

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

REINALDO BARROS GERALDO

**INIBIDORES PLAQUETÁRIOS DE
ORIGENS SINTÉTICA E ANIMAL:
ESTUDO DE MOLÉCULAS COM
POTENCIAL PARA O TRATAMENTO DE
NEUROPATIAS VASCULARES.**

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Helena Carla Castro

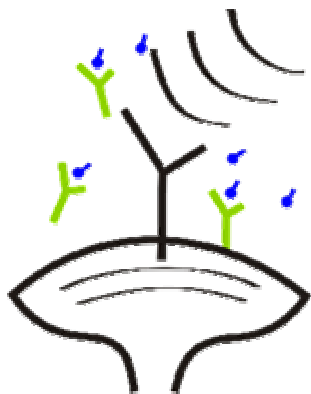


**NITERÓI
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE ESTUDOS GERAIS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

REINALDO BARROS GERALDO

**INIBIDORES PLAQUETÁRIOS DE
ORIGENS SINTÉTICA E ANIMAL:
ESTUDO DE MOLÉCULAS COM
POTENCIAL PARA O TRATAMENTO DE
NEUROPATIAS VASCULARES.**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM NEUROIMUNOLOGIA

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Helena Carla Castro



**NITERÓI
2009**

GERALDO, Reinaldo Barros

Inibidores plaquetários de origens sintética e animal: estudo de moléculas com potencial para o tratamento de neuropatias vasculares/ Reinaldo Barros Geraldo. – Niterói [s. n.], 2009.

XXf

**Dissertação – (Mestrado em Neuroimunologia) –
Universidade Federal Fluminense, 2009.**

**1. Plaquetas 2. Integrinas 3.Desintegrinas 4. Derivados Acilhidrazônicos 5.
Modelagem Molecular 6. *in silico* 7. *in vitro* I. Título**

REINALDO BARROS GERALDO

**INIBIDORES PLAQUETÁRIOS DE ORIGENS
SINTÉTICA E ANIMAL: ESTUDO DE MOLÉCULAS
COM POTENCIAL PARA O TRATAMENTO DE
NEUROPATIAS VASCULARES.**

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade
Federal Fluminense como
requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em
Neurociências.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Paula Campello Costa - GNE - UFF

Dr. José Mauro Granjeiro - GCM- UFF

Dra. Magaly Girão Albuquerque – IQ- UFRJ

Dra. Hye Chung Kang – HUAP- UFF (revisora e suplente)

Agradecimentos

Agradeço a Deus por estar sempre presente na minha vida, mesmo quando não consigo senti-Lo.

Agradeço aos meus pais, Reinaldo e Solange, por tudo, pelos anos de esforço para dar atenção, carinho, conforto, educação e por ensinar como ser bom e honesto com as pessoas.

Aos meus irmãos Pedro e Nina, pelos grandes momentos que passamos, e todo o apoio que me deram para as escolhas da minha vida, amo vocês dois de paixão.

A minha grande família: minha vó Sonia, que tanto carinho me deu e dá todas as vezes que nos encontramos, aos meus tios e tias que muito me ensinaram, considero-os meus pais e mães. Aos meus primos-irmãos, em especial ao Jorge e Mariana, irmãos-primos de longo período estudantil e de vida, vocês são inesquecíveis.

Aos meus amigos que conheci aqui em Niterói e com eles formei uma “família Carioca”.

À minha orientadora Helena, por ter acreditado em meu potencial, deste os meus primeiros passos...

Agradeço a minha esposa, anjo da minha vida, que sempre esteve ao meu lado acreditando em mim, me apoiando, sendo o meu sustento nos piores momentos de saudades. Meu grande amor...

*“Qual será o absurdo de hoje que
será a verdade de amanhã?”*

Alfred North Whitehead (1925)

Sumário

Resumo.....	i
Abstract.....	iii
Lista de abreviaturas.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Acidentes Vasculares Cerebrais (AVC).....	1
1.1.1. Visão Geral.....	1
1.2. Estudando alvos terapêuticos e novos ligantes para o tratamento do AVC.....	4
1.2.1. Breve compreensão sobre a Hemostasia.....	4
1.2.2. Plaquetas: alvos atuais para o tratamento do AVC.....	6
1.2.2.1. Constituição e características plaquetárias.....	6
1.2.2.2. Integrinas: alvos terapêuticos plaquetários.....	13
1.2.3. Moléculas de origem animal e sintética com potencial para o tratamento do AVC.....	16
1.2.3.1. Origem sintética: derivados acilhidrazônicos.....	16
1.2.3.2. Origem animal: desintegrinas de veneno de serpente.....	20
1.3. Modelagem molecular: ferramenta para o estudo da relação estrutura-atividade (SAR) de moléculas antiplaquetárias potenciais para o tratamento do AVC.....	24
1.3.1. <i>Ligand Based Drug Design</i> : Estudando o ligante.....	27
1.3.1.1. Análise <i>in silico</i> dos parâmetros farmacocinéticos (ADMET).....	29
1.3.1.2. Regra dos cinco de Lipinski: avaliação sobre a biodisponibilidade oral teórica.....	31
1.3.2. <i>Structure Based Drug Design</i> : estudando os ligantes e os alvos terapêuticos.....	32
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. Objetivo geral.....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
3. METODOLOGIA.....	39
3.1. Derivados acilhidrazônicos: análise <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> do perfil antiplaquetário de moléculas de origem sintética.....	39
3.1.1. <i>In vitro</i> : Ensaios de agregação plaquetária.....	39
3.1.2. <i>In silico</i> : Estudos de Modelagem molecular.....	40
3.1.2.1. Análise de relação estrutura-atividade (SAR).....	40
3.1.2.2. Análise teórica dos parâmetros farmacocinéticos.....	41
3.2. Desintegrinas de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> : análise <i>in silico</i> do perfil antiplaquetário de moléculas de origem animal.....	42
3.2.1. Alinhamento de seqüência e construção de modelos comparativos por homologia para as desintegrinas (JARC e JAST) e peptídeos cíclicos.....	42
3.2.2. Construção do modelo dos complexos desintegrinas e peptídeos cíclicos com a estrutura cristal da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ humana.....	44
4. RESULTADOS.....	46

4.1. Derivados acilhidrazônicos: análise <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> do perfil antiplaquetário de moléculas de origem sintética.....	46
4.1.1. Estudos <i>in vitro</i>	46
4.1.2. Estudos <i>in silico</i>	48
4.1.2.1. Análise da relação estrutura-atividade (SAR).....	48
4.1.2.2. Análise teórica dos parâmetros farmacocinéticos (ADMET).....	53
4.2. Desintegrinas de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> : análise <i>in silico</i> do perfil antiplaquetário de moléculas de origem animal.....	56
4.2.1. Estudo estrutural e construção dos modelos por homologia das desintegrinas (JARC, JAST) e dos peptídeos cíclicos derivados.....	56
4.2.2. Análise dos complexos ligantes – alvo terapêutico (desintegrina-integrina): <i>Docking</i> , interações e mudança conformacional.....	64
5. DISCUSSÃO.....	69
5.1. Derivados acilhidrazônicos: análise <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> do perfil antiplaquetário de moléculas de origem sintética.....	70
5.2. Desintegrinas de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> : análise <i>in silico</i> do perfil antiplaquetário de moléculas de origem animal.....	73
6. CONCLUSÕES.....	81
6.1 Derivados do sistema acilhidrazona: análise do perfil antiplaquetário dos ligantes de origem sintética.....	81
6.2 Desintegrinas de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> : Análise <i>in silico</i> da relação estrutura-atividade de ligantes de origem natural.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
8. APÊNDICES.....	93
ARTIGO 1 - Integrin inhibitors from snake venom: exploring the relationship between the structure and activity of rgd-peptides (Aceito na revista <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i>).....	93
ARTIGO 2 - Biological evaluation and SAR study of a series of platelet antagonists of n ¹ -benzylidene-carbohydrazide derivatives (Submetido na revista <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i>).....	102
ARTIGO 3 - Synthesis and antiplatelet evaluation of novel n-arylamino-5-methyl-1h-[1,2,3]-triazole-4-carboxylic acid hydrazides (Submetido na revista <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i>).....	112

Resumo

As plaquetas apresentam um papel importante em processos fisiológicos, como a hemostase e em eventos trombóticos que podem resultar em acidentes vasculares cerebrais (AVC) e enfartos. O AVC é responsável por mais de 5 milhões de mortes de acordo com a Organização Mundial da Saúde e os agentes antiplaquetários tem sido uma opção não só para o tratamento como também para a prevenção destes quadros trombóticos. Tendo em vista que os agentes antiplaquetários atualmente utilizados ainda apresentam vários efeitos colaterais e podem provocar resistência, há a necessidade premente de novas moléculas ativas com perfil mais seguro que surjam como opção de tratamento. Com o objetivo de analisar o perfil antiplaquetário e determinar a relação estrutura-atividade de moléculas de origem animal ou sintética, neste trabalho avaliamos as desintegrinas de veneno de serpente (origem animal) e os compostos acilhidrazônicos (origem sintética), utilizando ensaios *in vitro* e análises *in silico* com o uso da modelagem molecular.

Nos estudos com as moléculas de origem sintética, os ensaios *in vitro* de agregação plaquetária utilizando plaquetas de coelhos e colágeno (5 µg / ml), ADP (5 µM) e ácido araquidônico (100 µM) como agonistas revelaram os compostos acilhidrazônicos ativos apenas contra o colágeno e ácido araquidônico. Os valores de IC₅₀ para os dois compostos mais ativos (3a - IC₅₀ = 61 µM e 3c - IC₅₀ = 68 µM) foram aproximadamente cinco vezes melhores do que a aspirina (IC₅₀ = 300µM). Esses compostos apresentaram ainda os maiores valores de *drug-score* e *druglikeness* e baixos riscos de toxicidade teórica na análise de ADMET *in silico*. De forma interessante, a maioria dos compostos preencheu as exigências da regra dos cinco de Lipinski sugerindo uma boa biodisponibilidade oral. Nos estudos com moléculas de origem animal, realizamos uma análise *in silico* das desintegrinas jarastatina (JAST) e jaracina (JARC) presentes no veneno de *Bothrops jararaca*, que apresentam efeitos biológicos inibitórios sobre a agregação plaquetária induzida por ADP (IC₅₀ de 281 nM e 89,5 nM, respectivamente) e por trombina (IC₅₀ 110 nM e 29 nM, respectivamente) in plaquetas humanas. Para o estudo da relação estrutura-atividade sobre a importância da alça RGD e a possível participação de outras regiões na atividade biológica, construímos modelos por homologia para JARC, JAST, seis peptídeos cíclicos referentes a região RGD destas desintegrinas e complexos destas moléculas com a estrutura cristal do receptor de plaquetas α_{IIb}β₃. Nossos resultados mostram que, de forma análoga ao seu perfil biológico mais potente, JARC apresenta um maior número de interações com α_{IIb}β₃ comparado a JAST, incluindo interações de alta energia, como ligações de hidrogênio (ex.: C₆-S₂₂₆ e N₅₄-D₂₅₁) não só na região RGD, mas também em outras regiões (N- e C-terminal). Os peptídeos cíclicos mostraram menos interações com a subunidade α_{IIb} do receptor do que a observada nas desintegrinas, o que pode explicar a baixa atividade inibitória observada para estas moléculas em comparação a JAST e JARC. Estes dados reforçam hipótese da necessidade de outras regiões (C- ou N-terminal) além da alça RGD, como observados nos complexos JAST/JARC-receptor, para inibir o processo de agregação plaquetária.

Palavras chaves: Plaquetas, integrinas, desintegrinas, derivados acil-hidrazonas, modelagem molecular, *in silico*, *in vitro*.

Abstract

Platelets present an important role in physiological processes such as haemostasis and in thrombotic events that may lead to strokes and heart attack. Stroke is responsible for more than 5 million deaths according to World Health Organization and the antiplatelet agents have been an option not only for treatment but also for preventing these thrombotic events. As the antiplatelet agents currently in use still present several side effects and may provoke resistance, there is an urgent need for new active molecules with a safer profile that come up as a treatment option. Aiming to analyze the antiplatelet profile and determine the structure-activity relationship of molecules of animal or synthetic origin, in this study we evaluated the disintegrins from snake venom (animal origin) and acylhydrazone derivatives (synthetic origin) using *in vitro* assays and *in silico* analysis, using a molecular modeling approach.

In the study of molecules from synthetic origin, the *in vitro* platelet aggregation assays using rabbit platelets and collagen (5 $\mu\text{g/mL}$), ADP (5 μM) and arachidonic acid (100 μM) as agonists revealed that the acylhydrazone compounds active only against collagen and arachidonic acid. The IC_{50} values for the two most active compounds (3a - $\text{IC}_{50} = 61 \mu\text{M}$ and 3c - $\text{IC}_{50} = 68 \mu\text{M}$) were almost five times better than aspirin IC_{50} ($\text{IC}_{50} = 300 \mu\text{M}$). These compounds also presented the higher values of drug-score and druglikeness and low theoretical toxicity risks in the *in silico* ADMET screening. Interestingly, most compounds fulfilled the requirements of Lipinski rule of five suggesting a good oral bioavailability.

In the study of molecules from animal origin, we performed an *in silico* analysis of the disintegrins jarastatin (JAST) and jararacin (JARC) from *Bothrops jararaca* venom, which presents inhibitory biological effects on platelets aggregation induced by ADP ($\text{IC}_{50} = 281 \text{ nM}$ and $89,5 \text{ nM}$, respectively) and thrombin ($\text{IC}_{50} = 110 \text{ nM}$ and 29 nM , respectively) in human platelets. For the structure-activity relationship study about the role of RGD loop and the requirement of others regions for the biological activity, we constructed the homology models of JARC, JAST, six RGD cyclic peptides and docking complexes with the platelet receptor $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ crystal structure. Our results showed that, analogous to its potent biological profile, JARC presents a higher number of interactions with $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ than JAST, including high energy interactions such as H-bonds (*i.e.* C₆-S₂₂₆, and N₅₄-D₂₅₁) not only in the RGD motif but also in other regions (N- and C-terminal). RGD-loop cyclic peptides showed less interaction with α_{IIb} subunit than that observed for disintegrins which may explain their low inhibitory activity in comparison to JAST and JARC. These data reinforced the hypothesis of the requirement of other regions (C- and N-terminal) than the RGD-loop domain as observed in JAST/JARC-receptor for inhibiting the platelet aggregation process.

Keywords: Platelets, integrins, disintegrins, acylhydrazone derivatives, molecular modeling, *in silico*, *in vitro*.

Lista de Abreviaturas

- 3D – Tridimensional
- ADP – Adenosina difosfato
- ADME - absorção, distribuição metabolismo e eliminação
- ADMET - absorção, distribuição metabolismo, eliminação e toxicidade
- Ala – A – Alanina
- AM1 – Austin model 1
- AMPc – Monofosfato de adenosina cíclico
- Arg – R – Arginina
- Asn – N – Asparagina
- Asp – D – Ácido aspártico
- ATP – Adenosina trifosfato
- AVC – Acidente vascular cerebral
- AVE – Acidente vascular encefálico
- Ca⁺⁺ – Íon cálcio
- CAM – Molécula de adesão celular
- cLogP - coeficiente de partição octanol/água calculado
- COX-1 – Ciclooxygenase-1
- Cys – C – Cisteína
- Da – Dalton
- DAG – Diacilglicerol
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DCV – Docenças cerebrovasculares
- Gln – Q – Glutamina
- Glu – E – Ácido glutâmico
- Gly – G – Glicina
- GMPc – Monofosfato de guanosina cíclico
- GP – Glicoproteína
- His – H – Histidina
- HOMO – Orbital molecular ocupado de maior energia
- IC₅₀ - Concentração necessária do composto promover a inibição de 50%
- IP₃ – Inositol trifosfato

Ile – I – Isoleucina
JARC – Jararacina
JAST – Jarastatina
KGD – Lisina-Glicina-Ácido Aspártico
LBDD - Ligand Based Drug Design
Leu – L – Leucina
LogS – Solubilidade em água
LUMO – Orbital molecular desocupado de menor energia
Lys – K – Lisina
MLD – Metionina-Leucina-Ácido Aspártico
Met – M – Metionina
nALH – Número de aceptores de ligação hidrogênio
nDLH – Número de doadores de ligação hidrogênio
PAF – Fator ativador de plaquetas
PDB – Banco de dados de proteínas
PGDF – Fator de crescimento derivado das plaquetas
PGG₂ – Prostaglandina G₂
PGH₂ – Prostaglandina H₂
Phe – F – Fenilalanina
pI – Ponto isoelétrico
PIP₂ – Fosfatidilinositol bifosfato
PKC – Proteína quinase C
PPP – Plasma pobre em plaqueta
Pro – P – Prolina
PRP – Plasma rico em plaqueta
PSA – Área de superfície polar
RM1 – Recife model 1
RMN – Ressonância magnética nuclear
RMSD – desvio médio quadrático
SAR – Relação estrutura atividade
SBDCV - Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares
SBDD – Structure Based Drug Design
SCA – Sistema canicular aberto
SVMP – Metaloproteases de veneno de serpente

Thr – T – Treonina

Trp – W – Triptófano

TxA₂ – Tromboxano A₂

TxS – Tromboxano A₂ sintase

Tyr – Y – Tirosina

Val – V – Valina

VGD - Valina–Glicina–Ácido Aspártico

vWF – Fator de von Willebrand

Índice de Figuras

- Figura 1. Acidentes vasculares cerebrais (AVC). (A) AVC isquêmico, no qual a circulação local de sangue é diminuída pela formação do trombo sanguíneo. (B) AVC hemorrágico, no qual o sangue se espalha pelo tecido cerebral com a ruptura do tecido vascular, diminuindo o fluxo dentro dos vasos sanguíneos.....2
- Figura 2. Processo de formação das plaquetas. A) Formação das pró-plaquetas a partir de extensões citoplasmáticas formadas por projeções do citoesqueleto dos megacariócitos. B-E) Amplificação das pró-plaquetas pela a formação de novas projeções nas pró-plaquetas pré-existentes, nas quais as organelas, mitocôndrias e os grânulos α são deslocados através de microtúbulos, para que sejam incluídos dentro das milhares de plaquetas formadas. F) A formação de plaquetas gera um processo de apoptose nos megacariócitos.....7
- Figura 3. Morfologia das plaquetas. (A) componentes e organização e (B) morfologia pré e pós ativação por agonistas9
- Figura 4. Receptores plaquetários (preto) e agonistas (cinza).....10
- Figura 5. Participação da plaqueta na formação do trombo. A-Plaquetas circulantes são mantidas no estado inativado por prostaglandinas e óxido nítrico (NO) liberado por células endoteliais do vaso sanguíneo. Células endoteliais expressam CD39 em sua superfície, que inibe a ativação plaquetária convertendo ADP em AMP. B e C – Nas regiões lesionadas, as plaquetas se aderem ao tecido sub-endotelial exposto, através da interação entre colágeno, fator de von Willebrand e fibronectina com seus receptores integrina $\alpha 2\beta 1$, glicoproteína Ib-IX-V (GP Ib-IX-V) e integrina $\alpha 5\beta 1$, respectivamente. A trombina e o ADP causam a mudança conformacional das plaquetas. D – Plaquetas ativadas secretam ADP, fator de crescimento derivado de plaquetas (PGDF), e fibrinogênio dos grânulos armazenados nas plaquetas, e TxA₂, produzido por biosíntese. ADP e TxA₂ causam “shape change” nas plaquetas circulantes tornando-as ativadas. E – o receptor GP IIb-IIIa (α IIb β 3) presentes na superfície das plaquetas ativadas ligam-se ao fibrinogênio, levando a formação de pontes de fibrinogênio entre as plaquetas, resultando na agregação plaquetária. F - A retração plaquetária leva a formação do trombo branco.....11
- Figura 6. A família das integrinas e sua especificidade funcional como receptor.....14
- Figura 7. A aspirina e seu mecanismo. (A) Via metabólica alvo da aspirina – produção do ácido araquidônico e Tromboxana A₂ e (B) Estrutura cristal do complexo cicloxigenase com o substrato, ácido araquidônico (rosa) e com o inibidor, aspirina (cinza).....17

- Figura 8. Sistema acilhidrazona. (A) Estrutura bidimensional do sistema acilhidrazona, (B) compostos derivados do sistema acilhidrazona (box azul) descritos na literatura que apresentam atividade anti-plaquetária com associações de outros sistemas (box vermelho) e (C) mecanismo de ação proposto para os derivados.....18
- Figura 9. Estratégia de síntese dos compostos acilhidrazônicos (**3a-3k**).....19
- Figura 10. Esquema dos precursores de metaloproteases de veneno de serpentes (SVPMPs) e das desintegrinas. A) Classificação propondo uma origem comum para as metaloproteases e desintegrinas a partir de precursores de alta massa molecular. B) Precursores alternativos nos quais as setas pontilhadas indicam as regiões de processamento entre domínios.....20
- Figura 11. Processo de descoberta de novos fármacos.....25
- Figura 12. Efeito dos compostos acilhidrazônicos (3a-3k) (100µM) sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno (*=p<0,05).....46
- Figura 13. Efeito dos compostos acilhidrazônicos (3a-3k) (100µM) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP (p<0,05).....47
- Figura 14. Efeito e possível mecanismo dos compostos acilhidrazônicos mais ativos. (A) Traços representativos da agregação plaquetária em coelhos induzido por ácido araquidônico (AA-control) e o efeito inibitório dos compostos mais ativos (3a, 3c e 3f) (100µM) e (B) via metabólica afetada por estes derivados e os possíveis alvos na via do ácido araquidônico (Ciclooxigenase I - Cox-1 e Tromboxana A2 sintase).....48
- Figura 15. Estruturas 3D dos compostos (3a-3k). Comparação das conformações das estruturas mais estáveis. Os quadrados azuis marcam os compostos mais ativos e o círculo verde, os substituintes volumosos nos derivados menos ativos.....52
- Figura 16. Comparação dos mapas de potenciais eletrostáticos dos compostos (3a-3k). Vermelho: as regiões mais eletronegativas, azul: as regiões mais eletropositivas.....53
- Figura 17. Comparação dos valores de druglikeness e drug-score dos compostos acilhidrazônicos mais potentes (3a, 3c e 3f) e de alguns fármacos utilizados na terapêutica do AVC.....55
- Figura 18. Risco de toxicidade calculado utilizando o programa Osiris Property Explorer para os compostos acilhidrazônicos mais potentes (3a, 3c e 3f) e de alguns fármacos utilizados na terapêutica do AVC.....56
- Figura 19. Alinhamento múltiplo de seqüência de desintegrinas de veneno de serpente: jararastina - JAST, jararacina - JARC, insularina – INSU (*Bothrops insularis*, gi:52426579), salmosina – SALM (*Gloydius halys*,

- gi:4106003), flavostatina – FLAV (*Trimeresurus flavoviridis*, gi: 14595995), trismetatina – TRIM (*T. flavoviridis*, gi: 37926519), botrostatina – BOTH (*Bothrops jararaca*, gi:13194760), halisina – HALY (*Gloydus blomhoffi*, gi: 118651), saxatilina – SAXA (*G. halys*, gi: 9945028), albolabrina – ALBO (*Cryptelytrops albolabris*, gi: 67462322), rodostomina – RHOD (*Calloselasma rhodostom*, gi:605649), kistrina – KIST (*C. rhodostoma*, gi:159162730). A numeração segue a estrutura primária da salmosina (SALM). Os aminoácidos idênticos ou conservados em todas as seqüências estão marcados com caixa cinza escuro e cinza claro, respectivamente. A seqüência RGD está marcada em caixa preta e as seis ligações dissulfeto (Cys₄–Cys₁₃, Cys₆–Cys₁₄, Cys₁₉–Cys₃₃, Cys₂₇–Cys₅₇, Cys₃₂–Cys₃₆, e Cys₄₅–Cys₆₄) foram marcadas com (+). Os aminoácidos presentes exclusivamente nos grupos de seqüência da jarastatina ou da jararacina estão em cinza e foram utilizados para orientar a divisão em dois grupos baseados na sua maior similaridade.....58
- Figura 20. Comparação dos modelos teóricos das desintegrinas jararacina (JARC), jarastatina (JAST) e dos *templates* salmosina (SALM) e trimestatina (TRIM). A tríade RGD está representada em amarelo (arginina), rosa (glicina) e vermelho (ácido aspártico).....59
- Figura 21. Validação dos modelos das desintegrinas JARC e JAST. Gráficos (A) e valores (B) de Ramachandram para os modelos JARC e JAST, comparados aos templates salmosina (SALM) e trimestatina (TRIM). As regiões mais favoráveis estão em vermelho, favoráveis em amarelo, menos favoráveis em bege e desfavoráveis em branco.....60
- Figura 22. Comparação dos resultados dos gráficos obtidos da análise com o programa Verify3D para os modelos JAST e JARC e as estruturas de RMN e cristal dos templates salmosina e trimestatina..... 61
- Figura 23. Mapa de potencial Eletrostático das desintegrinas (A) JARC; (B) JAST; (C) Trimestatina e (D) Salmosina. Em vermelho as regiões mais eletronegativas e em azul, as regiões mais eletropositivas.....62
- Figura 24. Estrutura tridimensional dos peptídeos cíclicos baseados em (A) JARC (A1 - P1', A2 - P2' e A3 - P3') e em (B) JAST (B1 - P1, B2 - P2 e B3 - P3). O mapa de potencial eletrostático está mostrado nas caixas brancas. Alinhamento da estrutura primária (abaixo) e terciária (C) das desintegrinas (azul) e dos peptídeos cíclicos (verde). A região RGD está representada em amarelo (arginina), rosa (glicina) e vermelho (ácido aspártico).....63
- Figura 25. Interações de alta energia presente no complexo integrina–JARC. Visão total do complexo (A) e suas interações (B). A desintegrina está representada em azul e a integrina ($\alpha_{1b}\beta_3$) e m branco.....66

- Figura 26. Interações de alta energia presente no complexo integrina–JAST. Visão total do complexo (A) e suas interações (B). A desintegrina está representada em azul e a integrina ($\alpha_{1b}\beta_3$) em branco.....67
- Figura 27. Interações de alta energia dos complexos integrina–peptídeos cíclicos. (A) Visão total do complexo e suas interações com (B) JAST P₁, (C) JARC P₂ e (D) JARC P₃. Os peptídeos cíclicos estão representados em azul e a integrina ($\alpha_{11b}\beta_3$) em branco.....68

Índice de Tabelas

Tabela 1.	Características diferenciais das desintegrinas baseados na seqüência, padrão de ligações dissulfeto e relações evolucionárias.....	21
Tabela 2.	Comparação do perfil inibitório (IC50) das desintegrinas JARC e JAST e dos peptídeos cíclicos da região RGD das desintegrinas sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e trombina.....	23
Tabela 3.	Comparação dos efeitos inibitórios e os descritores estero-eletrônicos dos derivados acilhidrazônicos (3a-3k).....	50
Tabela 4.	Matriz de correlação cruzada da atividade inibitória dos compostos na agregação plaquetária induzida por colágeno (colágeno) e os descritores calculados (energia de HOMO/LUMO (E_{HOMO} , E_{LUMO} - eV), Momento dipolo (μ), volume e área molecular, área de superfície polar (PSA), peso molecular (Peso), lipofilicidade (cLogP) e solubilidade (LogS)).....	51
Tabela 5.	Análise teórica das propriedades físico-químicas das acilhidrazonas (3a-3k) envolvidas na biodisponibilidade oral para fármacos, seguindo a regra dos cinco de Lipinski.....	54
Tabela 6.	Interações de alta energia dos complexos integrina-desintegrina (JARC- $\alpha_{IIb}\beta_3$ e JAST- $\alpha_{IIb}\beta_3$) e integrina-peptídeos cíclicos.....	65

1. Introdução

1.1. Acidentes Vasculares Cerebrais (AVC)

1.1.1. Visão Geral

O processo hemostático ao ser ativado por meio de danos vasculares, fluxo sangüíneo lento (estase), alteração na composição pró-coagulante sangüínea ou ainda sob a ação de fatores de risco, como o uso de contraceptivo oral, gravidez, obesidade, tabagismo, entre outros, pode induzir a formação de um coágulo, denominado trombo, no interior do vaso sangüíneo (Gentry *et al.*, 2004; Moustafa *et al.*, 2008). Com a formação do trombo, a circulação local é diminuída favorecendo o entupimento do vaso, provocando uma diminuição significativa, ou mesmo parada de oxigenação e de fornecimento de nutrientes às células locais. O agravamento deste processo pode levar a morte celular e mesmo do indivíduo (Taoufik *et al.*, 2008). Muitas patologias seguem este processo fisiopatológico de interrupção sangüínea, dentre elas os acidentes vasculares cerebrais, que apresentam uma grande importância no quadro de mortalidade mundial (Bhatt *et al.*, 2007).

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) pode ser definido como déficit neurológico focal súbito, devido a uma lesão vascular. O termo inclui lesões causadas por distúrbios da coagulação e hemodinâmicos, mesmo que não haja alterações detectáveis nas veias ou artérias (Stephanie *et al.*, 2007). O AVC, também denominado de acidente vascular encefálico (AVE), pode ser apresentado de duas formas: a anóxico-isquêmica e a hemorrágica. A forma anóxico-isquêmica do AVC é caracterizada com a falta de suprimentos de oxigênio e nutrientes adequados para os tecidos, enquanto a forma hemorrágica é resultado de um

extravasamento de sangue dos vasos para as estruturas do sistema nervoso central (Figura 1) (Chaves, 2000; Moustafa *et al.*, 2008).

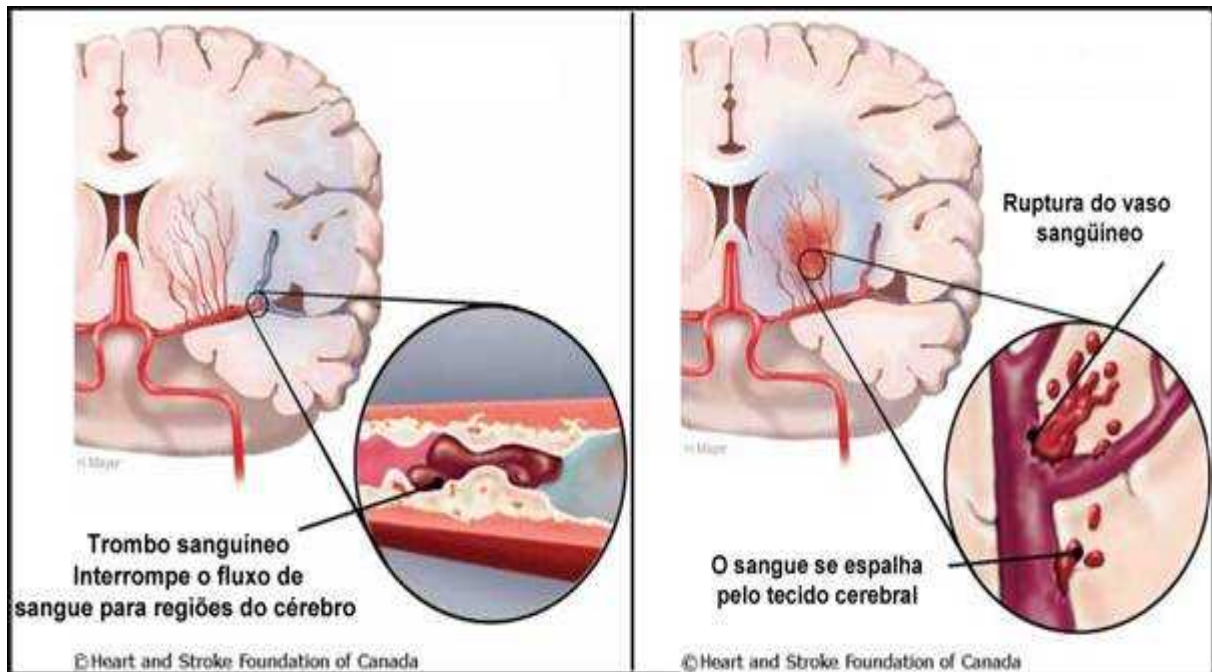


Figura 1: Acidentes vasculares cerebrais (AVC). (A) AVC isquêmico, no qual a circulação local de sangue é diminuída pela formação do trombo sanguíneo. (B) AVC hemorrágico, no qual o sangue se espalha pelo tecido cerebral com a ruptura do tecido vascular, diminuindo o fluxo dentro dos vasos sanguíneos (modificado de HSFC, 2008).

Atualmente, o AVC é considerado a primeira causa de incapacidade motora, sensitiva e cognitiva no mundo (Shah *et al.*, 2003). Em 2005, a Organização Mundial da Saúde analisou as taxas de mortalidade e de incapacidade motora, sensitiva e cognitiva provocadas pelo AVC, gerando uma projeção desde 2003 até 2030. No ano de 2005 aproximadamente 5 a 7 milhões de mortes foram causados pelo AVC e aproximadamente 50-58 milhões de pessoas ficaram incapacitadas (Strong *et al.*, 2007). No Brasil é estimado que as doenças cerebrovasculares estejam entre as principais causas de óbito nos grandes centros urbanos e segundo a Sociedade Brasileira de Doenças Cerebrovasculares (SBDCV), o AVC é a primeira causa de

óbito, e gera grande impacto sobre a saúde da população (SBDCV, 2001). Aproximadamente, 80% dos casos de AVC se devem à oclusão, seja pela formação de ateroma na artéria, que gera uma ativação inespecífica das plaquetas, ou ainda, por êmbolos secundários, que privam a oxigenação e nutrientes do cérebro (André, 2006).

A região da isquemia vascular é composta por uma região denominada núcleo, onde ocorre a interrupção e da perda do fluxo sanguíneo cerebral, com consecutiva perda do volume do sangue na região, que pode gerar uma rápida perda funcional dos neurônios. A isquemia vascular é composta ainda por uma região mais distal, que é menos afetada pela interrupção de fluxo sanguíneo no cérebro. Esta região é subdividida em região de penumbra, próxima ao núcleo e que apresenta o metabolismo de oxigênio preservado, e zona oligêmica que sofre um grau moderado de hipoperfusão com metabolismo normal de oxigênio, volume sanguíneo elevado e fração da extração de oxigênio elevada, sem risco de infarto nessas artérias (Moustafa *et al.*, 2008).

Alguns fatores de risco podem contribuir para a ocorrência do AVC, como as cardiopatias, o tabagismo, o alcoolismo, o sedentarismo, o diabetes e o uso de anticoncepcionais orais. A hipertensão arterial sistêmica é o principal fator de risco preditivo para AVC isquêmico, pois está presente em cerca de 70% dos casos de doenças cerebrovasculares. As cardiopatias são consideradas o segundo fator de risco mais importante para o AVC isquêmico (frequência = 41,9%) diferentemente do AVC hemorrágico (frequência = 2%) (Allen *et al.*, 2008).

A fibrilação atrial crônica é a doença cardíaca mais associada com AVC, representando cerca de 22% destes casos, enquanto o Diabetes mellitus é fator de risco independente para a doenças cerebrovasculares (DCV), uma vez que acelera o

processo aterosclerótico, sendo que cerca de 23% de pacientes com AVC isquêmicos são diabéticos (Pires *et al.* 2004). As DCVs incidem com maior frequência em pessoas com idade avançada, período de vida em que se observam as maiores taxas de óbito e seqüelas. O doente idoso possui algumas características próprias em relação à etiologia e prevenção destas doenças quando comparado ao doente jovem. Nesta população, observa-se uma nítida predominância da aterosclerose como causa de DCV, ao contrário dos jovens, nos quais prevalecem condições hereditárias, malformações e uso de drogas ilícitas. (Botrel *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002).

Atualmente, um grande investimento tem sido feito na área de pesquisa para a descoberta e desenvolvimento de novas moléculas de origem sintética ou natural que possuam um efeito antiplaquetário e anti-trombótico com baixos efeitos colaterais. Devido ao alto índice de incidência de AVC na população mundial, e pelo fato dos medicamentos presentes no mercado (ex.: aspirina – ácido acetil salicílico) ainda apresentarem significativos efeitos deletérios, podendo induzir a resistência do indivíduo ao tratamento (Tourmousoglou *et al.*, 2008; Komotar *et al.*, 2008).

1.2. Estudando alvos terapêuticos e novos ligantes para o tratamento do AVC

1.2.1. Breve compreensão sobre a Hemostasia

O sistema circulatório possui uma grande importância no papel de transporte de oxigênio, nutrientes, hormônios e macromoléculas para os tecidos e para a eliminação de moléculas tóxicas pelo pulmão e pelos rins, principalmente (Meadows *et al.*, 2007). A integridade desse sistema é essencial para o organismo

humano, uma vez que a perda de uma quantidade significativa do volume sangüíneo por algum dano vascular é incompatível com a vida. Desta forma, o organismo possui um mecanismo complexo denominado de hemostase, que, na ocorrência de uma lesão vascular, inicia a ativação de componentes celulares e proteínas plasmáticas solúveis, produzindo uma barreira insolúvel, também denominado de plug hemostático, que detém a perda sangüínea (Rosenberg, 2001). Este bloqueio é formado principalmente por plaquetas e uma rede insolúvel de fibrina, formada a partir da ação de enzimas sobre o fibrinogênio (Weisel, 2005; Wolberg *et al.*, 2008).

A hemostase fisiológica é um processo que controla a fluidez sangüínea, que é mantida estável enquanto o endotélio vascular estiver íntegro. Entretanto, caso ocorra qualquer agressão tecidual, tem-se a ruptura do tecido endotelial e a exposição de uma camada rica em colágeno que induz uma rápida adesão das plaquetas. Essa adesão a matriz extracelular presente no sub-endotélio que contém ainda, fibronectina, fator de von Willebrand (vWF), laminina e vitronectina, ativa a hemostase que ocorrerá em três etapas incluindo a hemostase primária, secundária e a fibrinólise (Cannobio *et al.*, 2004).

A hemostasia primária é resultante de uma complexa interação entre a parede vascular lesada, plaquetas e algumas proteínas responsáveis pela adesão plaquetária (e x.: vWF), receptores de adesão e agregação plaquetária (ex.: integrinas, receptores de colágeno e ADP), além de moléculas ativadoras das plaquetas (Meadows *et al.*, 2007). De fato, a hemostasia primária corresponde à resposta inicial da vasculatura e das plaquetas após a exposição da camada de colágeno sub-endotelial. Assim que ocorre a lesão no vaso sangüíneo, há uma vasoconstrição local, transitória, diminuindo o fluxo sanguíneo quando, então, as plaquetas se ativam ao entrar em contato com o colágeno, se aderindo a esta

superfície. Com a ativação, as plaquetas liberam uma série de compostos que irá ativar a agregação plaquetária, amplificando a resposta hemostática, formando o trombo branco (Castro *et al.*, 2006; Caplan *et al.*, 2007).

A hemostasia secundária consiste no processo de coagulação na qual ocorre uma ativação seqüencial de proteínas plasmáticas inativas, os zimogênios, também chamados de fatores de coagulação, em enzimas capazes de originar como produto final a rede de fibrina a partir do fibrinogênio. Neste processo uma das enzimas produzidas, a trombina, é também um agonista plaquetário que aumentará o processo de agregação plaquetária. O terceiro processo da hemóstase, que compreende a fibrinólise, corresponde ao controle da formação do coágulo no vaso, garantindo a restauração adequada da circulação no local em que ocorreu a lesão vascular. O sistema fibrinolítico é composto de enzimas que dissolvem o coágulo para controle de sua extensão, após a cobertura da área lesada (Wohner, 2008; Wolberg *et al.*, 2008).

1.2.2. Plaquetas: alvos atuais para o tratamento do AVC

1.2.2.1. Constituição e características plaquetárias

O AVC é um processo fisiopatológico que resulta em quadros clínicos de alto índice de morbidade ou/e fatalidade, tendo as plaquetas como parte principal envolvida na iniciação e propagação de formação de trombos (Gentry *et al.*, 2004). As plaquetas são fragmentos celulares oriundos dos megacariócitos presentes na medula óssea sendo geradas a partir de um processo que envolve a formação de projeções citoplasmáticas e diferentes etapas (Figura 2) (Italiano *et al.*, 2003; Schulze *et al.*, 2005; Deutsch *et al.*, 2006).

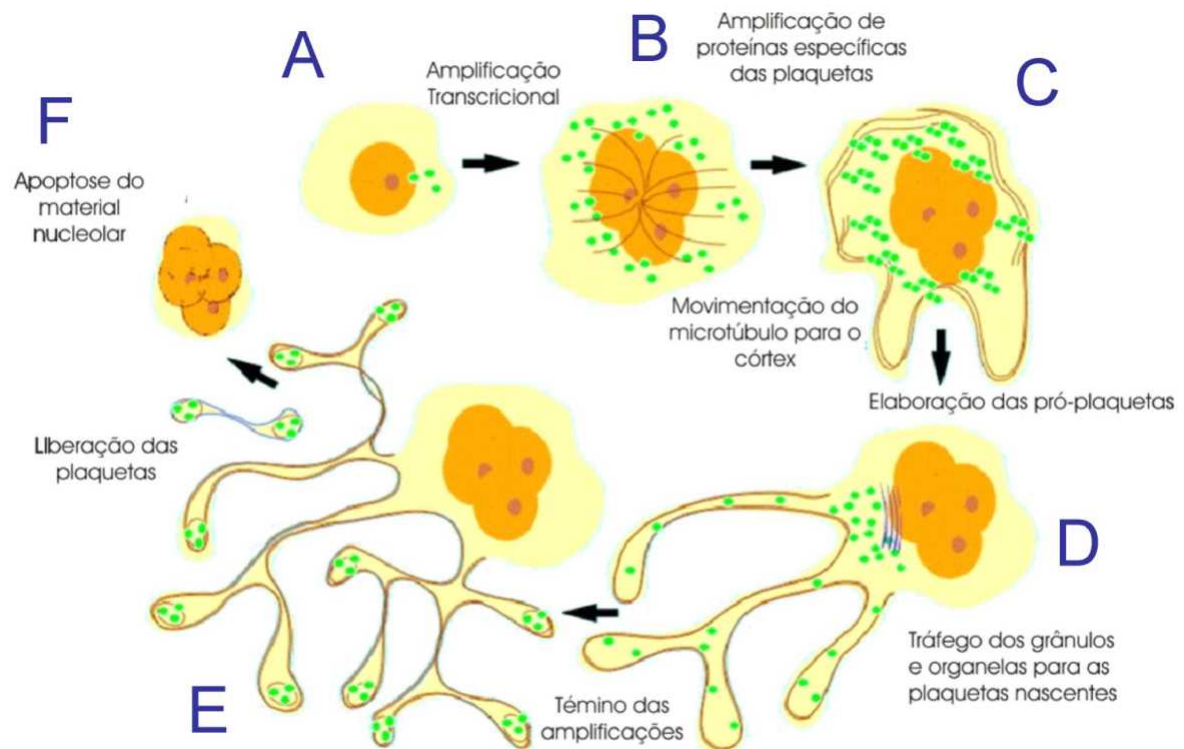


Figura 2: Processo de formação das plaquetas. A) Formação das pró-plaquetas a partir de extensões citoplasmáticas formadas por projeções do citoesqueleto dos megacariócitos. B-E) Amplificação das pró-plaquetas pela a formação de novas projeções nas pró-plaquetas pré-existentes, nas quais as organelas, mitocôndrias e os grânulos α são deslocados através de microtúbulos, para que sejam incluídos dentro das milhares de plaquetas formadas. F) A formação de plaquetas gera um processo de apoptose nos megacariócitos (modificado de Hartwig *et al.*, 2006; Falcieri *et al.*, 2000).

O sangue humano apresenta 150 a 400 x 10³ plaquetas/mm³ sendo que, 70% estão presentes na circulação e 30% no baço. As plaquetas permanecem na circulação durante uma média de 10 dias, quando são eliminadas pelas células reticulo-endoteliais do baço e do fígado (Italiano *et al.*, 2003; Andrews *et al.*, 2004; Schulze *et al.*, 2005).

As plaquetas apresentam quatro zonas morfológicas na sua forma quiescente (Figura 3):

- Zona periférica: região que inclui duas membranas, a externa e a interna e um sistema de canais ligados à superfície denominada de sistema canicular aberto

(SCA). O SCA é responsável pela troca de moléculas com o meio externo, por onde ocorre uma significativa liberação de várias moléculas quando a plaqueta está ativada (Figura 3) (Schulze *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2006).

- Zona sol-gel: região que se encontra abaixo da zona periférica, e é composta pelo citoesqueleto, que fornece a sustentação para a forma discóide da plaqueta, e por um sistema contrátil que, sob ativação, permite a mudança da forma discóide para a forma dendrítica (Figura 3). Esta mudança permite o prolongamento de pseudópodos, a contração interna e a liberação dos constituintes granulares. De forma interessante, o citoesqueleto parece orientar a centralização dos grânulos para a liberação do conteúdo através do sistema canicular aberto na zona periférica (Figura 3) (Hartwig, 2002).

- Zona de organelas: região formada por grânulos alfa, que contêm proteínas adesivas, fator de von Willebrand (vWF), trombospondina, vitronectina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PGDF), fator IV plaquetário, fatores da coagulação (como exemplo o fator XI), e inibidor do ativador plasminogênio; por grânulos densos, ricos em ATP, ADP, serotonina e cálcio; e por componentes celulares, tais como lisossomos e mitocôndria, que além de conter ATP e ADP, também participam dos processos metabólicos da plaqueta e armazenam enzimas e outras moléculas críticas para a função plaquetária (Figura 3) (Castro *et al.*, 2006).

- Zona ou Sistema membranar: região que inclui o sistema tubular denso, que contém o cálcio importante para desencadear os eventos contráteis e os sistemas enzimáticos envolvidos na produção e síntese de prostaglandinas (Figura 3) (Hartwig, 2002).

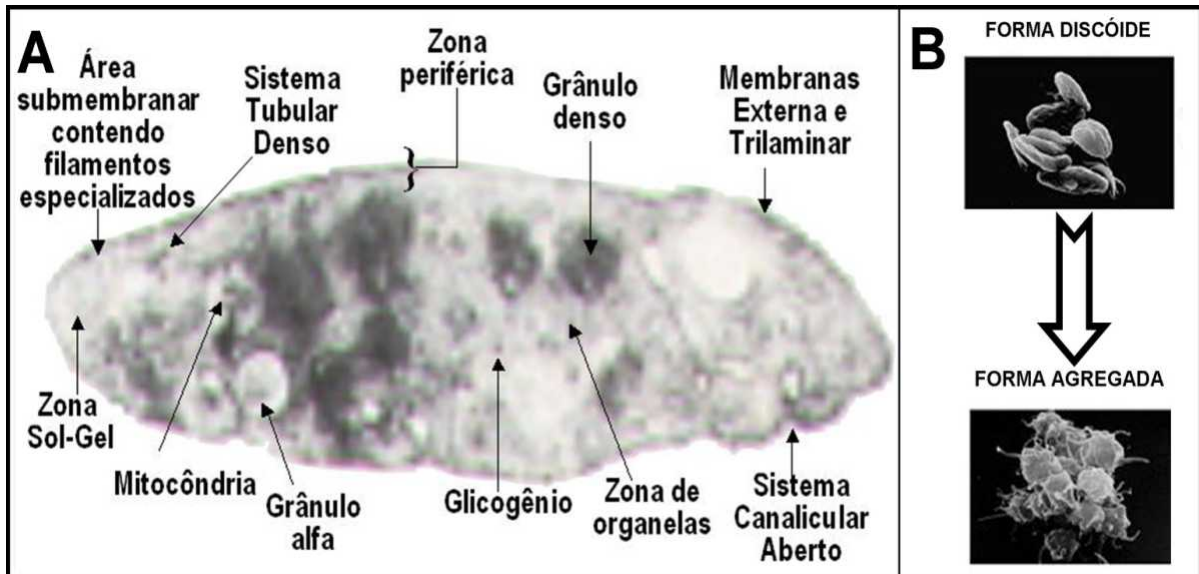


Figura 3: Morfologia das plaquetas. (A) componentes e organização e (B) morfologia pré e pós ativação por agonistas (A - Castro *et al.*, 2006; B - Modificado, www.biomed.brown.edu/.../webpages/plateletslink.htm).

Além das 4 zonas, as plaquetas apresentam um grande número de receptores de superfície em sua membrana que, quando ativados, são responsáveis pela sua mudança da forma discóide ou quiescente para a forma ativada; permitindo a sua adesão ao endotélio e a agregação a outras plaquetas (Figuras 3 e 4). Estes receptores são ativados por diferentes agonistas como o colágeno, fator de von Willenbrand, ADP, epinefrina e a trombina (Figura 4).

Os receptores plaquetários são glicoproteínas (GPs) com estruturas distintas como, por exemplo, o receptor GPIb-IX-V, que é um complexo de proteínas da família das moléculas ricas em leucinas, o receptor GPVI da super-família das imunoglobulinas, ou ainda os receptores de ADP ou de trombina, que são receptores purinérgicos e integrinas (Hartwig, 2002).

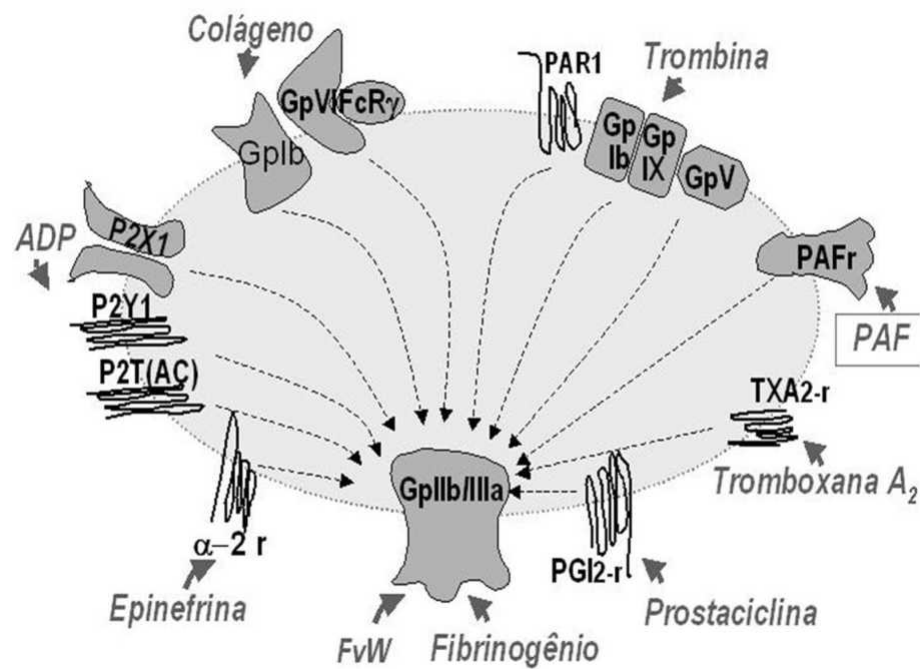


Figura 4: Receptores plaquetários (preto) e agonistas (cinza) (Castro *et al.*, 2006).

Uma visão mais detalhada ativação plaquetária revela que esta ocorre pela interação de algum receptor plaquetário com agonistas específicos desencadeando dois processos: a adesão da plaqueta ao subendotélio, e a agregação plaquetária (Figura 5). A adesão plaquetária à matriz subendotelial é mediada principalmente por vWF e colágeno presentes na matriz. A interação do vWF é mediada pela glicoproteína GPIb α , do complexo GPIb-IX-V plaquetário. O fator vWF se liga no domínio N-terminal de 45kDa do complexo GPIb-IX-V, que é essencial para a adesão plaquetária, visto que se liga ao colágeno e conseqüentemente ao endotélio. Outros receptores se ligam diretamente ao colágeno estabilizando a adesão, como as glicoproteínas GPVI, $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ (via vWF) (Nieswandt *et al.*, 2003).

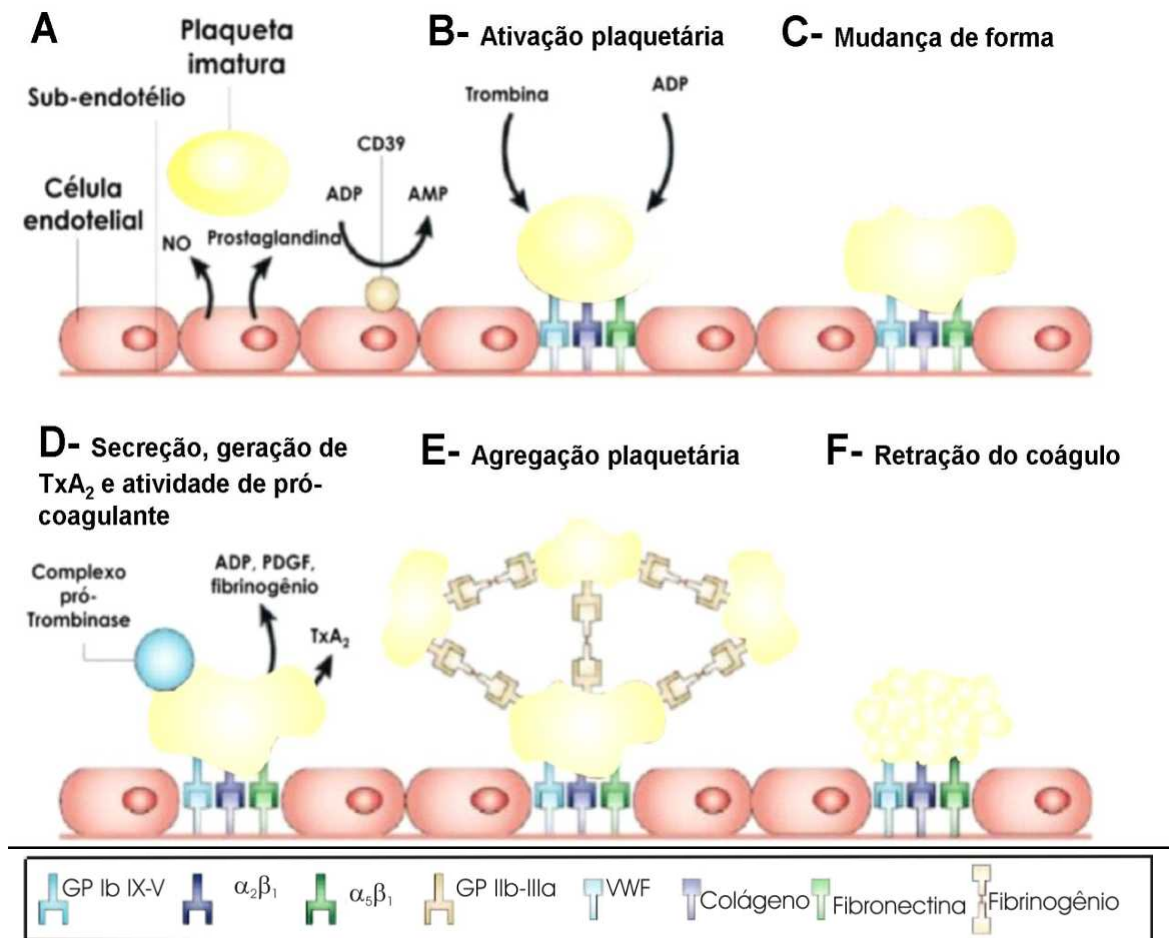


Figura 5: Participação da plaqueta na formação do trombo. **A** - Plaquetas circulantes são mantidas no estado inativado por prostaglandinas e óxido nítrico (NO) liberado por células endoteliais do vaso sanguíneo. Células endoteliais expressam CD39 em sua superfície, que inibe a ativação plaquetária convertendo ADP em AMP. **B** e **C** – Nas regiões lesionadas, as plaquetas se aderem ao tecido sub-endotelial exposto, através da interação entre colágeno, fator de von Willebrand e fibronectina com seus receptores integrina $\alpha_2\beta_1$, glicoproteína Ib-IX-V (GP Ib-IX-V) e integrina $\alpha_5\beta_1$, respectivamente. A trombina e o ADP causam a mudança conformacional das plaquetas. **D** – Plaquetas ativadas secretam ADP, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), e fibrinogênio dos grânulos armazenados nas plaquetas, e TxA_2 , produzido por biosíntese. ADP e TxA_2 causam “shape change” nas plaquetas circulantes tornando-as ativadas. **E** – o receptor GP IIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) presentes na superfície das plaquetas ativadas ligam-se ao fibrinogênio, levando a formação de pontes de fibrinogênio entre as plaquetas, resultando na agregação plaquetária. **F** - A retração plaquetária leva a formação do trombo branco (Modificado de Bhatt *et al.*, 2003).

Após a adesão e subsequente ativação, as plaquetas liberam o conteúdo de seus grânulos que contêm ADP, ATP, serotonina, cálcio, proteínas adesivas (como

fibrinogênio e fibronectina), fatores de coagulação (como o fator V e XI) e enzimas hidrolíticas. As plaquetas também produzem tromboxano A_2 (TxA_2) através da cascata do ácido araquidônico. O conteúdo liberado pelos grânulos como ADP e serotonina, agem em conjunto com TxA_2 no recrutamento de plaquetas para a região de lesão vascular. A interação entre as plaquetas, provocando o crescimento do “plug” hemostático, é mediada pela ligação bivalente do fibrinogênio ao receptor GP $\alpha_{IIb}\beta_3$ resultando na agregação plaquetária (Figura 5) (Andrews *et al.*, 2004).

Muitos indutores da atividade plaquetária agem através da ativação da fosfolipase C. Esta enzima converte fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2), um fosfolípido presente na membrana da plaqueta, em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). O DAG ativa proteína quinase C (PKC), enquanto o IP_3 se liga a canais de Ca^{++} presentes no sistema tubular denso (que serve de reservatório intracelular de Ca^{++} na plaqueta), causando, assim, a saída de Ca^{++} e aumentando sua concentração no citosol (Kato *et al.*, 2003). Este aumento provoca a ativação da actomiosina ATPase, expondo mais integrinas na superfície da plaqueta e uma reorientação do citoesqueleto, resultando na mudança de forma da plaqueta (discóide para esferoidal). O grande influxo de íons Ca^{++} também promove a ativação da fosfolipase A_2 , que gera ácido araquidônico através da clivagem de fosfolípidios de membrana. A enzima ciclooxygenase-1 (COX-1) presente nas plaquetas converte este ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos – prostaglandina G_2 (PGG_2) e prostaglandina H_2 (PGH_2), enquanto a enzima tromboxano sintase converte esses endoperóxidos cíclicos (PGG_2 e PGH_2) em TxA_2 . Esses produtos da COX-1 da plaqueta são potentes vasoconstritores e ativadores plaquetários. Apenas os indutores plaquetários, como a trombina, ativam diretamente a fosfolipase C, enquanto outros agonistas agem de forma indireta, via formação da TxA_2 endógena

(Ofosu *et al.*, 2000). A ativação plaquetária tem como propósito produzir um trombo plaquetário que constitui o tampão hemostático primário, com objetivo final restringir o extravazamento sanguíneo (Jin *et al.*, 2005).

1.2.2.2. Integrinas: alvos terapêuticos plaquetários

As integrinas são receptores plaquetários transmembrânicos compostos por dois monômeros glicoprotéicos distintos, α e β . Estes receptores apresentam como função mediar as interações entre as moléculas de adesão celular (CAM), que estão presentes no meio extracelular, com o citoesqueleto do meio intracelular, permitindo as interações célula-célula ou célula-matriz. Essas moléculas possuem um domínio extracelular, uma porção transmembrânica e uma pequena região citoplasmática (20 a 60 aminoácidos). Esse receptor está presente não só em plaquetas, mas também em todos os organismos multicelulares, embora apresentem certa variação entre as espécies. Os mamíferos, por exemplo, apresentam 18 subunidades α e 8 subunidades β , combinada em 24 receptores distintos (Humphries, 2000) (Figura 6).

Existem descritos na literatura cinco tipos de subunidades α (α_2 , α_{IIb} , α_v , α_5 e α_6) e dois tipos de subunidades β (β_1 e β_3) que formam as integrinas plaquetárias $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_6\beta_1$ (Kasirer-Friede *et al.*, 2007). As integrinas podem interagir com laminina, vitronectina, fibronectina, através da interação com a região RGD dessas moléculas, formada pelos aminoácidos arginina (R), glicina (G) e ácido aspártico (D). Já foram descritas interações das integrinas com outras seqüências de aminoácidos, como Valina-Glicina-Ácido Aspártico (VGD), Metionina-Leucina-Ácido Aspártico (MLD), Lisina-Glicina-Ácido Aspártico (KGD), dentre outras (Schaffner *et al.*, 2003; Calvete *et al.*, 2005).

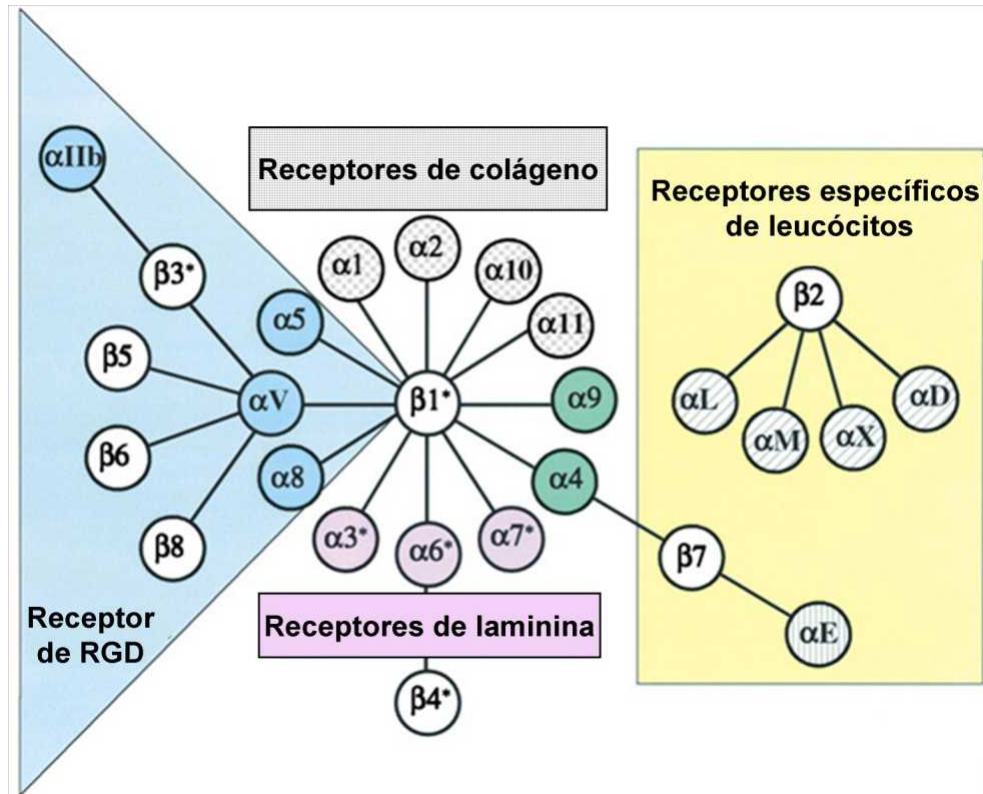


Figura 6: A família das integrinas e sua especificidade funcional como receptor.

A sinalização via integrina ocorre de forma bidirecional a partir da interação da integrina com seu ligante, podendo ser do meio extracelular para o meio intracelular (“Outside-in”) ou do meio intracelular para o extracelular (“Inside-out”). As interações provocadas via ligantes extracelulares desencadeiam um sinal intracelular, que no caso das plaquetas, induzem a modificação de sua morfologia. Por outro lado, a ativação das integrinas via sinalização interna modula a afinidade desses receptores com seus ligantes (Schaffner *et al.*, 2003).

As integrinas que interagem diretamente com colágeno apresentam a região denominada de domínio-α1, na sub-unidade α. Nas plaquetas, a integrina α₂β₁ apresenta este domínio e tem o papel principal de viabilizar a adesão da plaqueta ao colágeno, permitindo ainda que este interaja com um segundo receptor de colágeno, o GPVI (Jung *et al.*, 2008). Vários estudos têm sugerido que α₂β₁ e GPVI possuem

papéis complementares, em que $\alpha_2\beta_1$ é capaz de se ligar ao colágeno antes da ativação plaquetária, sendo a GPVI necessária para formação do trombo. Entretanto, o papel da $\alpha_2\beta_1$ não se resume apenas a adesão plaquetária, mas também na geração de sinais intracelulares que auxiliam na estabilização do trombo (Nieswandt *et al.*, 2003).

A glicoproteína $\alpha_{IIb}\beta_3$ é uma integrina que também possui um papel de grande importância à plaqueta. Esta molécula está envolvida no mecanismo de agregação plaquetária após o processo de adesão ao tecido sub-endotelial e pode ser regulada seguindo uma via intracelular para extracelular, com a prévia ativação de receptores GPVI, GPIb-IX-V e $\alpha_2\beta_1$ (Andrews *et al.*, 2004). Após o contato com o colágeno, estes receptores ativam uma cascata de sinalização intracelular que geram um aumento na concentração de íons Ca^{++} e a formação de produtos das fosfolipases e tirosina-quinases, como PKC, PI 3-quinase e Rap1b. Esta ativação influencia na fluidez do sangue quando ocorre um processo de lesão vascular. O receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ pode ser regulado negativamente pela ativação do monofosfato de adenosina (AMPc), monofosfato de guanosina (GMPc), gerados pela interação da plaqueta com prostaciclina, e óxido nítrico mantendo a plaqueta inativada (Brass, 2005).

O receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ tem sido considerado um importante alvo terapêutico devido ao seu papel no processo de agregação plaquetária. Muitos compostos agem neste receptor inibindo sua atividade, como é o caso do abciximab, um fragmento Fab de anticorpo monoclonal de camundongo (Atwater *et al.*; 2005), e do medicamento eptifibatide, um peptídeo cíclico formado por sete aminoácidos contendo a seqüência lisina-glicina-ácido aspártico (KGD). Este composto tem origem a partir das desintegrinas que são peptídeos inibidores específicos das

integrinas (Wu *et al.*; 2005). A busca de novos compostos antiplaquetários seja de origem natural ou sintética é um campo de pesquisa importante na área médica devido ao seu potencial para um tratamento mais seguro para as pessoas que apresentem patologias envolvendo processos trombóticos.

1.2.3. Moléculas de origem animal e sintética com potencial para o tratamento do AVC

1.2.3.1. Origem sintética: derivados acilhidrazônicos

O conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos pelos quais as plaquetas atuam nos processos hemostáticos pode revelar a patogênese de doenças envolvendo acidentes tromboembólicos. Os estudos farmacológicos têm mostrado que a inibição da atividade plaquetária, seja atuando sobre enzimas ou receptores presentes nas vias envolvidas na função plaquetária, ainda é um importante mecanismo para o tratamento dessas doenças vaso-oclusivas.

A inibição plaquetária se baseia principalmente em dois conceitos incluindo a modulação dos fatores anti-agregantes endógenos, e a inibição dos agentes pró-trombóticos. Pode-se obter essa inibição atuando diferentemente sobre esses fatores e/ou sobre as vias de síntese plaquetária em que estão envolvidos. Muitos compostos tendo sido utilizados como inibidores da atividade plaquetária como o ácido acetil salicílico, que age irreversivelmente na inibição da atividade da ciclooxigenase-1 (COX-1) e também é conhecido como aspirina. A COX-1 catalisa a conversão do ácido araquidônico para a prostaglandina H_2 (PGH₂), um endoperóxido cíclico precursor do TxA₂ (Farré *et al.*, 1995, Nakahata *et al.*, 2008). Com isso, a

aspirina atua inibindo a formação de TxA_2 , um importante agente agregante e vasoconstritor, e, conseqüentemente, o processo de ativação e agregação plaquetária (Figura 7) (Undas *et al.*; 2007). Infelizmente, a aspirina apresenta diversos efeitos colaterais incluindo, irritação gastrointestinal, quadros de hemorragias e a literatura mostram também a presença de resistência em indivíduos que fazem uso preventivo contínuo deste medicamento (Gladding *et al.*, 2008).

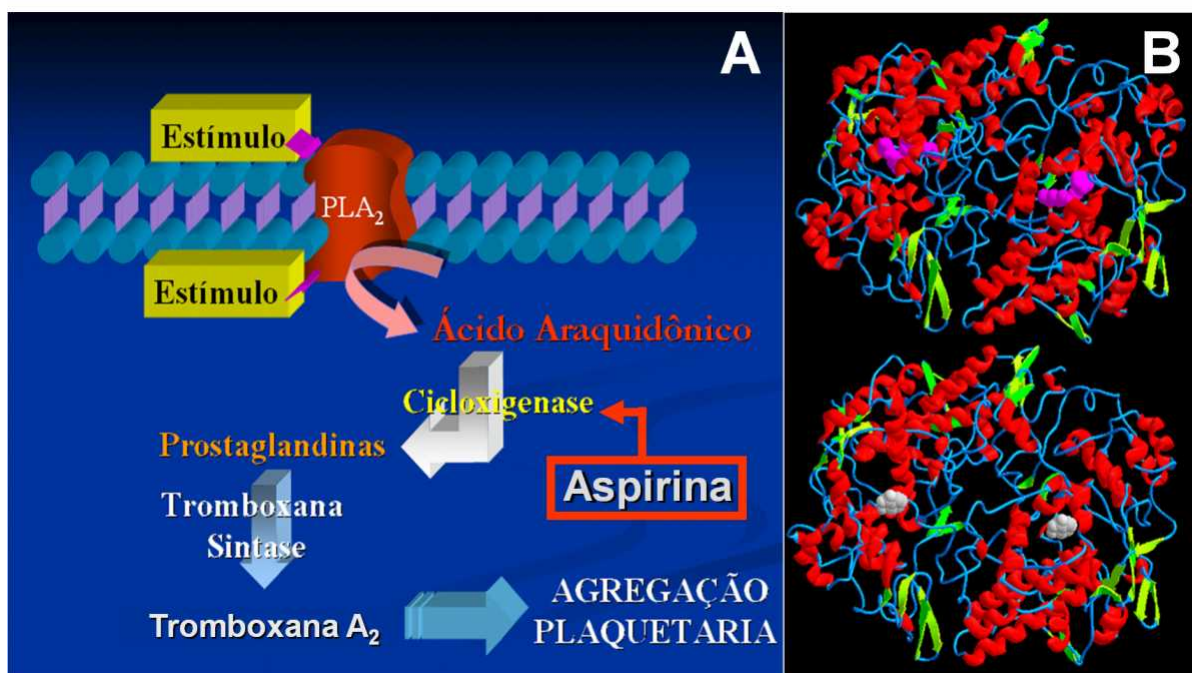


Figura 7: A aspirina e seu mecanismo. (A) Via metabólica alvo da aspirina – produção do ácido araquidônico e Tromboxana A₂ e (B) Estrutura cristal do complexo cicloxigenase com o substrato, ácido araquidônico (rosa) e com o inibidor, aspirina (cinza) (Castro *et al.*, 2006).

A busca terapêutica por novas drogas que possuam efeitos colaterais mínimos ou ausentes ainda se faz necessária para o tratamento de processos patológicos de alta incidência, como a trombose arterial e o acidente vascular encefálico, que são responsáveis por mais de 30% de óbitos no Brasil (DATASUS, 2004). Com os relatos de resistência, como é nos casos da aspirina e do clopidogrel,

muitos estudos têm sido direcionados para o desenvolvimento de novos compostos como os derivados do sistema acilhidrazona, descritos na literatura como sendo inibidores da agregação plaquetária (Figura 8) (Fraga *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2003; Gladding *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2008).

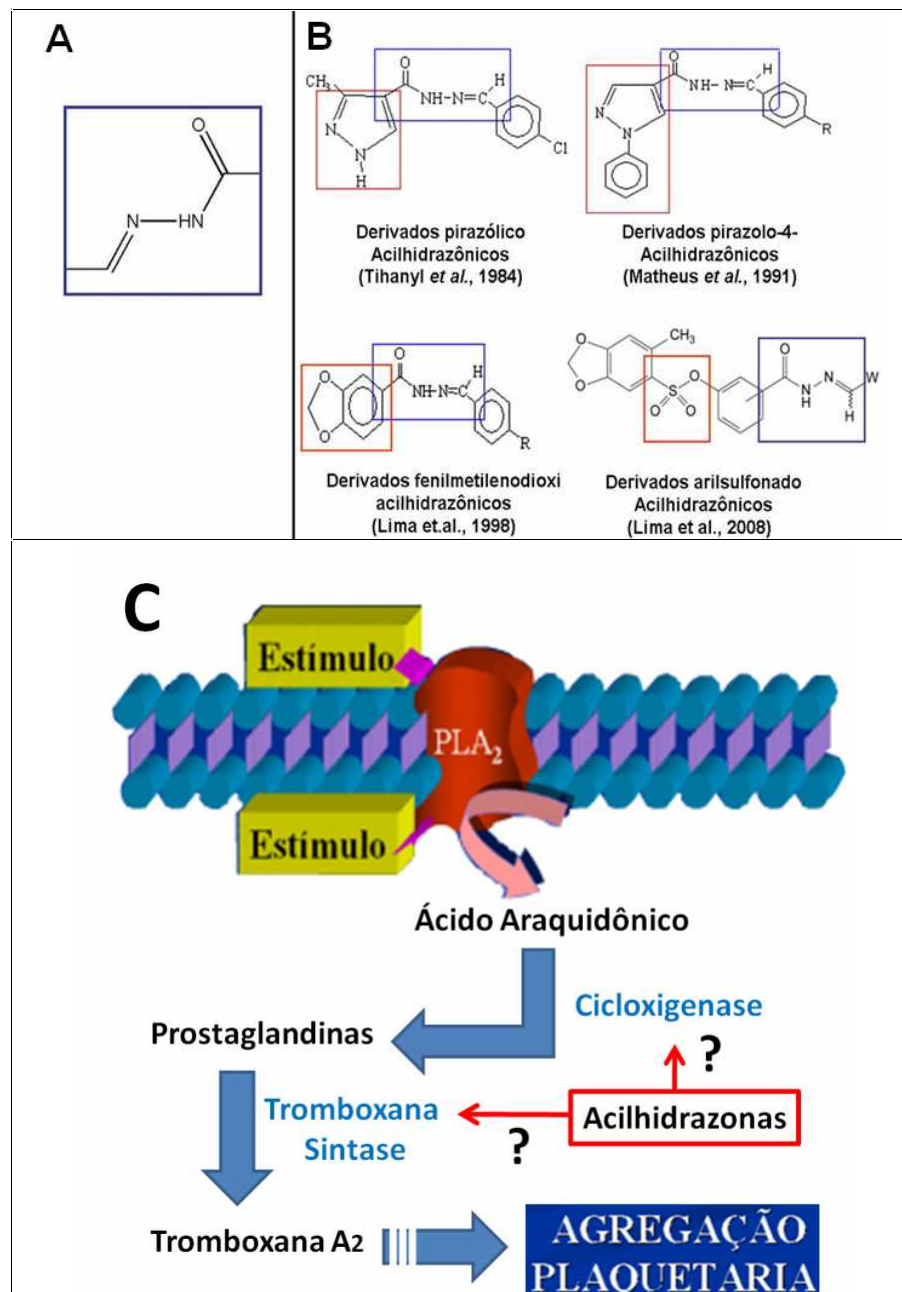


Figura 8: Sistema acilhidrazona. (A) Estrutura bidimensional do sistema acilhidrazona, (B) compostos derivados do sistema acilhidrazona (box azul) descritos na literatura que apresentam atividade anti-plaquetária com associações de outros sistemas (box vermelho) e (C) mecanismo de ação proposto para os derivados.

Esses compostos têm apresentado a capacidade de inibir a agregação induzida pelo colágeno e pelo ácido araquidônico, entretanto não apresentando atividade inibitória na agregação induzida pelo ADP quando testados em plaquetas de coelho. Esses resultados sugerem a ação desses compostos sobre a via de formação da tromboxana A_2 (Cunha *et al.*, 2003, Lima *et al.*, 2008).

De acordo com a literatura, o perfil da atividade biológica dos compostos acilhidrazônicos se deve a sua relativa acidez e capacidade de estabilizar os radicais livres, mimetizando certos ácidos graxos, como por exemplo, o ácido araquidônico e seus derivados (PGG_2 e PGH_2). Isso sugere que estes compostos podem estar agindo sobre a enzima ciclooxygenase-1 (COX-1) que converte ácido araquidônico em PGH_2 ou mesmo sobre a tromboxana A_2 sintase, que converte PGH_2 em Tromboxana A_2 (Figura 8) (Mahy *et al.*, 1994, Silva 2004).

Recentemente, onze compostos (**3a-3k**) foram sintetizados pelos grupos das professoras Dras. Luiza Dias e Maria Abadia Di Vaio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense contendo o sistema acilhidrazona (Figura 9).

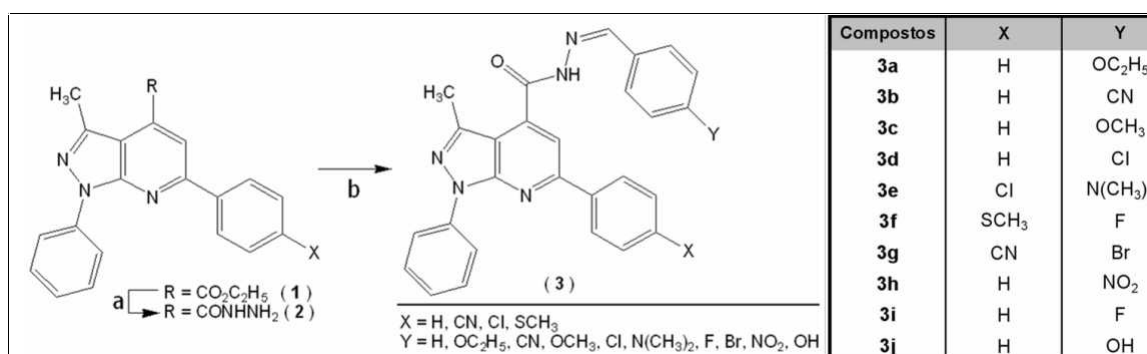


Figura 9: Estratégia de síntese dos compostos acilhidrazônicos (3a-3k).

Devido à possível potencialidade destas moléculas como futuros protótipos a agentes antiplaquetários, um estudo para identificação da atividade antiagregante

e da relação estrutura-atividade destes compostos seria de grande interesse para a comunidade científica em geral.

1.2.3.2. Origem animal: desintegrinas de veneno de serpente

As desintegrinas são um grupo de polipeptídeos (49-84 aminoácidos) não-enzimáticos de baixo peso molecular (5-9kDa) ricos em cisteínas (Calvete *et al.*, 2003). Algumas destas desintegrinas são oriundas de venenos de serpentes e podem apresentar diferentes propriedades estruturais e funcionais (McLane *et al.*, 2004). As desintegrinas de veneno de serpentes descritas na literatura apresentam seqüências com alta densidade de cisteínas sendo oriundas de precursores maiores, como as metaloproteases de veneno de serpente (SVMPs). As desintegrinas podem ser agrupadas em quatro classes (P-I – P-IV), de acordo com a presença de domínios específicos (Bjarnason *et al.*, 1994; Mclane *et al.*, 1998 Calvete *et al.*, 2003) (Figura 10).

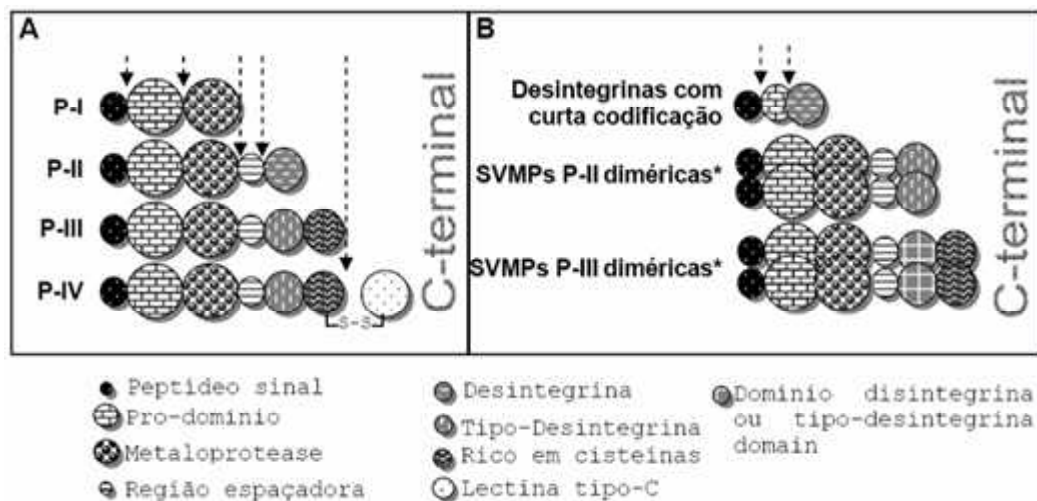


Figura 10: Esquema dos precursores de metaloproteases de veneno de serpentes (SVPMPs) e das desintegrinas. A) Classificação propondo uma origem comum para as metaloproteases e desintegrinas a partir de precursores de alta massa molecular. B) Precursores alternativos nos quais as setas pontilhadas indicam as regiões de processamento entre domínios (RAMOS, 2006).

Recentemente, algumas evidências têm mostrado que desintegrinas como a ecostatina, do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix contortrix*, e a piscivostatina, do veneno de *Agkistrodon piscivorus*, são codificadas por precursores sem o domínio das metaloproteases, o que levou a descoberta de desintegrinas com codificação curta (*i.e.* gabonina-1 e gabonina-2) (Francischetti *et al.*, 2004).

As desintegrinas podem ser classificadas levando em consideração a similaridade das seqüências, o padrão das ligações dissulfeto, relações evolutivas, número e tamanho das cadeias – monodiméricas (pequenas, médias ou grandes); ou diméricas (homo ou heterodiméricas). Existe ainda outra classe de desintegrinas que apresentam domínios do tipo desintegrina, e que são expressos em fusão com o domínio ricos em cisteínas de SVMPs de classe III (Tabela 1) (Calvete *et al.*, 2003).

Tabela 1: Características diferenciais das desintegrinas baseados na seqüência, padrão de ligações dissulfeto e relações evolucionárias (RAMOS, 2006).

Tipo	Cadeia	Classe	Resíduos	Pontes de dissulfeto	Distâncias evolucionárias*	Membros **
Desintegrina	Monomérica	Pequena	41-51	4	0.27	Echistatina, Eristostatina, Obtustatina, Ocellatusina
		Média	~ 70	6	0.14	Albolabrina, Barbourina, Elegantina, Flavoridina, Halisina, Kistrina, Salmosina 2, Triflavina
		Grande	~ 84	7	0.09	Bitistatina, Salmosina-3
	Dimérica	Homodimérica Heterodimérica	~ 67/cadeia	4 ic / 2 bc	0.41	CC8, Contortrostatina, EC3, EC6, EMF10, EO5, VB7, VLO4, VLO5
Tipo-desintegrina	Monomérica	-	~ 100	8	0.1	HR1A, Trimelisina-I, HF3, Botropasina, Jararagina, Catrocolastatina-C

ic: Pontes de dissulfeto intracadeia; bc: ponte de dissulfeto entre cadeias.

* Distância evolucionária mínima estimada pelo método de "neighbor joining" (calculadas a partir de CALVETE *et al.*, 2003). Unidades arbitrárias inferidas por relógio evolutivo.

** membros representativos

As desintegrinas já foram descritas promovendo diversos efeitos biológicos, incluindo a inibição da agregação plaquetária (McLane *et al.*, 2004). A interação destas proteínas com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, o receptor glicoproteico plaquetário, ocorre através de sua seqüência tri-peptídica contendo os aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico reconhecida como motivo RGD, que se liga a um domínio presente na integrina, bloqueando a via final da agregação plaquetária, e conseqüentemente, a formação do trombo branco (Chuang *et al.*, 2003).

A literatura descreve uma série de desintegrinas isoladas de venenos serpentes da família Viperidae, como por exemplo, a *Bothrops jararaca* (Cidade *et al.*, 2006). O grupo de pesquisa da professora Dr^a Russolina B. Zingali do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro isolou duas desintegrinas, a jarastatina (JAST) (7556 Da) e a jararacina (JARC) (7355 Da) do veneno de *B. jararaca*. Estas moléculas pertencem ao grupo PII e apresentam um alto grau de similaridade estrutural e funcional (Tabela 2).

Recentemente, em ensaios “*in vitro*” de agregação plaquetária utilizando sangue humano e ADP e trombina como agonistas revelaram um perfil inibitório diferenciado para JAST e JARC, apesar de seu alto grau de similaridade (Wermelinger *et al.*, 2007). Nesse estudo o grupo sintetizou seis peptídeos cíclicos baseados na seqüência primária da região RGD da JAST (P1–CRRARGDDMDDYC, P2–CRARGDDMDDC e P3–CARGDDMDC) e da JARC (P1’–CRRARGDNPDDRC, P2’–CRARGDNPDDC e P3’–CARGDNPDC), visto que esta região é indicada na literatura como responsável pela inibição da agregação plaquetária. A comparação dos resultados dos ensaios *in vitro* de agregação plaquetária usando ADP e trombina como agonistas mostraram a ausência de qualquer perfil inibitório frente à agregação induzida por ADP e um fraco perfil frente a agregação induzida por

trombina, em contraste com os resultados obtidos previamente com JARC e JAST (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação do perfil inibitório (IC_{50}) das desintegrinas JARC e JAST e dos peptídeos cíclicos da região RGD das desintegrinas sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e trombina (Wermelinger *et al.*, 2007).

Moléculas	Sequência	Número de aminoácidos	IC_{50} (nM)	
			ADP	Trombina
JAST	completa	71	281	99,5
JASTP ₁	CRRARGDDMDDYC	11	ND	66.000
JASTP ₂	CRARGDDMDDC	9	ND	ND
JASTP ₃	CARGDDMDC	7	ND	ND
JARC	completa	69	89,5	23,1
JARCP' ₁	CRRARGDNPDDRC	11	ND	ND
JARCP' ₂	CRARGDNPDDC	9	ND	65. 000
JARCP' ₃	CARGDNPDC	7	ND	57.000

ND = Não detectado até a concentração de 100 μ M.

Tendo em vista a diferença de potência do perfil biológico de JARC e JAST e que apenas a alça contendo o RGD (peptídeos cíclicos) não foi capaz de repetir o efeito inibitório das desintegrinas, uma análise da relação estrutura-atividade destas moléculas (desintegrinas e peptídeos) poderia permitir a identificação e compreensão do possível papel de outras regiões das desintegrinas de veneno de serpente na atividade biológica.

1.3. Modelagem molecular: ferramenta para o estudo da relação estrutura-atividade (SAR) de moléculas antiplaquetárias potenciais para o tratamento do AVC

As drogas antiplaquetárias têm emergido como agentes fundamentais para a prevenção de eventos isquêmicos recorrentes. Entretanto, embora tenha sido estabelecido que a aspirina sozinha, ou em associações com clopidogrel, seja a melhor escolha para o tratamento do AVC, este ainda não é o mais adequado tendo em vista os problemas que ainda existem com efeitos colaterais e resistências (Zimmermann *et al.*, 2008).

A obtenção de um novo fármaco envolve diversas etapas desde a identificação de um grupo de moléculas que apresentam um potencial de interação com um alvo, passando pela análise da atividade biológica destas moléculas em ensaios *in vitro*, testes pré-clínicos em animais de laboratório para verificação da eficácia, toxicidade e efeitos colaterais das moléculas em condições fisiológicas e finalmente aos testes clínicos em seres humanos em condições controladas para determinar a eficácia, toxicidade e efeitos colaterais no organismo humano. Assim, o processo se inicia com uma grande quantidade de moléculas, onde em cada fase, muitas delas são descartadas por não atender às especificações necessárias. Ao final, apenas algumas moléculas apresentarão um perfil adequado, e uma será eleita como candidato potencial a um novo fármaco (Figura 11) (Troullier *et al.*, 2002).

Neste processo de descoberta dos novos fármacos é gasto uma grande parte do suporte financeiro das indústrias farmacêuticas (~75%), sendo empregado na avaliação e no teste de substâncias que serão descartadas no decorrer do processo. Caso as indústrias possam eliminar grande parte destas substâncias nas etapas iniciais do processo, poderão aumentar o seu retorno comercial e

redirecionar o investimento em novas pesquisas. Neste sentido, a modelagem molecular se mostra promissora no atendimento desta demanda, por permitir a detecção precoce de moléculas com problemas e por orientar a pesquisa na direção de moléculas com maior potencial (Troullier *et al.*, 2002, Collins *et al.*, 2003; Hansch *et al.*, 2004; Meek *et al.*, 2006).



Figura 11: Processo de descoberta de novos fármacos (Modificado de Troullier *et al.*, 2002 e Abreu, 2008).

A modelagem molecular surgiu como um conjunto de ferramentas da bioinformática que investiga as estruturas e propriedades moleculares usando a química computacional e técnicas de visualização gráfica para fornecer uma representação tridimensional próxima da estrutura real (Sant'anna, 2002). O grande desenvolvimento da modelagem molecular se deve ao avanço nos recursos computacionais em termos de equipamentos, que aumentam a velocidade de cálculo

e a capacidade de armazenamento de dados, e de programas de química computacional, que tornou possível a obtenção de um número maior de informações com grande rapidez e acuidade, podendo então ser analisadas e utilizadas por áreas afins (Bajorath *et al.*, 1993, Meek *et al.*, 2006). Com avanços nessas duas áreas, reduziu-se significativamente o tempo computacional dos cálculos necessários para uma melhor análise e confiança dos resultados permitidos (Blundell *et al.*, 1987; Assumpção, 2006). Tendo em vista os benefícios para a saúde humana e os altos custos de tempo e dinheiro no processo da descoberta de novos fármacos, as novas técnicas de modelagem molecular têm sido desenvolvidas visando melhorar este processo (Cohen *et al.*, 1990; Ooms *et al.*, 2000; Abreu, 2008).

As técnicas de modelagem molecular utilizadas na descoberta de fármacos variam, dependendo da quantidade de informações estruturais disponíveis sobre o alvo terapêutico (enzima/receptor) e seus ligantes (agonistas/substrato, antagonistas/inibidores). Assim, podem ser utilizadas diversas estratégias de análise no processo do desenho de novos fármacos, incluindo: o desenho direto, também denominado de “Structure Based Drug Design” (SBDD) e o desenho indireto, ou “Ligand Based Drug Design” (LBDD) (Cohen *et al.*, 1990; Ooms, 2000; Chavatte *et al.*, 2006). O método indireto (LBDD) é utilizado quando a estrutura tridimensional do alvo é desconhecida, se analisando as informações sobre a estrutura dos compostos ativos e inativos. Isto pode ser útil para determinar características importantes (ex.: grupos hidrofóbicos, ligação hidrogênio e momento dipolo) para a atividade biológica observada nos ensaios experimentais. A partir destas informações, gera-se um modelo que pode ser utilizado para a seleção de compostos dentro de bancos de dados, ou ainda, orientar o processo de planejamento e síntese de novas entidades químicas (Veselovsky *et al.*, 2003; Jorgensen, 2004). Já o método direto (SBDD) é

utilizado quando a estrutura tridimensional (3D) do alvo é conhecida, na qual é analisado o complexo ligante-receptor. As estruturas-3D de macromoléculas podem ser obtidas experimentalmente; por cristalografia de raios-X, uma das técnicas mais empregadas, ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN), na qual a limitação está relacionada ao tamanho da proteína; ou teoricamente, por modelagem por homologia ou modelagem comparativa (Acharya *et al.*, 2005). Estruturas de complexos determinadas experimentalmente por co-cristalização ou obtidas teoricamente utilizando técnicas de docking têm sido os métodos mais utilizados para estudar o modo de interação ligante-receptor (Santos *et al.*, 2002, Kontoyianni *et al.*, 2004, Chavatte *et al.*, 2006).

1.3.1. *Ligand Based Drug Design*: Estudando o ligante

Na ausência de conhecimento específico do alvo, como análises bioquímicas, ou mesmo da estrutura tridimensional da molécula-alvo, torna-se mais restrito a busca sobre as descobertas de novos fármacos (Carvalho *et al.*, 2003). Porém, a análise específica dos compostos se torna de grande importância à medida que se têm dados experimentais de suas atividades para direcionar os estudos. Além disso, a disponibilidade de programas computacionais de química e bancos de dados em rede são ferramentas fundamentais para a simulação do comportamento de sistemas moleculares reais no planejamento de novos fármacos. Estes programas possibilitam a análise de propriedades físico-químicas de moléculas de interesse biológico. Com isso, os novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos pela análise da relação estrutura-atividade, onde os dados estruturais podem ser obtidos por técnicas de modelagem molecular, o que resulta em

parâmetros potencialmente indicadores do perfil de atividade biológica (Patrick, 2001; Carvalho *et al.*, 2003).

A análise da relação estrutura-atividade se inicia geralmente pelo estudo conformacional das moléculas, avaliando-se as possíveis conformações assumidas tendo em vista seus vários níveis de energia. Esta análise é realizada pela rotação das ligações simples, onde são alterados os ângulos de torção ou ângulos de diedro e calculados os correspondentes estados de energia para cada conformação (Leach *et al.*, 1996; Abreu, 2008). Desta forma, a análise conformacional é uma etapa primordial para analisar a estrutura de um ligante, pois as moléculas desenhadas, inicialmente, na forma tridimensional não estão na conformação mais estável, devido a possíveis distorções, como deformações de comprimentos de ligação, de ângulos de ligação e de ângulos de torção de seus valores de menor energia (*i.e.* mais estáveis) (Leach *et al.*, 1996; Souza, 2007). Uma técnica bastante utilizada é a análise conformacional sistemática, que consiste na varredura de todos os ângulos de rotação de uma única molécula simultaneamente. Este procedimento apresenta como limitação, o número de moléculas resultante da divisão de uma rotação completa (360°) por um valor pré-fixado, formando o número dos ângulos de rotações permitidas. Este resultado é potencializado pelo número de diedros a ser analisados. Assim, o número de conformeros a ser analisado equivale, então, segue a expressão $(360^\circ/\theta)^n$, onde θ é o incremento utilizado na varredura do ângulo de torção e n é o número de angulações permitidas, maior será a quantidade de conformações geradas, mas, na prática, apenas alguns conformeros são importantes. No caso de uma ligação simples entre carbonos, por exemplo, um incremento de pesquisa da energia conformacional de 60° é adequado, pois permite

que as conformações mais próximas dos mínimos e máximos da superfície de energia potencial sejam encontradas (Leach, 1996; Sant'anna, 2002; Souza, 2007).

Após a escolha do confôrmero mais estável, as propriedades estereoeletrônicas podem ser calculadas, usando a mecânica quântica que se baseia na equação de Schrödinger (Foresman *et al.*, 1993; Souza, 2007). Este tipo de cálculo tem um custo computacional elevado por descrever as propriedades das moléculas levando em conta a natureza ondulatória dos elétrons, sendo restrito a sistemas com menos de mil átomos (Sant'anna, 2002).

Os cálculos de mecânica quântica podem ser subdivididos em dois grupos: *ab initio* e semi-empírico. O método *ab initio* usa equações exatas, sem aproximações, que envolve a população eletrônica total da molécula, podendo ser aplicado apenas a moléculas relativamente pequenas e, por ser mais exato requer grande capacidade de memória e tempo de cálculo do computador. O método semi-empírico possui uma exatidão menor por usar vários graus de aproximação e envolve apenas os elétrons da camada de valência dos átomos da molécula (e.g. RM1 e AM1), porém é mais rápido e pode ser utilizado na otimização da geometria de moléculas que variam de 10 a 120 átomos (Sant'anna, 2002, Carvalho *et al.*, 2003; Patrick, 2001).

1.3.1.1. Análise *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos (ADMET)

Os processos de absorção, distribuição metabolismo e eliminação (ADME) de um fármaco são consideravelmente importantes e devem ser avaliados, pois podem interferir na eficiência da ação do respectivo composto. Com isso, para um fármaco ou candidato a fármaco conseguir a eficácia terapêutica, precisa ter uma

seletividade para interagir com o alvo biológico, potência considerável (Katzung, 2002).

Aproximadamente, 50% das razões que levam ao fracasso no desenvolvimento de um fármaco são associadas ao perfil farmacocinético e toxicológico. Assim, a determinação do perfil farmacocinético (ADME) junto com a toxicidade (ADMET) são parâmetros importantes na definição da biodisponibilidade e os efeitos tóxicos de uma molécula, auxiliando na redução do tempo e do custo do processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (Hansch *et al.*, 2004). De fato, a busca pela otimização da estrutura química de compostos em relação aos parâmetros ADMET é ainda um grande desafio (Figura 9) (Pajouhesh *et al.*, 2005).

Atualmente, estes estudos *in silico* dos parâmetros ADMET são realizados em etapas preliminares do processo de desenvolvimento de fármacos, com a intenção de economizar tempo e definir melhor os compostos a serem estudados. A melhoria destas propriedades por modificações moleculares de compostos promissores se apresenta de suma importância na seleção de candidatos a fármacos por possuir maior probabilidade de não serem descartados na fase clínica. A análise do potencial de um composto como fármaco também pode ser realizado por estudos de similaridade aos fármacos (*druglikeness*) e análise geral dos compostos comparados a bancos de dados (*drug-score*) (Souza, 2007).

O potencial de *druglikeness* de um composto está relacionado à semelhança com fármacos do mercado, sendo baseado em descritores topológicos, dados estruturais ou outras propriedades como cLogP (coeficiente de partição octanol/água calculado) e peso molecular. O programa Osiris (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html>) utiliza uma lista de 5300 fragmentos moleculares, onde a frequência de ocorrência de cada fragmento é determinada com

base em uma coleção de 3300 fármacos comerciais e 15000 compostos da coleção Fluka que não são fármacos comerciais. As análises demonstram que 80% dos fármacos comerciais têm um valor de *druglikeness* positivo, enquanto a maioria dos compostos Fluka apresenta valores negativos. O potencial de *drug-score* combina o potencial de *druglikeness*, cLogP, LogS (solubilidade em água), peso molecular e risco de toxicidade em um valor que é utilizado para inferir o potencial de um composto se tornar um fármaco.

1.3.1.2. Regra dos cinco de Lipinski: avaliação sobre a biodisponibilidade oral teórica

Levando em consideração os parâmetros de ADMET, uma boa biodisponibilidade oral também é um dos atributos mais almejados para um novo fármaco, pois viabiliza o uso de doses menores e menos freqüentes, proporcionando melhor adesão do paciente e diminuindo o custo/consumo do fármaco (Pereira, 2007). A predição da biodisponibilidade oral envolve uma série de fatores biológicos e físico-químicos como dissolução no trato gastrointestinal, permeação pelas membranas intestinais e metabolismo de primeira passagem intestinal e hepático. Atualmente, alguns programas computacionais têm sido criados para predizer a absorção intestinal, que é a primeira etapa para uma boa biodisponibilidade oral (Hou *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2007). Considerando estes fatores, Lipinski e colaboradores propuseram regras que avaliam teoricamente a biodisponibilidade oral das novas moléculas com potenciais terapêuticos. Esta predição é conhecida como “regra dos cinco de Lipinski” que tem como definição um conjunto de parâmetros capazes de identificar compostos com problemas de absorção e permeabilidade. Um banco de dados de aproximadamente 2500 fármacos comerciais oralmente ativos foi

usado para elaborar diretrizes gerais que pudessem ser utilizadas pelos químicos medicinais para estimar o potencial de permeabilidade e de solubilidade de um composto. De acordo com esta regra uma molécula apresenta boa absorção e permeabilidade quando segue pelo menos três de quatro características: possuir o número de grupos aceptores de ligação hidrogênio menor ou igual a 10, o número de grupos doadores de ligação hidrogênio menor ou igual a 5, peso molecular menor ou igual a 500 Da e Log P calculado menor ou igual a 5 (Lipinski *et al.*, 2001).

1.3.2. *Structure Based Drug Design*: estudando os ligantes e os alvos terapêuticos

A técnica de modelagem computacional conhecida como modelagem por homologia ou comparativa consiste em analisar similaridades estruturais entre proteínas, a partir da construção de um modelo tridimensional (3D), utilizando uma ou mais estruturas de proteínas experimentalmente determinadas e conhecidas. Assim, a escolha da proteína molde deve ser criteriosa, levando em consideração não só a similaridade das estruturas primárias da proteína bem como características funcionais importantes (Jiang, 2008). A relação de similaridade da estrutura primária e da conformação tridimensional foi quantificada por Chothia e Lesk, em 1986, por interpolação de valores de similaridade seqüencial e o desvio padrão da superposição das estruturas (Chothia e Lesk, 1986). Isso tornou o estudo de avaliação de seqüências importante para a determinação de estruturas teóricas de proteínas até hoje.

A modelagem de proteína comparativa é baseada em alguns padrões que podem observados, em nível molecular, no processo de evolução biológica: (a) a similaridade entre seqüências de aminoácidos que podem implicar em semelhança

estrutural e funcional (homologia); (b) a conservação de regiões internas constituídas de elementos de estrutura secundária (hélices- α e fitas- β) principalmente em proteínas homólogas; e (c) diferenças estruturais em regiões externas, constituídas principalmente por alças (“loops”), que ligam os elementos de estruturas secundárias (Santos Filho *et al.*, 2003).

O estudo de determinação de uma estrutura protéica 3D usando a técnica de modelagem por homologia consiste em cinco procedimentos principais incluindo, a) Identificação de estruturas cristais ou de RMN com similaridade com a estrutura primária da sua proteína alvo e/ou pertencente a mesma família; b) Escolha de um ou mais moldes, aqui denominados de “*templates*”, para a análise comparativa; c) Alinhamento entre o “*template*” e a seqüência primária da proteína a ser modelada; d) Construção do molde; e) Validação do modelo.

O reconhecimento molecular do ligante pelo sítio receptor está associado à sua estrutura que deve ser complementar ao sítio de ligação (Verli *et al.*, 2002). Este sítio de ligação está geralmente presente em uma molécula-alvo comumente uma enzima, ou receptor, que apresentam propriedades estéreo-químicas que interagem com moléculas específicas, como os agonistas e antagonistas, no caso de um receptor, ou substratos e inibidores no caso de uma enzima. Desta forma, os aminoácidos posicionados no sítio de ligação do receptor/enzimas interagem com a molécula-ligante através de átomos presentes nas cadeias laterais ou nas ligações peptídicas da cadeia principal iniciando uma mudança conformacional ou reação. Geralmente, as ligações entre o fármaco e a macromolécula-alvo ocorrem através de interações não-covalentes, como as ligações de hidrogênio, interações iônicas, dipolo-dipolo, hidrofóbicas e van der Waals (Gearien, 1989), dependendo dos

grupamentos /átomos e das distâncias entre as superfícies moleculares (Silverman, 1992; Santos, 2002).

As ligações covalentes são consideradas de alta energia exigem alto custo energético ao serem rompidas em processos não-enzimáticos, devido ao alto custo energético. Assim, os complexos ligante-receptor envolvendo ligações desta natureza raramente são desfeitos e levam a uma inibição enzimática irreversível ou inativação do sítio alvo (inibição suicida) (Santos, 2002; Katzung, 2002).

A ligação de hidrogênio é a interação mais importante nos sistemas biológicos, sendo, por exemplo, responsável pela formação da estrutura secundária em proteínas (α -hélice e folha β -pregueada) e nos ácidos nucleicos. A interação é formada entre um outro átomo eletronegativo (geralmente nitrogênio ou oxigênio) contendo um par de elétrons livre e um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a outro átomo eletronegativo (geralmente nitrogênio e oxigênio), sendo muito importante também para o encaixe do fármaco ou ligante no sítio da macromolécula-alvo (Santos, 2002).

Nas interações iônicas, os grupamentos com cargas opostas formam interações fortes com uma energia de interação maior do que as ligações hidrogênio e mais fracas que a ligação covalente (Murray *et al.*, 2006). Em pH fisiológico, as proteínas apresentam as cadeias laterais dos resíduos aminoácidos básicos (arginina e lisina) ou ácidos (ácido aspártico e glutâmico) protonadas (sítios catiônicos) ou desprotonadas (sítios aniônicos), respectivamente. Assim, os grupamentos dos ligantes e dos receptores/enzimas contendo cargas opostas são mutuamente atraídos por complementaridade de cargas (Santos, 2002).

As interações dipolo-dipolo são mais fracas do que as interações iônicas e envolvem as atrações entre dipolos opostos do ligante e do receptor/enzima. Esses

dipolos são produzidos pela distribuição assimétrica de elétrons em função da presença de ligações polares (Silverman, 1992). A ligação hidrogênio é um tipo especial de ligação dipolo-dipolo.

As interações hidrofóbicas ocorrem entre grupamentos apolares que tendem a se associar para minimizar as interações desfavoráveis energeticamente com moléculas polares, incluindo a água presente nos meios biológicos (Murray *et al.*, 2006). Este tipo de interação ocorre comumente entre os lipídios das membranas biológicas, assim como entre as cadeias hidrofóbicas presentes no ligante e no sítio receptor (Santos, 2002; Katzung, 2002). A literatura descreve este tipo de interação com sendo responsáveis por uma melhor estabilização das proteínas solúveis, e principalmente as transmembrânicas (Strub *et al.*, 2004; Kitazoe *et al.*, 2008).

As interações de Van der Waals são as de mais fraca energia e ocorrem em função da polarização transitória (dipolo instantâneo e dipolo induzido) de ligações de baixa polaridade ou apolares como ligações carbono-carbono e carbono-hidrogênio. Apesar de fracas, estas interações são de extrema importância para o reconhecimento molecular do ligante pelo sítio receptor (Silverman, 1992).

Ressalta-se que fármacos que interagem por ligações fracas são, por vezes, mais seletivos do que aqueles que interagem por ligações de alta energia. Isto ocorre porque as ligações fracas podem exigir um encaixe muito mais preciso do ligante no sítio receptor (Katzung, 2002). O estudo da interação ligante-proteína é de grande importância, visto que o seu entendimento possibilita a descoberta de fármacos com potência elevada, maior seletividade e menos efeitos adversos (Baskin *et al.*, 2003).

O *docking* é um método de ajuste ou ancoramento molecular que permite explorar o modo de interação dos compostos nos sítios de ligação, por ajuste

manual (*docking* manual), onde o composto é posicionado no sítio de interação de acordo com modelos comparativos de outros compostos análogos; ou por um ajuste automático (*docking* automático) no qual o composto é posicionado por programas que utilizam algoritmos de busca para achar as orientações mais estáveis (*i.e.* de menor energia) (Smith, 1996; Assumpção, 2006).

Assim, as ferramentas que envolvem a modelagem molecular podem ser extremamente úteis no estudo de moléculas de origem animal ou sintética com promissor potencial antiplaquetário para o desenvolvimento de moléculas mais ativas, visto que permitirão o entendimento da relação estrutura-atividade destas moléculas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho apresenta como objetivo principal a análise do perfil antiplaquetário de moléculas de origem animal (desintegrinas do veneno de *B. jararaca*) e sintética (compostos acilhidrazônicos) identificando uma possível relação estrutura atividade.

2.2. Objetivos Específicos

Na análise das moléculas de origem sintéticas (compostos acilhidrazônicos):

- Determinar o perfil da atividade de 11 compostos da série N'-benzilideno-carbohidrazida no ensaio de agregação plaquetária utilizando colágeno, ADP e ácido araquidônico como agonistas.

- Identificar a correlação entre a estrutura e o perfil de atividade inibitória sobre a agregação plaquetária induzida pelo colágeno dos compostos, através de análise conformacional, estrutural e eletrônica, utilizando a modelagem molecular.

- Avaliar o perfil das acilhidrazonas como potenciais fármacos, utilizando os parâmetros ADMET, comparando ainda com outros fármacos utilizados na terapêutica dos AVCs.

Na análise *in silico* de moléculas de origem animal (desintegrinas):

- Construir modelos teóricos das estruturas tridimensionais das desintegrinas jararacina (JARC) e jarastatina (JAST) e de peptídeos cíclicos da

região RGD, utilizando a técnica de modelagem comparativa, para auxiliar na investigação das características estruturais que determinam seu perfil de atividade biológica.

- Realizar o *docking* das desintegrinas e dos peptídeos cíclicos na estrutura cristal da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, para determinar os resíduos importantes na interação ligante-receptor.

- Comparar todos os complexos construídos para a identificação da possível participação de outras áreas presentes nas desintegrinas e ausentes na seqüência peptídica, na interação com o receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$.

3. Metodologia

3.1. Derivados acilhidrazônicos: análise *in vitro* e *in silico* do perfil antiplaquetário de moléculas de origem sintética

3.1.1. *In vitro*: Ensaios de agregação plaquetária

O sangue foi retirado da artéria central da orelha de coelho sendo adicionado a uma solução de citrato 3.8% (9: 1 v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado por centrifugação do sangue total em 1200 rpm por 15 minutos enquanto o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido com centrifugação do PRP a 7000 rpm por cinco minutos. No ensaio foram utilizados como agonistas o colágeno (5µg/mL), o ADP (5µM) e ácido araquidônico (100µM). Todos os reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EUA) e a agregação foi realizada em um agregômetro da Chrono-log Corporation (Haverton, PA, EUA) do Laboratório de Hemostase e Venenos do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os compostos (100µM) e dimetilsulfóxido (DMSO 0.5 % v/v), que foi utilizado como controle negativo, foram pré-incubados por 1 minuto com o PRP antes da adição do agonista. O protocolo executado neste trabalho foi aprovado pelo Núcleo de Animais de Laboratório da Universidade Federal Fluminense.

Os testes de agregação plaquetária foram realizados pelo menos três vezes em duplicata e os dados foram analisados estatisticamente utilizando one way Anova ($p < 0,05$) no programa Microcal Origin.

A determinação da concentração necessária para inibir 50% da agregação plaquetária foi realizada fazendo diluições seradas dos compostos em DMSO como descrito por (Cunha *et al.*, 2003).

3.1.2. *In silico*: Estudos de Modelagem molecular

3.1.2.1. Análise de relação estrutura-atividade (SAR)

A construção das estruturas tridimensionais dos 11 compostos derivados do sistema acilhidrazona (**3a-3k**) foi realizada utilizando o programa Spartan'06, no qual inicialmente o derivado hipotético não-substituído ($R_1=R_2=H$) foi construído e submetido à análise conformacional sistemática, usando o campo de força MMFF94, disponível no programa.

Para a construção dos outros derivados (**3a-3k**) foram realizadas as respectivas substituições na estrutura do confôrmero mais estável do derivado não substituído. As estruturas foram submetidas aos cálculos de otimização de geometria, realizados no vácuo e sem qualquer restrição geométrica, utilizando o método semi-empírico RM1 (Recife Model 1), uma reparametrização do método AM1 (Austin Model1). Depois, cada estrutura foi submetida a cálculos *ab initio* de ponto único (single point) utilizando o método Hartree-Fock com a base 3-61G** disponível no programa Spartan'06 (Souza, 2007).

Após o processo de otimização das energias das moléculas foram, então, calculados os descritores estéreo-eletrônicos incluindo energias dos orbitais de fronteira HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) e LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), coeficientes de distribuição dos orbitais HOMO e LUMO, densidade eletrônica e mapa de potencial eletrostático molecular. As superfícies

tridimensionais dos mapas de potencial eletrostático foram geradas na faixa de energia entre -30 e +30 kcal/mol e sobrepostos em uma superfície molecular de densidade de elétrons constante ($0,002e/ua^3$). Cada ponto do mapa expressou o valor da energia de interação eletrostática avaliada através de um átomo prova de carga unitária positiva fornecendo uma indicação do tamanho total e a forma das moléculas e da localização dos potenciais eletrostáticos atrativos (negativos) e repulsivos (positivos) (Silva *et al.*, 2008).

Além destes, outros descritores também foram calculados, como LogP (coeficiente de partição octanol/água), LogS (solubilidade em água), utilizando o programa Osiris Property Explorer disponível em <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>. A partir desses parâmetros foi construída uma matriz de correlação cruzada para identificar aqueles com maior correlação com a variação da resposta biológica como descritos por Romeiro *et al.* (2006).

3.1.2.2. Análise teórica dos parâmetros farmacocinéticos

As estruturas dos compostos acilhidrazônicos e dos fármacos utilizados para o tratamento e prevenção do AVC (aspirina, clopidogrel, epitifibatide, triflusal, cilostazol e tirofiban) foram submetidos à análise *in silico* dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) usando o programa Osiris Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html>). Nesta análise foram determinados o potencial de *druglikeness* e o *drug-score* que são relacionados a descritores topológicos, e outras propriedades como cLogP e massa molecular (Teckto, 2005). A avaliação *in silico* da toxicidade de moléculas

também incluiu a análise teórica de efeitos mutagênico, tumorigênico, irritante e sobre a reprodução como descrito por Abreu, 2008.

Finalmente, como os compostos foram planejados para serem administrados via oral e portanto devem ser capazes de ser absorvidos no trato gastrointestinal, eles foram avaliados de acordo com a “Regra dos Cinco” de Lipinski, que estabelece que pelo menos três de quatro requisitos devam ser apresentados para que o composto possua uma boa biodisponibilidade oral teórica. Assim, os compostos para serem absorvidos devem possuir peso molecular ≤ 500 daltons (Da), coeficiente de partição octanol/água calculado (cLogP) ≤ 5 , número de aceptores de ligação hidrogênio (nALH) ≤ 10 e número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) ≤ 5 (Lipinski, 2001).

3.2. Desintegrinas de veneno de *Bothrops jararaca*: análise *in silico* do perfil antiplaquetário de moléculas de origem animal

3.2.1. Alinhamento de seqüência e construção de modelos comparativos por homologia para as desintegrinas (JARC e JAST) e peptídeos cíclicos

As seqüências correspondentes às desintegrinas jarastatina (JAST) e jararacina (JARC) presente no veneno da serpente *Bothrops jararaca* foram obtidas do banco de seqüências do banco de dados de proteínas (PDB) pelos códigos Q0NZX5 e P31989, respectivamente.

Inicialmente, foi realizado um alinhamento com 12 desintegrinas de veneno de serpentes incluindo, insularina (*Bothrops insularis*, gi: 52426579), salmosina (*Gloydius halys*, gi: 4106003), flavostatina (*Trimeresurus flavoviridis*, gi: 14595995),

trismetatina (*T. flavoviridis*, gi: 37926519), botrostatina (*Bothrops jararaca*, gi: 13194760), halisina (*Gloydius blomhoffi*, gi: 118651), saxatilina (*G. halys*, gi: 9945028), albolabrina (*Cryptelytrops albolabris*, gi: 67462322), rodostomina (*Calloselasma rhodostoma*, gi: 605649), kistrina (*C. rhodostoma*, gi: 159162730), além da jararacina e jarastatina usando o programa Clustal-W (Thompson, 1994). Para determinação dos templates foi utilizado o programa on-line *protein Blast* disponível no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, usando o algoritmo Blosum62 presente no programa *BlastP* (Altschul *et al.*, 1997), que busca por regiões conservadas contendo similaridade entre as seqüências de bancos de dados de proteínas (Protein Data Bank – PDB) e as seqüências das desintegrinas. A partir desta avaliação, foram selecionadas as estruturas das desintegrinas salmosina (PDB=1L3X) e trimestatina (PDB=1J2L), devido ao alto grau de similaridade apresentado às seqüências alvos (85–90%). Para a análise do ponto isolétrico das desintegrinas foi utilizado o programa ExPasy-ProtParam, disponível no site: <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>.

A construção dos modelos das estruturas 3D de JARC e JAST foi feita utilizando-se o servidor Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), que usa o programa ProModII para a construção da estrutura protéica e para o campo de força Gromos96 o programa Deep View / Swiss-PDB Viewer 3.7 (Guex *et al.*, 1997). Estes modelos usaram como moldes as estruturas de cristalografia de raio-X da trimestatina, disponível no PDB sob o código 1J2L; e a estrutura resolvida por ressonância magnética nuclear da salmosina, disponível sob o código 1L3X.

Por fim, os modelos construídos foram submetidos a etapas sucessivas de otimização da geometria usando o campo de força Gromos96, disponível no programa Deep View / Swiss-PDB Viewer 3.7, com o objetivo de minimizar contatos

desfavoráveis entre os resíduos, e em seguida os modelos JAST e JARC foram validados pela análise do gráfico de Ramachandran e pela análise do score 3D-1D, usando os programas Procheck e Verify-3D respectivamente, ambos disponíveis no servidor Parmodel (http://laboheme.df.ibilce.unesp.br/cluster/parmodel_mpi). Os dois modelos gerados foram depositados no Protein Data Bank (PDB) com o código de acesso no PDB 2IIX para JARC e 2INH para JAST.

Os peptídeos cíclicos sintéticos referentes à região RGD das desintegrinas JARC e JAST foram construídos utilizando as regiões RGD dos modelos de JAST (JT1–CRRARGDDMDDYC, JT2–CRARGDDMDDC e JT3–CARGDDMDC) e de JARC (JC1–CRRARGDNPDDRC, JC2–CRARGDNPDDC e JC3–CARGDNPDC) e promovendo a interação das cisteínas pelas pontes dissulfeto.

3.2.2. Construção do modelo dos complexos desintegrinas e peptídeos cíclicos com a estrutura cristal da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ humana

Os complexos das desintegrinas JARC, JAST e dos peptídeos cíclicos (JC1-3, JT1-3) com a estrutura cristal do receptor integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ foram construídos usando técnicas de alinhamento estrutural e a estrutura cristalográfica da integrina ligada ao tripeptídeo RGD (1TY6.pdb) como template o programa Deep View / Swiss-PDB Viewer 3.7 (Guex *et al.*, 1997).

Após o *docking* manual seguindo o alinhamento estrutural o tripeptídeo foi retirado, sendo os complexos otimizados utilizando etapas sucessivas de otimização da geometria usando o campo de força Gromos96, disponível no programa Deep View / Swiss-PDB Viewer 3.7. Esse processo tem o objetivo de minimizar contatos desfavoráveis entre os resíduos e validar os modelos criados.

A análise das interações entre os ligantes e as subunidades do receptor foi realizada usando os programas Deep View / Swiss-PDB Viewer 3.7 e os programas Ligand-Protein Contacts – LPC (<http://bip.weizmann.ac.il/oqa-bin/lpccsu>), este último capaz de analisar automaticamente os resíduos em contato e os tipos de interação (Sobolev *et al.*, 1999).

4. Resultados

4.1. Derivados acilhidrazônicos: análise *in vitro* e *in silico* do perfil antiplaquetário de moléculas de origem sintética

4.1.1. Estudos *in vitro*

Os resultados iniciais com os derivados acilhidrazônicos (**3a-3k**) a uma concentração de 100 μ M frente à agregação plaquetária induzida pelo colágeno (5 μ g/mL) em plasma rico em plaquetas de coelho revelaram que todos os compostos apresentam algum nível de atividade inibitória. Entretanto os compostos **3a** ($R_1=H$, $R_2=OH$), **3b** ($R_1=H$, $R_2=CN$), **3c** ($R=H$), **3f** ($R_1=H$, $R_2=F$) e **3h** ($R_1=H$, $R_2=NO_2$) apresentaram o perfil inibitório mais significativo (>50%) (Figura 12).

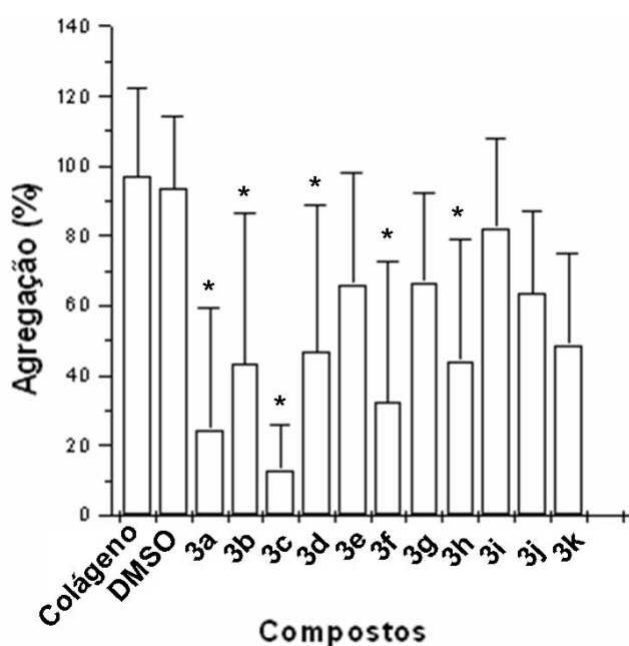


Figura 12: Efeito dos compostos acilhidrazônicos (3a-3k) (100 μ M) sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno (*= $p<0,05$).

Tendo em vista que os compostos **3a** e **3c** apresentaram a maior atividade inibitória, determinamos a concentração necessária desses derivados para promover a inibição de 50% da agregação plaquetária (IC_{50}). De forma promissora, os compostos **3a** e **3c** mostraram concentrações inibitórias (**3a** IC_{50} = 61 μ M e **3c** IC_{50} = 68 μ M) (Tabela 3) aproximadamente cinco vezes melhores do que a inibição promovida pela aspirina, um reconhecido inibidor da agregação plaquetária (IC_{50} = 300 μ M) (não mostrado).

Após os ensaios com o colágeno, os compostos foram testados frente à agregação plaquetária induzida pelo ADP (5 μ M) (Figura 13), visto que em coelhos a via de ativação plaquetária deste agonista não interfere na via induzida pelo colágeno. Os resultados mostraram que os compostos testados não são capazes de promover uma inibição significativa nas plaquetas de coelhos usando ADP como agonista plaquetário.

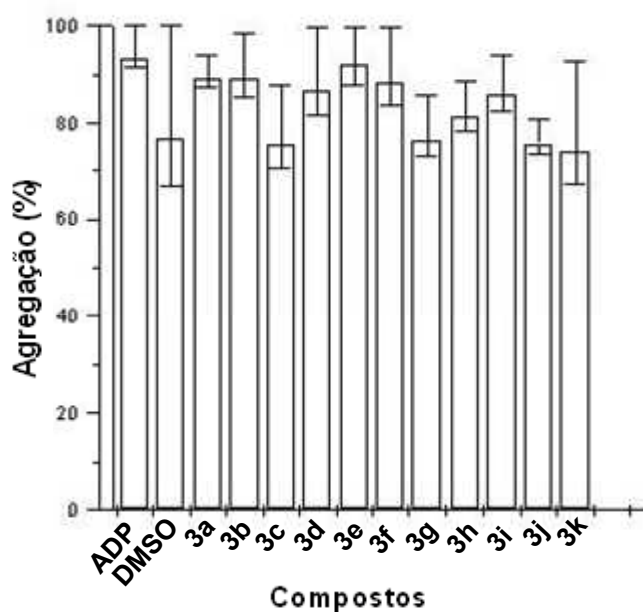


Figura 13: Efeito dos compostos acilhidrazônicos (3a-3k) (100 μ M) sobre a agregação plaquetária induzida por ADP ($p < 0,05$).

Para observar se os compostos **3a**, **3c** e **3f** agiriam pela via do ácido araquidônico que também é estimulada pelo colágeno, utilizamos o ácido araquidônico (100 μ M) como agonista nos ensaios de agregação plaquetária (Figura 14).

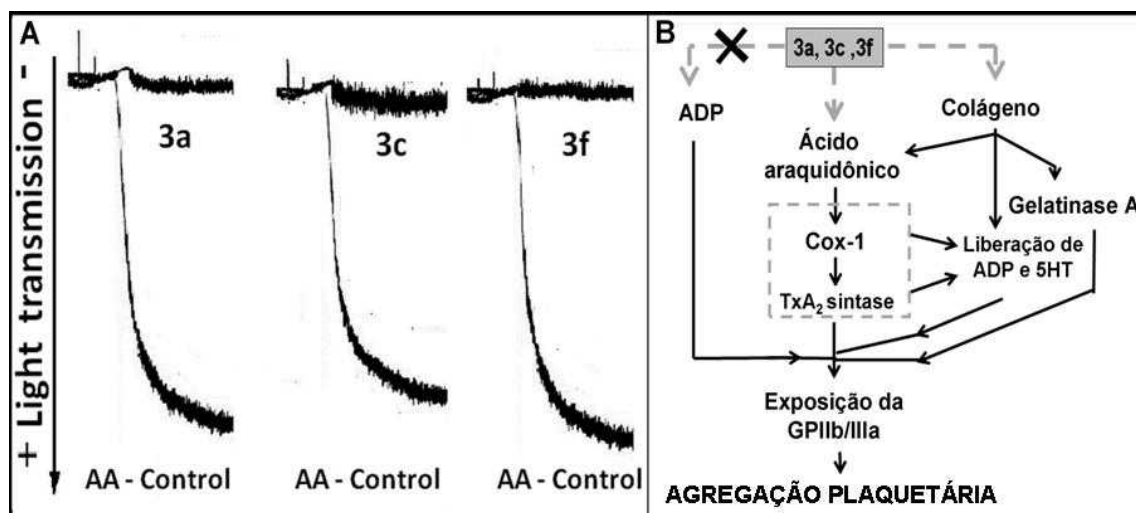


Figura 14: Efeito e possível mecanismo dos compostos acilhidrazônicos mais ativos. (A) Traços representativos da agregação plaquetária em coelhos induzido por ácido araquidônico (AA-control) e o efeito inibitório dos compostos mais ativos (3a, 3c e 3f) (100 μ M) e (B) via metabólica afetada por estes derivados e os possíveis alvos na via do ácido araquidônico (Ciclooxigenase I - Cox-1 e Tromboxana A2 sintase).

Os resultados mostraram que estes compostos apresentam uma atividade inibitória significativa com uma inibição total (100%) da agregação plaquetária induzida por ácido araquidônico.

4.1.2. Estudos *in silico*

4.1.2.1. Análise da relação estrutura-atividade (SAR)

Tendo em vista os resultados promissores de alguns derivados da série acilhidrazônicas, realizamos então, um estudo da relação estrutura-atividade (SAR) *in*

silico, calculando-se inicialmente uma série de descritores eletrônicos e estruturais, incluindo a energia de HOMO (E_{HOMO}), a energia de LUMO (E_{LUMO}), a área de superfície polar (PSA), o volume molecular, a área molecular, o peso molecular (MM), o número de grupamentos aceptores/doadores de ligações de hidrogênio (nHBA, nHBD), momento dipolo, lipofilicidade (cLogP) e solubilidade (LogS) (Tabela 3).

A análise destes descritores moleculares revelou características importantes nestes derivados que podem estar relacionadas com a atividade inibitória observada nos ensaios *in vitro* de agregação plaquetária induzida pelo colágeno (50%). Uma análise geral das propriedades eletrônicas como a energia de HOMO/LUMO e da área de superfície polar (PSA) da série **3a-3k** mostrou que os valores variam de forma significativa, mas com baixa ou nenhuma correlação direta com a atividade inibitória da agregação plaquetária induzida por colágeno (Tabela 3).

De todos os descritores estruturais avaliados dos compostos da série, aparentemente somente as características estéricas parecem estar diretamente relacionadas ao perfil antiplaquetário observado (Tabela 3). Em concordância com essa análise, à matriz de correlação cruzada que inclui todos os descritores calculados (eletrônicos e estruturais) e os resultados biológicos, observa-se que os descritores estruturais apresentaram maior correlação com a atividade biológica observada do que os eletrônicos, sendo o volume ($R=-0,747$), área ($R=-0,746$), o peso molecular ($R=-0,647$) e a lipofilicidade ($R=-0,718$) os mais correlatos. Estas características apresentaram um coeficiente de correlação inversa à atividade inibitória desses compostos, significando que altos valores destas características são deletérias para a atividade biológicas (Tabela 4) (Romeiro *et al.*, 2006).

Tabela 3: Comparação dos efeitos inibitórios e os descritores estero-eletrônicos dos derivados acilhidrazônicos (3a-3k).

#	R1	R2	Inibição(%)		Energia		Volume	Área	Ligação de Hidrogênio		cLogP	LogS	μ	Peso Molecular	PSA
			Colágeno	ADP	HOMO	LUMO			Aceptores	Doadores					
3a	H	OH	71,4*	13,3	-7,95	1,72	485,78	506,43	7	1	5,24	-6,86	5,01	447,50	70,17
3b	H	CN	50,3	10,8	-8,07	1,43	468,46	487,90	7	1	4,72	-7,93	4,43	456,50	65,94
3c	H	H	86,4*	10,9	-7,91	1,78	476,12	496,79	7	1	4,8	-7,15	5,80	431,50	50,67
3d	H	OCH ₃	43,3	24,4	-8,01	1,61	458,63	477,34	6	1	5,52	-7,17	5,42	561,52	57,46
3e	H	Cl	24,3	13,2	-7,67	1,65	551,92	533,24	7	1	5,52	-7,89	4,93	449,49	50,63
3f	H	F	62,9	8,1	-8,00	1,65	490,47	512,28	6	1	5,46	-7,47	4,64	449,48	50,62
3g	H	OCH ₂ CH ₃	24,1	11,5	-8,23	1,13	486,79	508,31	6	1	5,42	-7,47	5,62	475,55	57,01
3h	H	NO ₂	52,4	23,4	-8,10	1,03	470,84	493,15	9	1	4,78	-7,61	4,51	476,49	89,61
3i	Cl	N(CH ₃) ₂	9,6	18,7	-7,97	1,68	453,75	472,76	6	1	4,97	-7,92	6,45	509,01	51,86
3j	CN	Br	30,7	14,2	-7,92	1,76	456,13	475,83	7	2	4,61	-8,76	6,04	535,40	65,99
3k	SCH ₃	F	46,7	24,3	-7,94	1,73	449,07	467,03	6	1	4,91	-8,32	4,46	495,58	50,64

* IC₅₀ **3a** = 61 μ M e **3c** = 68 μ M

Tabela 4: Matriz de correlação cruzada da atividade inibitória dos compostos na agregação plaquetária induzida por colágeno (colágeno) e os descritores calculados (energia de HOMO/LUMO (E_{HOMO} , E_{LUMO} - eV), Momento dipolo (μ), volume e área molecular, área de superfície polar (PSA), peso molecular (Peso), lipofilicidade (cLogP) e solubilidade (LogS)).

	Colágeno	E(HOMO)	E(LUMO)	PSA	Dipolo	Volume	cLogP	Peso	LogS	Área
Colágeno	1									
E(HOMO)	-0,091	1								
E(LUMO)	0,119	0,759	1							
PSA	0,149	-0,536	-0,762	1						
Dipolo	-0,383	0,255	0,153	-0,291	1					
Volume	-0,747	0,167	-0,145	-0,062	0,472	1				
cLogP	-0,718	0,091	0,069	-0,518	0,402	0,546	1			
Peso	-0,647	-0,339	-0,489	0,123	0,413	0,810	0,602	1		
LogS	0,548	0,536	0,515	0,053	-0,076	-0,489	-0,688	-0,787	1	
Área	-0,746	0,149	-0,164	-0,036	0,453	0,999	0,538	0,815	-0,486	1

Como a complementaridade estereo-eletrônica é essencial para as interações do ligante ao alvo, foi realizada uma análise conformacional das propriedades estruturais e do mapa de potencial eletrostático com a intenção de observar as características que podem estar relacionadas à atividade inibitória. Na análise conformacional de propriedades estruturais, os compostos mais ativos (**3a**, **3c** e **3f**) não apresentam substituintes na posição R_1 do anel aromático A (Tabela 3 e Figura 15). Embora na posição R_2 , apenas o composto **3c**, o mais ativo, não apresenta substituinte no anel aromático C (**3c**, $R_2=H$), os derivados **3a** e **3f** apresentam grupos substituintes na posição R_2 carregados negativamente (-OH, e -F, respectivamente). A adição destes grupos ainda foi deletério para a atividade inibitória, comparado ao composto mais ativo **3c** (Tabela 3 e Figura 15). Observando os compostos que apresentaram uma menor atividade biológica, nota-se a presença de substituintes maiores, como por exemplo, os compostos **3g** ($R_1=H$, $R_2=OCH_2CH_3$) e **3i** ($R_1=Cl$, $R_2=N(CH_3)_2$) (Tabela 3 e Figura 15).

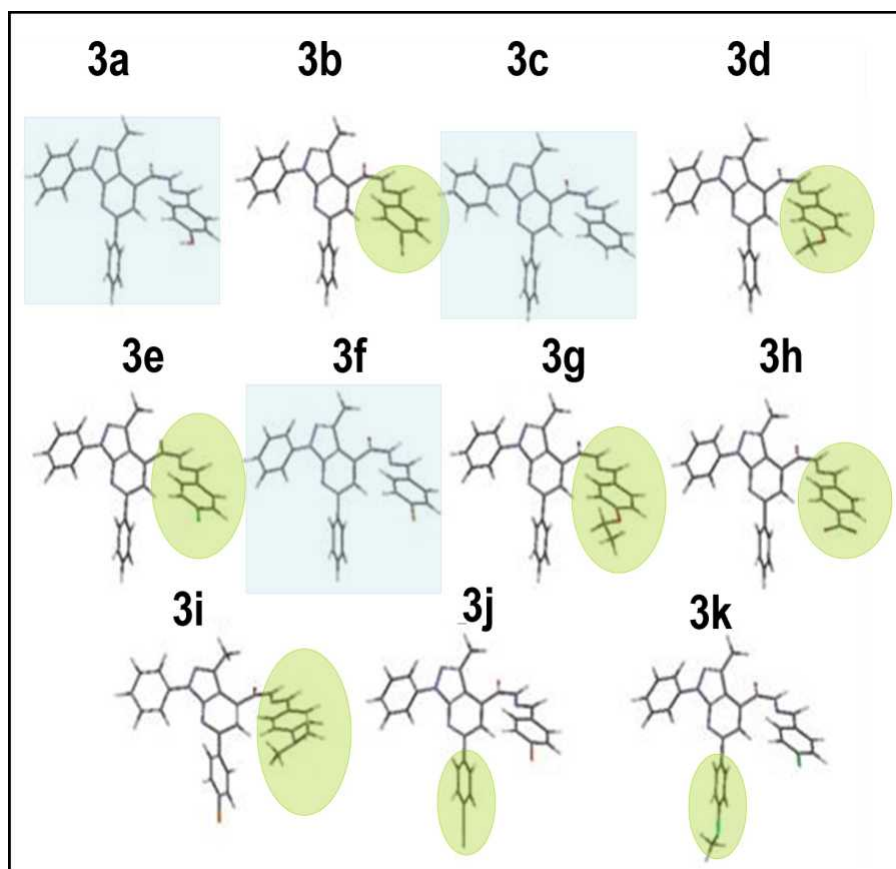


Figura 15: Estruturas 3D dos compostos (3a-3k). Comparação das conformações das estruturas mais estáveis. Os quadrados azuis marcam os compostos mais ativos e o círculo verde, os substituintes volumosos nos derivados menos ativos.

A análise do mapa de potencial eletrostático mostrou um perfil similar com um potencial negativo no anel fenólico B para todos os compostos (Figura 16). Entretanto, é interessante observar uma maior carga eletronegativa presente no anel aromático C no composto mais ativo (**3c**), e que reduz gradualmente com a perda da atividade inibitória nos outros derivados, com exceção de **3d** ($R_1=H$, $R_2=OCH_3$), **3g** ($R_1=Cl$, $R_2=N(CH_3)_2$) e **3i** ($R_1=Cl$, $R_2=N(CH_3)_2$) (Figura 16).

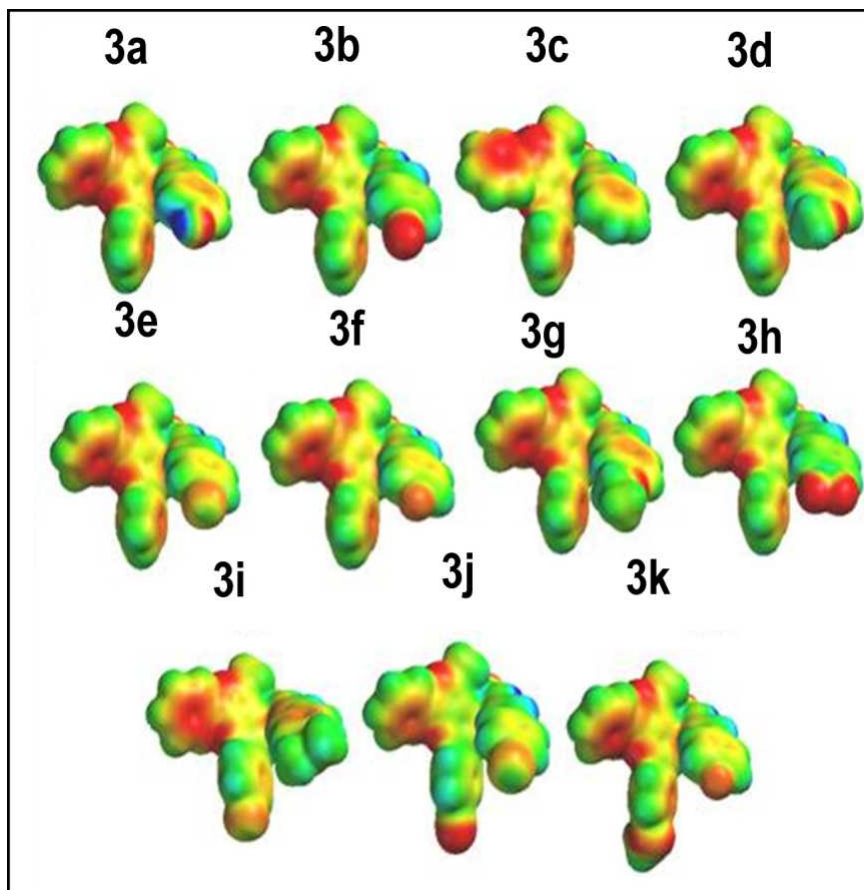


Figura 16: Comparação dos mapas de potenciais eletrostáticos dos compostos (3a-3k). Vermelho: as regiões mais eletronegativas, azul: as regiões mais eletropositivas.

4.1.2.2. Análise teórica dos parâmetros farmacocinéticos (ADMET)

Os derivados acilhidrazônicos mais ativos (**3a**, **3c** e **3f**) foram submetidos a uma análise *in silico* utilizando o programa Osiris Property Explorer com a intenção de avaliar o seu potencial teórico como possíveis candidatos a novos fármacos. A comparação com alguns fármacos já utilizados na terapêutica contra os acidentes vasculares cerebrais, como a aspirina, o clopidogrel, o epitifibatide e o tirofiban também foi realizada neste estudo. Para isso, determinamos os valores de cLogP, que representa a lipofilicidade do composto; o risco de toxidez teórica relacionado à efeitos irritante, mutagênico, tumorigênico e efeitos sobre o sistema reprodutivo;

além dos parâmetros de *druglikeness* e o *drug-score*. O valor de *druglikeness* avalia a índice de fragmentos comuns a fármacos comerciais enquanto o *drug-score* combina uma série de descritores incluindo o *druglikeness*, a lipofilicidade (clogP), solubilidade (LogS), a massa molecular e o risco de toxidez em um valor que pode inferir teoricamente o potencial de um composto se tornar um futuro fármaco.

Inicialmente, foi avaliado o parâmetro teórico de biodisponibilidade oral utilizando para isso a regra dos cinco de Lipinski que indica se estes compostos químicos podem ser drogas ativas em humanos pela via de administração oral (Lipinski *et al.*, 2001). Os resultados mostraram que todos os compostos da série (**3a-3k**) seguiram a regra de Lipinski, que determina que o composto deva possuir pelo menos três de quatro requisitos, como descrito na seção de Metodologia desta dissertação (nHBD 5, nHBA 10, MM 500 e cLogP 5) (Tabela 5).

Tabela 5 : Análise teórica das propriedades físico-químicas das acilhidrazonas (3a-3k) envolvidas na biodisponibilidade oral para fármacos, seguindo a regra dos cinco de Lipinski.

Compostos	HBA	HBD	Peso	cLogP
3a	7	2	447,50	4,61
3b	7	1	456,50	4,70
3c	6	1	431,50	4,91
3d	7	1	461,52	4,8
3e	6	1	449,49	5,52
3f	6	1	449,48	4,97
3g	7	1	475,55	5,24
3h	9	1	476,49	4,78
3i	7	1	509,01	5,52
3j	6	1	535,40	5,42
3k	6	1	495,58	5,46

De acordo com a análise teórica, a lipofilicidade teórica (clog P) dos derivados mais ativos (4,61-4,97) mostrou um perfil hidrofóbico suficiente para

penetração das barreiras biológicas. A análise de doadores (nHBD) e aceptores (nHBA) de ligação de hidrogênio mostrou que os derivados acilhidrazônicos apresentam uma variação de nHBA=6-9 e nHBD=1-2 e enquanto a massa molecular se manteve menor do que 500 (431,50-476,49) como exigido pela regra dos cinco (Tabela 5).

Os compostos os mais ativos **3a**, **3c** e **3f** apresentaram os melhores perfis de *drug-likeness* e *drug-score* do que os fármacos utilizados atualmente na terapêutica de AVC (Figura 17).

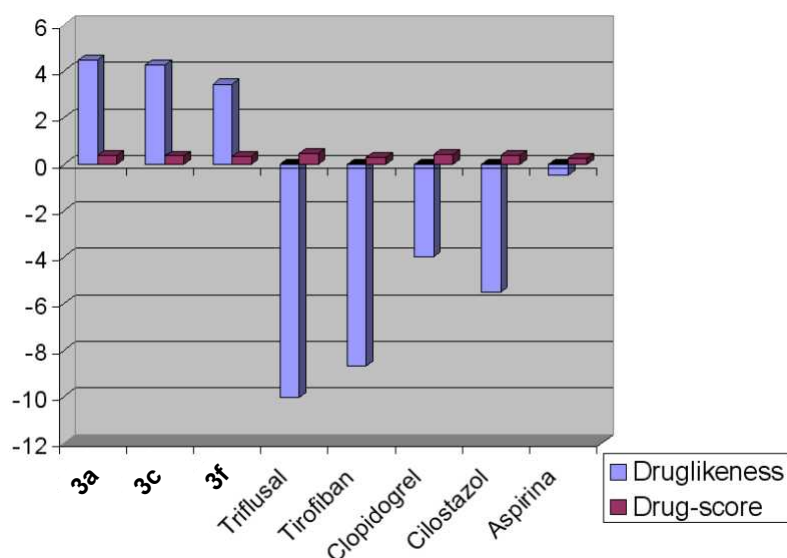


Figura 17: Comparação dos valores de druglikeness e drug-score dos compostos acilhidrazônicos mais potentes (3a, 3c e 3f) e de alguns fármacos utilizados na terapêutica do AVC.

A avaliação da toxicidade no Osiris revelou ainda que teoricamente a maioria dos compostos acilhidrazônicos apresentam grupamentos com baixo risco para efeitos irritante, tumorigênico, mutagênico ou reprodutivo (Figura 18).

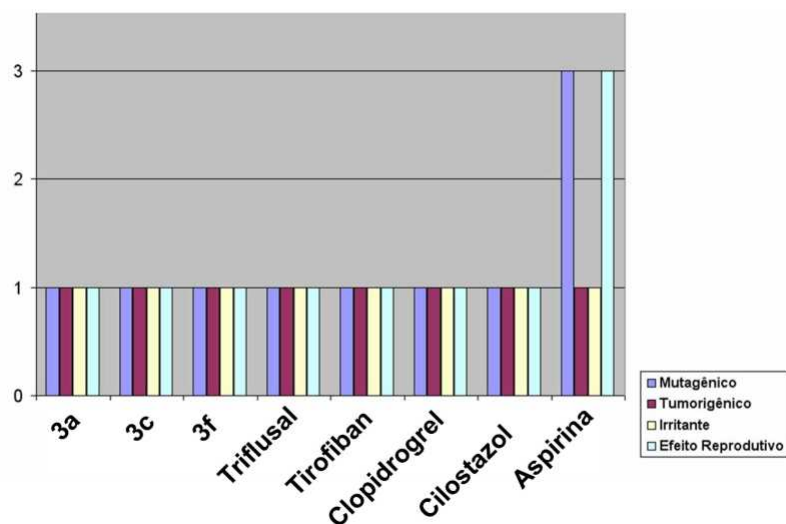


Figura 18: Risco de toxicidade calculado utilizando o programa Osiris Property Explorer para os compostos acilhidrazônicos mais potentes (3a, 3c e 3f) e de alguns fármacos utilizados na terapêutica do AVC.

4.2. Desintegrinas de veneno de Bothrops jararaca: análise *in silico* do perfil antiplaquetário de moléculas de origem animal

4.2.1. Estudo estrutural e construção dos modelos por homologia das desintegrinas (JARC, JAST) e dos peptídeos cíclicos derivados

Na procura por seqüências similares a da jarastatina (JAST) e a jararacina (JARC), utilizando o programa *BlastP* foram identificadas 100 moléculas dentre proteínas e peptídeos que possuem o *score* (identidade) mínimo de 90,1%. Dentre estas, apenas nove possuíam suas estruturas tridimensionais determinadas experimentalmente, por meio da cristalografia de raios-x ou ressonância magnética nuclear.

Para comparação da estrutura primária das desintegrinas JARC e JAST foi realizado um alinhamento múltiplo utilizando dez destas seqüências de desintegrinas incluindo, insularina, salmosina, flavostatina, albolabrina, rodostomina, saxatilina, kistrina, halisina, trimestatina e botrostatina, além da JAST e da JARC que apresentaram um alto valor de *score* usando o programa Clustal-W (Figura 19). Destas seqüências apenas a flavostatina, salmosina e trimestatina tiveram a suas estruturas tridimensionais elucidadas experimentalmente por RMN ou cristalografia de raios-X (Figura 19).

O alinhamento das seqüências primárias das desintegrinas de veneno de serpente revelou uma alta similaridade (61-97%) e a conservação dos doze resíduos de cisteínas que formam as seis ligações dissulfeto (Cys₆-Cys₁₅, Cys₈-Cys₁₆, Cys₂₁-Cys₃₅, Cys₂₉-Cys₅₉, Cys₃₄-Cys₃₈ e Cys₄₇-Cys₆₆) (Figura 19). Entre as doze desintegrinas selecionadas para a construção do alinhamento foram observados trinta e nove aminoácidos idênticos e pareados na mesma posição no alinhamento primário. A estrutura secundária predita no programa Swiss Model revela a presença apenas de estruturas folhas β -pregueada conservadas entre JARC e JAST. Interessante observar que a seqüência da jararacina apresenta apenas duas folhas β -pregueadas localizadas na região da alça do motivo RGD.

Comparando as estruturas primárias da JARC (69aa) e da JAST (71aa), observamos apenas doze aminoácidos distintos (Lys39Met, Gly40Lys, Ala41Glu, Lys43Thr, Ile44Val, Asn52Asp, Pro53Met, Arg56Tyr, Thr58Gln, Gln60Ile, Asp63Gly e Arg68Pro) (Figura 19). De forma interessante, a JARC apresenta nove aminoácidos ácidos e doze aminoácidos básicos, enquanto a JAST possui onze aminoácidos ácidos e nove aminoácidos básicos.

	1	10	20	30	40	50	60	70	
JAST	--GEECD	CGT	PGNPCCDAATCKLRP	GAQCAEGLCCDQCRFMKEGTVCRRARGD	DMDDY	CNGI	SAGCPRNPFHA	71	
BOTH	GAGEECD	CGT	PGNPCCDAVTCKLRP	GAQCAEGLCCDQCRFMKEGTVCRRARGD	DMDDY	CN-I	SAGCPRNPFHA	72	
HALY	EAGEECD	CGSPGNPCCDAATCKLRQ	GAQCAEGLCCDQCRFMKKGTVCRI	ARGD	DMDDY	CNGI	SAGCPRNPF--	71	
SAXA	EAGEECD	CGAPANPCCDAATCKLRP	GAQCAEGLCCDQCRFMKEGTICRM	ARGD	DMDDY	CNGI	SAGCPRNPFHA	73	
SALM	EAGEECD	CGSPGNPCCDAATCKLRQ	GAQCAEGLCCDQCRFMKEGTICRR	ARGD	DLDDY	CNGI	SAGCPRNPFHA	73	
ALBO	EAGEDCD	CGSPANPCCDAATCKLRP	GAQCGEGLCCDQCRFMKKGTVCRI	ARGD	DLDDY	CNGI	SAGCPRNPLHA	73	
JARC	----	ECDCGTPGNPCCDAATCKLRP	GAQCAEGLCCDQCRFKGAGKICRR	ARGD	NPDDR	CTGQ	SADCPRNRFHA	69	
INSU	EAGEECD	CGAPENPCCDAATCKLRP	RAQCAEGLCCDQCRFKGAGKICRR	ARGD	NPDDR	CTGQ	SADCPRNRFHA	73	
RHOD	-MGKECD	CSSPENPCCDAATCKLRP	GAQCGEGLCCEQCKFSRAGKICRI	PRGDM	PDDR	CTGQ	SADCPRYHRR-	70	
KIST	EAGKECD	CSSPENPCCDAATCKLRP	GAQCGEGLCCEQCKFSRAGKICRI	PRGDM	PDDR	CTGQ	SADCPRYHSHA	73	
FLAV	EAGEECD	CGSP-NPCCDAATCKLRP	GAQCADGLCCDQCRFKKKRTICRR	ARGD	NPDDR	CTGQ	SADCPRNS---	69	
TRIM	--GEECD	CGSPSNPCCDAATCKLRP	GAQCADGLCCDQCRFKKKRTICRI	ARGD	FPDDR	CTGQ	SADCPRWN---	68	
		+	+		+	++	+		
			++	+					
				+					
					++	+			
							+		
								+	

Figura 19: Alinhamento múltiplo de seqüência de desintegrinas de veneno de serpente: jararastina - JAST, jararacina - JARC, insularina = INSU (*Bothrops insularis*, gi:52426579), salmosina = SALM (*Gloydius halys*, gi:4106003), flavostatina = FLAV (*Trimeresurus flavoviridis*, gi: 14595995), trismetatina = TRIM (*T. flavoviridis*, gi: 37926519), botrostatina = BOTH (*Bothrops jararaca*, gi:13194760), halisina = HALY (*Gloydius blomhoffi*, gi: 118651), saxatilina = SAXA (*Gloydius halys*, gi: 9945028), albolabrina = ALBO (*Cryptelytrops albolabris*, gi: 67462322), rodostomina = RHOD (*Calloselasma rhodostom*, gi:605649), kistrina = KIST (*C. rhodostoma*, gi:159162730). A numeração segue a estrutura primária da salmosina (SALM). Os aminoácidos idênticos ou conservados em todas as seqüências estão marcados com caixa cinza escuro e cinza claro, respectivamente. A seqüência RGD está marcada em caixa preta e as seis ligações dissulfeto (Cys₄-Cys₁₃, Cys₆-Cys₁₄, Cys₁₉-Cys₃₃, Cys₂₇-Cys₅₇, Cys₃₂-Cys₃₆, e Cys₄₅-Cys₆₄) foram marcadas com (+). Os aminoácidos presentes exclusivamente nos grupos de seqüência da jararastina ou da jararacina estão mostrados na cor cinza e foram utilizados para orientar a divisão em dois grupos baseados na sua maior similaridade.

Através da seqüência primária foi possível obter o ponto isoelétrico teórico (pI teórico) das desintegrinas, no qual como esperado, os valores foram mais ácido para a jarastatina (pI=4,87) e mais básicos para a jararacina (pI=8,07).

Os modelos teóricos tridimensionais das desintegrinas JAST e JARC foram construídos usando o servidor Swiss Model como descrito na seção Metodologia. Os modelos criados foram validados pela análise do gráfico de Ramachandran, do gráfico do “Verify-3D” utilizando o programa Procheck e pela análise da estrutura tridimensional, comparando a estrutura terciária do modelo com a dos *templates*, salmosina e trimestatina, como descrito na literatura (Figura 20) (Laskowski *et al.*, 1993).

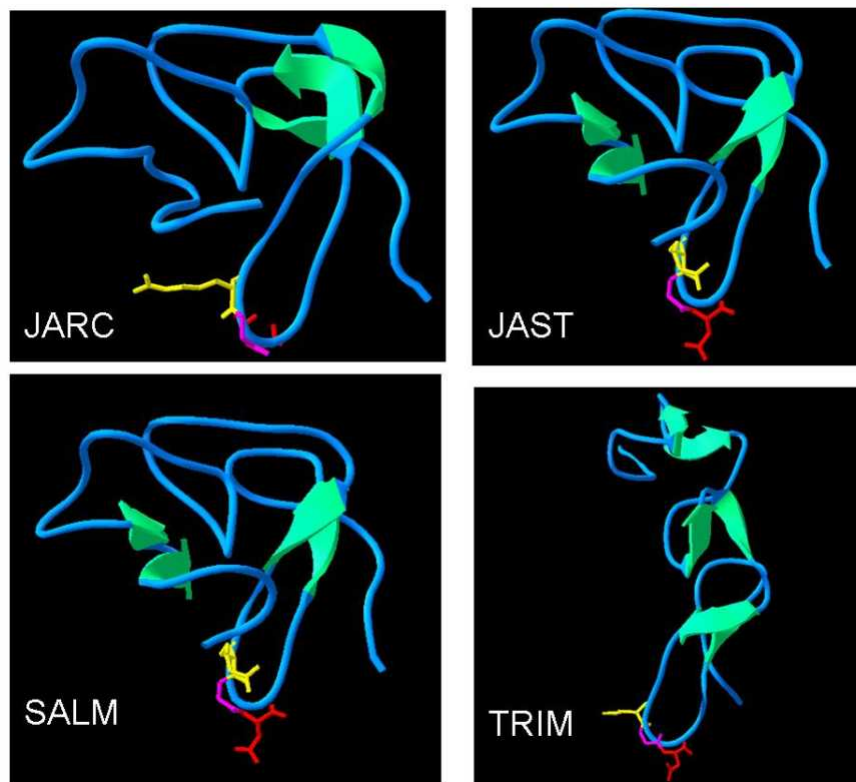


Figura 20: Comparação dos modelos teóricos das desintegrinas jararacina (JARC), jarastatina (JAST) e dos templates salmosina (SALM) e trimestatina (TRIM). A tríade RGD está representada em amarelo (arginina), rosa (glicina) e vermelho (ácido aspártico).

A análise dos gráficos de Ramachandram demonstra que os modelos apresentam uma boa estereoquímica, visto que cerca de 91% dos resíduos de aminoácidos da JAST e 94% da JARC adotam ângulos de torção ψ e ϕ mais favoráveis. Comparado aos *templates*, o modelo da JARC se mostrou superior à estrutura da salmosina enquanto JAST mostrou valores semelhantes (Figura 21).

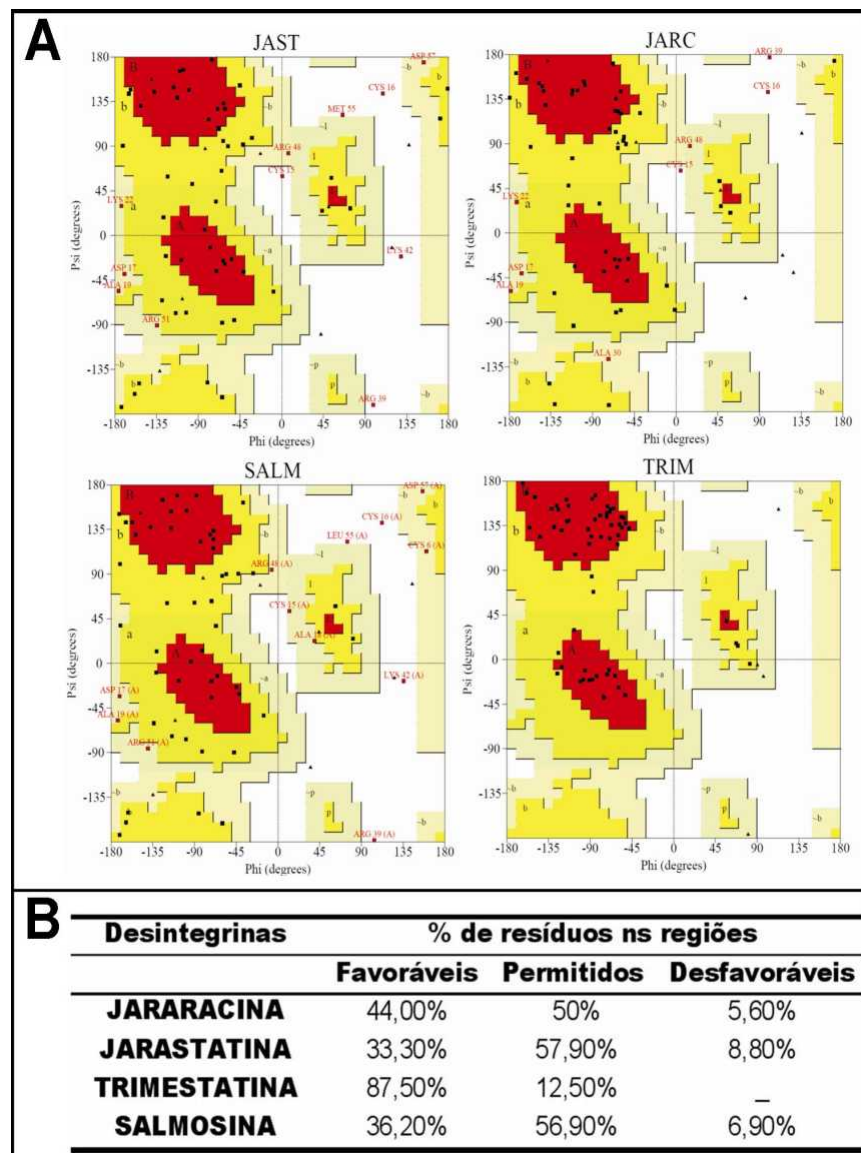


Figura 21: Validação dos modelos das desintegrinas JARC e JAST. Gráficos (A) e valores (B) de Ramachandram para os modelos JARC e JAST, comparados aos templates salmosina (SALM) e trimestatina (TRIM). As regiões mais favoráveis estão em vermelho, favoráveis em amarelo, menos favoráveis em bege e desfavoráveis em branco.

Apenas 5,60% e 8,8% dos resíduos foram encontrados em regiões desfavoráveis nos modelos de JARC e JAST, próximos aos valores encontrados para salmosina, que apresentou 6,9% dos resíduos em regiões desfavoráveis (Figura 21).

A validação utilizando o Verify-3D gera uma comparação da estrutura tridimensional com a seqüência primária, identificando um melhor perfil tridimensional quanto maior a proporção dos aminoácidos 3D/1D. Assim, observamos que os modelos tridimensionais de JARC e JAST se apresentaram superior à estrutura cristal da trimestatina, principalmente a partir do aminoácido glutamina 37 até a região C-terminal, onde está presente a alça RGD. A análise da estrutura terciária revelou que as desintegrinas JARC e JAST seguiram principalmente a estrutura terciária da salmosina, apresentando uma forma mais esférico-ovalada, do que a da trimestatina, que apresenta uma forma mais alongada sendo a JARC menos similar (Figura 22).

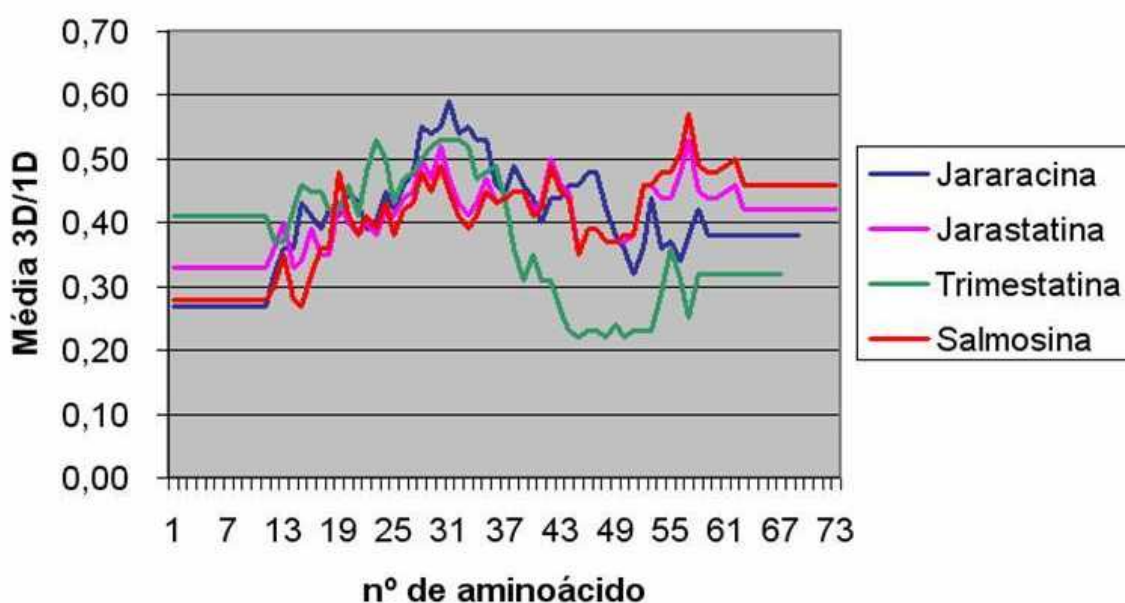


Figura 22: Comparação dos gráficos obtidos da análise com o programa Verify3D (média 3D/1D) para os modelos JARC e JAST e as estruturas de RMN e cristal dos templates salmosina e trimestatina.

A análise dos mapas de potencial eletrostático da JARC e da JAST calculados no programa deepview/Swiss PDBViewer confirmou os valores isoelétricos preditos inicialmente a partir da estrutura primária (JARC=8,07 e JAST=4,87), mostrando um perfil mais eletropositivo para a JARC do que para JAST. Comparando os dois mapas com os templates, foi observado que a JARC segue o perfil da trimestatina que possui um pI teórico de 7,58 e um mapa mais eletropositivo, enquanto a JAST segue o perfil da salmosina que possui um mapa mais eletronegativo e um ponto isoelétrico teórico mais ácido ($pI=4,72$) (Figura 23).

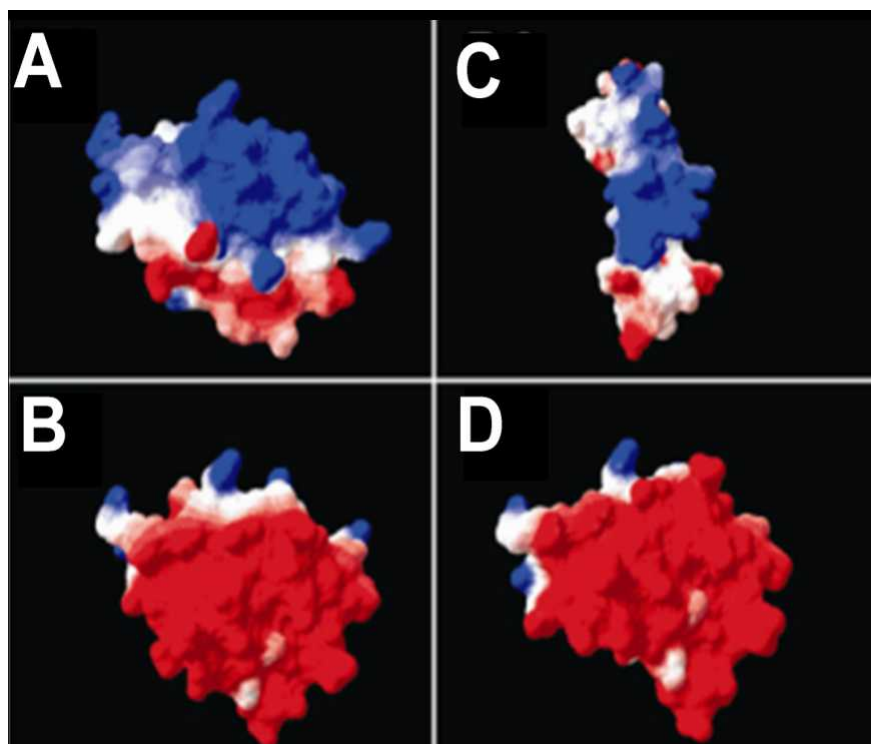


Figura 23: Mapa de potencial Eletrostático das desintegrinas (A) JARC; (B) JAST; (C) Trimestatina e (D) Salmosina. Em vermelho as regiões mais eletronegativas e em azul, as regiões mais eletropositivas.

O grupo da professora Dra. Russolina Zingali identificaram diferenças no perfil de atividade biológica das desintegrinas e dos peptídeos cíclicos gerados a partir de seqüência da região da alça RGD (Tabela 2). Tendo em vista a diferença

significativa entre essas moléculas nas quais os peptídeos apresentaram baixa ou nenhuma atividade antiplaquetária, construímos teoricamente esses peptídeos a partir da alça da região RGD presente nos modelos das desintegrinas JARC e JAST. A ciclização dos peptídeos foi realizada promovendo a interação entre as cisteínas que estão presentes nessa alça nas respectivas sequências (Figura 24).

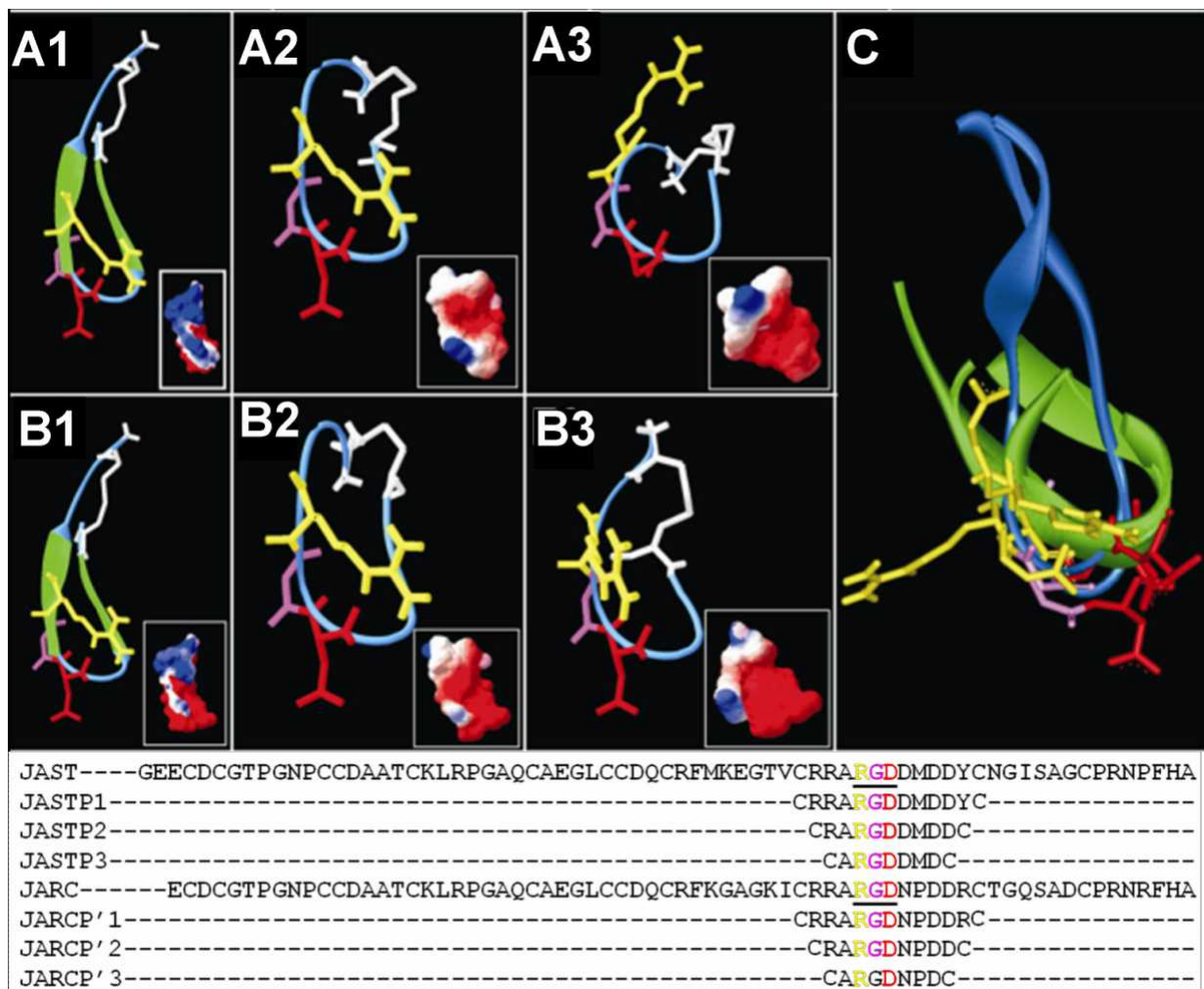


Figura 24: Estrutura tridimensional dos peptídeos cíclicos baseados em (A) jararacina (A1 - P1', A2 - P2' e A3 - P3') e em (B) jarastatina (B1 - P1, B2 - P2 e B3 - P3). O mapa de potencial eletrostático está mostrado dentro das caixas brancas. Alinhamento da estrutura primária (abaixo) e terciária (C) das desintegrinas (azul) e dos peptídeos cíclicos (verde). A região RGD está representada em amarelo (arginina), rosa (glicina) e vermelho (ácido aspártico).

De forma importante, os modelos dos peptídeos cíclicos revelam um deslocamento da estruturada alça (RGD) em comparação com a mesma região na desintegrina completa (Figura 24).

O mapa de potencial eletrostático dos peptídeos seguiu um caráter mais negativo devido ao maior número de resíduos de aminoácidos ácidos, com exceção dos peptídeos JAST P₁ e JARC P'₁, que possuem mais resíduos de argininas do que os peptídeos menores (Figura 24 - inset).

4.2.2. Análise dos complexos ligantes – alvo terapêutico (desintegrina-integrina): Docking, interações e mudança conformacional

Para realizar o docking dos modelos teóricos da JARC, JAST e dos peptídeos cíclicos com o receptor plaquetário $\alpha_{IIb}\beta_3$, utilizamos a estrutura cristal do complexo RGD- $\alpha_{IIb}\beta_3$ (PDB1TY6). Assim, os modelos foram alinhados com o tri-peptídeo (RGD) complexado na estrutura da integrina plaquetária ($\alpha_{IIb}\beta_3$), sendo o ligante original retirado e os complexos analisados, otimizados e validados como descrito na seção de Metodologia. A construção dos complexos envolvendo as desintegrinas completas (JARC- $\alpha_{IIb}\beta_3$ e JAST- $\alpha_{IIb}\beta_3$) permitiu a observação de várias interações entre estas moléculas e as subunidades do receptor (Tabela 6).

O região RGD da JARC interagiu com as duas subunidades da integrina (α_{IIb} e β_3), principalmente através das ligações de hidrogênio (ex.: Asp₅₁-Tyr₁₂₂, JARC- β_3) e interações iônicas (ex.: Arg₄₉-Ser₂₂₆ - JARC- α_{IIb} , Asp₅₁-Lys₁₂₅ - JARC- β_3) (Tabela 6). As regiões N-terminal e C-terminal das desintegrinas também interagiram

com as subunidades α_{IIb} e β_3 , respectivamente (ex.: Asp₅-Ser₂₂₆ - JARC- α_{IIb} ; His₇₀-Asp₁₂₆ - JARC- β_3) (Figura 25 e Tabela 6).

Tabela 6 : Interações de alta energia dos complexos integrina–desintegrina (JARC- $\alpha_{IIb}\beta_3$ e JAST- $\alpha_{IIb}\beta_3$) e integrina-peptídeos cíclicos.

Molécula	Interações com o receptor			
	Subunidade α_{IIb}		Subunidade β_3	
	Ligação de hidrogênio	Interação iônica	Ligação de hidrogênio	Interaçã o iônica
Jararacina	C4-S ₂₂₆ , D5-D ₁₅₉ , D5-D ₂₂₄ , T8-D ₁₅₉ ,	D5-S ₂₂₆ , N11-E ₁₅₇ , N11-N ₁₅₈ , R49-S ₁₅₉ , R49-S ₂₂₆	D51-Y ₁₂₂ , N52-S ₁₂₃ , N52-D ₂₅₁	D51-K ₁₂₅ , H70-D ₁₂₆
JC₁	ND	R5-D ₁₅₉	D7-D ₁₂₆ , N8-S ₁₂₃ , N8-K ₂₅₃ , P9-N ₃₁₃ , P9-D ₂₅₁	-
JC₂	ND	R5-D ₁₅₉	D7-D ₁₂₃ , N8-A ₂₁₈ , P9-D ₂₅₁ , D10-D ₁₂₆	N8-D ₂₅₁ , N8- K ₂₅₃
JC₃	ND	R5-S ₂₂₆	D7-S ₁₂₃ , N8-A ₂₁₈ , P9-S ₁₂₃ , D10-D ₁₂₆	R5-D ₂₅₁ , D10-K ₁₂₅
Jarastatina	D5-D ₁₅₉ , T8-D ₁₅₉	C4-S ₂₂₆ , D5-S ₂₂₆ , N11-E ₁₅₇ , N11-D ₁₅₉ , R49-D ₁₅₉	D51-S ₁₂₃ , N52-S ₁₂₃ , N52-D ₁₂₆	D51-Y ₁₂₂ , H70-D ₁₂₆
JT₁	ND	R5-D ₁₅₉	D7-S ₁₂₃ , D8-Y ₁₂₂ , D8-S ₁₂₃ , M9-T ₃₁₁ , M9-E ₃₁₂ , M9-N ₃₁₃ , Y ₁₂ -D ₁₂₆	D7-K ₁₂₅ , D8-K ₂₅₃
JT₂	ND	R5-D ₁₅₉	D8-D ₁₂₉	D10-K ₂₅₃
JT₃	ND	R5-D ₁₅₉	D8-D ₁₂₉	D10-K ₂₅₃

* ND=Não detectado

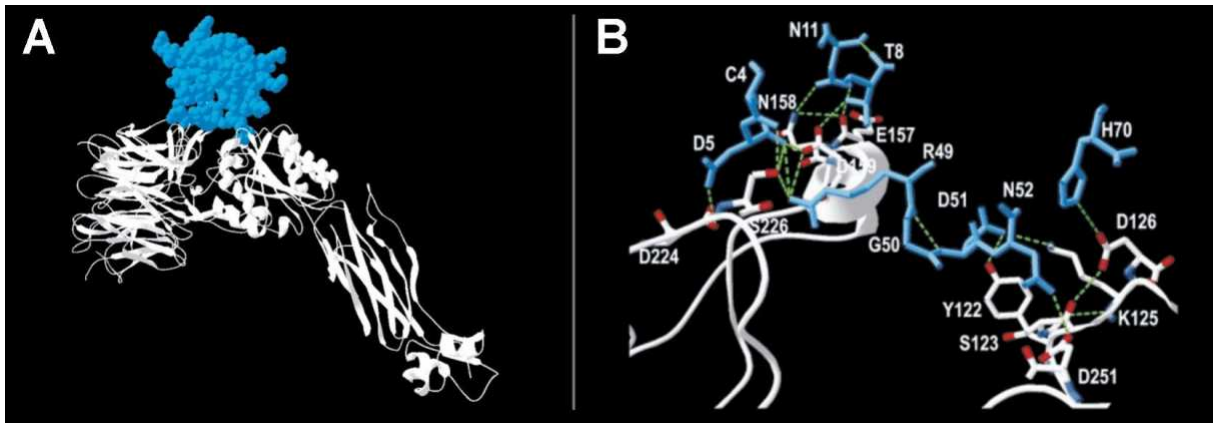


Figura 25: Interações de alta energia presente no complexo integrina–JARC. Visão total do complexo (A) e suas interações (B). A desintegrina está representada em azul e a integrina ($\alpha_{IIb}\beta_3$) em branco.

Interações também foram observados no complexo formado pela JAST/ $\alpha_{IIb}\beta_3$, porém em um número menor (Figura 26). Observou-se ainda interações através de ligações de hidrogênio entre o RGD da JAST tanto com a subunidade α_{IIb} (ex.: Arg₄₉-Asp₁₅₉), quanto com a sub-unidade β_3 (ex.: Asp₅₁-Ser₁₂₃) do receptor. As interações iônicas também foram encontradas nesse complexo (ex.: Asp₅₁-Tyr₁₂₂ da subunidade β_3) (Figura 26 e Tabela 8). De forma similar a JARC, as regiões N-terminal e a C-terminal da JAST também interagiram com as duas subunidades da integrina (ex.: JAST- α_{IIb} - Asp₅-Ser₂₂₆; JAST- β_3 - His₇₀-Asp₁₂₆. (Figura 26 e Tabela 6).

A análise do mapa de potencial eletrostático dos complexos desintegrina- $\alpha_{IIb}\beta_3$ mostrou uma distribuição eletrônica diferenciada destas estruturas comparada ao receptor não complexado. O receptor induz uma redistribuição de cargas mais negativas da superfície nas duas desintegrinas (JARC e JAST) (não mostrado) enquanto sofre uma discreta, mas clara mudança conformacional (JARC/ $\alpha_{IIb}\beta_3$ =0,69Å e JAST/ $\alpha_{IIb}\beta_3$ =0,59Å). Como esperado, nota-se também uma variação de volume dos complexos com relação a estrutura cristal do receptor não-complexado (113.267Å³) comparado aos complexos com as desintegrinas JARC (114.927Å³) e JAST (114.265Å³).

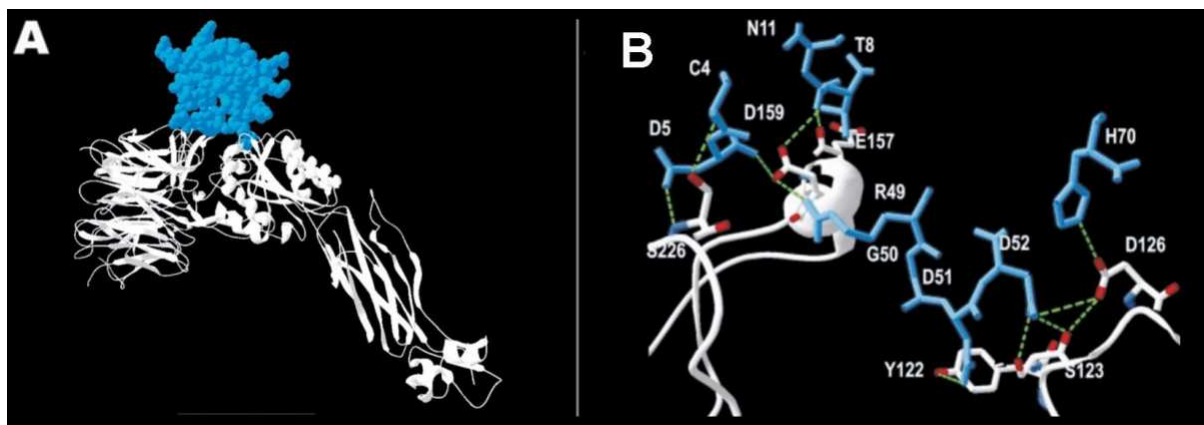


Figura 26: Interações de alta energia presente no complexo integrina–JAST. Visão total do complexo (A) e suas interações (B). A desintegrina está representada em azul e a integrina ($\alpha_{IIb}\beta_3$) em branco.

Análogo a ausência ou baixa atividade antiagregante dos peptídeos cíclicos, o *docking* dos complexos com $\alpha_{IIb}\beta_3$ revelou um número inferior de interações com a subunidade α_{IIb} comparado ao encontrado nas desintegrinas. Todos os seis complexos construídos mostrou interações entre todos os peptídeos cíclicos com a subunidade β_3 da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ com diversas variações (Tabela 6) e com a subunidade α_{IIb} por interações iônicas (Arg₅-Asp₁₅₉). A única exceção foi o JARC P₃' que interagiu através de uma ligação de hidrogênio formada entre os aminoácidos Arg₅-Ser₂₂₆.

O número de interações dessas moléculas com a subunidade β_3 do receptor foi maior nos peptídeos mais ativos JAST P₁ (Asp₇-Ser₁₂₃, Asp₇-Lys₁₂₅, Asp₈-Tyr₁₂₂, Asp₈-Ser₁₂₃, Asp₈-Lys₂₅₃, Met₉-Thr₃₁₁, Met₉-Glu₃₁₂, Met₉-Asn₃₁₃, Tyr₁₂-Asp₁₂₆), JARC P₂' (Asp₇-Asp₁₂₃, Asn₈-Ala₂₁₈, Asn₈-Asp₂₅₁, Asn₈-Lys₂₅₃, Pro₉-Asp₂₅₁, Asp₁₀-Asp₁₂₆) e JARC P₃' (Asp₇-Ser₁₂₃, Asn₈-Ala₂₁₈, Pro₉-Ser₁₂₃, Asp₁₀-Lys₁₂₅, Asp₁₀-Asp₁₂₆, Arg₅-Asp₂₅₁) e menor nos menos ativos (JARC P₁', JAST P₂, JAST P₃) (Figura 27 e Tabela 6). Algumas características estruturais importantes podem ser notadas acerca das interações hidrofóbicas, como é o caso do resíduo de glicina do motivo RGD que permitiu um alinhamento perfeito do resíduo Phe₁₆₀ da integrina em uma

distância de 4,59Å nos complexos da integrinas com as desintegrinas e de pelo menos 7,74Å nos complexos formado pelos peptídeos cíclicos-receptor. Os complexos formados pelas desintegrinas- $\alpha_{IIb}\beta_3$ direcionam o ligante para grupamentos hidrofóbicos presentes na sub-unidade α_{IIb} da integrina com alguns resíduos (Pro₂₂₈, Phe₂₃₁, Trp₂₆₀ e Trp₂₆₂).

De forma importante, a mudança conformacional da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ foi consideravelmente menor com peptídeos cíclicos (RMSD = 0,07-0,10Å) comparados ao dos complexos envolvendo as desintegrinas (JARC/ $\alpha_{IIb}\beta_3$ =0,69Å e JAST/ $\alpha_{IIb}\beta_3$ =0,59Å) (Figura 25 – 27).

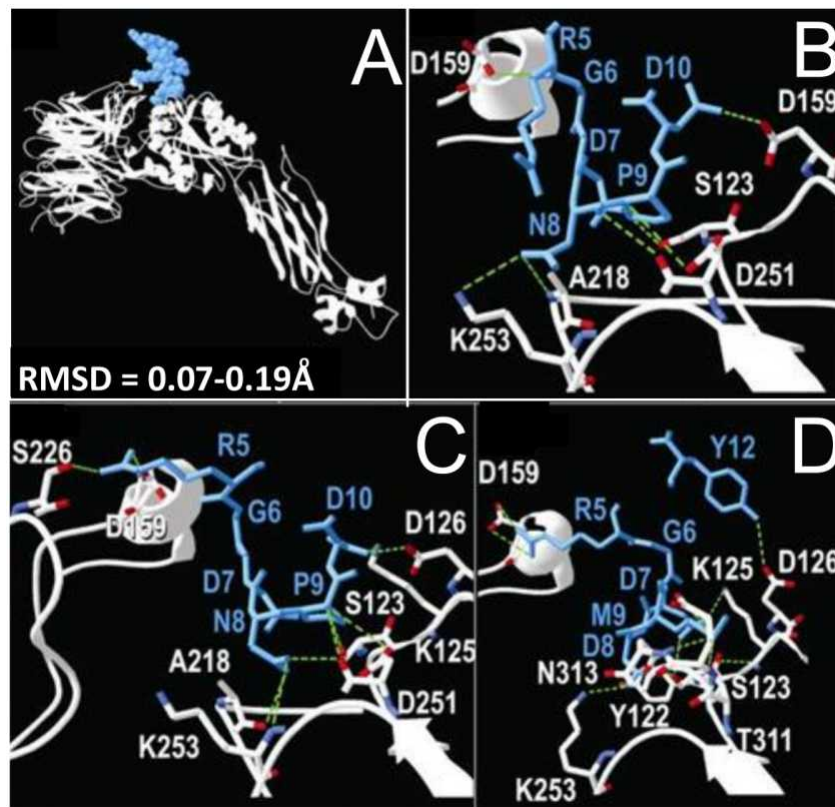


Figura 27: Interações de alta energia dos complexos integrina-peptídeos cíclicos. (A) Visão total do complexo e suas interações com (B) JAST P₁, (C) JARC P₂ e (D) JARC P₃. Os peptídeos cíclicos estão representados em azul e a integrina ($\alpha_{IIb}\beta_3$) em branco.

5. Discussão

A utilização de inibidores como agente terapêutico é amplamente descrita na literatura e inclui diferentes medicamentos como os anti-hipertensivos, os antibióticos e fármacos utilizados no tratamento do câncer (Lall *et al.*, 2004; Voorhees *et al.*, 2006; Calle *et al.*, 2007). Devido a grande importância para a redução das altas taxa de mortalidade e morbidade de doenças como o AVC, trombose e infarto agudo do miocárdio, os agentes com ação antiplaquetária também são bastante estudados, sejam eles de origem natural (ex.: a botrojaracina, um potente inibidor de pró-trombina e trombina presente no veneno da serpente *Bothrops jararaca*), ou sintética (ex.: compostos antitrombóticos derivados do sistema acilhidrazona associados ao sistema arilsulfonamida) (Zingali *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2008).

O estudo aprofundado destes inibidores do processo hemostático, bem como seu perfil de atividade frente ao alvo terapêutico ou evento fisiopatológico, e ainda a compreensão deste alvo proteico são de grande importância para a determinação de novas drogas anti plaquetárias. Por isso, atualmente existe um enorme investimento das indústrias farmacêuticas e de centros de pesquisas para a busca e o desenvolvimento de novos inibidores naturais ou sintéticos de alta especificidade (Lombardino *et al.*, 2004).

No intuito de avaliar a relação estrutura-atividade de compostos de origem sintética e de origem animal, nesta dissertação, analisamos compostos acilhidrazônicos produzidos pela Faculdade de Farmácia da UFF e moléculas antiplaquetárias presentes no veneno de *Bothrops jararaca*. Assim dividimos a discussão nas duas seções a seguir.

5.1. Derivados acilhidrazônicos: análise *in vitro* e *in silico* do perfil antiplaquetário de moléculas de origem sintética:

Vários compostos derivados do sistema acilhidrazona têm sido descritos na literatura como sendo inibidores da agregação plaquetária (Fraga *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2003 e Lima *et al.*, 2008). Esses compostos são relatados como capazes de inibir a agregação induzida pelo colágeno e pelo ácido araquidônico, entretanto não apresentando atividade inibitória na agregação induzida pelo ADP, quando testados em sangue de coelho. Os resultados têm inferido a atuação destas moléculas sobre a via de formação da tromboxana A_2 , o que aponta seu potencial com agente terapêutico (Cunha *et al.*, 2003, Lima *et al.*, 2008).

A literatura descreve que o perfil da atividade biológica dos compostos que apresentam sistema acilhidrazona é dependente a uma relativa acidez e sua capacidade de estabilizar os radicais livres, mimetizando certos ácidos graxos, como por exemplo, o ácido araquidônico e seus derivados (PGG_2 e PGH_2), sugerindo então, que estes compostos poderiam estar agindo sobre a enzima ciclooxigenase-1 (COX-1) que converte ácido araquidônico em PGH_2 ou mesmo sobre a tromboxana A_2 sintase (TxS), que converte PGH_2 em Tromboxana A_2 (TxA_2) (Mahy *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2004; Nakahata *et al.*, 2008).

A literatura descreve a molécula de TxA_2 envolvida em uma série de atividades biológicas relacionadas a uma série de condições patológicas, como AVC, infarto agudo do miocárdio e trombose arterial, asma e aterosclerose (Eikelboom *et al.*, 2002; Dogne *et al.*, 2002). Segundo essa literatura, vários tipos de moduladores da síntese e/ou da atividade da TxA_2 têm sido desenvolvidos nos últimos 20 anos. Dentre eles temos, inibidores da COX-1 como a aspirina e a indometacina; inibidores

da tromboxana sintase, ozagrel, pirmagrel e furegrelate; antagonistas do receptor de tromboxana A_2 , genisteína e apigenina; e ainda de dupla ação (antagonista do receptor e inibidor da TxS), como o ridogrel. Estes fármacos são comumente utilizados na terapêutica destas doenças que apresentam a participação da tromboxana A_2 , mas que apresentam efeitos colaterais e problemas de resistência individual dos pacientes (Nakahata *et al.*, 2008).

Nesta dissertação são descritos novos derivados acilhidrazônicos (**3a-3k**) que de acordo com nossos resultados atuam como inibidores da agregação plaquetária. Os compostos **3a**, **3c** e **3f** apresentaram o melhor perfil inibitório frente à agregação plaquetária induzida por colágeno e ácido araquidônico, mas foram praticamente inativos quando ADP foi utilizado como agonista em plaquetas de coelho. O ADP em plaquetas de coelhos utiliza uma via independente dos efeitos do colágeno e do ácido araquidônico (Lima *et al.*, 2008), sugerindo que os compostos aqui avaliados estejam agindo sobre a formação da tromboxana A_2 .

Os compostos **3a** e **3c** apresentaram a maior atividade inibitória (IC_{50} = 61 μ M e 68 μ M, respectivamente), com valores quase cinco vezes melhor do que a aspirina (IC_{50} = 300 μ M), um reconhecido inibidor da agregação plaquetária e bastante utilizado na terapêutica e prevenção de AVC agudo reforçando o potencial destas moléculas para o tratamento de sintomas de doenças vasculares como o AVC e o infarto agudo do miocárdio. (Cucchiara *et al.*, 2008).

A análise da relação estrutura atividade (SAR) dos compostos estudados mostrou que os elementos estruturais como volume molecular (-0,747), área molecular (-0,746), peso molecular (-0,647) e a lipofilicidade (-0,718) apresentaram uma significativa correlação com a atividade biológica, diferentemente dos parâmetros eletrônicos como a energia dos orbitais de fronteira, como HOMO (-

0,091) e LUMO (0,119), o mapa de superfície polar (0,149) e o momento dipolo (-0,383). Esses resultados sugerem que o possível sítio de interação destes compostos no alvo terapêutico apresenta um perfil mais apolar e é dependente destas características estéricas e de lipofilicidade, já que compostos derivados da série analisada (**3a-3k**) com grupos substituintes menores resultam em um melhor perfil inibitório no processo de agregação plaquetária. Esse resultado teórico também corrobora a hipótese de que estes compostos estejam inibindo enzimas que participam de via de síntese da tromboxana A_2 , como a COX-1 e a TxA₂ sintase, já que os alvos biológicos destas enzimas são os eicoisanóides que apresentam uma cadeia apolar de 20 átomos carbonos (ácido araquidônico, PGG₂ e PGGH₂) (Barreiro *et al.*, 2002).

A análise dos parâmetros ADMET mostrou que os compostos mais ativos obedecem à regra de Lipinski, indicando uma boa biodisponibilidade oral teórica. Isso se torna importante para futuros estudos *in vivo* que podem elucidar de forma mais detalhada a ação destes compostos. A análise do potencial teórico destes compostos como candidatos a novos fármacos através dos valores de *druglikeness* e de *drugscore*, comparado aos fármacos comumente na terapêutica das doenças tromboembólicas, mostrou que as acilhidrazonas apresentam valores melhores, sugerindo um grande potencial comercial. Os valores de *druglikeness* indicam ainda que estes compostos contenham, predominantemente, fragmentos que estão presentes com maior frequência nos fármacos comerciais, com potencial para se tornar um fármaco segundo os valores de *drug-score* (Tekto, 2005).

Além disso, os compostos mais ativos (**3a**, **3c** e **3f**) apresentam baixa toxicidade teórica seja para efeitos irritante, mutagênico, carcinoênico e sobre sistema reprodutor. É importante notar que a toxicidade predita aqui, não garante

que estes compostos sejam completamente livres de efeitos tóxicos, entretanto, reforçam seu potencial promissor, especialmente **3a** e **3c** que apresentaram os melhores valores de IC_{50} do que a aspirina (Silva *et al.*, 2008). Este estudo pode servir para a proposta de novos fármacos potencialmente mais seletivos e com menos efeitos colaterais úteis na terapia das doenças tromboembólicas.

5.2. Desintegrinas de veneno de *Bothrops jararaca*: análise in silico do perfil antiplaquetário de moléculas de origem animal

Os venenos de serpentes são misturas complexas que contêm diversos tipos de moléculas com atividades farmacológicas incluindo, componentes minerais, como íons e sais, e componentes orgânicos, como peptídeos e proteínas. De forma importante os componentes orgânicos representam cerca de 90-95% do peso seco do veneno (Calvete *et al.*, 2007). Devido à importância para o animal que o produz, o conteúdo dos venenos inclui moléculas com diferentes perfis biológicos com potencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, geração de novas drogas e busca de um melhor entendimento de alvos moleculares que possam estar envolvidos em processos fisiopatológicos.

Muitos fármacos foram desenvolvidos a partir de moléculas presentes em venenos de serpentes, como é o caso do Captopril, que tem seu princípio ativo derivado de um inibidor da enzima conversora de angiotensina isolado do veneno da *Bothrops jararaca*, e que é amplamente utilizado contra a hipertensão (Fournier *et al.*, 2000). Um outro grupo de moléculas, que já serviram como protótipos para fármacos comercializados no mercado, incluem as desintegrinas que serviram como protótipo para medicamentos como Aggrastat (Merk), que utilizou a desintegrina echistatina do veneno *Echis carinatus*, o Ancrod (Knoll), que usou como protótipo a

molécula de kistrina do veneno de *Agkistrodon rhodostoma* (Bennett, 2001; Hennerici *et al.*, 2006).

Neste trabalho foi realizado um estudo da relação estrutura-atividade de duas desintegrinas, a jararacina (JARC) e jarastatina (JAST), isoladas do veneno da serpente do gênero *B. jararaca* que apresentam um perfil de atividade antiplaquetária diferenciado quanto a sua potência. Neste estudo avaliamos também peptídeos cíclicos sintetizados para mimetizar a região RGD destas moléculas (JAST: P₁ - CRRARGDDMDDYC, P₂ - CRARGDDMDDC e P₃ - CARGDDMDC; JARC: P₁' - CRRARGDNPDDRC, P₂' - CRARGDNPDDC e P₃' - CARGDNPDC) que apresentaram baixa ou nenhuma atividade antiplaquetária.

A análise da estrutura primária das desintegrinas comparado a outras dez moléculas da família mostrou um alto grau de conservação estrutural (61-97%), confirmando os dados da literatura que mostram as desintegrinas da classe PII com tamanho médio (60 a 80 aminoácidos) alto grau de homologia entre si (Fujii *et al.*, 2003; Calvete *et al.*, 2005).

A análise estrutural revelou ainda várias características interessantes entre as desintegrinas de *B. jararaca* avaliadas. A literatura descreve o resíduo prolina na posição 53, próximo a região RGD, como importante para a ligação com a integrina de plaqueta $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Chang *et al.*, 2001). De forma importante, este resíduo de aminoácido está presente na JARC, mas é substituído por uma metionina na JAST. Este fato se torna interessante quando comparamos as atividades inibitórias destas duas desintegrinas, onde observamos que a JARC apresenta uma maior atividade inibitória na agregação plaquetária induzida por ADP e trombina (IC₅₀ = 110 nM e 29 nM, respectivamente) do que a JAST (IC₅₀ = 281 nM e 89,5 nM, respectivamente). Analisando o alinhamento primário das doze desintegrinas (JARC, JAST, insularina,

salmosina, flavostatina, albolabrina, rodostomina, saxatilina, kistrina, halisina, trimestatina e botrostatina) foi possível observar claramente dois padrões de seqüências dos resíduos de aminoácidos na região próxima a região RGD. Os padrões observados apresentam a presença dos resíduos Pro₅₃, Arg₅₆, Thr₅₈ e Asp₆₃, nas desintegrinas JARC, insularina, flavostatina, trimestatina, kistrina, rodostomina; enquanto se notam a presença dos resíduos Asp₅₃, Tyr₅₆, Gln₅₈ e Gly₆₃, nas desintegrinas JAST, salmosina, albolabrina, saxatilina e botrostatina. Este padrão sugere um papel importante destes resíduos para o perfil inibitório destas desintegrinas, já que os dois grupos possuem graus distintos de atividade antiplaquetária. De acordo com os dados biológicos apresentados na literatura, o primeiro grupo de desintegrinas se apresenta mais potente (ex.: flavostatina, IC₅₀ = 78nM e trimestatina, IC₅₀ = 60nM) do que o segundo (ex.: saxatilina, IC₅₀ = 127 nM e salmosina, IC₅₀ = 131 nM) (Maruyama *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1998; Okuda *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2002), sendo corroborado pelos dados observados pelo grupo da professora Dra. Russolina Zingali nos ensaios biológicos utilizando a JARC e a JAST como inibidores da agregação plaquetária.

Marcinkiewicz (2005) descreve que as desintegrinas podem ser classificadas com base na especificidade de ligação dependendo da região de ligação à integrina. O motivo RGD das desintegrinas se liga as integrinas $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_v\beta_3$; enquanto o motivo MLD (Met, Leu, Asp) interage com $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$ e $\alpha_9\beta_1$; e desintegrinas contendo o motivo KTS (Lys, Thr, Ser) se ligam a integrina $\alpha_1\beta_1$. De acordo com os resultados obtidos, um outra subclassificação poderia ser estabelecida dentro do grupo das desintegrinas com o motivo RGD, separando em pelo menos dois sub-grupos (A e B), na qual as desintegrinas do grupo A apresentariam os resíduos de aminoácidos Pro₅₃, Arg₅₆, Thr₅₈ e Asp₆₃, que incluem a

JARC, e o grupo B que possuiria os resíduos de aminoácidos Asp₅₃, Tyr₅₆, Gln₅₈ e Gly₆₃, e inclui a JAST. Aparentemente, o grupo A possui uma interação mais significativa com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ do que o grupo B, pela presença destes resíduos na interação do complexo.

O motivo RGD é reconhecido como o responsável pela inibição das integrinas pelas desintegrinas, mas segundo alguns autores, ele não seria responsável exclusivamente por este perfil de atividade (Calvete *et al.*, 2003). O estudo biológico do grupo da professora Dra. Russolina Zingali – UFRJ utilizando seis peptídeos cíclicos revelou uma baixa ou nenhuma atividade inibitória de agregação plaquetária nos ensaios biológicos, comparados as desintegrinas. Isso reforça os dados da literatura que mostram que os peptídeos compostos apenas pela região RGD não apresentam boa atividade inibitória (Kim *et al.*, 2004). Entretanto, os peptídeos cíclicos possuem uma atividade superior aos peptídeos lineares, sugerindo que certa rigidez conformacional poderia beneficiar a atividade destes peptídeos, possivelmente por facilitar a orientação e ligação ao receptor (Kim *et al.*, 2004).

A nossa análise *in silico* destas moléculas utilizando os modelos teóricos desenvolvidos revelou que a diminuição do número de aminoácidos na estrutura dos peptídeos promove um aumento na rigidez da molécula, modificando-a da forma alongada, com presença de uma pequena estrutura secundária nas JAST P₁ e JARC P₁', para a uma forma mais circular, como visto nas JAST P₃ e JARC P₃'. Contudo as atividades inibitórias dos peptídeos cíclicos, bastante inferiores às desintegrinas, podem estar relacionados não só com essa rigidez excessiva mas também à ausência de outras regiões importantes, que devem ser necessárias para a interação das desintegrinas com o receptor além da alça RGD (Kim *et al.*, 2004).

A glicoproteína $\alpha_{IIb}\beta_3$ é uma integrina que apresenta uma atividade essencial na agregação plaquetária, posto que interage com a fibronectina e provoca a agregação entre as plaquetas (Prévoost *et al.*, 2007). As integrinas são alvos das desintegrinas por possuir o sítio de ligação para RGD (Calvete *et al.*, 2003). Desta forma, utilizamos a estrutura cristal da região extracelular da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ para realizar os estudos de *docking* com as desintegrinas e os peptídeos cíclicos, no intuito de identificar interações e outras regiões de interação, diferentes da alça RGD. A região extracelular heterodimérica do receptor é composta por subunidades que apresentam um alto padrão de superfície eletronegativo, como observado no mapa de potencial eletrostático e nos pontos isoelétricos das subunidades que apresentam um caráter mais ácido (α_{IIb} -pI=5,5; β_3 -pI= 5,5) (Charo *et al.*, 1986). Com isso, a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ interage melhor com estruturas que apresentam o perfil eletrônico positivo como a JARC. Assim, superfícies negativas tais como as dos peptídeos cíclicos poderiam estar afetando a aproximação e interações iniciais com este receptor, o que pôde ser observado pelas interações diminuídas desses peptídeos cíclicos com a integrina, quando comparada às desintegrinas completas.

A região RGD das desintegrinas realiza interações de alta energia com as subunidades do receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$, porém a desintegrina JARC apresenta um número maior de interações com as subunidades, na qual o resíduo de Arg₄₉ interage com a subunidade α_{IIb} , e o resíduo de aminoácido Asp₅₁ interage com a subunidade β_3 . A literatura descreve que o resíduo de glicina, que completa o motivo RGD, se encontra na interface das subunidades das integrinas α e β . Esta característica sugere uma restrição para uma possível mutação glicina por resíduos polares, visto que aparentemente esta é capaz de realizar interações hidrofóbicas com a subunidade α_v da integrina $\alpha_v\beta_3$ (Xiong *et al.*, 2001). Neste trabalho, não foi possível

observar interações hidrofóbicas da glicina do RGD diretamente com resíduos de aminoácidos da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, contudo, uma região hidrofóbica presente na subunidade α_{IIb} está próxima a esta região das desintegrinas no complexo desintegrina/receptor.

A literatura infere que os resíduos posicionados tanto na região N-terminal, quanto na região C-terminal, além da seqüência RGD, apresentam grande importância para determinar a especificidade do reconhecimento das integrinas sendo atribuída a região C-terminal o papel na regulação destas interações com as integrinas (Rahman, *et al.*; 1998). Os resultados teóricos apresentados nessa dissertação corroboram com os dados da literatura, mostrando que essas regiões estruturais (porções N-terminal e C-terminal) participam nas interações de alta energia (*ex.* ligações de hidrogênio e interações iônicas) com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, além do domínio RGD, tanto na JAST quanto na JARC (Rahman, *et al.*; 1998). De forma importante, as substituições dos resíduos de aminoácidos na região C-terminal próximos ao motivo RGD também parecem estar influenciando no perfil diferenciado da atividade inibitória de JARC e JAST. De forma diferente, de acordo com esses resultados, a modificação pós-traducional do N-terminal destas desintegrinas aparentemente não compromete suas interações com $\alpha_{IIb}\beta_3$, já que um perfil diferenciado de interações não foi observado utilizando a seqüência completa dos modelos criados por homologia na avaliação dos complexos (dados não mostrados).

Os estudo *in silico* revelou que os peptídeos cíclicos apresentam uma menor interação com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, análoga a sua baixa atividade inibitória. Estes peptídeos não apresentam outras regiões para interagir com o receptor, além do motivo RGD, notado na análise dos complexos teóricos integrina-peptídeos cíclicos que apresentam diminuição ou ausência de interações com a subunidade α do

receptor (Kim *et al.*, 2005). A análise individual dos peptídeos mostra que a atividade inibitória observada para JAST P₁, em contraste com JARC P₁', pode ser devido à presença do resíduo Tyr₁₂ em JAST, que é capaz de interagir com Asp₁₂₆ da subunidade β_3 do receptor. Entretanto, Tyr₁₂ é substituído por Arg₁₂ nos peptídeos cíclicos de JARC, que interage, então, com o Cys₁₃ no interior da própria molécula, não ficando disponível para a interação. É importante notar que esta interação não está presente em JAST P₂ e JAST P₃, que são menores do que JAST P₁. O grande número de interações que resultam da presença da prolina na estrutura pode ser responsável pela atividade de JARC P₂' e JARC P₃', ao invés dos peptídeos cíclicos da JAST, possivelmente pela reorientação dos resíduos que poderia facilitar algumas das interações observadas.

O perfil negativo observado nos mapas de potencial eletrostático dos peptídeos cíclicos pode comprometer a interação com receptores plaquetários, como $\alpha_{IIb}\beta_3$, que apresenta um perfil ácido (Charo *et al.*, 1986). A análise do *docking* dos complexos mostrou que algumas das interações destes peptídeos cíclicos que contêm apenas a seqüência da alça RGD, com as subunidades α_{IIb} e β_3 estavam ausentes, quando comparados com a alça nas estruturas das desintegrinas. Isso sugere um deslocamento da região de interações entre esses peptídeos com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. O deslocamento do motivo RGD nos peptídeos cíclicos somado com a incapacidade para interagir perfeitamente com as subunidades α_{IIb} e β_3 podem ser características importantes e deve ser considerado nos estudos de relação estrutura-atividade destas moléculas.

Estas interações são importantes não só para as mudanças de conformação observadas no presente estudo e pela literatura (Xiao *et al.*, 2004), mas também para a atividade inibitória das moléculas de desintegrinas. As

mudanças na conformação do receptor após ligação das desintegrinas foram confirmadas pelos nossos resultados de modelagem molecular, no qual JAST e JARC alcançaram uma mudança conformacional do receptor com valores maiores do que os peptídeos. Esta mudança conformacional poderia ser responsável pela modificação das regiões transmembrânicas e intracelular da integrina $\alpha_{11b}\beta_3$, interrompendo sua atividade, ou ativando uma via inibitória.

A compreensão dos mecanismos de ação destas moléculas pode orientar não só a produção de moléculas ativas, mas permite também o entendimento sobre estas estruturas protéicas e a família a que estas pertencem.

6. Conclusões

6.1 Derivados do sistema acilhidrazona: análise do perfil antiplaquetário dos ligantes de origem sintética

- O estudo *in vitro* demonstrou que a série do sistema acilhidrazona apresenta um perfil antiplaquetário promissor contra a agregação induzida por colágeno e ácido araquidônico com valores de IC₅₀ melhores que a aspirina.

- Os resultados biológicos de agregação plaquetária revelaram os derivados **3a**, **3c** e **3f** com maior atividade inibitória frente à agregação plaquetária induzida por colágeno e por ácido araquidônico, não sendo ativo frente agregação induzida por ADP, o que sugere a ação sobre a via da síntese da Tromboxana A₂.

- O estudo *in silico* dos derivados do sistema acilhidrazona mostrou que as propriedades estruturais (volume, peso molecular e área) estão mais relacionadas com a atividade biológica, do que as características eletrônicas, sugerindo uma restrição espacial do sítio de ligação e um requerimento de hidrofobicidade na região de interação do alvo protéico com estes derivados.

- A análise dos parâmetros ADMET mostrou que os compostos **3a**, **3c** e **3f** obedeceram à regra de Lipinski e apresentaram baixa toxicidade teórica, similar ao clopidrogrel, o epitifibatide e o tirofiban, sugerindo que estes compostos possam ser utilizados em estudos *in vivo* para avaliação de aspectos importantes como eficácia, toxicidade, farmacodinâmica e farmacocinética.

6.2 Desintegrinas de veneno de *Bothrops jararaca*: Análise *in silico* da relação estrutura-atividade de ligantes de origem natural

- No estudo da relação estrutura atividade das desintegrinas JARC e JAST observa-se diferenças na estrutura tridimensional, nos mapas de potencial eletrostático e nas interações como o sítio de ligação destas moléculas na integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, apontando estes fatores como os responsáveis pela diferença de atividade inibitória frente aos ensaios de agregação plaquetária.

- O modelo do complexo JARC- $\alpha_{IIb}\beta_3$ apresentou um maior número de interações com relação ao modelo JAST- $\alpha_{IIb}\beta_3$, enquanto o mapa de potencial eletrostático da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ sugere uma maior afinidade à estrutura da JARC do que à JAST.

- Outras regiões (porções N- e C-terminal), além do domínio RGD, teoricamente interagem com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, tanto na JARC quanto na JAST, apontando novas regiões para estudo estrutural e mutações sítio dirigidas.

- Os peptídeos cíclicos apresentaram um pequeno número de interações no complexo ligante-receptor reforçando a necessidade de outras regiões além da região RGD e a provável necessidade de uma maior liberdade conformacional e de determinados aminoácidos (ex.: Prolina 53) para manter o perfil inibitório plaquetário.

7. Referências Bibliográficas

Abreu, PA. (2008) Receptor de NMDA: modelagem molecular por homologia e análise SAR de antagonistas de um potencial alvo terapêutico em doenças neurodegenerativas. Dissertação do curso de Pós graduação em Neuroimunologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense.

Acharya, K.R.; Lloyd, M.D. (2005) The advantages and limitations of protein crystal structures, *Trends Pharmacol Sci.* 26(1):10-14.

Allen, C.L.; Bayraktutan, U. (2008) Risk factors for ischaemic stroke. *Int J Stroke.* 3(2):105-16.

Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A., *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17): 3389-402.

André, C. (2006) Manual de AVC ". 2ªed. Rio de Janeiro: Revinter.

Andrews, R.K.; Berndt, M.C. (2004) Platelet physiology and thrombosis. *Thromb. Res.* 114(5-6): 447-453.

Andrews, R.K.; Gardiner, E.E.; Shen, Y.; Berndt, M.C. (2004) Platelet interactions in thrombosis. *IUBMB life* 56(1): 13-18.

Assumpção, R.S. (2006) Avaliação por Modelagem Molecular de uma Série de análogos 4-oxo-quinolínicos como potenciais inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa do HIV. Monografia do curso de Biologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense.

Atwater, B.D.; Roe, M.T.; Mahaffey, K.W. (2005) Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in non-ST segment elevation acute coronary syndromes: a review and guide to patient selection. *Drugs* 65(3): 313-324.

Bajorath, J., Stenkamp, R.E.; Aruffo, A. (1993) Knowledge-based model building of proteins: Concepts and examples. *Protein Science* 2(11):1798-1810.

Ballas, S.K.; Mohandas, N. (1996) Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am.* 10(6): 1221-1239.

Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M.; Miranda, A.L.P.; Rodrigues, C.R. (2002) A química medicinal de N-acilhidrazonas; novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. *Quím. Nova* 25(1): 129-148.

Baskin, I.I.; Tikhonova, I.G.; Palyulin, V.A.; Zefirov, N.S. (2003) Selectivity fields: comparative molecular field analysis (CoMFA) of the glycine/NMDA and AMPA receptors. *J Med Chem.* 46(19):4063-9.

- Bennett, J.S. (2001) Novel platelet inhibitors. *Annu Rev Med.* 52:161-84.
- Bhatt, DL; Topol, EJ. (2003) Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2(1):15-28.
- Bhatt DL. (2007) Intensifying platelet inhibition--navigating between Scylla and Charybdis. *N Engl J Med.* 357(20):2078-81.
- Bjarnason, JB; Fox, JW. (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* 62(3):325-372.
- Blundell, T.L.; Sibanda, B.L.; Sternberg, M.J.; Thornton, J.M. (1987) Knowledge based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature* 326(6111):347 – 352.
- Botrel, T.E.A.; Costa, R.D.; Costa, M.D.; Costa, A.M.D. (2000) Doenças cardiovasculares: causas e prevenção. *Rev Bras Clin Ter.* 26:87-90.
- Brass, L.F. (2005) Molecular basis for platelet activation. In: Hoffman, R.; Benz, E.; Shattil, S.; et al, eds. Hematology. "Basic Principles and Practice". 4th ed. Nova Iorque, NY: Churchill-livingstone. Inpress.
- Cale, J.M.; Lawrence, D.A. (2007) Structure-function relationships of plasminogen activator inhibitor-1 and its potential as a therapeutic agent. *Curr Drug Targets.* 8(9):971-81.
- Calvete, J.J.; Marcinkiewicz, C.; Monleón, D.; Esteve, V.; Celda, B.; Juárez, P.; Sanz, L. (2005) Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon.* 45(8): 1063-1074.
- Calvete, J.J.; Moreno-Murciano, M.P.; Theakston, D.G.; Kisiel, D.G.; Marcinkiewicz, C. (2003) Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochem. J.* 372: 725–734.
- Calvete, J.J.; Juárez, P.; Sanz, L. (2007) Snake venomomics. Strategy and applications. *J Mass Spectrom.* 42(11):1405-14.
- Canobbio, I.; Balduini, C.; Torti, M. (2004) Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal.* 16: 1329-1344.
- Carvalho, I.; Pupo, M.T.; Borges, A.D.L.; Bernardes, L.S.C. (2003) Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Quim. Nova* 26(3):428-438.
- Caplan, L.R.; Fisher, M. (2007) The endothelium, platelets, and brain ischemia. *Rev Neurol Dis.* 4(3):113-21.
- Castro, H.C.; Ferreira, B.L.A.; Nagashima T.; Schueler, A.; Rueff, C.; et al., (2006) Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J Bras Patol Med Lab* 42(5):321-332.

Chang, C.P.; Chang, J.C.; Chang, H.H.; Tsai, W.J.; Lo, S.J. Positional importance of Pro53 adjacent to the Arg49-Gly50-Asp51 sequence of rhodostomin in binding to integrin α IIb β 3. *Biochem J.* 357: 57-64.

Charo, I.F.; Fitzgerald, L.A.; Steiner, B.; Rall, S.C. Jr; Bekeart, L.S.; Phillips, D.R. (1986) Platelet glycoproteins IIb and IIIa: evidence for a family of immunologically and structurally related glycoproteins in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 (21):8351-5.

Chavatte, P.; Farce, A. (2006) A computational view of COX-2 inhibition. *Anti-Cancer Ag. Med. Chem.* 6(3): 239-249.

Chaves, M.L.F. (2000) Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. *Ver. Bras. Hipertns.* 7(4): 372-82.

Chothia, C.; Lesk, A.M. (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5(4):823-6.

Chuang, W.J.; Wu, C.H.; Huang, H.N.; Chen, S.H.; Hsiao, G.; Lin, C.H.; Sheu, J.R. (2003) Comparison of the binding character of triflavin on resting and activated α (IIb) β (3) integrin in human platelets by electron microscopy. *Thromb Res.* 109(1):37-46.

Cidade, D.A.; Simão, T.A.; Dávila, A.M.; Wagner, G.; Junqueira-de-Azevedo, I.L.; Ho, P.L.; Bom, C.; Zingali, R.B.; Albano, R.M. (2006) *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon.* 48(4):437-61.

Cohen, N.C.; Blaney, J.M.; Humblet, C.; Gund, P.; Barry, D.C. (1990) Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* 33(3), 883-894.

Collins, F.S.; Green, E.D.; Guttmacher, A.E.; Guyer, M.S. (2003) US National Human Genome Research Institute. A vision for the future of genomics research. *Nature.* 422(6934):835-47.

Cucchiara, B.; Ross, M. (2008) Transient Ischemic Attack: Risk Stratification and Treatment. *Annals of Emergency Medicine*, 52(2): S27-S39.

Cunha, A.C.; Figueiredo, J.M.; Tributino, J.L.M.; Miranda, A.L.P.; Castro, H.C.; Zingali, R.B.; Mansour, C.A.; Souza, M.C.B.V.; Ferreira, V. F.; Barreiro, E.J. (2003) Antiplatelet Properties of Novel N-Substituted-phenyl-1,2,3- triazole-4-acylhydrazone Derivatives. *Biorg. Med. Chem.* 11(9):2051-2059.

DATASUS (2004) Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/idb>>. Acesso em junho de 2008.

Deutsch V.R.; Tomer A. (2006) Megakaryocyte development and platelet production. *Br. J. Haematol.* 134(5): 453-466.

Dogné, J.M.; de Leval, X.; Benoit, P.; Delarge, J.; Masereel, B. (2002) Thromboxane A2 inhibition: therapeutic potential in bronchial asthma. *Am J Respir Med.* 1(1):11-7.

Eikelboom, J.W.; Hirsh, J.; Weitz, J.I.; Johnston, M.; Yi, Q.; Yusuf, S. (2002) Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation.* 105(14):1650-1655.

Falcieri, E.; Bassini, A.; Pierpaoli, S.; Luchetti, F.; Zamai, L.; Vitale, M.; Guidotti, L.; Zauli, G. (2000) Ultrastructural characterization of maturation, platelet release and senescence of human cultured megakaryocytes. *Anat. Rec.* 258(1): 90-99.

Farré, A.L.; Caramelo, C.; Casado, S. (1995) Nuevos mecanismos antiagregantes y vasodilatadores inducidos por la aspirina. *Nefrología.* 15(4): 315-318.

Foresman, J.B.; Frisch, A.E. (1993) Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods: A Guide to Using Gaussian. Gaussian, Inc, USA.

Fournier, A.; Pruna, A.; Esper, N.E.; Makdassi, R.; Oprisiu, R.; Westeel, P.F.; Mazouz, H.; Achard, J.M. (2000) Captopril prevention project--what shall we do about captopril and the risk of stroke? *Nephrol Dial Transplant.* 15(1):2-5.

Fraga, A.G.; Rodrigues, C.R.; de Miranda, A.L.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A. (2000) Synthesis and pharmacological evaluation of novel heterocyclic acylhydrazone derivatives, designed as PAF antagonists. *Eur J Pharm Sci.* 11(4):285-90.

Francischetti, I.M.; My-Pham, V.; Harrison, J.; Garfield, M.K.; Ribeiro, J.M. (2004) Bitis gabonica (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. *Gene.* 337:55-69.

Fujii, Y.; Okuda, D.; Fujimoto, Z.; Horii, K.; Morita, T.; Mizuno, H. (2003) Crystal structure of trimestatin, a disintegrin containing a cell adhesion recognition motif RGD. *J.Mol.Biol.* 332(5): 1115-1122.

Gearien, J.E. (1989) Receptor Site Theory. In: FOYE, W.O. Eds. Principles of Medical Chemistry. Philadelphia: Lea e Febiger, 6: 119-128.

Gentry, P.A. (2004) "Comparative aspects of blood coagulation". *Vet. J.* 168: 238-251.

Gladding, P.; Webster, M.; Ormiston, J.; Olsen, S.; White, H. (2008) Antiplatelet drug nonresponsiveness. *American Heart J.* 155:591-9.

Guex, N.; Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18(15):2714-2723.

Hansch, C.; Leo, A.; Mekapati, S.B.; Kurup, A. (2004) QSAR and ADME. *Bioorg. Med. Chem.* 12 3391-3400.

Hartwig, J.H. (2002) Platelet structure. In: MICHELSON, A. D. Platelets. California: Academic Press.

Hartwig, J.H.; Italiano, J.E. (2006) Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood cells mol. Dis.* 36(2): 99-103.

Hennerici, M.G.; Kay, R.; Bogousslavsky, J.; Lenzi, J.L.; Verstraete, M.; Orgogozo, J.M.; *et. al.*, (2006) Intravenous ancrod for acute ischaemic stroke in the European Stroke Treatment with Ancrod Trial: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 368 (9550): 1871-1878.

Hong, S.Y.; Koh, Y.S.; Chung, K.H.; Kim, D.S. (2002) Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration. *Thromb. Res.* 105: 79–86.

Hou, T.; Wang, J.; Zahng, W.; Zhang, W.; Xiaojie, X. (2007) ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification. *J. Chem. Inf. Model.* 47(1):208 -218.

Humphries, M.J. (2000) Integrin Structure. *Biochem. Soc. Trans.* 28(4): 311-339.

Italiano, J.E.; Shivdasani, R.A. (2003) Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets". *J. Thromb. Haemost.* 1(6): 1174-1182.

Jiang, Z. (2008) Computational analysis of the interaction between ligand-receptor pairs. *Curr Pharm Des.* 14(6):588-92.

Jin, Y.R.; Cho, M.R.; Ryu, C.K.; Chung, J.H.; Yuk, D.Y.; Hong, J.T.; Lee, K.S.; Lee, J.J.; Lee, M.Y.; Lim, Y.; Yun, Y.P. (2005) Antiplatelet activity of J78 (2-Chloro-3-[2'-bromo, 4'-fluoro-phenyl]-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone), an antithrombotic agent, is mediated by thromboxane (TX) A2 receptor blockade with TXA2 synthase inhibition and suppression of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *J Pharmacol Exp Ther.* 312(1):214-9.

Jorgensen, W.L. (2004) The Many Roles of Computation in Drug Discovery *Science.* 303(5665): 1813-1818.

Jung, S.M.; Takemura, Y.; Imamura, Y.; Hayashi, T.; Adachi, E.; Moroi, M. (2008) Collagen-type specificity of glycoprotein VI as a determinant of platelet adhesion. *Platelets.* 19(1):32-42.

Kang, I.C.; Chung, K.H.; Lee, S.J.; Yun, Y.; Moon, H.M.; Kim, D.S. (1998) Purification and molecular cloning of a platelet aggregation inhibitor from the snake (*Agkistrodon halys brevicaudus*) venom. *Thromb. Res.* 91 (2): 65–73.

Kasirer-Friede, A.; Kahn M.L.; Shattil, S .J. (2007) Platelet integrins and immunoreceptors *Immunol Rev.* 218:247-64.

Kato, K.; Kanaji, T.; Russell, S.; Kunicki, T.J.; Furihata, K.; Kanaji, S.; Marchese, P.; Reininger, A.; Ruggeri, Z.M.; Ware J. (2003) The contribution of glycoprotein VI to

stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion". *Blood*. 102:1701-1707.

Katzung, B.G. (2002) *Farmacologia Básica e Clínica*. 6ed., Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro.

Khan, M.T.; Sylte, I. (2007) Predictive QSAR Modeling for the Successful Predictions of the ADMET Properties of Candidate Drug Molecules. *Curr. Drug. Discov. Technol.* 4(3):141-149.

Kim, J.; Hong, S.Y.; Park, H.; kim D.S.; Lee, W. (2004) Structure and function of RGD peptides derived from disintegrin proteins. *Molecules and Cells*. 19(2) 205 – 211.

Kitazoe, Y.; Kishino, H.; Hasegawa, M.; Nakajima, N.; Thorne, J.L.; Tanaka, M. (2008) Adaptive threonine increase in transmembrane regions of mitochondrial proteins in higher primates. *PLoS ONE*. 3(10):e3343.

Komotar, R.J.; Kim, G.H.; Otten, M.L.; Hassid, B.; Mocco, J.; Sughrue, M.E.; Starke, R.M.; Mack, W.J.; Ducruet, A.F.; Merkow, M.B.; Garrett, M.C.; Connolly, E.S. (2008) The role of complement in stroke therapy. *Adv Exp Med Biol*. 632:23-33.

Kontoyianni, M.; McClellan, L.M.; Sokol, G.S. (2004) Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. *J. Med. Chem.* 47(3):558-565.

Lall, M.S.; Jain, R.P.; Vederas, J.C. (2004) Inhibitors of 3C cysteine proteinases from Picornaviridae. *Curr Top Med Chem*. 4(12):1239-53.

Laskowski, R.A.; Macarthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structure. *J. Appl. Cryst.* 26: 283-291.

Leach, A.R. (1996) *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Addison Wesley Longman, London.

Lee, T.H.; Hsu, W.C.; Chen, C.J.; Chen, S.T. (2002) Etiologic study of young ischemic stroke in Taiwan. *Stroke* 33:1950-1955.

Lima, L.M.; Frattani, F.S.; Dos Santos, J.L.; Castro, H.C.; Fraga, C.A.; Zingali, R.B.; Barreiro, E.J. (2008) Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. *Eur J Med Chem*. 43(2):348-56.

Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46(1-3):3-26.

Lombardino, J.G.; Lowe III, J.A. (2004) The role of the medicinal chemist in drug discovery – then and now. *Nat Rev Drug Discov*. 3(10):853-62.

Mahy, J.P.; Gaspar, S.; Delaforge, M.; Mansuy, D. (1994) Reactions of prostaglandin H synthase with monosubstituted hydrazines and diazenes. Formation of iron(II)-diazene and iron(II)-o-alkyl or iron(II)-o-aryl complexes. *Eur. J. Biochem.* 226: 445-457.

Marcinkiewicz, C. (2005) Functional characteristics of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication. *Curr. Pharm. Des.* 11: 815-827.

Maruyama, T.; Kawasaki, Y.; Sakai, Y.; Taniuchi, M.; Shimizu, H.; Kawashima, T.; (1997) Isolation and Amino Acid Sequence of Flavostatin, a Novel Disintegrin From the Venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *Peptides* 18(568): 73-78.

McLane, M.A.; Sanchez, E.E.; Wong, A.; Paquette-Straub, C.; Perez, J.C. (2004) Disintegrins. *Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 4(4):327-55.

McLane, M.A.; Marcinkiewicz, C.; Vijay-Kumar, S.; Wierzbocka-Patynowski, I.; Niewiarowski, S. (1998) Viper venom disintegrins and related molecules. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 219(2): 109-119.

Meadows, T.A.; Bhatt, D.L. (2007) Clinical Aspects of Platelet Inhibitors and Thrombus Formation. *Circ. Res.* 100: 1261-1275.

Meek, P.J.; Liu, Z.; Tian, L.; Wang, C.Y.; Welsh, W.J.; Zauhar, R.J. (2006) Shape Signatures: speeding up computer-aided drug discovery, *Drug Disc. Today* 11 (19/20): 895-904.

Moustafa, R.R.; Baron, J.C. (2008) Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery *British Journal of Pharmacology* 153: S44-S54.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (2006) Harper: Bioquímica Ilustrada. 26ed., ed. Atheneu, São Paulo.

Nakahata, N. (2008) Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, 118(1): 18-35.

Nieswandt, B.; Watson, S.P. (2003) Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood.* 102(2): 449-461.

Ofori, F.A.; Nyarko, K.A. (2000) Human platelet thrombin receptors. Roles in platelet activation. *Hematol Oncol Clin North Am.* 14(5):1185-98.

Okuda, D.; Morita, T. (2001) Purification and Characterization of a New RGD/KGD-Containing Dimeric Disintegrin, Piscivostatin, from the Venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*: The Unique Effect of Piscivostatin on Platelet Aggregation. *J. Biochem.* 130(3): 407-415.

Ooms, F.; (2000) Molecular Modeling and Computer Aided Drug Design. Examples of their applications in Medicinal Chemistry. *Curr. Med. Chem.* 7(2): 141-158.

Pajouhesh, H.; Lenz, G.R. (2005) Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx*. 2(4): 541-553.

Patrick, G.L. (2001) An Introduction to Medicinal Chemistry, 2nd ed., Oxford University Press: Oxford.

Pereira, D.G. (2007) The importance of metabolism in drug design. *Quím. Nova*. 1:171-177.

Pires, S.L.; Gagliardi, R.; Gorzoni, M.L. *et al.* (2004) Estudo das freqüências dos principais fatores de risco para o Acidente Vascular Cerebral isquêmico em idosos, *Arq. Neuro. Psiquiatr.* 62(3b):p.740-745.

Prévost, N.; Kato, H.; Bodin, L.; Shattil, S.J. (2007) Platelet Integrin Adhesive Functions and Signaling. *Methods Enzymol.* 426: 103–115.

Rahman, S.; Aitken, A.; Flynn, G.; Formstone, C.; Savidge, G.F. (1998) Modulation of RGD sequence motifs regulates disintegrin recognition of α IIb β 3 and α 5 β 1 integrin complexes. *Biochem. J.* 335: 247-257.

Ramos, O.H.P. (2006) Desintegrinas de *Bothrops alternatus*: biologia molecular, estudos *in vitro*, *in vivo* e bioinformática estrutural. São Carlos, Tese Doutorado, Programa de Pós-graduação em genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos.

Romeiro, N.C.; Albuquerque, M. G.; Alencastro, R.B.; Ravi, M.; Hopfinger, A.J. (2006) Free-energy force-field three-dimensional quantitative analysis of a set of p38-mitogen activated protein kinase inhibitors. *Journal of Molecular Modeling*, 12: 855-868.

Rosenberg, R.D. (2001) Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states: Clinic utility of activation peptide assays in predicting thrombotic events in different clinical populations. *Thromb. Haemost.* 86: 41–50.

Sant'anna, C.M.R. (2002) Glossário de Termos Usados no Planejamento de Fármacos. *Quim. Nova* 25(3): 505-512.

Santos Filho, O.A.; Alencastro, R.B. (2003) Modelagem de proteína por homologia. *Quim. Nova*. 26(2): 253-259.

Santos, A.C.S. (2002) Estudo Semi-Empírico da Interação de 20-hidroxicdisona e seus Agonistas Sintéticos com Modelos de Homologia de Receptores de Ecdisteróide (EcR). Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Schaffner, P.; Dard, M.M. (2003) Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cell Mol Life Sci.* 60(1):119-32.

Schulze, H.; Shivasani, R.A. (2005) Mechanisms of thrombopoiesis. *J. Thromb. Haemos.* 3(8): 1717-1724.

SBDCV, Sociedade Brasileira de doenças cerebrovasculares. (2001) Primeiro consenso brasileiro do tratamento da fase aguda do acidente vascular cerebral. São Paulo.

Shah, H; Gondek, K. (2003) Aspirin plus extended – release dipyridamole or Clopidogrel compared with aspirin monotherapy for prevention of recurrent ischemic stroke: a cost effectiveness analysis. In: Piedade, P.R. *et. al.* Platelet aggregation test: applicant in the control of antiplatelet aggregation in the secondary prevention of stroke. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 61(3b): 764-7.

Silva, G .A.; Costa, L .M.; Brito, F .C.; Miranda, A .L.; Barreiro, E .J.; Fraga, C .A. (2004) New class of potent antinociceptive and antiplatelet 10H-phenothiazine-1-acylhydrazone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 12(12): 3149-58.

Silva, F.C.; Souza, M.C.B.V.; Frugulhetti, I.C.P.P.; Castro, H.C.; Souza, S.L.O.; Souza, T.M.L.; Rodrigues, D.Q.; Souza, A.M.T.; Abreu, P.A.; Passamani, F.; Rodrigues, C.R.; Ferreira, V.F. (2009) Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates. *Eur. J. Med. Chem.* 44 (1): 373-83.

Silvermann, R.B. (1992) The Organic Chemistry of Drug Design and Action. California. Academic Press, Inc.

Smith, W.B. (1996) Introduction to Theoretical Organic Chemistry and Molecular Modeling Wiley-VCH Publishers, New York.

Sobolev, V.; Sorokine, A.; Prilusky, J.; Abola, E.E.; Edelman, M. (1999) Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics* 15(4): 327-332.

Souza, A.M.T. (2007) Aplicação De Métodos Computacionais No Estudo da Relação Estrutura-Atividade E Perfil Toxicológico De Novos Compostos Antiparasitários e Antimicobacterianos. Rio de Janeiro, Tese Doutorado, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense.

Stephanie, R.; White-Bateman, H.; Schumacher, C.; Sacco, R.L.; Appelbaum, P.S. (2007) Consent for Intravenous Thrombolysis in Acute Stroke. *Arch Neurol.* 64: 785-792.

Strong, K.; Mathers, C.; Bonita, R. (2007) Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol.* 6(2):182-187.

Strub, C.; Alies, C.; Lougarre, A.; Ladurantie, C.; Czaplicki, J.; Fournier, D. (2004) Mutation of exposed hydrophobic amino acids to arginine to increase protein stability. *BMC Biochem.* 5(9): 1-6.

Taoufik, E .; Probert, L. (2008) Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des.* 14(33):3565-73.

Tekto, I.V. Computing chemistry on the web. *Drug Discovery Today* 10(22): 1497-1500.

Thompson, J.D.; Hidding, D.G.; Gibson, T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673-80.

Tourmousoglou, C.E.; Rokkas, C.K. (2008) Clopidogrel and aspirin in cardiovascular medicine: responders or not – current best available evidence. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 6(4):312-22.

Troullier, P.; Olliaro, P.; Orbinski, J.; Laing, R.; Ford, N. (2002) Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public health policy failure. *The Lancet.* 359: 2188-2194.

Undas, A.; Brummel-Ziedins, K.E.; Mann, K.G. (2007) Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions” *Blood.* 109(6): 2285-2292.

Verli, H.; Albuquerque, M.G.; Alencastro, R.B.; Barreiro, E.J. (2002) Local intersection volume: a new 3D descriptor applied to develop a 3D-QSAR pharmacophore model for benzodiazepine receptor ligands. *Eur. J. Med. Chem.* 37(3):219-229.

Veselovsky, A.V.; Ivanov, A.S. (2003) Strategy of Computer-aided drug design. *Curr. Drug. Targets. Infect. Disord.* 3(1)33-40.

Voorhees, P.M.; Orłowski, R.Z. (2006) The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:189-213.

Weisel, J.W. (2005) Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem.* 70:247–299.

Wermelinger, L.S.; Frattani, F.S.; Geraldo R.B.; Juliano, M.A.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B. (2007) Snake venom disintegrins and their derived-peptides - structural and biological. In: 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro- RJ.

Wolberg, A.S.; Campbell, R.A. (2008) Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus Apher Sci.* 38(1):15-23.

Wohner, N. (2008) Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 6(3):224-8.

Wu, K.K.; Matijevic-Aleksic, N. (2005) Molecular aspects of thrombosis and antithrombotic drugs. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 42(3): 249-77.

Xiao, T.; Takagi, J.; Collier, B.S.; Wang, J.H.; Springer T.A. (2004) Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature.* 432(7013):59-67.

Xiong, J.P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D.L.; Joachimiak, A.; Goodman, S.L.; Arnaout, M.A. (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$. *Science*. 294: 339-345.

Zimmermann, N., Hohlfeld, T. (2008) Clinical implications of aspirin resistance. *Thromb Haemost.* 100(3):379-389.

Zingali, R.B., Ferreira, M.S., Assafim, M., Frattani, F.S., Monteiro, R.Q. (2005) Bothrojaracin, a Bothrops jararaca snake venom-derived (pro)thrombin inhibitor, as an anti-thrombotic molecule. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 34(4-5):160-163.

8. Apêndices

8.1 - Artigo 1: Integrin inhibitors from snake venom: Exploring the relationship between the structure and activity of RGD-peptides

Aceito em dezembro 2008 na revista *Archives of Biochemistry and Biophysics*.

8.2 - Artigo 2: Biological evaluation and SAR study of a series of platelet antagonists of N'-benzylidene-carbohydrazone derivatives

Submetido em dezembro 2008 na revista *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.

8.3 - Artigo 3: Synthesis and Antiplatelet Evaluation of Novel N-Arylamino-5-Methyl-1H-[1,2,3]-triazole-4-carboxylic Acid Hydrazides

Submetido em dezembro 2008 na revista *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)