB: 1PPB

Conforme mencionado no Capítulo 3 – Triáde catalítica, a trombina apresenta além do sítio catalítico, outros dois exosítios. Enquanto a triáde catalítica que compõe o sítio catalítico está localizada no centro da molécula, os exosítios I e II encontram-se em posição mais afastada do sítio ativo e em regiões opostas (Fenton, 1981; Lane, Philippou, Huntington, 2005).

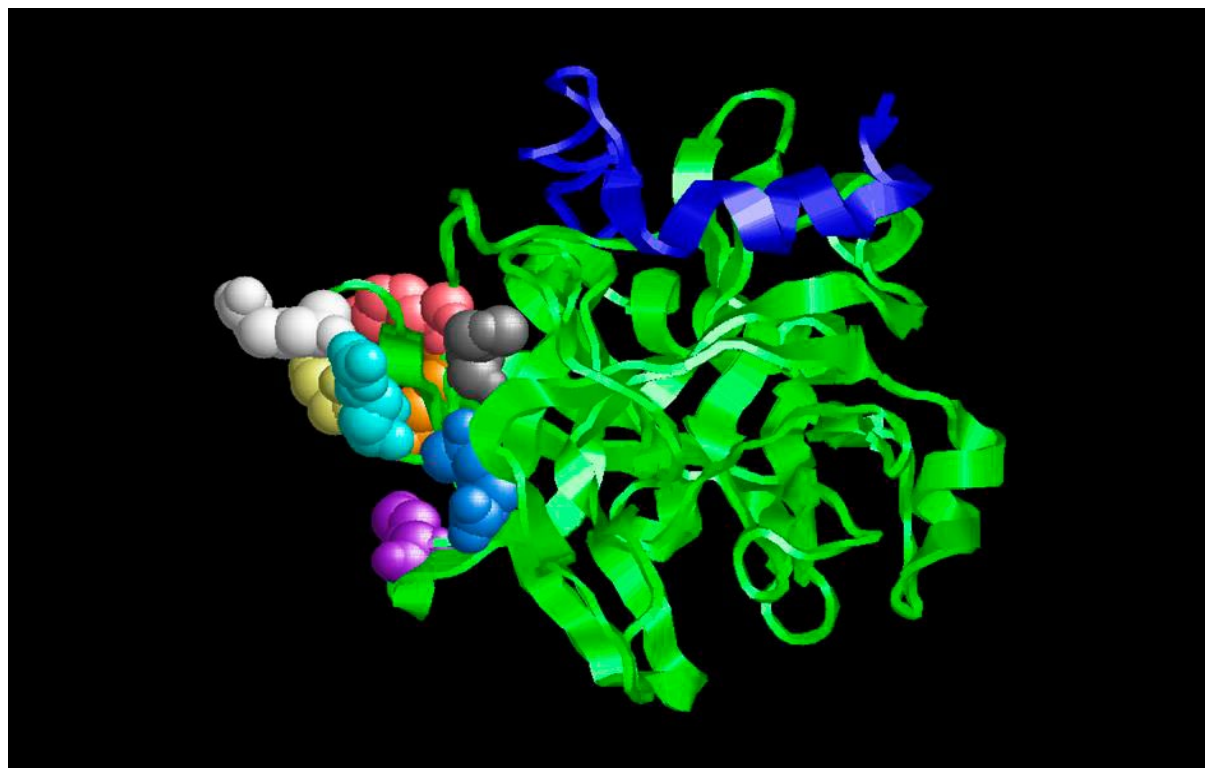
O exosítio I é composto pelos resíduos de: arginina 73, arginina 75, arginina 77, histidina 71, lisina 36, lisina 109, lisina 110 e tirosina 76 (Lane, Philippou, Huntington, 2005). A interação do fibrinogênio com a trombina ocorre por meio de ligações que ocorrem no sítio ativo e no exosítio I. Assim sendo, o exosítio I desempenha um papel importante na ligação da trombina com o fibrinogênio, uma vez que permite que o complexo se posicione corretamente, de modo que os sítios de clivagem do fibrinogênio estejam corretamente alinhados junto à triáde catalítica. A função da trombina pode ser inibida pela ligação de diferentes inibidores com o exosítio I, entre eles estão: hirudina, trombomodulina, entre outros (Di Cera, 2003).









Na figura 3, observa-se a trombina representada no Modo *Cartoons* sendo a subunidade maior representada em verde (*green*) e a subunidade menor representada em azul (*blue*). Os resíduos do exosítio I estão apresentados no Modo *Spacefill* em diferentes cores: arginina 73 em azul celeste (*skyblue*), arginina 75 em ciano (*cyan*), arginina 77 em branco (*white*), histidina 71 em cinza (*grey*), lisina 36 em púrpura (*purple*), lisina 109 em ouro (*gold*), lisina 110 em rosa (*pink*) e tirosina 76 em amarelo matiz (*yellowtint*).

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 1PPB.pdb e está apresentado no quadro 3.



Figura 3 – Exosítio I



Legenda de cores		
Estrutura	Cor	Amostra de cor
Subunidade maior	Verde ( <i>green</i> )	
Subunidade menor	Azul ( <i>blue</i> )	
Arginina 73	Azul celeste ( <i>skyblue</i> )	
Arginina 75	Ciano ( <i>cyan</i> )	
Arginina 77	Branco ( <i>white</i> )	
Histidina 71	Cinza ( <i>grey</i> )	
Lisina 36	Púrpura ( <i>purple</i> )	
Lisina 109	Ouro ( <i>gold</i> )	
Lisina 110	Rosa ( <i>pink</i> )	
Tirosina 76	Amarelo matiz ( <i>yellowtint</i> )	

### Quadro 3 - Script desenvolvido para exosítio I

```
load 1ppb.pdb
wireframe off
cartoons
select *l
colour blue
select *h
colour green
select arg73
colour skyblue
spacefill
select arg75
colour cyan
spacefill
select arg77
colour white
spacefill
select his71
colour grey
spacefill
select lys36
colour purple
spacefill
select lys109
colour gold
spacefill
select lys110
colour pink
spacefill
select tyr76
colour yellowtint
spacefill
rotate x 140
rotate y -20
translate y 4
zoom 150
```

## **Referências**

Di Cera E. Thrombin interactions. Chest [Internet]. 2003 [citado 2018 fev. 12]:124(3 Suppl):11S-7S. Disponível em: [http://journal.chestnet.org/article/S0012-3692\(15\)31753-0/fulltext](http://journal.chestnet.org/article/S0012-3692(15)31753-0/fulltext).

Fenton JW II. Thrombin specificity. Ann NY Acad Sci [Internet]. 1981 [citado 2017 jul. 23];370:468-95. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1981.tb29757.x/abstract>.

Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. Blood. [Internet]. 2005 [citado 2018 fev. 13]:106(8):2605-12. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/106/8/2605.full.pdf?sso-checked=true>.

## 5 Exosítio II

Código PDB: 1PPB

O exosítio II corresponde a uma terceira área importante de ligação da trombina com diferentes substâncias. Assim como o exosítio I, esta área de interação também é rica em resíduos de arginina e lisina. O exosítio II é composto pelos resíduos de: arginina 93, arginina 101, arginina 233, lisina 236, lisina 240 (Lane, Philippou, Huntington, 2005).

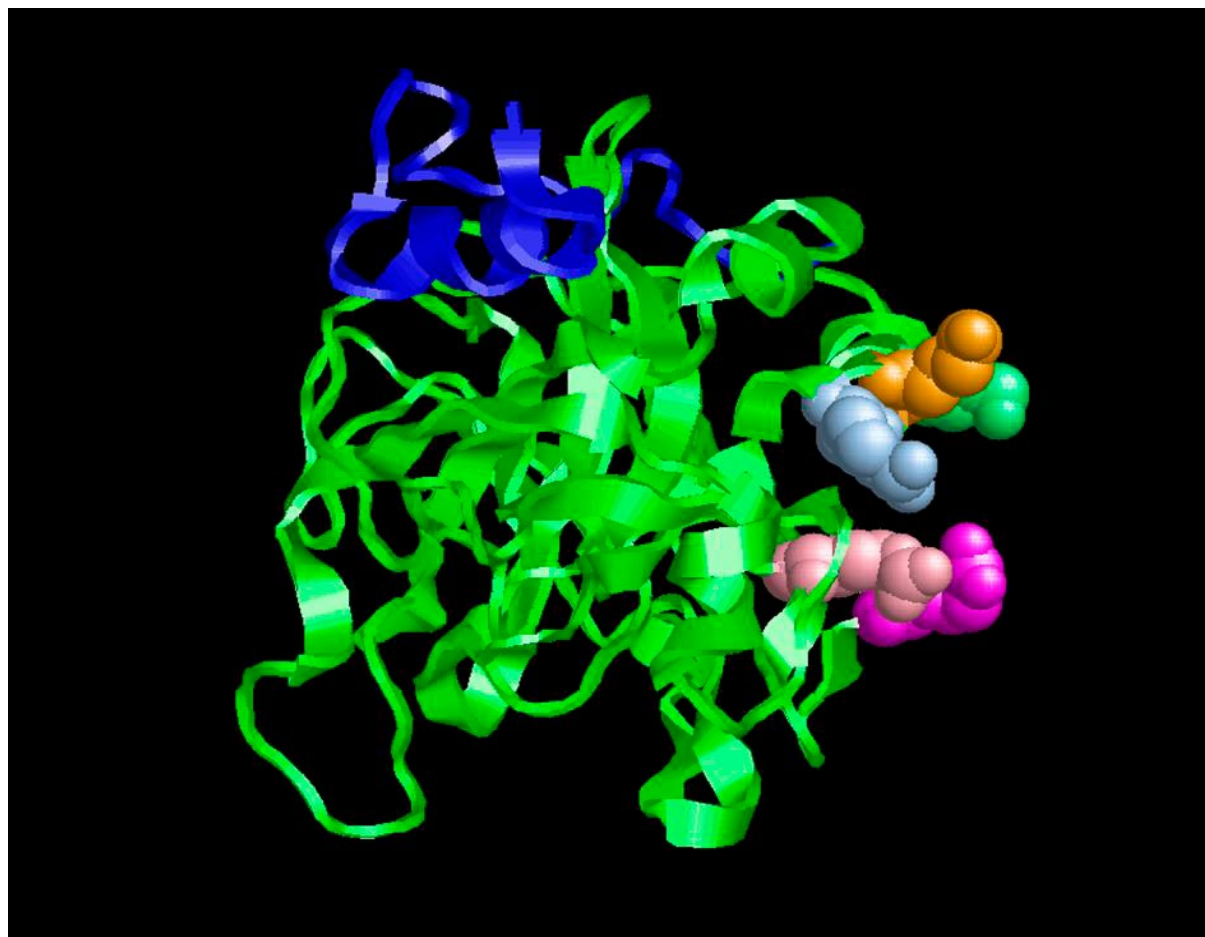
O exosítio II está localizado em uma região oposta ao exosítio I e corresponde à uma área de interação com ligantes polianiónicos como glicosaminoglicanas, entre elas a heparina (Di Cera, 2003). Para desempenhar seu papel fisiológico, a heparina se liga à antitrombina, formando um complexo capaz de inativar enzimas da coagulação como os fatores da coagulação II, IX e X e a trombina. A ligação da heparina com a antitrombina aumenta em mais de 1000 vezes a sua atividade inibitória. O efeito da heparina pode ser revertido por meio da administração de um antídoto denominado protamina (Rosenberg, 1985).

Na figura 4, observa-se a trombina representada no Modo *Cartoons* sendo a subunidade maior representada em verde (*green*) e a subunidade menor representada em azul (*blue*). Os resíduos do exosítio II estão apresentados no Modo *Spacefill* em diferentes cores: arginina 93 em magenta (*magenta*), arginina 101 em rosa matiz (*pinktint*), arginina 233 em azul matiz (*bluetint*), lisina 236 em laranja (*orange*) e lisina 240 em verde mar (*seagreen*).

Observe que na figura 4, a trombina foi girada no eixo y à esquerda, pois o exosítio II encontra-se localizado na região posterior da molécula quando comparado com a figura 3.

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 1PPB.pdb e está apresentado no quadro 4.

Figura 4 – Exosítio II



Legenda de cores		
Estrutura	Cor	Amostra de cor
Subunidade maior	Verde ( <i>green</i> )	
Subunidade menor	Azul ( <i>blue</i> )	
Arginina 93	Magenta ( <i>magenta</i> )	
Arginina 101	Rosa matiz ( <i>pinktint</i> )	
Arginina 233	Azul matiz ( <i>bluetint</i> )	
Lisina 236	Laranja ( <i>orange</i> )	
Lisina 240	Verde mar ( <i>seagreen</i> )	

#### Quadro 4 - Script desenvolvido para exosítio II

```
load 1ppb.pdb
wireframe off
cartoons
select *l
colour blue
select *h
colour green
select arg93
colour magenta
spacefill
select arg101
colour pinktint
spacefill
select arg233
colour bluetint
spacefill
select lys236
colour orange
spacefill
select lys240
colour seagreen
spacefill
rotate x 140
rotate y -75
translate y 4
zoom 150
```

## **Referências**

Di Cera E. Thrombin interactions. Chest [Internet]. 2003 [citado 2018 fev. 12]:124(3 Suppl):11S-7S. Disponível em: [http://journal.chestnet.org/article/S0012-3692\(15\)31753-0/fulltext](http://journal.chestnet.org/article/S0012-3692(15)31753-0/fulltext).

Lane DA, Philippou H, Huntington JA. Directing thrombin. Blood. [Internet]. 2005 [citado 2018 fev. 13]:106(8):2605-12. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/106/8/2605.full.pdf?sso-checked=true>.

Rosenberg RD. Role of heparin and heparinlike molecules in thrombosis and atherosclerosis. Fed Proc. [Internet]. 1985 [citado 2018 fev. 13]:44(2):404-9. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/19999987\\_Role\\_of\\_heparin\\_and\\_heparinlike\\_molecules\\_in\\_thrombosis\\_and\\_atherosclerosis](https://www.researchgate.net/publication/19999987_Role_of_heparin_and_heparinlike_molecules_in_thrombosis_and_atherosclerosis).

## 6 Protrombina

Código PDB: 5EDM

A protrombina ou fator II participa da penúltima etapa da cascata de coagulação. É convertida em trombina pela protrombinase, composta pelo fator Xa, cofator Va, íon cálcio e fosfolipídeos (Rosing, Tans, Govers-Riemslog, Zwaal, Hemker, 1980).

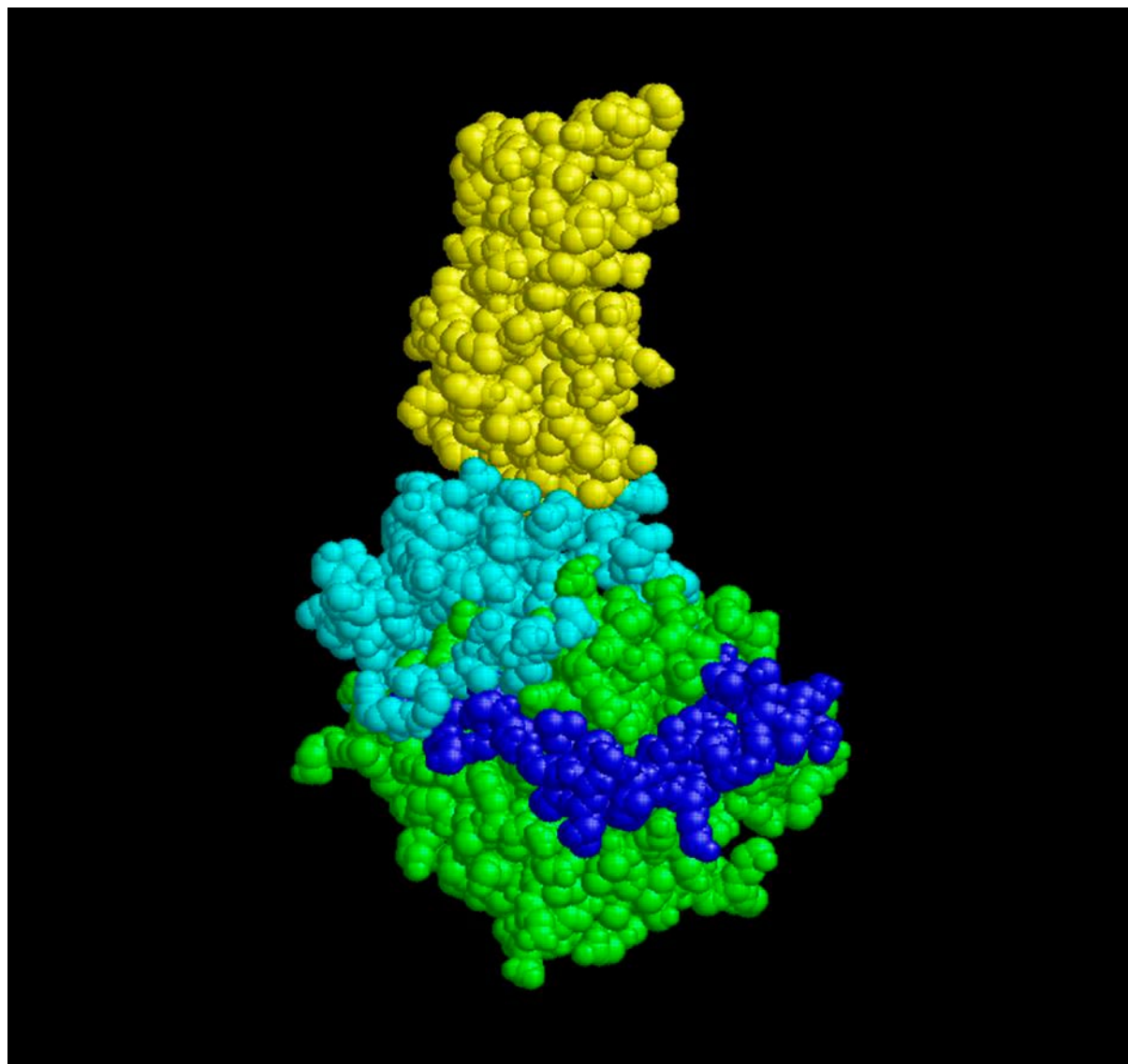
Possui 579 resíduos de aminoácidos e durante a sua ativação, é fragmentada em 4 componentes: 1) **fragmento 1** (resíduos 1-153), que por sua vez será convertido no domínio Gla (resíduos 1-46) e domínio Kringle 1 (resíduos 65-143), 2) **fragmento 2** (resíduos 154-270), que será convertido posteriormente no domínio Kringle 2 (resíduos 156-234), 3) **subunidade menor ou cadeia leve da protrombina** (resíduos 271-306) e 4) **subunidade maior ou cadeia pesada da trombina** (307 – 579). Assim sendo, serão estes dois últimos componentes que formarão a molécula de trombina (5EDM, 2016; Pozzi, Chen, Cera, 2016; Rosing, Tans, Govers-Riemslog, Zwaal, Hemker, 1980).





Na figura 5, observa-se a protrombina representada no Modo *Spacefill*. Estão destacadas as partes da molécula que originarão cada componente: os resíduos que originarão o fragmento 1 em amarelo (*yellow*), o fragmento 2 em ciano (*cyan*), a cadeia leve da trombina em azul (*blue*) e a cadeia pesada da trombina em verde (*green*).

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 5EDM.pdb e está apresentado no quadro 5.



Figura 5 – Protrombina



Legenda de cores		
Regiões originadas a partir da protrombina	Cor	Amostra de cor
Fragmento 1	Amarelo ( <i>yellow</i> )	
Fragmento 2	Ciano ( <i>cyan</i> )	
Cadeia leve da trombina	Azul ( <i>blue</i> )	
Cadeia pesada da trombina	Verde ( <i>green</i> )	

## Quadro 5 - Script desenvolvido para protrombina

```
load 5edm.pdb
wireframe off
spacefill
colour white
select 1-153
colour yellow
select 154-270
colour cyan
select 271-306
colour blue
select 307-568
colour green
select hetero
spacefill off
rotate x 165
rotate z -25
```

## Referências

5EDM - Crystal structure of prothrombin deletion mutant residues 154-167 (Form I) [Internet]. 2016. [citado 2017 jul. 26]. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=5edm>.

Pozzi N, Chen Z, Cera ED. How the Linker Connecting the Two Kringles Influences Activation and Conformational Plasticity of Prothrombin. *J Biol Chem* [Internet]. 2016 [citado 2017 jul. 26]; 291(12):6071-82. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/291/12/6071.long>.

Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Hemker, HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem* [Internet]. 1980 [citado 2017 jul. 26]; 255, 274-83. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/255/1/274.long>.

## 7 Pré-trombina-1

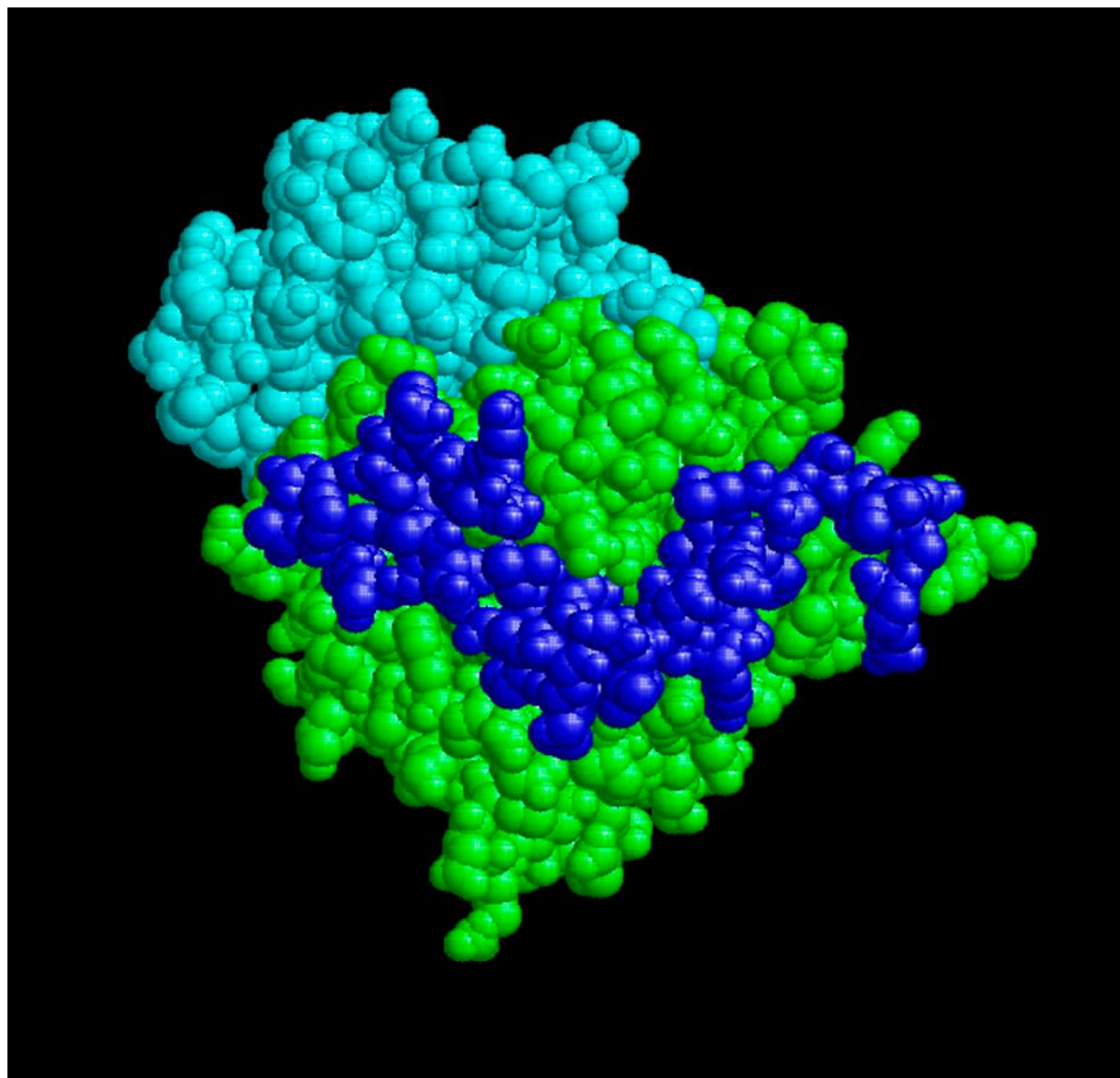
Código PDB: 3NXP

A pré-trombina-1 corresponde a um produto intermediário inativo, que se forma a partir da clivagem no resíduo 155 da protrombina pela protrombinase (composta pelo fator Xa, cofator Va, íon cálcio e fosfolipídeos). Assim sendo, difere-se da protrombina pela ausência de 155 resíduos na extremidade N-terminal, que corresponde ao fragmento 1. Desta forma, a pré-trombina-1 é formada apenas pelos resíduos que darão origem ao fragmento 2, à cadeia leve e à cadeia pesada (3NXP, 2010; Chen, Pelc, Di Cera, 2010; Weinreb, Mukhopadhyay, Majumder, Lentz 2002).


Na figura 6, observa-se a pré-trombina-1 representada no Modo *Spacefill*. Estão destacadas as partes da molécula que originarão cada um dos componentes formados a partir de sua ativação: o fragmento 2 em ciano (*cyan*), a cadeia leve da trombina em azul (*blue*) e a cadeia pesada da trombina em verde (*green*). Note que em comparação com a protrombina, observa-se a ausência do fragmento 1 (em amarelo (*yellow*) na figura 5 do Capítulo 6).

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 3NXP.pdb e está apresentado no quadro 6.

Figura 6 – Pré-trombina-1



Legenda de cores

Regiões originadas a partir da pré-trombina-1	Cor	Amostra de cor
Fragmento 2	Ciano ( <i>cyan</i> )	
Cadeia leve da trombina	Azul ( <i>blue</i> )	
Cadeia pesada da trombina	Verde ( <i>green</i> )	

## Quadro 6 - Script desenvolvido para pré-trombina-1

```
load 3nxp.pdb
wireframe off
spacefill
select 169-271
colour cyan
select 272-320
colour blue
select 321-654
colour green
select hetero
spacefill off
rotate z -40
rotate y 140
```

## **Referências**

3NXP - Crystal structure of human prethrombin-1 [Internet]. 2010. [citado 2017 ago. 01]. Disponível em: <https://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3nxp>.

Chen Z, Pelc LA, Di Cera E. Crystal structure of prethrombin-1. PNAS [Internet]. 2010. [citado 2017 jul. 30];9;107(45):19278-83. Disponível em: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010262107](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010262107).

Weinreb GE, Mukhopadhyay K, Majumder R, Lentz BR. Cooperative roles of factor Va and phosphatidylserine-containing membranes as cofactors in prothrombin activation. J Biol Chem [Internet]. 2002. [citado 2017 jul. 30];278(8):5679-84. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/278/8/5679.long>.

## 8 Pré-trombina-2

Código PDB: 1MKX

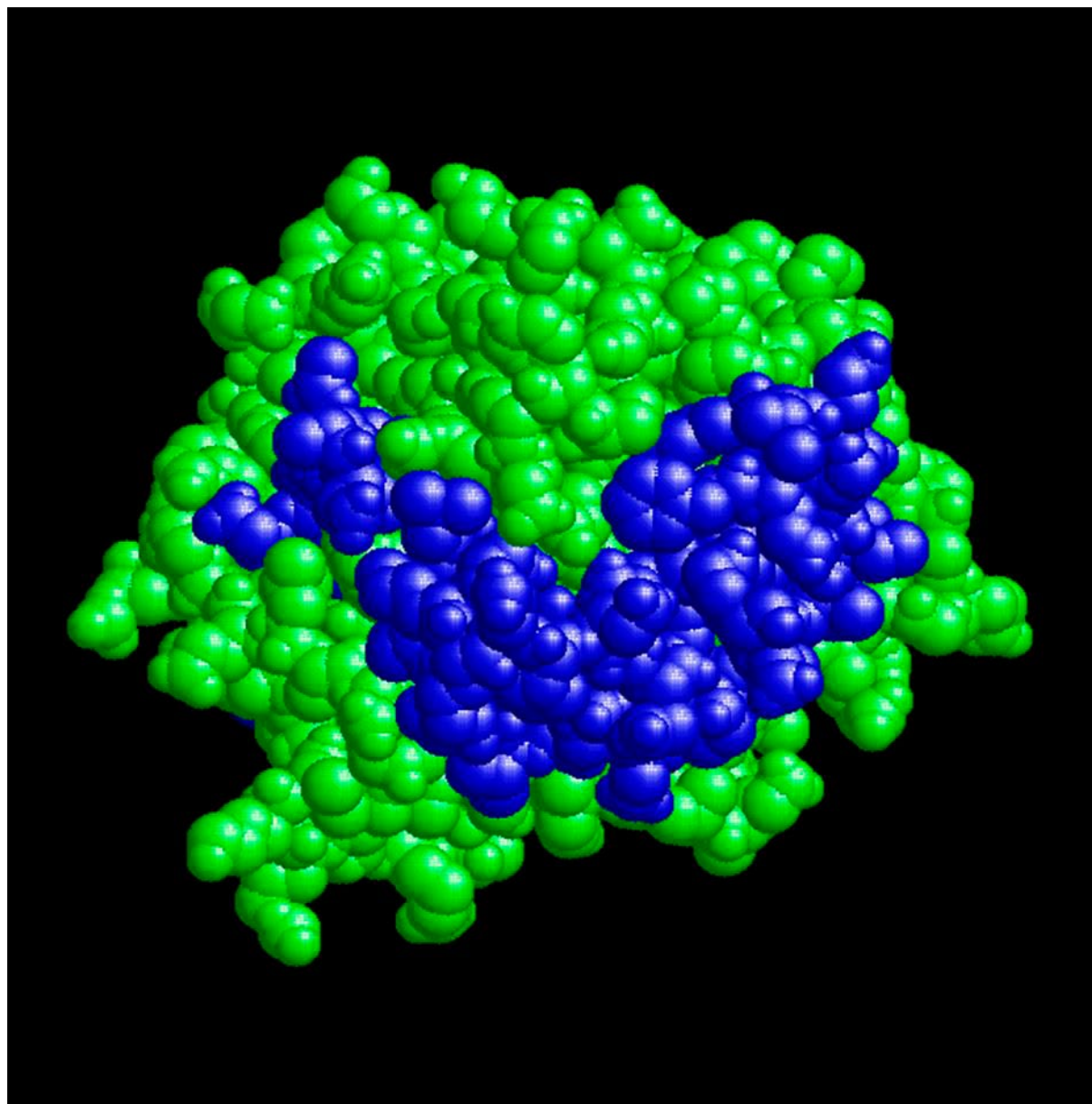
A pré-trombina-2 é constituída pelas cadeias leve e pesada, que ainda estão unidas. Assim sendo, difere-se da pré-trombina-1 pela ausência do fragmento 2 e difere-se da trombina pelo fato de que nesta as cadeias leve e pesadas estão separadas. O papel fisiológico da pré-trombina-2 ainda não é conhecido. Corresponde a um produto intermediário inativo, que se forma a partir da clivagem no resíduo 271 da protrombina pela protrombinase (composta pelo fator Xa, cofator Va, íon cálcio e fosfolipídeos). Após a clivagem no resíduo 271 da protrombina, os domínios Gla e os fragmentos 1 e 2 são perdidos (1MKX, 1997; Chen, Pelc, Di Cera, 2010; Malkowski, Martin, Guzik, Edwards, 1997).

Na figura 7, observa-se a pré-trombina-2 representada no Modo *Spacefill*. Estão destacadas as partes da molécula que originarão cada um dos componentes formados a partir de sua ativação: a cadeia leve da trombina em azul (*blue*) e a cadeia pesada da trombina em verde (*green*). Note que em comparação com a pré-trombina-1, observa-se a ausência do fragmento 2 (em ciano (*cyan*) na figura 6 do Capítulo 7).

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 1MKX.pdb e está apresentado no quadro 7.



Figura 7 – Pré-trombina-2



Legenda de cores

Regiões originadas a partir da pré-trombina-2	Cor	Amostra de cor
Cadeia leve da trombina	Azul ( <i>blue</i> )	
Cadeia pesada da trombina	Verde ( <i>green</i> )	

## Quadro 7 - Script desenvolvido para pré-trombina-2

```
load 1mkx.pdb
wireframe off
select 1-49K
spacefill
colour blue
select hetero
spacefill off
select 50-308K
spacefill
colour green
select hetero
spacefill off
rotate x 120
rotate z -145
rotate y 15
zoom 170
translate y-3
translate x 2
```

## Referências

1MKX - The co-crystal structure of unliganded bovine alpha-thrombin and prethrombin-2: movement of the yppw segment and active site residues upon ligand binding [Internet]. 1997. [citado 2017 ago. 11].

Disponível em:

<https://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1mkx>.

Chen Z, Pelc LA, Di Cera E. Crystal structure of prethrombin-1. PNAS [Internet]. 2010. [citado 2017 jul. 30];9;107(45):19278-83. Disponível em: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010262107](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010262107).

Malkowski MG, Martin PD, Guzik JC, Edwards BFP. The co-crystal structure of unliganded bovine a-thrombin and prethrombin-2: Movement of the Tyr-Pro-Pro-Trp segment and active site residues upon ligand binding. Protein Sci.[Internet]. 1997. [citado 2017 ago.

11];6(7):1438-48. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2143735/>.

## 9 Fibrinogênio

Código PDB: 1M1J

O fibrinogênio corresponde à forma inativa da fibrina. É solúvel em água e é encontrado em concentrações elevadas no sangue. Quando recebido o sinal, o fibrinogênio é convertido em fibrina, formando uma rede que torna o sangue, normalmente fluido, num material sólido gelatinoso e que, em seguida, seca para formar uma crosta (Goodsell, 2006).

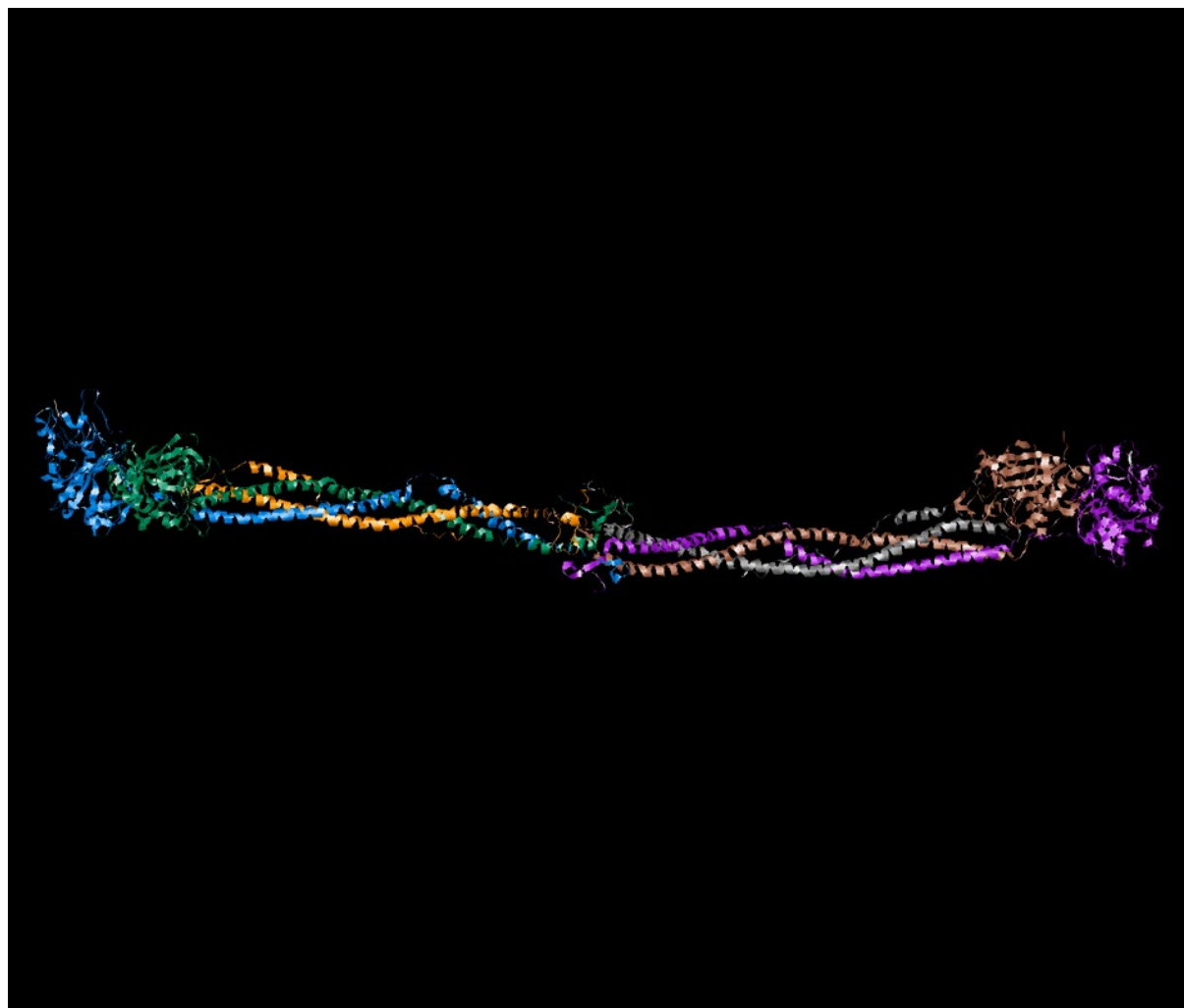
O fibrinogênio é uma glicoproteína produzida no fígado e presente no plasma sanguíneo, cuja meia-vida em humanos é de 3,8-4,9 dias. É convertida em fibrina, um importante componente do tampão plaquetário, por meio da trombina (Blomback, 1996).

Sua estrutura é hexamérica ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ), sendo formada por duas cadeias alfa, duas cadeias beta e duas cadeias gama, formadas respectivamente por 610, 461 e 411 resíduos de aminoácidos. Estas 6 cadeias são conectadas por meio de 29 pontes dissulfeto (Doolittle, 1983).

Na figura 8, observa-se a estrutura hexamérica do fibrinogênio no Modo *Cartoons*, onde são apresentadas as subunidades alfa (representadas pelas cadeias A e D em cinza (*gray*) e ouro (*gold*), respectivamente), as subunidades beta (representadas pelas cadeias B e E em marrom (*brown*) e verde azulado (*greenblue*), respectivamente) e as subunidades gama (representadas pelas cadeias C e F em púrpura (*purple*) e azul celeste (*skyblue*), respectivamente).

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 1M1J.pdb e está apresentado no quadro 8.

Figura 8 – Fibrinogênio



Legenda de cores		
Cadeias	Cor	Amostra de cor
A (alfa)	Cinza ( <i>gray</i> )	
B (beta)	Marrom ( <i>brown</i> )	
C (gama)	Púrpura ( <i>purple</i> )	
D (alfa)	Ouro ( <i>gold</i> )	
E (beta)	Verde azulado ( <i>greenblue</i> )	
F (gama)	Azul celeste ( <i>skyblue</i> )	

## Quadro 8 - Script desenvolvido para fibrinogênio

```
load 1m1j.pdb
wireframe off
cartoons
zoom 220
select *a
colour grey
select *b
colour brown
select *c
colour purple
select *d
colour gold
select *e
colour greenblue
select *f
colour skyblue
```

## **Referências**

Blomback B. Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* [Internet]. 1996 [citado 2017 ago. 15];83(1):1-75. Disponível em: [http://www.thrombosisresearch.com/article/0049-3848\(96\)00111-9/fulltext](http://www.thrombosisresearch.com/article/0049-3848(96)00111-9/fulltext).

Doolittle RF. The structure and evolution of vertebrate fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1983 [citado 2017 ago. 15];408:13-27. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1983.tb23231.x/abstract;jsessionid=DE1E241240E08C13D5ADB647C6107153.f02t01>.

Goodsell D. Fibrin [Internet]. 2006. [citado 2017 ago. 15]. Disponível em: <http://pdb101.rcsb.org/motm/83>.

# 10 Ligação da Trombina com o Fibrinogênio

Código PDB: 2A45

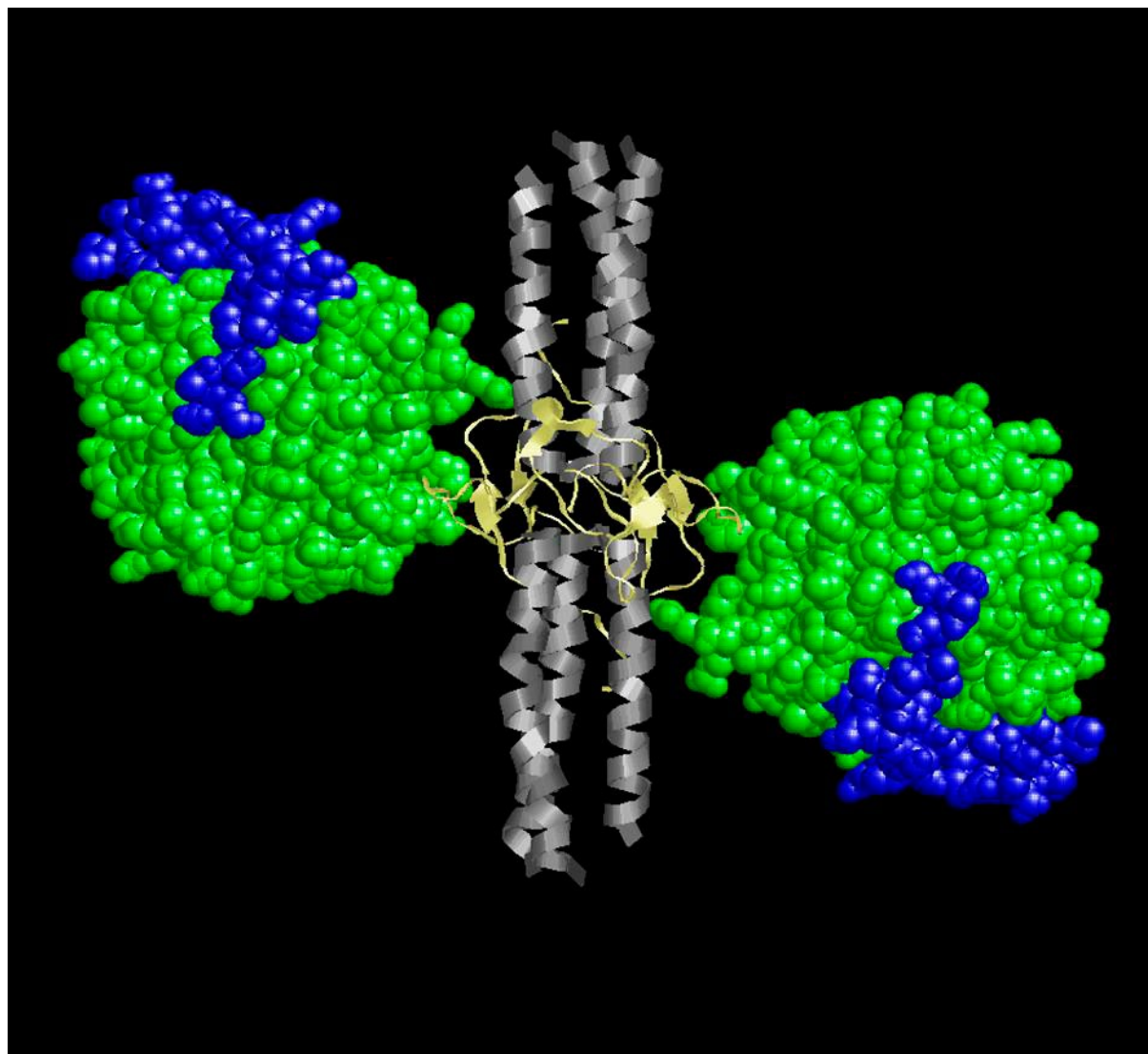
A trombina se liga ao fibrinogênio, convertendo-o em sua forma insolúvel, que corresponde à fibrina. Neste processo, dois peptídeos ácidos, os fibrinopeptídeos A e B (fpA e FpB) são liberados sequencialmente e o restante da molécula forma a fibrina que sofre polimerização na formação do coágulo. A trombina se liga ao fibrinogênio por meio de duas regiões: o sítio de reconhecimento do fibrinogênio e o exosítio 1 (Binnie, Lord, 1993; Blomback, 1996; Pechik, Yakovlev, Mosesson, Gilliland, Medved, 2006).





Na figura 9, são observadas duas moléculas de trombina representadas no Modo *Spacefill*, sendo as cadeias leves representadas em azul (*blue*) e as cadeias pesadas em verde (*green*). Observa-se também uma parte da molécula de fibrinogênio, representada no Modo *Cartoons* em cinza (*grey*), sendo o nó de dissulfeto amino terminal destacado em amarelo matiz (*yellowtint*).

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 2A45.pdb e está apresentado no quadro 9.



Figura 9 – Ligação da trombina com o fibrinogênio



Legenda de cores		
Estruturas	Cor	Amostra de cor
Cadeia leve da trombina	Azul ( <i>blue</i> )	
Cadeia pesada da trombina	Verde ( <i>green</i> )	
Fibrinogênio	Cinza ( <i>grey</i> )	
Nó de dissulfeto amino terminal	Amarelo matiz ( <i>yellowtint</i> )	

## Quadro 9 - Script desenvolvido para ligação da trombina com o fibrinogênio

```
load 2a45.pdb
wireframe off
select *a, *d
spacefill
colour blue
select *b, *e
spacefill
colour green
select *g, *h, *j, *i, *k, *l
cartoons
colour grey
select 1-46g, 1-46j, 1-77h, 1-77k, 1-20i, 1-20l
colour yellowtint
rotate y 90
rotate z 10
zoom 140
```

## **Referências**

Binnie CG, Lord ST. The fibrinogen sequences that interact with thrombin. *Blood* [Internet]. 1993 [citado 2017 ago. 22];81(12):3186-92. Disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/81/12/3186.full.pdf>.

Blomback B. Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* [Internet]. 1996 [citado 2017 ago. 15];83(1):1-75. Disponível em: [http://www.thrombosisresearch.com/article/0049-3848\(96\)00111-9/fulltext](http://www.thrombosisresearch.com/article/0049-3848(96)00111-9/fulltext).

Pechik I, Yakovlev S, Mosesson MW, Gilliland GL, Medved L. Structural basis for sequential cleavage of fibrinopeptides upon fibrina assembly. *Biochemistry* [Internet]. 2006 [citado 2017 ago. 20];45(11):3588-3597. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2531209/>.

# 11 Ligação da Trombomodulina com a Trombina

Código PDB: 1DX5

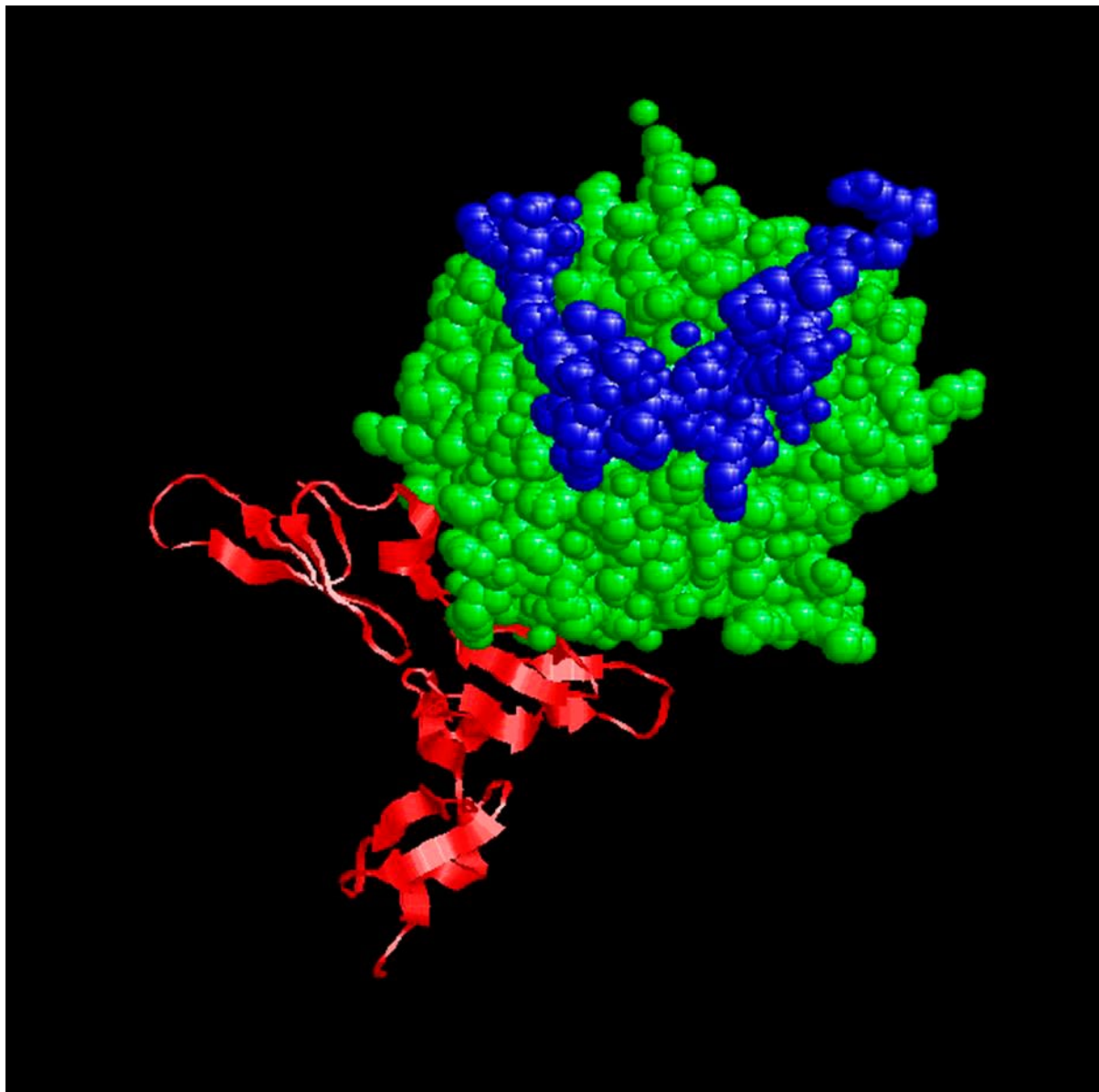
A trombomodulina (TM) corresponde a uma proteína integral presente na membrana plasmática de células endoteliais. Ao se ligar à trombina, forma o complexo trombina-trombomodulina, o qual ativa a proteína C e inativa os fatores Va e VIIIa da cascata sanguínea, impedindo a trombina a desempenhar o seu papel no processo de coagulação (Esmon, 1995; Hsu, Lucas, Jonson, Hong, Chan, 1994; Sadler, 1997).




A maior parte das interações que ocorrem entre a trombina e a trombomodulina são realizadas por meio de contatos hidrofóbicos entre as moléculas, entre eles o exosítio I (Di Cera 2003; Fuentes-Prior, Iwanaga, Huber, Pagila, Rumennik, Seto et al., 2000).

Na figura 10, observa-se a trombina representada no Modo *Spacefill*, sendo a cadeia leve representada em azul (*blue*) e a cadeia pesada em verde (*green*). Observa-se a trombomodulina representada no Modo *Cartoons* em vermelho (*red*).

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 1DX5.pdb e está apresentado no quadro 10.

Figura 10 – Ligação da trombomodulina com a trombina



Legenda de cores		
Estruturas	Cor	Amostra de cor
Cadeia leve da trombina	Azul ( <i>blue</i> )	
Cadeia pesada da trombina	Verde ( <i>green</i> )	
Trombomodulina	Vermelho ( <i>red</i> )	

## Quadro 10 - Script desenvolvido para ligação da trombomodulina com a trombina

```
load 1dx5.pdb
wireframe off
rotate x 110
rotate y 50
zoom 230
translate y-20
translate x -5
select *a
spacefill
colour blue
select *m
spacefill
colour green
select *i
cartoons
colour red
```

## **Referências**

Di Cera E. Thrombin interactions. *Chest* [Internet]. 2003 [citado 2018 fev. 12]:124(3 Suppl):11S-7S. Disponível em: [http://journal.chestnet.org/article/S0012-3692\(15\)31753-0/fulltext](http://journal.chestnet.org/article/S0012-3692(15)31753-0/fulltext).

Esmon CT. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J* [Internet]. 1995 [citado 2017 ago. 29]:9(10):946-55. Disponível em: <http://www.fasebj.org/content/9/10/946.long>.

Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M et al., Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* [Internet]. 2000 [citado 2017 ago. 29]: 404(6777):518-25. Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v404/n6777/full/404518a0.html?foxtrotcallback=true>.

Hsu CD, Lucas RB, Johnson TR, Hong SF, Chan DW. Elevated urine thrombomodulin/creatinine ratio in severely preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1994 [citado 2017 ago. 28]:171(3):854-6. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002-9378\(94\)90111-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002-9378(94)90111-2).

Sadler JE. Thrombomodulin structure and function. *Thromb. Haemost.* 1997;78(1):392-5.

## 12 Ligação do Hirulog com a Trombina

Código PDB: 2HGT

A hirudina é uma proteína produzida pelas glândulas perifaríngicas de sanguessugas *Hirudo medicinalis*. Sua propriedade anticoagulante decorre de sua ligação com a trombina (Markwardt, 1994). A hirudina e o fibrinogênio competem pelo mesmo sítio ativo da trombina. Assim sendo, quando a hirudina se liga à trombina ocorre uma alteração conformacional que impedirá a ligação do fibrinogênio (Clare, Sukumaran, Nilges, Zarbock, Gronenborn, 1987).

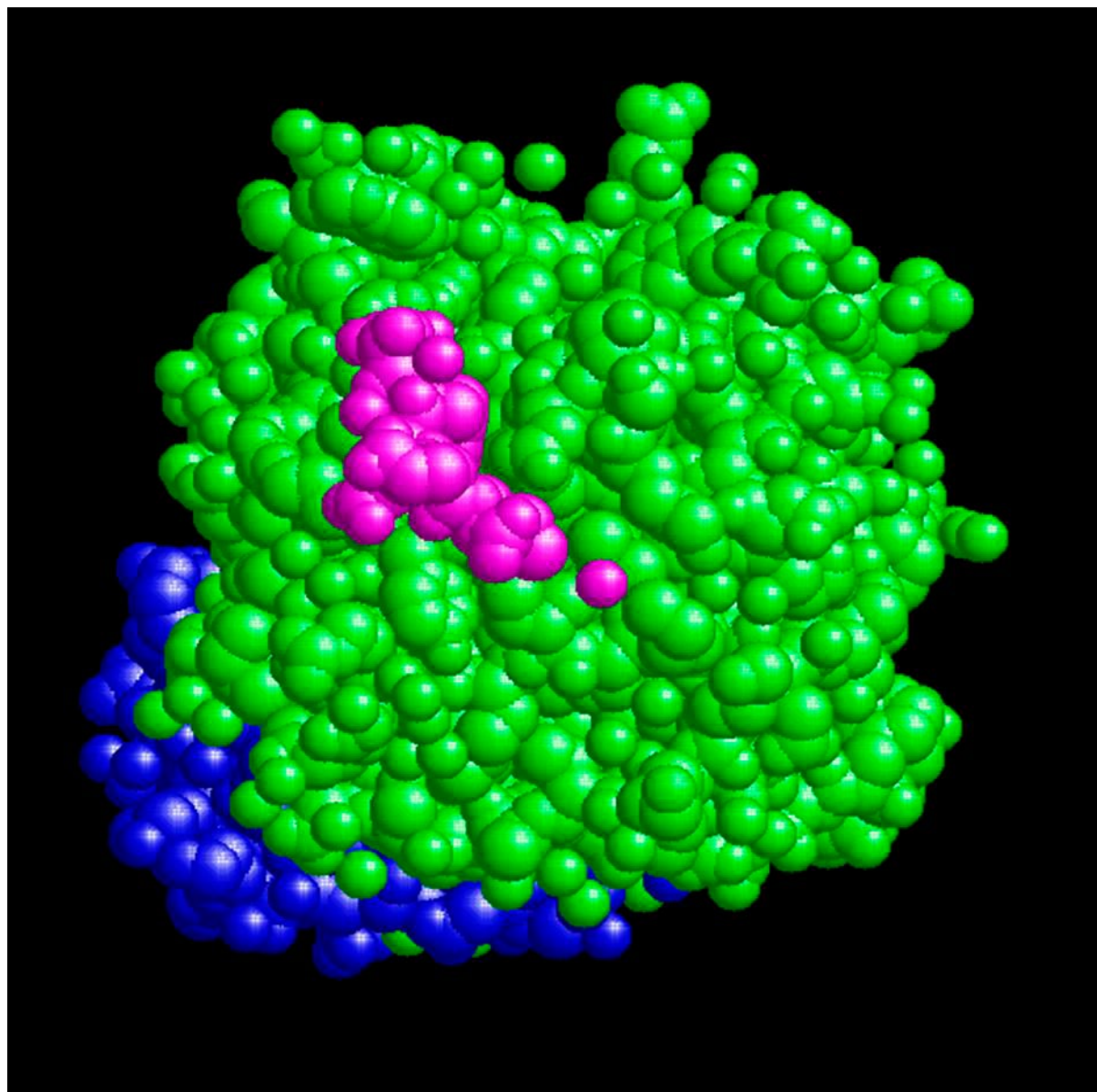
A hirudina pode ser fragmentada em peptídeos menores também capazes de inibir a trombina, como por exemplo o hirulog. A ação inibitória da trombina pela hirudina, decorre da ligação desta última ao sítio ativo da trombina e o exosítio I, impedindo a sua ação sobre o fibrinogênio (O'Brien; Mureebe, 2012; Skrzypczak-Jankun, Carperos, Ravichandran, Tulinsky, Westbrook, Maraganore, 1991).




Na figura 11, observa-se a trombina representada no Modo *Spacefill*, sendo a cadeia leve representada em azul (*blue*) e a cadeia pesada em verde (*green*). Observa-se o hirulog representado no Modo *Spacefill* em magenta (*magenta*).

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 2HGT.pdb e está apresentado no quadro 11.



Figura 11 – Ligação do hirulog com a trombina



Legenda de cores		
Estruturas	Cor	Amostra de cor
Cadeia leve da trombina	Azul ( <i>blue</i> )	
Cadeia pesada da trombina	Verde ( <i>green</i> )	
Hirulog	Magenta ( <i>magenta</i> )	

## Quadro 11 - Script desenvolvido para ligação do hirulog com a trombina

```
load 2hgt.pdb
wireframe off
select *l
spacefill
colour blue
select *h
spacefill
colour green
select *j
spacefill
colour magenta
```

## Referências

Clore GM, Sukumaran DK, Nilges M, Zarbock J, Gronenborn AM. The conformations of hirudin in solution: a study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *Embo J* [Internet]. 1987 [citado 2017 set. 10];6(2):529-37. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC553426/>.

Markwardt F. The development of hirudin as an antithrombotic drug. *Thromb Res* [Internet]. 1994 [citado 2017 set. 9];74(1):1-23. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0049384894900329>.

O'Brien PJ; Mureebe L. Direct thrombin inhibitors. *JCPT* [Internet]. 2012 [citado 2018 fev. 12];17(1):5-11. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1074248410395941>.

Skrzypczak-Jankun E, Carperos VE, Ravichandran KG, Tulinsky A, Westbrook M, Maraganore JM. Structure of the Hirugen and Hirulog 1 Complexes of  $\alpha$ -Thrombin. *J Mol Biol* [Internet]. 1991 [citado 2017 set. 11];221(4):1379-93. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283691909394?via%3Dihub>.

# 13 Ligação da Estafilocagulase com a Trombina

Código PDB: 1NU7

A estafilocagulase é secretada pela bactéria *Staphylococcus aureus*, que pode causar doenças em seres humanos como septicemia e endocardite. Esta enzima é capaz de se ligar à trombina, formando o complexo estafilotrombina que é capaz de converter diretamente o fibrinogênio em fibrina, levando à coagulação do plasma sanguíneo, sem ativação de outros elementos da cascata de coagulação (Kawabata, Morita, Miyata, Kaida, Iwanaga, Igarashi, 1987).

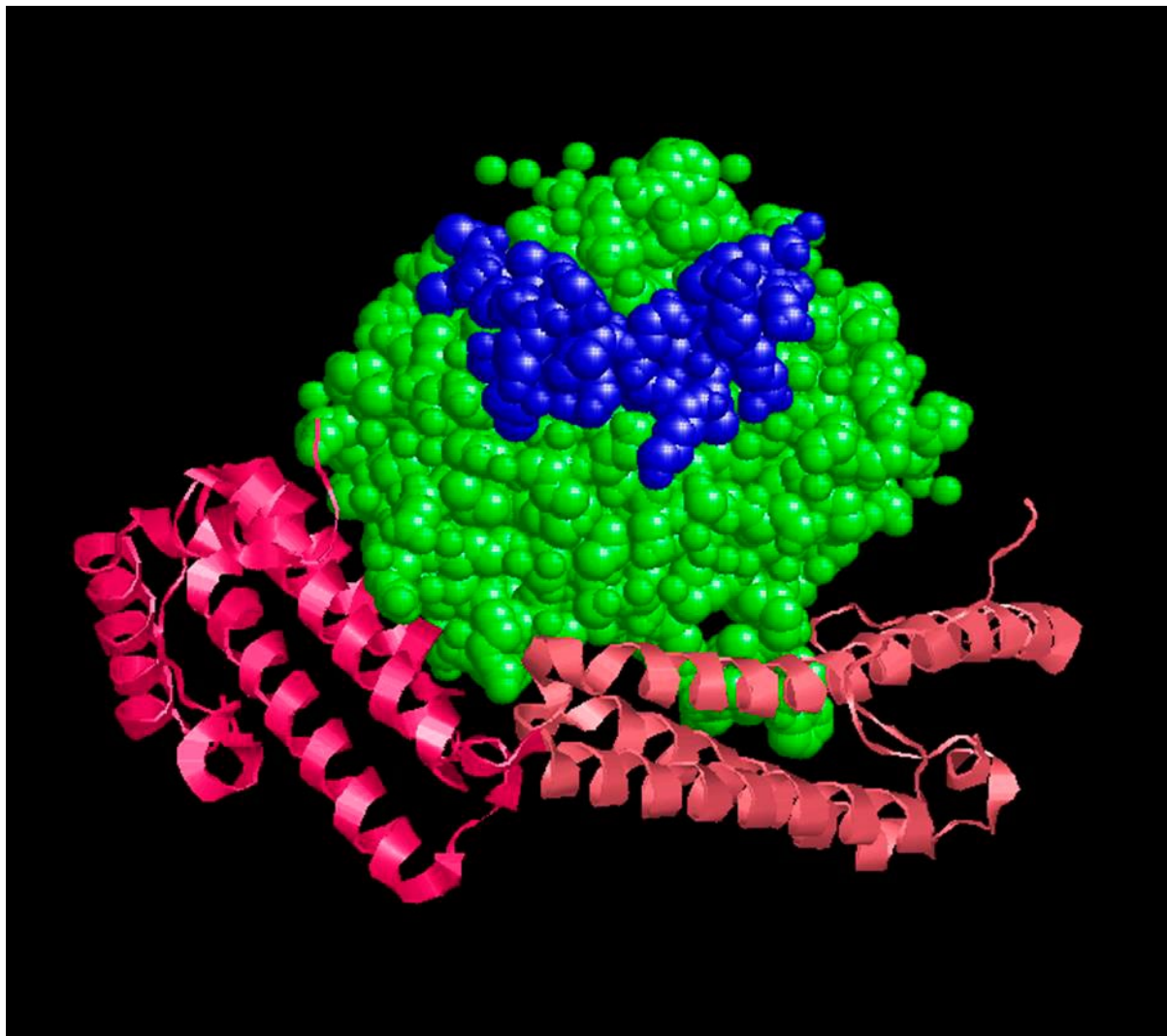
A estafilocagulase é organizada em dois domínios separados por um ângulo de 110°. O domínio D1 é formado pelos aminoácidos isoleucina 1 a glicina 142, sendo observadas três alfa-hélices. O domínio D2 é formado pelos aminoácidos treonina 150 a glicina 281, onde é observado um grupo de alfa-hélices semelhante ao observado em D1 e mais outras três alfa-hélices distribuídas ao longo do domínio (Friedrich, Panizzi Fuentes-Prior, Richter, Verhamme, Anderson et al., 2003).





A inibição da trombina pela estafilocagulase decorre da ligação da última nas regiões do sítio ativo e no exosítio 1 (Panizzi, Friedrich, Fuentes-Prior, Richter, Bock, Bode, 2006).

Na figura 12, observa-se a trombina representada no Modo *Spacefill*, sendo a cadeia leve representada em azul (*blue*) e a cadeia pesada em verde (*green*). Observa-se a estafilocagulase representado no Modo *Cartoons*, sendo o domínio D1 representado em rosa (*pink*) e o domínio D2 representado em rosa quente (*hotpink*).

O script foi desenvolvido para o software RasMol a partir do arquivo 1NU7.pdb e está apresentado no quadro 12.

Figura 12 – Ligação da estafilocogulase com a trombina



Legenda de cores		
Estruturas	Cor	Amostra de cor
Cadeia leve da trombina	Azul ( <i>blue</i> )	
Cadeia pesada da trombina	Verde ( <i>green</i> )	
Domínio D1 da estafilocogulase	Rosa ( <i>pink</i> )	
Domínio D2 da estafilocogulase	Rosa quente ( <i>hotpink</i> )	

## Quadro 12 - Script desenvolvido para ligação da estafilocagulase com a trombina

```
load 1nu7.pdb
wireframe off
select *a
spacefill
colour blue
select *b
spacefill
colour green
select 1-142d
cartoons
colour pink
select 143-281d
cartoons
colour hotpink
rotate y 190
rotate z 180
translate y 15
translate x 4
zoom 200
```

## **Referências**

Kawabata SI, Morita T, Miyata T, Kaida S, Iwanaga S, Igarashi H. Structure and function relationship of staphylocoagulase. *J Prot Chem* [Internet]. 1987 [citado 2017 set. 28]:6(1):17-32. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00248824>.

Friedrich R, Panizzi P, Fuentes-Prior P, Richter K, Verhamme I, Anderson PJ et al., Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature*. [Internet]. 2003 [citado 2017 set. 22]:425(6957):535-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature01962>.

Panizzi P, Friedrich R, Fuentes-Prior P, Richter K, Bock PE, Bode W. Fibrinogen substrate recognition by staphylocoagulase.(pro)thrombin complexes. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 [citado 2018 fev. 12]:13;281(2):1179-87. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/281/2/1179.long>



Este livro apresenta uma análise estrutural da trombina humana, uma importante proteína que participa do processo de coagulação sanguínea. Foram utilizados softwares de simulação computacional para o desenvolvimento de imagens que apresentam a estrutura bioquímica da trombina, bem como de seus precursores e alguns de seus principais inibidores.

