

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Estudos funcionais e cristalográficos da interação de
análogos de suramina com α -trombina humana**

Maria Thereza Cargnelutti do Carmo

Rio de Janeiro
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Maria Thereza Cargnelutti do Carmo

Estudos funcionais e cristalográficos da interação de análogos de suramina com α -trombina humana

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Química Biológica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Orientador: Prof. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima

Co-orientador: Prof. Robson de Queiroz Monteiro

Rio de Janeiro
2009

C287e

Carmo, Maria Thereza Cargnelutti do..

Estudos funcionais e cristalográficos da interação de análogos de Suramina com α -trombina humana / Maria Thereza Cargnelutti do Carmo; orientadores Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima, Robson de Queiroz Monteiro. – Rio de Janeiro : UFRJ, Instituto de Bioquímica Médica, 2009.

xvi, 137f. : il. (algumas col.) ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Química biológica) – UFRJ/ Instituto de Bioquímica Médica, 2009.

Inclui bibliografia.

1. α -Trombina humana. 2. Análogos de suramina. 3. Atividade enzimática. I. Lima, Luís Maurício Trambaioli da Rocha. II. Monteiro, Robson de Queiroz. III. Título.

CDD 615.718

Maria Thereza Cargnelutti do Carmo

Estudos funcionais e cristalográficos da interação de análogos de suramina com α -trombina humana

Dissertação submetida ao corpo docente do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Rio de Janeiro, 14 de Setembro de 2009.

Banca examinadora:

Prof. Carlos Rangel Rodrigues

Professor Associado da Universidade Federal do Rio de Janeiro e Diretor da Faculdade de Farmácia, UFRJ, RJ.

Prof. Ronaldo da Silva Mohana Borges

Professor Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, RJ.

Prof^a. Russolina Benedeta Zingali

Professora Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, RJ.

Prof^a. Ana Paula Canedo Valente

Professora Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, RJ. (Revisora e suplente interna)

Prof^a. Yraima Moura Lopes Cordeiro

Professora Adjunta da Faculdade de Farmácia, UFRJ, RJ. (Suplente externa)

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Luís Maurício, pelos ensinamentos desses 4 anos que se iniciaram quando eu estava na graduação e me tornei sua aluna de Iniciação Científica. Por ser paciente, compreensivo e por acreditar em mim, depositando confiança desde o início.

Ao meu co-orientador, Prof. Robson Monteiro, por me ajudar nas purificações de trombina, disponibilizando seu tempo e seu laboratório e por me ajudar a enxergar meus resultados de forma mais interessante.

A Professores que aceitaram participar da banca de avaliação dessa dissertação: Carlos Rangel, Ronaldo Mohana, Russolina Zingali, Yraima Cordeiro e Ana Paula Valente que também foi a revisora da dissertação e me deu várias sugestões que ajudaram a melhorar meu texto.

Ao pessoal do Laboratório que tantas vezes incomodei para que me ajudassem a pegar N_2 , que fazem o dia-a-dia ser mais divertido, que me tiram várias dúvidas e que passam (ou passaram) pelas mesmas coisas que eu, fazendo com que eu não me sinta sozinha nas minhas agonias. São vocês: Cynthia, Camile, Nathalia, Luiz Henrique, Maely, Vivian, Léo, Raquel e especialmente a Adriana que me atura todo dia, ouve meus desabafos, me esclarece várias coisas, me conta suas aventuras e me ensina com elas.

Á Profa Sheila e ao Prof. Luís Maurício, mais uma vez, por manterem o Laboratório com seus trabalhos de pesquisa, e por serem além de professores e pesquisadores, os ``gestores`` do Laboratório.

Aos amigos: Paula, Ridan, Fernanda e Chico. Meus momentos de lazer são muito mais legais quando estamos juntos. Obrigada pelo apoio, por me fazerem esquecer as coisas ruins e por me proporcionar momentos maravilhosos que vou lembrar para toda a vida.

À minha família que mesmo sem entender nada sobre meu trabalho, me apóia, me ensina, me trouxe até aqui e ainda vai me levar mais longe. OBRIGADA especial ao meu pai e à minha mãe que estão ao meu lado em todas as horas, aguentando o meu mau-humor quase diário.

Ao meu noivo, Thiago, que me faz continuar, me incentiva, que se orgulha, que dormiu noites com a luz acesa enquanto eu escrevia e nem reclamou! Que também aguenta meu mau-humor e mesmo assim me ama. Eu também Thi amo!

“A natureza reservou para si tanta
liberdade que não a podemos nunca
penetrar completamente com o nosso
saber e a nossa ciência.”

Johann Wolfgang Von Goethe

Resumo

Cargnelutti, Maria Thereza. **Estudos funcionais e cristalográficos da interação de análogos de suramina com α -trombina humana**. Rio de Janeiro – 2009. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Atualmente doenças relacionadas ao sistema cardiovascular são muito comumente causas de morte e invalidez ao redor do mundo. Essas doenças envolvem trombozes arteriais e venosas. O tratamento das trombozes consiste no uso de fármacos anticoagulantes e antiplaquetários. O principal fator limitante desse tratamento é o efeito adverso de sangramento. A trombina (α Th) é uma serinoprotease do sistema hemostático. Ela promove a catálise chave desse processo que é a clivagem do fibrinogênio em fibrina. Já foi demonstrado que o fármaco suramina (SVR) é capaz de inibir a atividade enzimática de trombina sobre fibrinogênio e a ocorrência de dois eventos distintos quando essas duas moléculas interagem. Na pesquisa desenvolvida por nosso grupo anteriormente, foi observada a presença de contatos cristalinos promovidos pela molécula de SVR e as moléculas de proteína simetricamente relacionadas, além de dimerização da enzima na presença SVR. Nesse trabalho investigamos o comportamento da enzima diante de análogos de SVR. Realizamos ensaios de atividade enzimática de α Th sobre fibrinogênio humano. A maioria dos compostos, inclusive a SVR, ativou a enzima antes de inibi-la. Em paralelo, cristalizamos complexos de α Th com os análogos de SVR. α Th:NF258 apresentou mudanças conformacionais ao redor do sítio catalítico, indicando a atuação de ligante alostérico sobre a enzima. Estudos cristalográficos conduzidos com complexos de trombina:análogos de suramina permitiram a solução de conformações de proteínas dissimilares. Duas estruturas de α Th:NF151 ainda estão em refinamento. Os dados mostrados aqui juntamente com trabalhos anteriores sugerem que SVR e seus análogos formam complexos $[\alpha$ Th:ligante]₁, que ativam a enzima em baixas concentrações na faixa μ M e, em altas concentrações, ainda na faixa μ M, são capazes de inibir α Th devido à oligomerização da enzima em complexos $[\alpha$ Th:ligante]₂, caracterizando o comportamento bimodal sobre atividade catalítica promovida por esses compostos.

Abstract

Cargnelutti, Maria Thereza. **Estudos funcionais e cristalográficos da interação de análogos de suramina com α -trombina humana**. Rio de Janeiro – 2009. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Nowadays, diseases related to the cardiovascular system are usually causes of death and disability around the world. These diseases involve arterial and venous thrombosis. The treatments of thrombosis consist in the use of anticoagulants and antiplatelets drugs. The main limiting factor of this treatment is the side effect of bleeding. Thrombin (α Th) is a serine protease of the hemostatic system. It promotes the key catalysis of this process, that is the cleavage of fibrinogen in fibrin. It was already demonstrated that the drug suramin (SVR) is capable of inhibiting thrombin enzymatic activity upon fibrinogen and the event of two distinct effects when these two molecules interact. In the research developed by our group previously, was observed the presence of crystalline contacts promoted by the SVR molecule and the symmetric related protein molecules, besides enzyme dimerization in the presence of SVR. In this work, we investigate the behavior of the enzyme in front of SVR analogues. We performed enzymatic activity assays of α Th upon human fibrinogen. Most of the compound, including SVR, activated the enzyme before inhibiting it. In parallel, we crystallized complexes of α Th with SVR analogues. α Th:NF258 showed conformational changes around the catalytic site, indicating the action of an allosteric ligand upon the enzyme. Crystallographic studies conducted with complexes of thrombin:suramin analogues allowed the solution of dissimilar protein conformations. Two structures of α Th:NF151 are still under refinement. The data showed here together with previously works suggest that SVR and its analogous form $[\alpha$ Th:ligante]₁ complexes which activate the enzyme under low concentrations in the μ M range, and in high concentration, still in the μ M range, they are capable of inhibiting α Th because of the oligomerization of the enzyme in $[\alpha$ Th:ligante]₂ complexes, characterizing the bimodal behavior upon the catalytic activity promoted by these compounds.

Lista de Figuras

Figura 1. Tabela da Organização Panamericana da Saúde (OPS).....	1
Figura 2. Ilustrações de placas de ateroma.....	3
Figura 3. Plaqueta (fragmento anucleado de megacariócito), receptores e ligantes.....	7
Figura 4. Ilustração da atividade resumida do sistema hemostático quando um vaso é lesionado.....	8
Figura 5. Cascata de coagulação proposta na década de 1960.....	9
Figura 6. Cascata de coagulação proposto na década de 1990.....	11
Figura 7. Representação dos complexos procoagulantes.....	12
Figura 8. Esquema representativo do mecanismo anticoagulante da proteína C ativada (PCa).....	13
Figura 9. Representação esquemática da regulação da fibrinólise.....	14
Figura 10. Representação da estrutura cristalográfica de α Th humana inibida por FPRCK (Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) depositada no <i>Protein Data Bank</i> (PDB) sob o código 1PPB.....	19
Figura 11. Representação esquemática da superfície acessível ao solvente da molécula de trombina com a localização dos seus sítios e detalhe estrutural de um sítio de Na^+ típico.....	21
Figura 12. Complexo ternário formado por antitrombina-heparina-trombina.....	22
Figura 13. Interações da heparina com as moléculas de trombina e antitrombina.....	23
Figura 14. Visão do ambiente de ligação do Na^+ nas estruturas de trombina rápida (azul – 1SFQ) e lenta (verde – 1SHH).....	24
Figura 15. Visão dos mapas de densidade eletrônica preenchidos na região de mudança estrutural mais significativa ao redor da região de interação do Na^+	25
Figura 16. Estrutura planar da suramina.....	26
Figura 17. Efeito da suramina na atividade catalítica de α Th sobre fibrinogênio.....	28
Figura 18. Espectros de dicroísmo circular de α Th com SVR.....	28
Figura 19. Calorimetria de titulação isotérmica da interação de SVR com α Th.....	29
Figura 20. Representação da estrutura cristalográfica do complexo α Th:SVR.....	30
Figura 21. Detalhe dos contatos entre SVR (carbonos em verde) e α Th (carbonos em cinza).....	31
Figura 22. Região polar da estrutura cristalográfica próxima a grupamento metil da SVR.....	32
Figura 23. Representação de potencial eletrostático de superfície de α Th após 10 ns de simulação de DM em solução.....	33

Figura 24. Tabela derivada de experimento de SAXS no trabalho publicado por Lima <i>et al.</i> , 2009.....	33
Figura 25. Perfil típico de eluição da coluna Heparina-Sepharose resultado da aplicação de gradiente de sal.....	38
Figura 26. SDS-PAGE 15% da purificação de α Th.....	39
Figura 27. Exemplo de experimento de atividade enzimática.....	41
Figura 28. Exemplo de curva de absorvância.....	42
Figura 29. Diagrama de fases para cristalização mediada por precipitante.....	44
Figura 30. Esquema da placa utilizada no método <i>sitting-drop</i>	45
Figura 31. Esquema demonstrando o aparato utilizado para cristalização de proteínas pelo método <i>hanging-drop</i>	46
Figura 32. Esquema da coleta do cristal com transferência para solução crioprotetora.....	48
Figura 33. Fotos do processo de coleta de cristal.....	49
Figura 34. Algumas formas de dividir a rede cristalina em células unitárias.....	50
Figura 35. Célula unitária (triclínica) geral com as margens a, b e c e os ângulos α , β e γ	50
Figura 36. Sistemas cristalinos e suas propriedades geométricas.....	51
Figura 37. Exemplo de imagem de difração de um cristal de proteína.....	53
Figura 38. Representação de coleta de imagens.....	54
Figura 39. Esquema do equipamento utilizado nas linha de raio-X.....	55
Figura 40. Fotos de equipamentos usados para difração dos cristais.....	56
Figura 42. Esquema de um experimento de difração.....	57
Figura 42. Esquema da definição de ângulo de fase (α).....	58
Figura 43. Estrutura geral dos análogos da Série 1 e 2.....	61
Figura 44. Estrutura geral de alguns análogos compactados.....	61
Figura 45. Estruturas dos análogos da Série 3.....	61
Figura 46. Efeito de concentrações crescentes dos compostos da Série 1 na atividade catalítica de α Th sobre fibrinogênio.....	62
Figura 47. Efeito de concentrações crescentes dos compostos da Série 2 na atividade catalítica de α Th sobre fibrinogênio.....	63
Figura 48. Efeito de concentrações crescentes dos compostos da Série 3 na atividade catalítica de α Th sobre fibrinogênio.....	64

Figura 49. Efeito de concentrações crescentes de análogos de SVR na atividade catalítica de α Th (1 nM) sobre fibrinogênio humano (2 mg/mL).....	67
Figura 50. Fotos de alguns cristais obtidos em nossos ensaios.....	70
Figura 51. Sítio de ligação de Na^+ nas três estruturas que entraram em processo de refinamento.....	73
Figura 52. Imagens de difração do cristal que foi usado na resolução da estrutura α Th:NF258.....	74
Figura 53. Estruturas sobrepostas de α Th:NF258 (vermelho) e α Th humana de código 1PPB (verde).....	76
Figura 54. Gráficos de RMSD (alinhamento entra α Th:NF258 e α Th de 1PPB) por aminoácidos com os 3 grupos de aminoácidos que apresentaram RMSD maior que $1,0^\circ$	77
Figura 55. Estruturas sobrepostas de α Th:NF258 e α Th humana de código 1PPB. Destaque para o grupo 1 de aminoácidos.....	78
Figura 56. Estrutura de α Th:NF258 contornada pelos mapas de densidade eletrônica $2F_o-F_c$ a $1,0\sigma$ (azul) e F_o-F_c a $3,00\sigma$ (verde – pico positivo e vermelho – pico negativo).....	78
Figura 57. Estruturas sobrepostas de α Th:NF258 e α Th humana de código 1PPB. Destaque para o grupo 2 de aminoácidos.....	79
Figura 58. Estrutura de α Th:NF258 contornada pelos mapas de densidade eletrônica $2F_o-F_c$ a $1,0\sigma$ (azul) e F_o-F_c a $3,0\sigma$ (verde – pico positivo e vermelho – pico negativo).....	80
Figura 59. Estruturas sobrepostas de α Th:NF258 e α Th humana de código 1PPB. Destaque para o grupo 3 de aminoácidos.....	81
Figura 60. Visão do sítio catalítico da α Th inibido por FPRCK (azul).....	82
Figura 61. Estrutura de α Th:NF258 com de densidade eletrônica não modelada próxima ao <i>loop</i> composto pelos aminoácidos do grupo 2.....	83
Figura 62. Imagem representativa do conjunto de dados de difração coletado para resolução da estrutura α Th:NF151 #1.....	84
Figura 63. Imagem representativa do conjunto de dados de difração coletado para resolução da estrutura α Th:NF151 #2.....	85
Figura 64. Densidade eletrônica não modelada na estrutura α Th:NF151 #1.....	87
Figura 65. Densidade eletrônica não modelada na estrutura α Th:NF151 #2.....	87
Figura 66. Gráfico de Atividade Relativa Máxima <i>versus</i> IC_{50} (μM). Análise dos compostos da Série 1 e 2.....	89
Figura 67. Esquema sugerido para explicação de componente de ativação seguido de componente de inibição no efeito de SVR e análogos na atividade de α Th sobre fibrinogênio.....	91

Lista de Tabelas

Tabela 1. Lista de tampões usados na purificação de α Th.....	39
Tabela 2. Análise quantitativa dos compostos da Série 1 e da SVR.....	65
Tabela 3. Análise quantitativa dos compostos da Série 2.....	65
Tabela 4. Análise quantitativa dos compostos da Série 3.....	66
Tabela 5. Cristalização dos complexos α Th:ligante usando kits da <i>Hampton Research</i>	69
Tabela 6. Informações resumidas sobre a qualidade dos cristais e os dados que obtivemos com eles.....	72
Tabela 7. Estatística de coleta e refinamento parcial dos dados de difração de raios-X do cristal de α Th:NF258.....	75
Tabela 8. Estatística de coleta e refinamento parcial dos dados de difração de raios-X do cristal de α Th:NF151 #1 e α Th:NF151 #2.....	86

Abreviaturas

2Fo-Fc	$2 F_{\text{observado}} - F_{\text{calculado}} $, onde F-fator de estrutura
α_{hkl}	Amplitude
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Ala	Alanina
ADP	Difosfato de adenosina
AR	Atividade relativa
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
AT	Antitrombina
α Th	α -Trombina humana
BaCl ₂	Cloreto de bário
Bis-ANS	4,4'-bis(1-anilinoftaleno 8-sulfonato)
BSA	Albumina sérica bovina (da sigla em inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAPM	Cinogênio de alto peso molecular
CD	Dicroísmo circular (do inglês <i>circular dichroism</i>)
COX	Ciclooxigenase
Cys	Cisteína
D _{máx}	Distância máxima
EC ₅₀	Concentração efetiva na metade da atividade máxima
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal (do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>)
EGTA	Ácido etileno glycol tetra-acético
EP	Embolia pulmonar
EPCR	Receptor endotelial de proteína C (do inglês <i>Endothelial PC Receptor</i>)
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos (do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i>)
Fo-Fc	$ F_{\text{observado}} - F_{\text{calculado}} $, onde F-fator de estrutura
FPRCK	Fenilalanina-Prolina-Arginina-Clorometilcetona
FT	Fator tecidual
FVW	Fator de von Willebrand
Gli	Glicina
Gln	Ácido glutâmico
Glu	Glutamina
HCS 1	<i>Hampton Crystal Screen 1</i>
HCS 2	<i>Hampton Crystal Screen 1</i>
His	Histidina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IBqM	Instituto de bioquímica médica
IC ₅₀	Concentração inibitória na metade da atividade máxima

Iso	Isoleucina
Leu	Leucina
LMWH	Heparina de baixo peso molecular (do inglês Low molecular weigh heparin)
LYS	Lisozima
Lys	Lisina
Met	Metionina
N ₂	Nitrogênio
PAI	Inibidor do ativador de plasminogênio (do inglês <i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>)
PAR	Receptor ativado por protease (do inglês <i>protein activated receptor</i>)
PC	Proteína C
Pca	Proteína C ativada
PDB	Banco de dados de proteína (Sigla do inglês <i>Protein Data Bank</i>)
PDB ID	Identidade no banco de dados de proteínas (do inglês <i>Protein data Bank Identity</i>)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta (do inglês Platelet-derived Growth Factor)
PEG	Polietilenoglicol
PGI ₂	Prostaciclina
Phe	Fenilalanina
PIS	<i>PEG Ion Screen</i>
PK	Pré-caliceína
PL	Fosfolípidos
Pro	Prolina
PS	Proteína S
R _g	Raio de giro
RMSD	Desvio médio quadrático (sigla do inglês <i>Root Mean Square Deviation</i>)
S-2238	Substrato cromogênico de trombina
Ser	Serina
SVR	Suramina (de acordo com o código imposto pelo <i>Protein Data Bank</i>)
TEV	Tromboembolismo venoso
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual (do inglês <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>)
TGF-α	Fator transformador de crescimento-α (do inglês <i>Transforming Growth Factor-α</i>)
TGF-β	Fator transformador de crescimento-β (do inglês <i>Transforming Growth Factor-β</i>)
Thr	Treonina
TM	Trombomodulina
t-PA	Ativador de plasminogênio tecidual
Tris	Hidroximetil aminometano
Trp	Triptofano
TVP	Trombose venosa profunda
TXA ₂	Tromboxano A ₂
Tyr	Tirosina
u-PA	Ativador de plasminogênio uroquinase
Val	Valina

Sumário

1 Introdução	1
1.1 Distúrbios de coagulação excessiva.....	1
1.1.1 Trombose arterial.....	2
1.1.2 Trombose venosa.....	3
1.2 Por trás dos distúrbios: a fisiologia da coagulação sanguínea.....	5
1.2.1 O papel das plaquetas.....	6
1.2.2 A Cascata de coagulação de 1964.....	7
1.2.3 O processo de coagulação moderno.....	10
1.2.4 A Regulação da coagulação.....	12
1.3 Tratamentos farmacológicos das trombozes.....	14
1.4 Trombina.....	18
1.5 Suramina.....	26
1.5.1 Atividade de suramina sobre α -trombina humana e interação entre elas.....	27
2 Objetivos gerais	34
2.1 Objetivos específicos.....	34
3 Material e métodos	35
3.1 Material.....	35
3.2 Métodos.....	36
3.2.1 Purificação de α Th.....	36
3.2.1.1 Fracionamento do plasma.....	36
3.2.1.2 Ativação da protrombina.....	37
3.2.1.3 Cromatografia de afinidade.....	37
3.2.1.4 Concentração e Quantificação.....	38
3.2.1.5 Avaliação da pureza e Estocagem.....	39
3.2.2 Atividade enzimática de α Th sobre fibrinogênio.....	40
3.2.3 Cristalografia.....	43
3.2.3.1 Cristalização.....	43
3.2.3.1.1 Alguns conceitos.....	43
3.2.3.1.2 Detalhes experimentais.....	46
3.2.3.2 Coleta e refriamento dos cristais.....	47
3.2.3.3 Difração.....	49
3.2.3.3.1 Alguns conceitos.....	49
3.2.3.3.2 Detalhes experimentais.....	55
3.2.3.4 Processamento das imagens de difração e resolução de estruturas.....	56
3.2.3.4.1 Alguns conceitos.....	56
3.2.3.4.2 Detalhes experimentais.....	58
4 Resultados	60
4.1 Atividade enzimática.....	60
4.2 Cristalografia.....	68
4.2.1 Cristalização.....	68
4.2.2 Difração e coleta de dados.....	71
4.2.3 Refinamento de estruturas.....	72
4.2.3.1 Sobre α Th:NF258.....	74
4.2.3.2 Sobre α Th:NF151 #1 e α Th:NF151 #2.....	83
5 Discussão	88
Referências bibliográficas	94
Anexo 1	100
Anexo 2	104
Anexo 3	108
Anexo 4	117
Anexo 5	126

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 DISTÚRBIOS DE COAGULAÇÃO EXCESSIVA

Atualmente doenças relacionadas ao aparelho cardiovascular são muito comumente causas de morte e invalidez (SHEN, 2006). Essas doenças envolvem trombose venosa e trombose arterial, que podem levar a tromboembolismo pulmonar e infarto, entre outras complicações (MACKMAN, 2008).

Índices brasileiros de mortalidade apontam para as doenças do aparelho cardiocirculatório como a principal causa de morte em 1996 (32,3% das causas de morte) e em 2004 (31,8% das causas de morte) (Figura 1). Nesses anos, nas 5 regiões do Brasil, essas doenças se destacaram das outras causas de morte por estarem sempre isoladas na primeira posição.

Essa seção será dedicada ao entendimento e ao tratamento das doenças causadas por coagulação excessiva, como a trombose venosa e a trombose arterial.

Grupos de Causas	Brasil		Norte		Nordeste		Sudeste		Sul		Centro-Oeste	
	1996	2004	1996	2004	1996	2004	1996	2004	1996	2004	1996	2004
Doenças infecciosas e parasitárias	6,8	5,1	9,2	7,3	8,6	6,0	6,6	4,9	4,6	4,0	8,1	5,5
Neoplasias	13,4	15,7	11,2	12,7	10,6	12,5	13,6	16,3	16,4	19,2	12,0	14,4
Doenças do sistema cardiocirculatório	32,3	31,8	24,1	24,3	29,9	30,9	33,3	32,7	34,7	33,1	28,9	30,8
Doenças do sistema respiratório	11,5	11,4	9,5	11,1	9,4	9,5	11,8	12,2	13,4	11,8	9,8	10,1
Doenças do feto e do recém-nascido	4,8	3,5	10,6	8,2	6,9	5,7	4,2	2,4	3,3	2,2	5,7	3,6
Causas externas	15,4	14,2	20,1	18,9	17,0	15,5	14,9	13,3	13,1	12,6	20,5	17,8
Outras causas definidas	15,7	18,3	15,3	17,6	17,7	19,9	15,6	18,2	14,6	17,1	15,1	17,8
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Fonte: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância da Saúde (SVS) – Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM).

Figura 1. Tabela da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Dados sobre os índices de mortalidade em função dos principais grupos de causas no Brasil. Fonte: Organización Panamericana de La Salud, 2008.

1.1.1 Trombose arterial

A trombose arterial normalmente se inicia com a ruptura de uma placa de ateroma. A placa de ateroma pode ser definida como uma placa fibro-ateromatosa localizada na camada íntima cujo núcleo é muito rico em lipídeos (fundamentalmente colesterol) e é limitada por uma capa fibrosa constituída de fibroblastos, colágeno, células musculares lisas, proteoglicanos, e outros. No núcleo (ou centro necrótico) há debris celulares, cálcio, cristais de colesterol derivado do sangue, além de grande quantidade de colesterol livre e esterificado. Ocorre também acúmulo de células espumosas (íntegras ou rotas) que são derivadas dos macrófagos (Figura 2A).

Num primeiro estágio as placas são escassas e distribuídas ao longo das artérias (geralmente de grande e médio calibre), mas com o avanço da doença se tornam mais freqüentes, crescem e comprometem o fluxo sanguíneo. No estágio mais complicado podem calcificar, ulcerar ou romper e liberar o conteúdo na circulação gerando microembolias e trombos.

Quando acontece a ruptura da placa (citada acima), processos procoagulantes são acionados para evitar a perda de sangue. O trombo arterial, derivado das ações procoagulantes que estão ocorrendo, se caracteriza por ser rico em plaquetas. As plaquetas são as responsáveis pelo tampão hemostático inicial. Elas aderem no endotélio, agregam, são ativadas recrutando mais plaquetas e logo começa o processo de coagulação com a formação de rede de fibrina (Figura 2B) (como descrito na seção seguinte).

A ação das plaquetas pode causar complicações nos vasos em questão. Uma vez a trombina atuado ou o colágeno endotelial exposto, as plaquetas secretam vários fatores de crescimento como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), EGF (fator de crescimento epidermal), TGF- α (fator transformador de crescimento- α), TGF- β (fator transformador de crescimento- β) (DUQUEL, 2003). Esses fatores agem como mitógenos potentes levando à proliferação das células musculares lisas e conseqüentemente adelgaçamento do endotélio (que pode romper novamente).

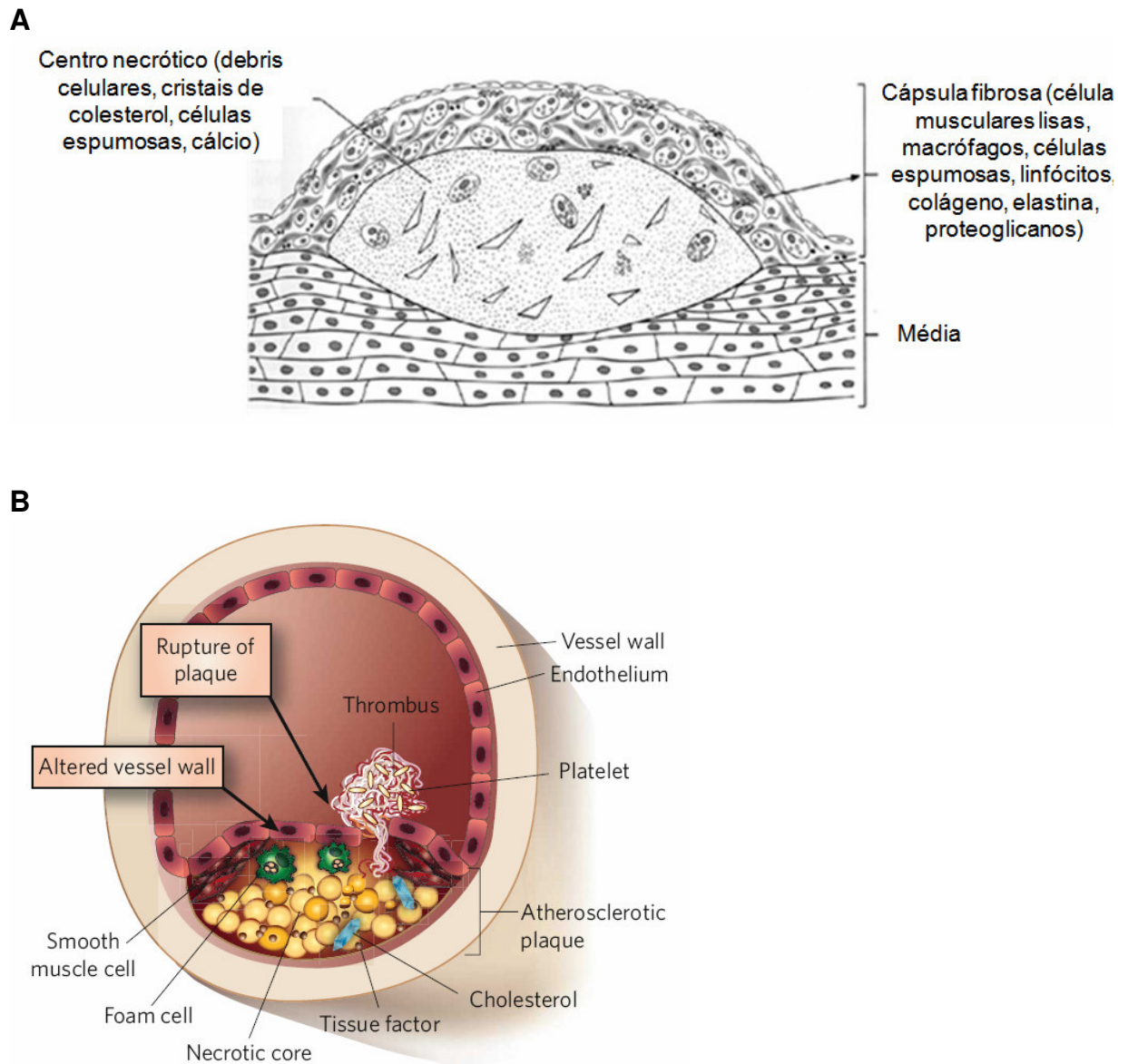


Figura 2. Ilustrações de placas de ateroma. A) Esquema de uma placa de ateroma detalhando o conteúdo do centro necrótico e da cápsula fibrosa. **B)** Esquema de uma artéria com placa de ateroma rompida e trombo (rico em plaquetas) formado.

1.1.2 Trombose venosa

A diferença mais marcante entre a trombose arterial e a venosa está no processo que inicia cada uma. Enquanto esse processo está bem definido para a trombose arterial, para a trombose venosa ainda não é muito claro, mas o que se sabe é que são bem diferentes (LOPÉZ & CHEN, 2009). O cerne do trombo arterial é formado pelas plaquetas, elas são os componentes celulares que se encontram mais próximos à

INTRODUÇÃO

parede do vaso sanguíneo, e a injúria do vaso é pré-requisito para o início da coagulação. Já no caso das trombozes venosas, a fibrina é a responsável pela adesão do trombo a parede vascular e só após ocorre a adesão das plaquetas ao trombo. Esse tem a característica de ser rico em hemácias presas pela rede de fibrina e por isso é conhecido como trombo vermelho (o trombo arterial é conhecido como trombo branco, por ser rico em plaquetas). Ao contrário do trombo arterial, o venoso não necessita que o vaso esteja lesionado para que se dê a sua formação. O gatilho para a trombose venosa pode ser uma mudança na composição do sangue (por causa de inflamação, por exemplo), fluxo sanguíneo reduzido (estase) e/ou alterações na parede do vaso.

A trombose venosa profunda (TVP) e a embolia pulmonar (EP) são designadas coletivamente com tromboembolismo venoso (TEV). A TVP costuma ocorrer nas veias profundas das pernas e podem complicar de tal modo que evoluem para a EP e, quando isso ocorre, o risco de morte é muito elevado em pacientes idosos.

O risco de desenvolvimento desses distúrbios da coagulação é acentuadamente aumentado a partir do 45 anos (CUSHMAN, 2007), com incidência maior em homens do que em mulheres (LILIENFELD, 2000) e ainda pode deixar um estado de debilitação crônico chamado de síndrome pós-trombótica (FEKRAZAD *et al.* 2009). Além da idade, existem fatores de risco exógenos para TEV, como cirurgias, hospitalização, imobilidade, trauma, gravidez e usos de hormônios. Existem também fatores endógenos como câncer, obesidade e algumas estados de hipercoagulação inerentes e adquiridos.

A estase (parada do fluxo sanguíneo) é capaz de ativar o tecido endotelial e isso é uma predisposição para desenvolver trombose. Pacientes acamados, hospitalizados e que passaram por certas cirurgias geralmente precisam passar por tratamento farmacológico profilático. A estase tem vários efeitos que causam o desequilíbrio entre os estados procoagulantes e anticoagulantes. Um deles é o fato de que o baixo fluxo do sangue faz com que se acumulem, em vasos de grande calibre, substâncias protrombóticas (como a trombina) que normalmente são "lavadas" para onde serão inativadas.

A estase também provoca rápida desnaturação da hemoglobina nos eritrócitos locais, desencadeando uma resposta à hipóxia pelos leucócitos, plaquetas e células endoteliais. A hipóxia poderá iniciar a trombose e isso acontece de várias maneiras. O

endotélio exposto a hipóxia começa, rapidamente, a expressar P-selectina de superfície (proteína de membrana), e a secreção de Fator de von Willebrand (FVW), maior e mais adesivo que o normal, acompanha essa expressão. Para inativar o FVW é necessário que o seu sítio de clivagem seja exposto através de seu desenovelamento pelo sangue que flui, se o fluxo for lento esse processo fica prejudicado. Além de favorecer a trombose, por causar hipóxia no endotélio ativando-o, a estase também permite que moléculas super adesivas permaneçam no local tempo suficiente para aderirem a plaquetas, leucócitos e eritrócitos (LOPÉZ & CHEN, 2009).

As P-selectinas produzidas também servem de âncora para que vesículas com grande quantidade de fator tecidual (FT), produzidas e liberadas em resposta à hipóxia, se fundam com a membrana da célula endotelial e das plaquetas, provocando a coagulação sequencial (DEL CONDE et al, 2005). Além desse evento, a hipóxia por si só estimula a síntese de FT nos monócitos (LAWSON *et al*, 1997).

Como citado anteriormente, o câncer também é um fator de risco para o desenvolvimento de trombose venosa, já que o paciente com câncer normalmente está exposto a vários fatores de risco ao mesmo tempo, incluindo infecções concomitantes, catéteres venosos, ou compressão vascular direta ou invasão por tumor. Os tumores podem liberar substâncias procoagulantes diretamente, ou sinalizar para que outras células (como monócitos, macrófagos ou células endoteliais) façam isso.

1.2 POR TRÁS DOS DISTÚRBIOS: A FISIOLOGIA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

O sistema de coagulação sanguínea é bastante complexo e precisa ser muito bem regulado para manter a fluidez do sangue, alternando entre ações procoagulantes e anticoagulantes. O bom funcionamento da circulação sanguínea depende do delicado equilíbrio que deve existir para impedir tanto a trombose quanto a hemorragia.

1.2.1 O papel das plaquetas

Quando um vaso é lesionado, ações pró-coagulantes predominam para evitar que haja perda excessiva de sangue. Num primeiro momento, plaquetas se aderem na região subendotelial do vaso através da interação de seus receptores $\alpha_2\beta_1$ -Integrina e glicoproteína Ib com colágeno exposto e com o fator de von Willebrand (molécula que adere a proteínas de membrana), respectivamente. Depois se agregam mediante ligação com fibrinogênio ou fibronectina no receptor do tipo integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, para formar um tampão hemostático no local (Figura 3). Nesse momento, as plaquetas também vão sendo ativadas. Dessa forma se dá a formação e o rápido crescimento do trombo (formação sólida no interior dos vasos resultada de agregação plaquetária e coagulação sanguínea) (MACKMAN, 2008).

A ligação da protease trombina (ativada pela cascata de coagulação) ao receptor PAR-1 (*Protease-Activated Receptor 1* – receptor ativado por protease 1) constitui a principal via de ativação plaquetária. Com esse processo, as plaquetas liberam o conteúdo dos grânulos presentes no seu interior para que outras plaquetas sejam recrutadas, aderidas, agregadas e ativadas. O conteúdo dos grânulos inclui entre outras substâncias tromboxano A_2 (TXA₂) e difosfato de adenosina (ADP), ambos também são capazes de promover a ativação plaquetária através de interação com seus respectivos receptores TXA₂R e P2Y₁₂ (Figura 3).

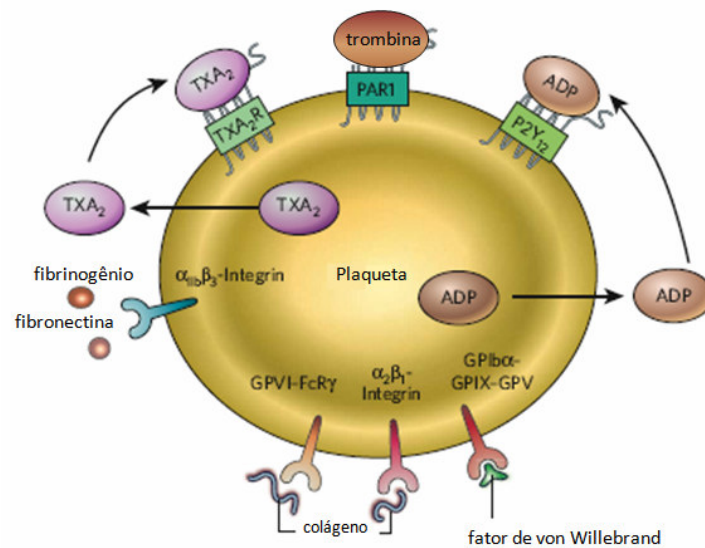


Figura 3. Plaqueta (fragmento nucleado de megacariócito), receptores e ligantes. Receptores responsáveis pela ativação (tons de verde), adesão (tons de vermelho) e agregação (azul). As plaquetas se aderem à superfície endotelial através da interação de colágeno aos receptores GPVI-FcR γ e $\alpha_2\beta_1$ -Integrina, e através da ligação de Fator de von Willebrand ao receptor GPIb α -GPIX-GPV. A adesão ocorre com a ligação de fibronectina ou fibrinogênio ao receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrina. Com a interação de trombina com o receptor PAR-1 ocorre a ativação das plaquetas e a consequente liberação de seus grânulos internos que contém tromboxano A₂ (TXA₂) e difosfato de adenosina (ADP), esses se ligam aos receptores TXA₂R e P2Y₁₂, respectivamente, e amplificam a ativação plaquetária. Fonte: Mackman, 2008.

1.2.2 A Cascata de coagulação de 1964

A coagulação é o processo que se segue para manter a trombo e evitar a hemorragia. Esse processo tem como objetivo principal a formação de fibrina (Figura 4), um produto insolúvel da clivagem do fibrinogênio (solúvel) pela trombina, através de interações entre proteases plasmáticas e seus cofatores.

A “cascata” de coagulação foi uma hipótese proposta em 1964 por Macfarlane e Davie & Ratnoff (FRANCO, 2001) (para explicar a fisiologia da coagulação sanguínea). Essa hipótese é baseada em um sistema de reações proteolíticas seqüenciais, onde uma enzima ativa cliva um zimogênio transformando-o em enzima ativa e assim sucessivamente (Figura 5) até a formação da rede de fibrina.

Esse mecanismo divide a coagulação em duas vias: a extrínseca e a intrínseca (Figuras 5 e 6). Além disso, sugere que a principal via responsável pelo início da formação de fibrina é a via extrínseca e a via intrínseca é a responsável pelo

crescimento e por manter rede de fibrina. As vias convergem no ponto de ativação do fator X.

A via extrínseca requer FT que está presente na adventícia do tecido e entra em contato com o sangue no momento que um vaso é lesionado. O FT é uma glicoproteína integral de membrana que está fortemente associada aos fosfolipídeos (PL). Na presença de Ca^{2+} o FT tecidual forma um complexo com o fator VII e o ativa levando a formação de fator VIIa (serinoprotease), reação essa que pode ser catalisada por traços de alguma protease presente no sangue (fator Xa, trombina, fator VIIa ou fator IXa). O complexo FT + fator VIIa é capaz de converter o fator X em fator Xa que passa a ser uma serinoprotease.

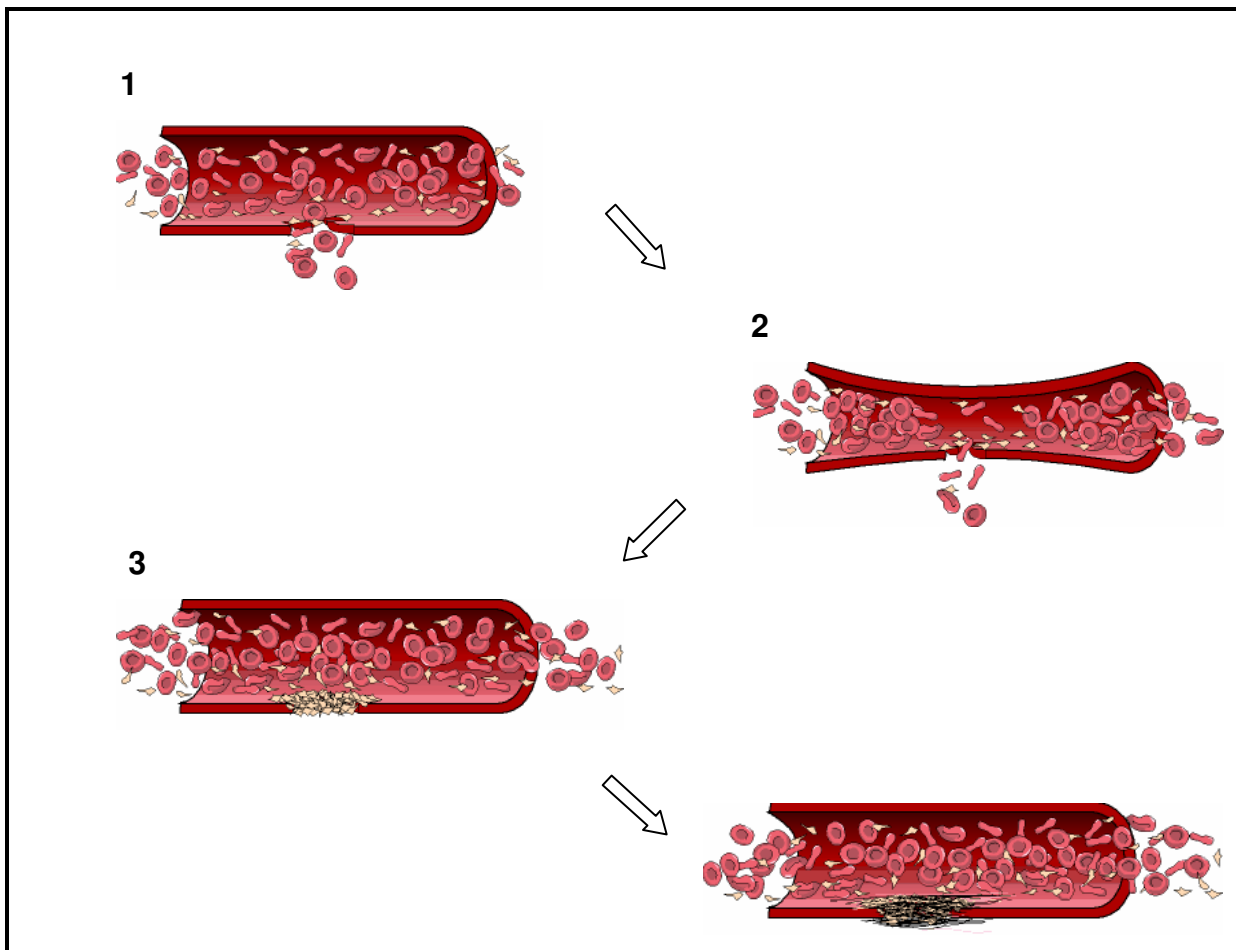


Figura 4. Ilustração da atividade resumida do sistema hemostático quando um vaso é lesionado. 1) A lesão vascular e o extravasamento de sangue. 2) Vasoconstrição para diminuir o fluxo sanguíneo na região. 3) Formação do tampão hemostático de plaquetas. 4) Formação do trombo como presença da rede de fibrina que deve permanecer no local até que o tecido se regenere.

INTRODUÇÃO

Na via intrínseca o fator XII é ativado quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Esse processo chamado de “ativação por contato”, requer também a presença de outros componentes como a pré-caliceína (PK - serinoprotease) e o cininogênio de alto peso molecular (CAPM - cofator). O fator XIIa ativa o fator XI e o fator XIa ativa o fator IX na presença de Ca^{2+} . O fator IXa é capaz de formar fator Xa a partir de fator X, na presença de fator VIIIa (cofator), Ca^{2+} e fosfolipídeos (PL).

Na via comum o fator Xa gerado é o responsável pela conversão da protrombina (fator II) em trombina (fator IIa), para tal ele conta com a presença do fator Va como cofator.

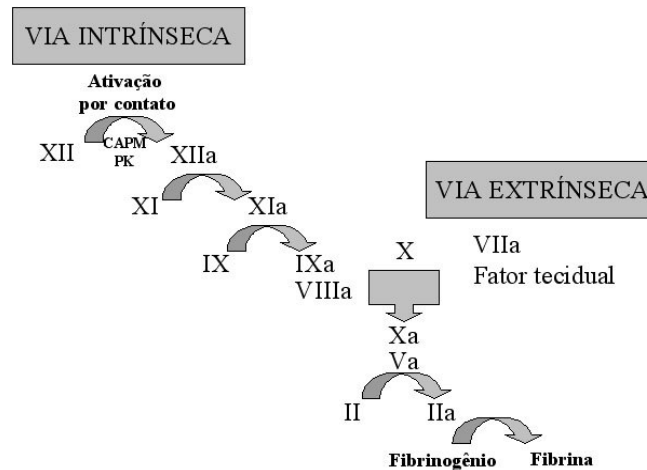


Figura 5. Cascata de coagulação proposta na década de 1960. A via intrínseca é iniciada com a “ativação por contato” do fXII, na presença de cininogênio de alto peso molecular (CAPM) e précaliceína (PK) e segue com reações sucessivas de ativação de zimogênios que se tornam enzimas ativas até que se forme fXa e, então, é iniciada a via comum. A via extrínseca se inicia com a interação entre fVIIa e fator tecidual e conseqüente ativação de fX. A formação de fXa caracteriza o início da via comum que tem o objetivo de converter o fibrinogênio em fibrina através de clivagem por trombina (fIIa). Os fatores da coagulação são expressos apenas pelo seu código em algarismo romano. Fonte: Franco, 2001.

Essa divisão do sistema de coagulação é bastante didática, mas hoje em dia não é considerada adequada para explicar a fisiologia, uma vez que a divisão não acontece *in vivo*.

1.2.3 O processo de coagulação atual

Na década de 90, alguns novos passos na cascata de coagulação foram propostos (DAVIE *et al*, 1991) e reconheceu-se a trombina como a enzima chave da cascata já que é capaz de regular vários pontos do processo e estimular a sua própria formação. Apesar da separação das vias, é uma visão atualizada do processo onde se observa pontos de conexão entre as vias. A principal reação promovida pela trombina é a clivagem do fibrinogênio para a formação de fibrina. Mas a trombina também é capaz de ativar o fator XIII que daí promoverá a ligação cruzada das moléculas de fibrina formando a rede de fibrina. A trombina também promove a ativação do fator V, do fator VIII e do fator XI (Figura 6).

Hoje em dia, o mecanismo aceito diz respeito à coagulação associada a três complexos enzimáticos pró-coagulantes. Esses complexos são formados por serinoproteases dependentes de vitamina K e cofatores interagindo sobre uma superfície de membrana celular onde estão em contato com PL (Figura 7). Essa superfície de membrana pode ser a de um vaso lesado, a de células inflamatórias ou a de plaquetas ativadas (mais comum).

A coagulação se inicia com a exposição do sangue a componentes normalmente ausentes no interior vascular, que podem resultar de injúrias ou alterações bioquímicas (presença de citocinas, por exemplo). De toda forma, a resposta do tecido vascular é a exposição do FT que vai desencadear o processo de coagulação sanguínea.

Normalmente, há níveis mínimos de fator VIIa (fVIIa) na circulação, e este se ligará ao FT exposto que funciona como seu receptor. O fVII também poderá se ligar no FT mas não formará um complexo ativo. O complexo enzimaticamente ativo é o FT-fVIIa que clivará o fVII num processo de "auto-ativação". Os fatores IX e X são substratos desse complexo ativo, que os transforma em fIXa e fXa, respectivamente (complexo tenase extrínseco). Daí ocorre a formação do complexo protrombinase que envolve a ativação da protrombina em trombina através de clivagem pelo fXa em presença de fVa.

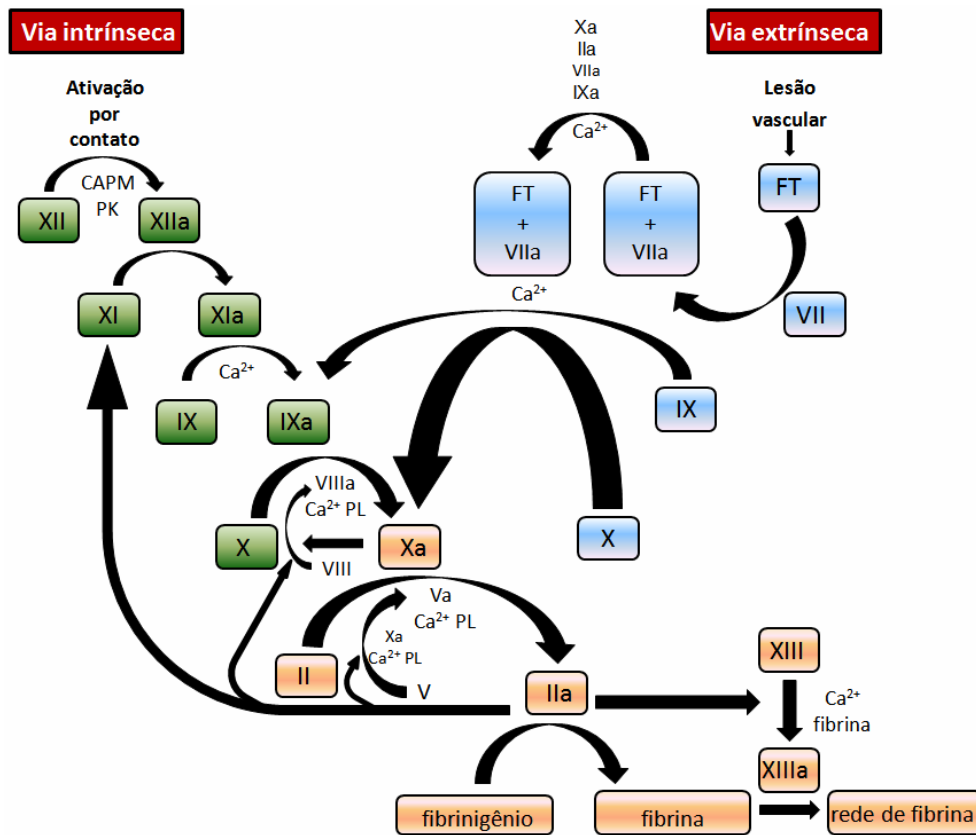


Figura 6. Cascata de coagulação proposta na década de 1990. A via intrínseca (Verde) é iniciada com a “ativação por contato” do fXII, na presença de cininogênio de alto peso molecular (CAPM) e précalicreína (PK) e segue com reações sucessivas de ativação de zimogênios que se tornam enzimas ativas até que se forme fXa e, então, é iniciada a via comum. A via extrínseca (Azul) se inicia com a interação entre fVII e fator tecidual (FT) exposto após lesão vascular e conseqüente formação de fVIIa através de clivagem por resquícios de fatores Xa, IIa, VIIa, ou IXa. O complexo FT-fVIIa é capaz de ativar os fIX (que entra na via intrínseca) e fX (que entra na via comum). A formação de fXa caracteriza o início da via comum (Laranja) que tem o objetivo de converter o fibrinogênio em fibrina através de clivagem por trombina (fIIa), e formar a rede de fibrina com auxílio de fXIIIa. É necessária a presença de Ca²⁺ e fosfolípidos (PL) para a ocorrência de algumas reações. Os fatores da coagulação são expressos apenas pelo seu código em algarismo romano. Adaptado da fonte: Davie *et al*, 1991.

O complexo tenase extrínseco gera pequena quantidade de trombina, pois a eficiência de formação de fXa a partir dele é muito baixa se comparada com a do complexo tenase intrínseco (fVIIIa-fIXa-fX-Ca²⁺). Mas, uma vez que alguma trombina é formada, esta é capaz de ativar os fV e fVIII o que é fundamental para a geração dos complexos tenase intrínseco e protrombinase.

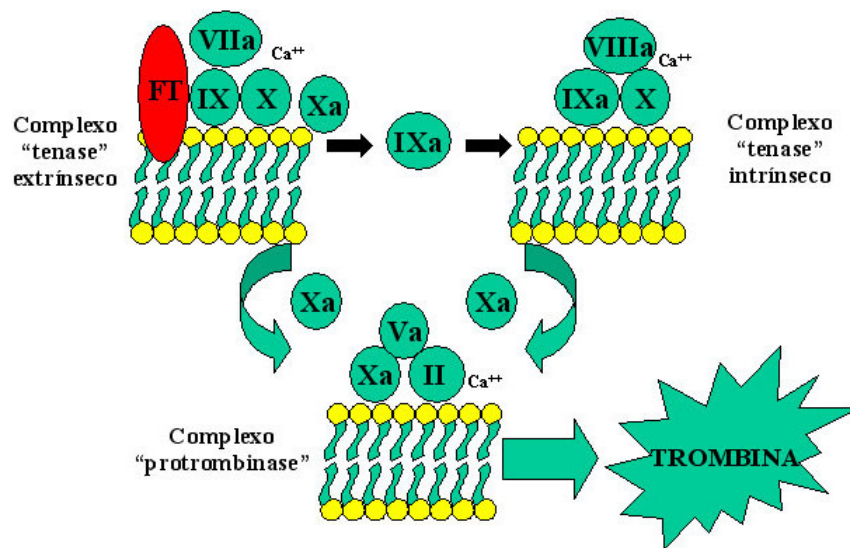


Figura 7. Representação dos complexos procoagulantes. O início da coagulação se dá com a interação entre o fVIIa (fator VIIa) e o FT (fator tecidual) que ativam o fIX e o fX. O fIXa compõe o complexo fVIIIa – fIXa que ativa o fX com maior eficiência. O fXa interage com o fVa formando outro complexo que tem a função de ativar o fII (protrombina) transformando em fIIa (trombina). Fonte: Franco, 2001.

1.2.4 A Regulação da coagulação

Enquanto o sistema coagulante está ativo no vaso que sofreu injúria, o tecido está sendo restabelecido. Em determinado momento é importante que o processo seja revertido através de fibrinólise e de inibição das reações procoagulantes, caso contrário o trombo formado pode crescer a ponto obstruir o vaso e atrapalhar a circulação do sangue. Nesse momento entram em ação os mecanismos de regulação da coagulação. Os mais relevantes apresentam o TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor* – inibidor da via do fator tecidual), a proteína C (PC), a proteína S (PS) e a antitrombina (AT) como antagonistas.

O complexo FT-fVIIa tem como substrato o fIX e o fX. O TFPI é uma proteína regulatória produzida por células endoteliais que apresenta três domínios. Um deles se liga ao complexo FT-fVIIa, outro se liga ao fXa inibindo-os. O TFPI, então, reduz a produção de fIXa e fXa.

A PC precisa ser ativada para exercer o seu papel anticoagulante. Para tal a PC encontra o seu receptor no endotélio (EPCR – *Endothelial PC Receptor* – receptor

endotelial de PC) e posteriormente é ativada pela trombina que se ligou ao seu receptor endotelial, trombomodulina. A função da PCa (PC ativada) é inibir os fVa e fVIIIa através de clivagem, de modo que na presença de PS essa função é potencializada (Figura 8). A identificação desse mecanismo chamou atenção para a atividade paradoxal da trombina no sistema hemostático, já que essa enzima muda a especificidade de substrato passando a atuar sobre a PC e não mais sobre substratos como fibrinogênio e fV.

Mais um mecanismo de regulação da coagulação é a inibição da trombina pela antitrombina (AT). A AT também pode inibir os fIXa, Xa e XIa secundariamente, além de acelerar a dissociação do complexo FT-VIIa. As ações da AT podem ser potencializadas pelo heparan sulfato e pela heparina; o primeiro é um proteoglicano presente na membrana das células endoteliais e a segunda é um polissacarídeo de estrutura semelhante ao heparan sulfato, cujo mecanismo de ação será descrito em seção posterior.

Quando de ausência de lesão vascular, ou seja, em situação fisiológica normal, o mecanismo anticoagulante (que conta com atuação conjunta das vias anteriormente citadas) sobrepõe o procoagulante com o objetivo de manter o sangue fluido.

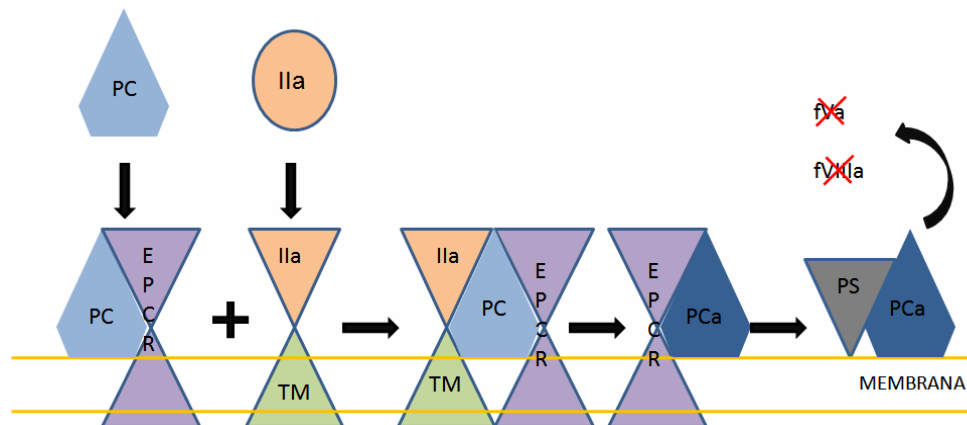


Figura 8. Esquema representativo do mecanismo anticoagulante da proteína C ativada (PCa). A PC (pentágono azul claro) se liga ao seu receptor endotelial (EPCR – triângulos lilás). A trombina (IIa – círculo laranja) se liga ao seu receptor endotelial trombomodulina (TM – triângulo verde) e sofre modificações (IIa – triângulo laranja) que permitem que a PC – EPCR interaja com ela e seja ativada (pentágono azul escuro). A PCa se liga a proteína S (triângulo cinza) que atua como cofator e inativa os fatores Va e VIIIa. Adaptado da fonte: Franco, 2001.

A fibrinólise é mais um meio de regular a coagulação. A degradação da fibrina é importante para evitar o crescimento excessivo do trombo que pode ocasionar a oclusão de vasos. O mecanismo de degradação de fibrina também conta com a atuação de serinoproteases, uma delas é a plasmina, responsável pela clivagem da fibrina. A plasmina circula como um zimogênio, o plasminogênio, que assim como os outros zimogênios se torna uma enzima ativa após clivagem de ligação peptídica. Os ativadores fisiológicos do plasminogênio são o ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA). O sistema fibrinolítico, por si só, também é regulado. Inibidores desse sistema agem sobre ativadores de plasminogênio, como é o caso dos PAIs (Plasminogen Activator Inhibitor – Inibidor do ativador de plasminogênio), e sobre a plasmina como é o caso da α_2 -antiplasmina (Figura 9).

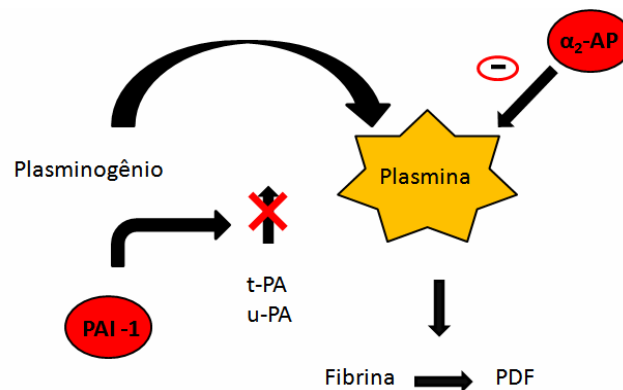


Figura 9. Representação esquemática da regulação da fibrinólise. O plasminogênio se transforma em plasmina pela ação do ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA). A plasmina cliva a fibrina gerando produto de degradação da fibrina (PDF). O inibidor do ativador de plasminogênio – 1 (PAI-1) inibe t-PA e u-PA. α_2 -antiplasmina (α_2 -AP) é inibidor direto da plasmina. Adaptado da fonte: Franco, 2001.

1.3 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS DAS TROMBOSES

Como se pode perceber as plaquetas têm papel bastante relevante nesses distúrbios, por isso são os principais alvos de fármacos no tratamento de trombozes arteriais (MACKMAN, 2008). Os fármacos antiplaquetários também são usados de

maneira profilática em pacientes com doença cardiovascular, para evitar a trombose arterial.

As moléculas envolvidas na agregação e ativação plaquetária são os alvos primários de fármacos antiplaquetários. Já os inibidores das moléculas responsáveis pela adesão das plaquetas ao colágeno e ao FVW, em teoria poderiam ser bastante poderosas nessa terapia (MEYER *et al.*, 2008), mas na prática, não têm se mostrado promissores, pois podem provocar trombocitopenia e/ou sangramento já que a adesão é um processo precoce da hemostasia, e impedi-la pode comprometer o papel fundamental das plaquetas na coagulação sanguínea normal. Apesar dessas limitações, inibidores de adesão plaquetária estão em desenvolvimento.

Fármacos fibrinolíticos também podem funcionar em tratamento de eventos trombóticos. O maior limitante nesse caso é o tempo. Quanto mais cedo for feita a intervenção, maior é a chance de sucesso da terapia. Por outro lado, esse grupo de fármacos que inclui o t-PA e a estreptocinase, apresenta o risco de provocar hemorragia cerebral.

Os fármacos antiplaquetários utilizados no tratamento e na prevenção das trombozes arteriais podem ser divididos em grupos de acordo com o tipo de molécula que inibem. Podem ser:

a) Inibidores de ciclooxigenase (COX)

A COX é uma enzima necessária para a síntese de tromboxano- A_2 (TXA₂), que atua ativando as plaquetas (Figura 3). O ácido acetil salicílico é um inibidor da COX-1 e é o antiplaquetário mais utilizado. Ele reduz incidência do primeiro infarto agudo do miocárdio em pacientes com distúrbio cardiovascular e reduz os riscos de paciente que já tiveram. Entretanto, esse fármaco pode causar úlceras estomacais e sangramentos.

Alguns inibidores seletivos da COX-2, como rofecoxib, foram retirados do mercado por apresentarem alta incidência de infarto. Isso demonstra o risco de inibição da COX "inadequada" (MACKMAN, 2008), provavelmente porque a inibição da COX-2 fez reduzir a síntese de prostacilina (PGI₂) dependente dessa enzima e a PGI₂ age inibindo a agregação plaquetária (GROSSER *et al.*, 2006).

b) Antagonistas do receptor de ADP

O ADP que se liga no receptor P2Y₁₂ tem função de ativação plaquetária (Figura 3). O antagonista desse receptor mais usado na clínica é o clopidogrel e é administrado em pacientes com síndromes coronárias agudas, como a angina instável e em pacientes durante intervenção coronária percutânea (procedimento realizado para remoção de placa aterosclerótica e colocação de *stent*). O prasugrel é mais um antagonista do receptor P2Y₁₂ usado nesses casos. Ele é mais potente do que o clopidogrel, mas apresenta maior risco de sangramento (MEYER *et al.*, 2008).

c) Inibidores de PAR-1

O PAR-1 é o receptor de trombina das plaquetas que também atua na ativação dessas (Figura 3). Esse receptor é um novo alvo da terapia antiplaquetária. Camundongos *knock-out* para PAR-3 e PAR-4 (suas plaquetas não expressam PAR-1) são protegidos contra trombose arterial, indicando o inibidor de PAR-1 como um tratamento promissor para humanos (MEYER *et al.*, 2008). As drogas E5555 e SCH 530348 estão em fase clínica II (MACKMAN, 2008).

d) Inibidores de $\alpha_{IIb}\beta_3$ – integrina

Esse receptor de fibrinogênio tem a função de promover a agregação das plaquetas (Figura 3). O abciximab e o eptifibatide são fármacos desenvolvidos para atuar como inibidores desse receptor. São usados por via intravenosa em pacientes durante a intervenção coronária percutânea (curto período). Por via oral esses fármacos não mostram benefícios e estão associados a aumentos nos níveis de mortalidade (CHEW *et al.*, 2001), sugere-se que isso se deva ao fato deles se comportarem como agonistas parciais.

O tratamento das trombozes venosas consiste no uso de anticoagulantes, mas assim como os antiplaquetários usados nas trombozes arteriais, o principal limitante do uso dos anticoagulantes é o efeito adverso de sangramento, já que as duas principais classes de anticoagulantes (antagonistas da vitamina K e heparinas) têm a característica de se ligarem a várias proteases da cascata de coagulação.

Os anticoagulantes podem diminuir a atividade de proteases da cascata de coagulação de algumas maneiras. Os tipos de anticoagulantes estão descritos abaixo:

a) Antagonistas de vitamina K

São usados em terapias de longo prazo e são os únicos anticoagulantes ativos por via oral atualmente em uso clínico. Eles agem inibindo a enzima vitamina K epóxido redutase que atua fazendo modificações pós-traducionais em diversas proteínas da coagulação (como fVII, fIX, fX e protrombina). A warfarina é a droga mais prescrita desse grupo apesar da necessidade de monitoramento cuidadoso para evitar sangramento. O efeito da warfarina varia com a dieta e com a genética. Polimorfismos no gene que codifica para a vitamina K epóxido redutase e no que codifica para CYP2C9 (citocromo P450) são responsáveis por mais de 50% da variabilidade individual de doses (MACKMAN, 2008).

b) Heparinas

Sabe-se que as heparinas se ligam a antitrombina e aumentam acentuadamente a habilidade dessa proteína em inibir fXa e trombina. (mais detalhes do mecanismo de ação da heparina na próxima seção). As heparinas não fracionadas são muito usadas em cirurgias cardiovasculares e na prevenção de TEV. Heparinas fracionadas, na forma de heparinas de baixo peso molecular (LMWH), também se ligam a fXa e trombina, mas seu uso está menos associado a episódios de sangramento do que as não fracionadas.

Pentassacarídeos sintéticos como fondaparinux e indraparinux têm estruturas baseadas na sequência de heparina que liga antitrombina, esses se ligam ao fXa, mas não se ligam a trombina pois são muito curtos para estabilizar a interação entre antitrombina e trombina.

O uso das heparinas não fracionadas pode causar a conhecida como síndrome da trombocitopenia induzida por heparina. De forma geral, a administração de heparina pode levar a formação de anticorpos contra o complexo heparina-plaqueta- Ca^{2+} e ativar as plaquetas, com consequente geração de trombina e isso levará a trombose. O risco de desenvolvimento dessa síndrome é bem menor com o uso de LMWH, e quase não é observado com o uso dos pentassacarídeos sintéticos (MACKMAN, 2008).

c) Inibidores diretos de fator Xa e trombina

Fármacos como a lepirudina e a desirudina são usados na terapia anticoagulante e em pacientes que apresentam síndrome da trombocitopenia induzida por heparina.

Vários agentes de administração oral estão em desenvolvimento incluindo o inibidor de trombina dabigatran e inibidor de fXa rivaroxaban. Estudos ainda são necessários para saber se esses inibidores de fXa e trombina poderão substituir a heparina e a warfarina nas terapias de curto prazo e de longo prazo, respectivamente (MACKMAN, 2008).

1.4 TROMBINA

A trombina (α Th) é uma enzima do tipo serinoprotease de maior destaque do sistema hemostático. Ela se destaca por promover a catálise chave no processo de coagulação que é a clivagem do fibrinogênio em fibrina. A trombina também atua regulando várias etapas da cascata com o objetivo de gerar mais trombina. Além do seu papel procoagulante notório, a trombina também exibe funções anticoagulantes quando interage com trombomodulina e com a Proteína C para ativar essa última que é responsável por inativar fVa e fVIIIa. Esses aspectos funcionais da trombina já foram expostos anteriormente e o objetivo desse tópico é esclarecer aspectos estruturais dessa proteína.

A trombina é uma protease do grupo da tripsina e da quimiotripsina, mas é conhecida por sua maior especificidade em relação a essas últimas. É formada por 2 cadeias plipeptídicas unidas por uma ponte dissulfeto. A cadeia menor é composta por 36 resíduos e é normalmente chamada de cadeia L (light) ou A. A cadeia maior possui 259 resíduos e é chamada de cadeia H (heavy) ou B (Figura 10). A cadeia L fica localizada no hemisfério oposto de onde está localizado o sítio ativo. Este fica localizado na cadeia H e é caracterizado por uma cavidade no centro da molécula.



Figura 10. Representação da estrutura cristalográfica de α Th humana inibida por FPRCK (Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) depositada no *Protein Data Bank* (PDB) sob o código 1PPB. Azul – FPRCK; Rosa – cadeia L; Verde – cadeia H. Figura gerada pelo PyMol.

As serinoproteases são assim denominadas, pois o mecanismo da sua atividade proteolítica envolve um resíduo de serina essencial para tal atividade. Esse resíduo é a Serina de número 195 que exacerba o potencial nucleofílico da His57 e do Asp102 que, devido ao dobramento característico dessas enzimas, ficam próximos no sítio catalítico. Esses resíduos formam a tríade catalítica. Próximo ao sítio catalítico é formado uma espécie de bolsão hidrofóbico que comporta principalmente, as cadeias laterais de Tyr, Trp e Phe (SOLOMONS E FRYHLE, 2002),

A “invaginação” que forma o sítio catalítico é contornada por dois *loops* também característicos do enovelamento da proteína. São eles o *loop-60* e o *loop- γ* . O primeiro tem caráter hidrofóbico e a estrutura rígida devido aos resíduos de Pro60B e Pro60C que são adjacentes. O segundo tem mais mobilidade e caráter hidrofílico (LANE, *et al.*, 2005) (Figura 11).

A especificidade da trombina é por clivar resíduos de Arg do substrato, mas diferentemente da tripsina que também tem essa especificidade, a trombina só cliva seu substrato em sítios específicos de Arg, e faz isso com o subsídio de seus exosítios (DI CERA, 2003).

Os exosítios de trombina são 2 e ficam afastados do sítio catalítico em regiões

INTRODUÇÃO

opostas (Figura 11). Eles são conhecidos como exosítio de ligação de ânions I e exosítio de ligação de ânions II, porque são formados por vários resíduos carregados com cargas positivas com argininas e lisinas. O exosítio I é centrado nos resíduos Lys36, His71, Arg73, Arg,75, Tyr76, Arg77a, Lys109 e Lys110 e o exosítio II nos resíduos Arg93, Ly236, Lys240, Arg101 e Arg233 (LANE, *et al.*, 2005).

O exosítio I exerce função essencial na interação do fibrinogênio (substrato natural) com a trombina. Essa interação é principalmente eletrostática e permite que o complexo se forme de modo ideal para que os sítios de clivagem do fibrinogênio se localizem no sítio ativo da enzima. O fibrinogênio circulante é encontrado na forma de um dímero de 3 cadeias $(A\alpha B\beta\gamma)_2$. A trombina age clivando a cadeia $A\alpha$ liberando o fibrinopeptídeo A e gerando o monômero I da fibrina. Depois a enzima cliva a cadeia $B\beta$ e libera o fibrinopeptídeo B e gera fibras mais grossas de fibrina que antes eram protofibrilas formadas pela união de monômeros I da fibrina. O exosítio I também está envolvido na ligação da hirudina (inibidor derivado do sanguessuga *Hirudus medicinalis*), do receptor PAR-1, da fibrina, da trombomodulina, etc (DI CERA, 2003).

O exosítio II é o local de interação de ligante polianiónicos devido à numerosa presença de resíduos de cargas positivas. A heparina é o ligante mais conhecido desse exosítio, mas outros glicosaminoglicanos também se ligam nele. Algumas características estruturais da interação de heparina e de sua ação anticoagulante merecem ser destacadas.

A heparina inibe a trombina de maneira indireta, pois na verdade, quem inibe a trombina com o auxílio da heparina é a antitrombina, uma serpina que atua inibindo o fXa também. A heparina se liga à antitrombina de maneira específica e ativa a serpina através de modificação alostérica da estrutura (Figura 12A) fornecendo um molde para que a antitrombina possa interagir com a trombina (Figura 12B e C).

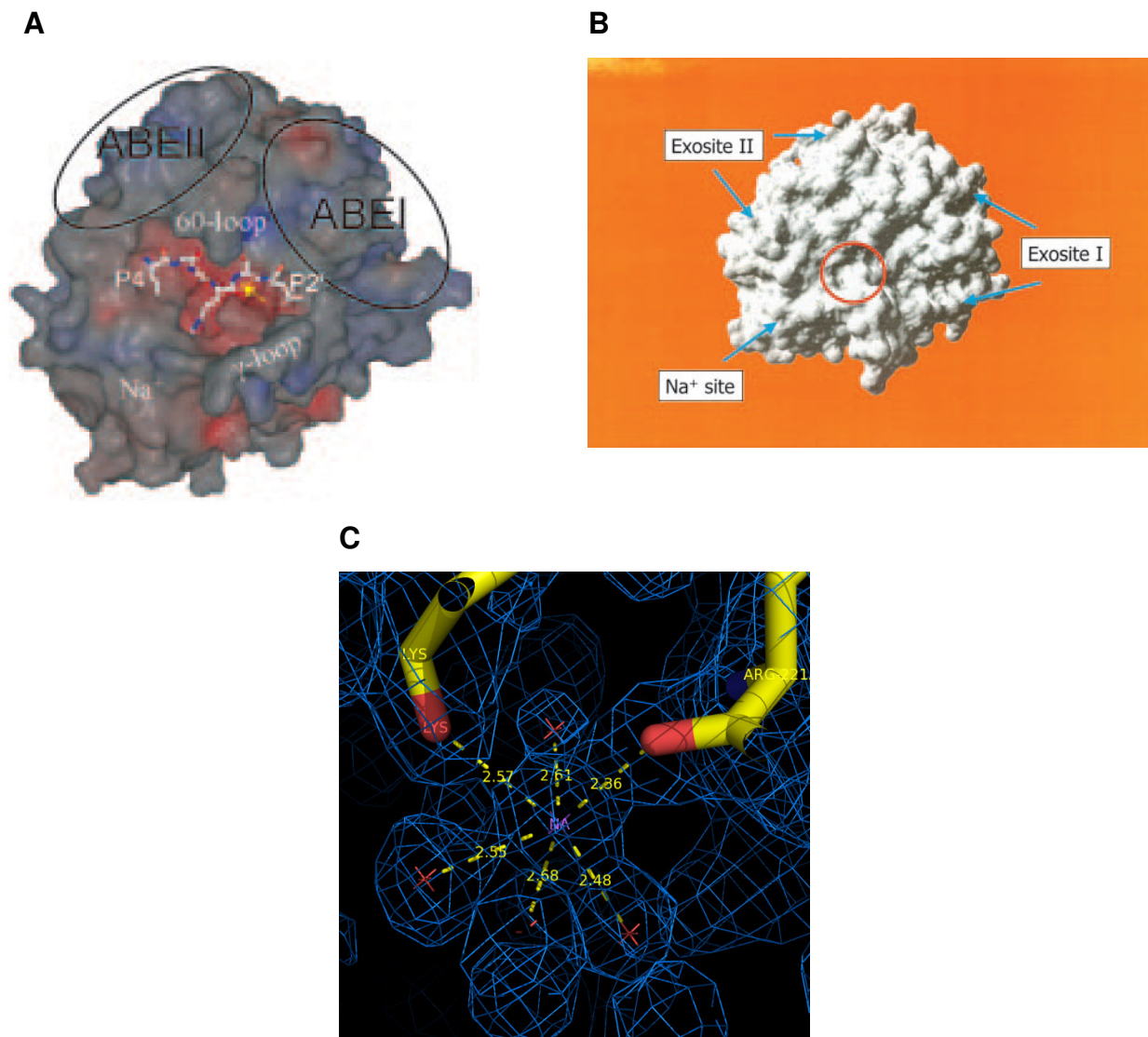


Figura 11. Representação esquemática da superfície acessível ao solvente da molécula de trombina com a localização dos seus sítios e detalhe estrutural de um sítio de Na^+ típico. A) Localização de ABE I e II (Anion binding exosite I e II – exosítio de ligação de ânio I e II). Localização sítio catalítico (onde se encontra um ligante) do loop-60, do loop- γ e do sítio de Na^+ . Figura colorida de acordo com potencial eletrostático onde azul e vermelho representam regiões carregadas positivamente e negativamente, respectivamente. **B)** Mais uma representação da da localização dos exosítios I e II, do sítio de ligação de Na^+ e do sítio catalítico (círculo vermelho). **C)** Íon Na^+ (asterisco roxo) coordenando com moléculas de água (asteriscos vermelhos) e com oxigênios das carbonilas de Lys e Arg em seu sítio de ligação na trombina na estrutura depositada no PDB com código 1SFQ. Mapa de $2F_o - F_c$ a $1,0\sigma$ ou $0,43\text{elétrons}/\text{Å}^3$ (azul). Fontes: Lane, *et al.*, 2005 – A; Di Cera, 2003 – B.

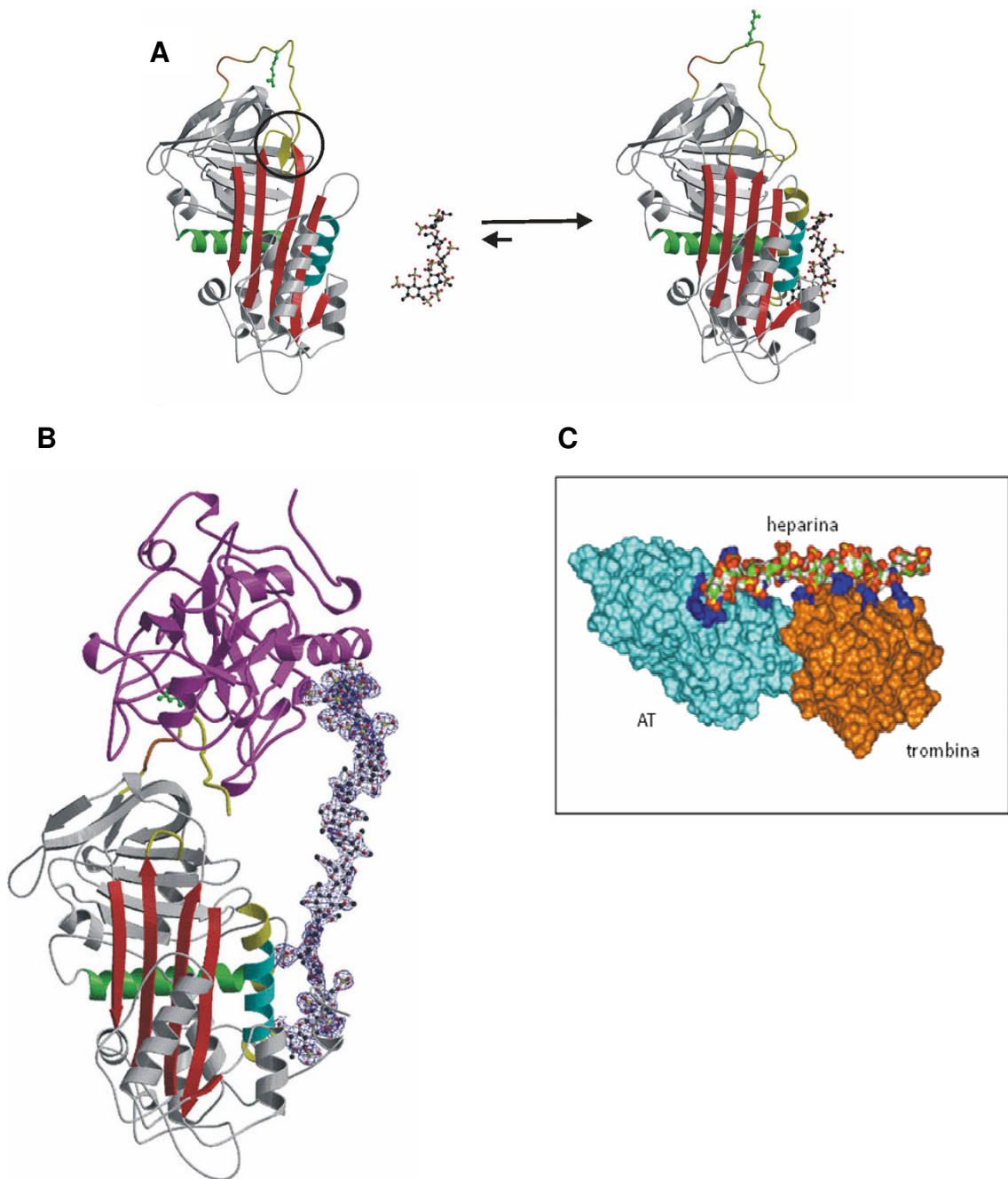


Figura 12. Complexo ternário formado por antitrombina-heparina-trombina. A) A ligação da heparina a antitrombina induz a mudança conformacional envolvendo a expulsão circularizada do loop central reativo (amarelo) da folha- β A (vermelha) e extensão das hélices A (verde) e D (azul e amarela). **B)** Representação da estrutura cristalográfica (PDB ID 1NQ9) do complexo ternário, antitrombina (colorida), trombina (roxa) e heparina (envolvida pelo mapa de densidade eletrônica). **C)** Heparina age como molde, formando uma ponte para facilitar a inibição de trombina mediada pela antitrombina. Fontes: Li, *et al.*, 2004 – A e B; Kork, *et al.*, 2005 – C.

INTRODUÇÃO

Ambas as maneiras são aproveitadas para inibição de fXa, mas somente a última é responsável pela inibição de trombina. Sendo assim, para que haja a inibição de trombina é necessária a interação específica entre heparina, antitrombina e heparina e trombina (Figura 13), onde a heparina é a responsável pela aproximação das duas moléculas (Figura 12B e C). Por isso, a habilidade da heparina de promover essa interação é dependente do seu tamanho que precisa ser de no mínimo 18 sacarídeos. Sem a presença de heparina essa inibição acontece em ritmo 1000 vezes mais lento, aproximadamente (Li, *et al.*, 2004).

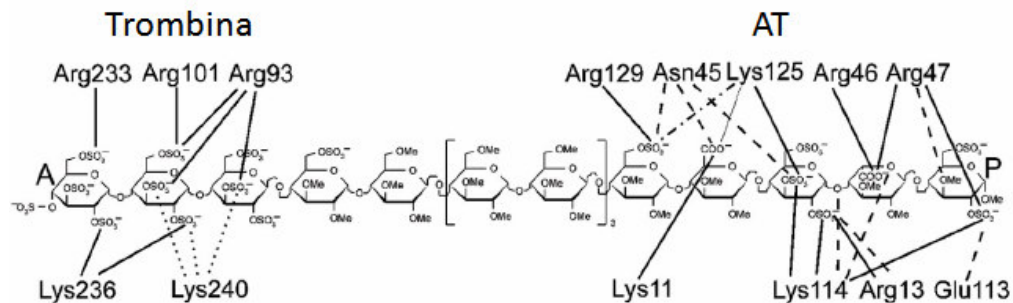


Figura 13. Interações da heparina com as moléculas de trombina e antitrombina. Molécula de heparina destacada com A na ponta não redutora e com P na ponta redutora. As interações com trombina e antitrombina são representadas por linhas, onde as linhas sólidas indicam ponte salina, linhas tracejadas ligações de hidrogênio, linhas pontilhadas e tracejadas ligações de hidrogênio mediadas por água e linha pontilhada interações de potencial eletrostático. Fonte: Li, *et al.*, 2004.

A trombina também apresenta um sítio de ligação de Na^+ que fica localizado entre 2 *loops* próximos do sítio catalítico (Figura 11). Esse cátion nada mais é do que um modulador alostérico da enzima. A ligação de Na^+ converte a trombina de uma forma lenta (sem Na^+) para uma forma rápida (ligada a Na^+). A concentração normal de Na^+ no sangue (140 mM – PINEDA *et al.*, 2004) não é capaz de saturar o sítio de ligação dele na trombina (K_d para a ligação de Na^+ a trombina é 110 mM – PINEDA *et al.*, 2004), por isso as duas formas da enzima são bem populadas em situações normais.

A enzima ligada a Na^+ , conseqüentemente a forma rápida, tem maior especificidade por fibrinogênio, fibrina, PAR-1, PAR-3 e PAR-4. A ligação do Na^+

umenta em mais de 20 vezes a clivagem do fibrinogênio e de PAR-1 e PAR-4. Já a forma lenta é mais específica para a Proteína C. Como se pode ver, a variação entre os níveis de trombina rápida e lenta são determinantes no equilíbrio entre a ação procoagulante e anticoagulante da protease.

Quando o organismo passa por situações que desestabilizam a ligação de Na^+ , como em episódios de hiponatremia ($[\text{Na}^+] < 135 \text{ mM}$ – PINEDA *et al.*, 2004), a forma lenta é estabilizada e o equilíbrio é deslocado para a anticoagulação. No caso de hipernatremia ($[\text{Na}^+] > 145 \text{ mM}$ – PINEDA *et al.*, 2004), acontece o contrário e uma tendência trombótica é induzida.

O sítio de ligação de Na^+ na trombina está estrategicamente localizado próximo do sítio ativo e entre os *loop*-220 e 186, que contribuem para a especificidade da serinoprotease. Os resíduos envolvidos na ligação de Na^+ (Figuras 14 e 15A) estão conectados com resíduos envolvidos na ligação e na catálise do substrato, através de ligações de hidrogênio mediadas ou não por moléculas de água. As mudanças estruturais que acontecem com a ligação de Na^+ são pequenas, mas são em locais críticos (como pode ser observado nas estruturas cristalográficas depositadas no PDB sob códigos: 1SHH para a forma lenta e 1SFQ para a forma rápida, ambas as estruturas são de enzima inibida com FPRCK) (Figuras 14; 15A e B).

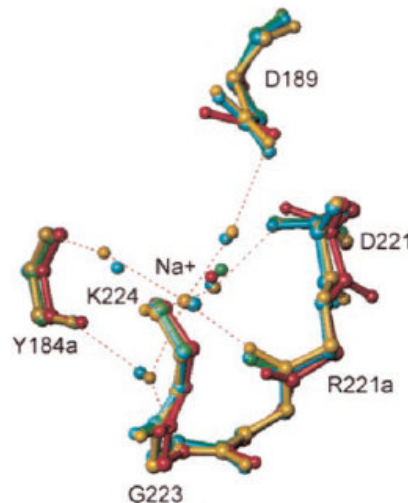


Figura 14. Visão do ambiente de ligação do Na^+ nas estruturas de trombina rápida (azul – 1SFQ) e lenta (verde – 1SHH). As outras cores representam outras estruturas mostradas nesse trabalho que não serão comentadas. São mostrados todos os átomos que estão a uma distância de $3,0 \text{ \AA}$ ou menos do Na^+ . As ligações de hidrogênio são as linhas descontinuas e as esferas livres são moléculas de água. Fonte: Pineda, *et al.*, 2004.

Além do mais é importante lembrar que o dobramento bastante conservado entre as serinoproteases nos remete a uma estrutura rígida, onde perturbações funcionais drásticas são difíceis de se enxergar estruturalmente. Essa visão pode ser apoiada em vários dados experimentais, (apesar de também existir exemplos de mudanças conformacionais significativas em serinoproteases) mas não ocorre somente nesse grupo de proteínas. Com alguma frequência nos deparamos com proteínas que ultrapassam grandes barreiras energéticas com transições conformacionais sutis, que são muito pequenas para se observar cristalograficamente. O contrário também acontece, grandes transições estruturais podem vir acompanhadas de pequenos saltos energéticos (PINEDA, *et al.*, 2004).

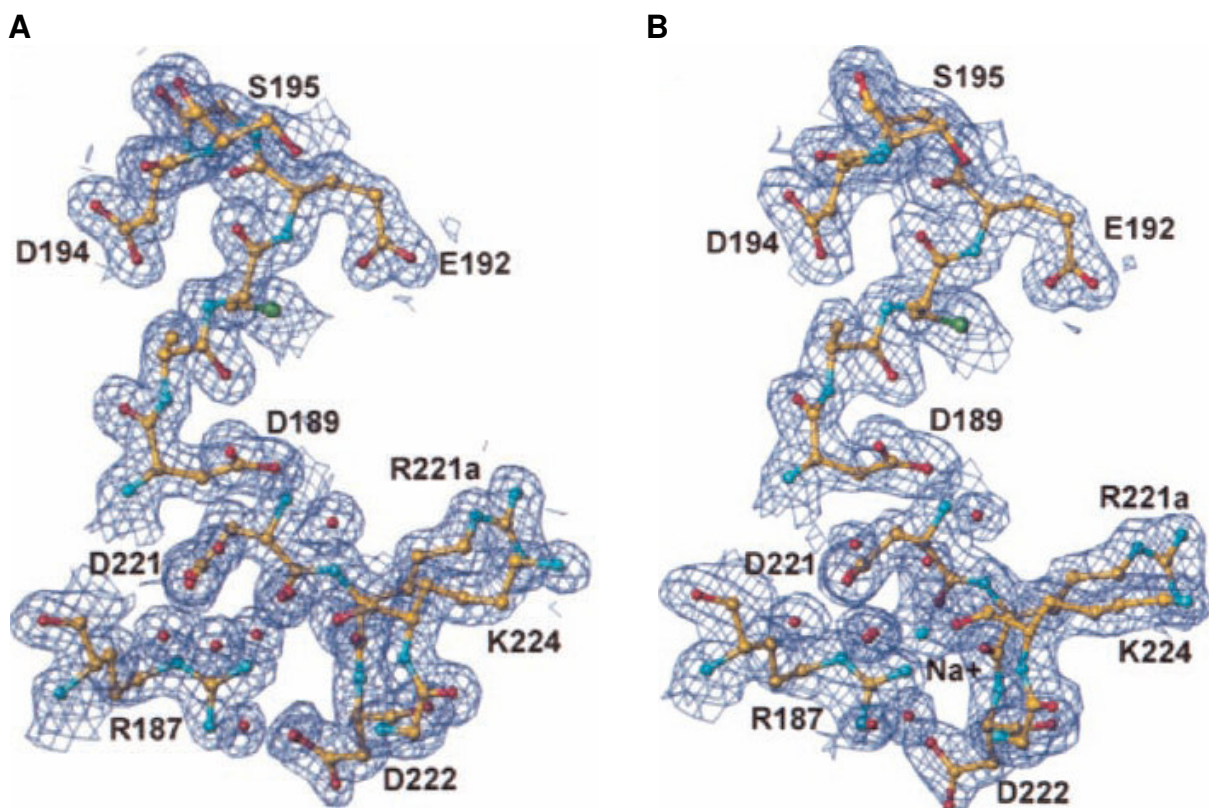


Figura 15. Visão dos mapas de densidade eletrônica preenchidos na região de mudança estrutural mais significativa ao redor da região de interação do Na⁺. A) Forma lenta (1SHH). B) Forma rápida (1SFQ). O íon Na⁺ está representado com uma esfera azul. Ambas as estruturas são de α Th inibida com FPRCK. Os mapas estão contornados a 1,0 σ . Fonte: Pineda, *et al.*, 2004.

1.5 SURAMINA

A suramina (SVR) é uma naftiluréia polissulfonada e simétrica (Figura 16), pioneiramente sintetizada pela Bayer em 1916, para o tratamento de oncocercose e tripanossomíase africana e tornou-se o principal fármaco usado contra essas moléstias. Descobriu-se, posteriormente, que a SVR era capaz de inibir a transcriptase reversa e por isso sua ação foi avaliada em vários estudos clínicos com pacientes com AIDS. Esses testes não evidenciaram atividade significativa desta molécula sobre o vírus HIV, mas ela pareceu promissora para o tratamento de neoplasias associadas ao HIV como o linfoma não-Hodgkin e o sarcoma de Kaposi. A SVR mostrou habilidade de bloquear a ação de vários fatores de crescimento como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), etc (KAUR *et al.*, 2002). Também mostrou que é um forte inibidor da angiogênese (BHARGAVA *et al.*, 2007) e que possui atividade antiproliferativa em linhagens celulares de câncer de próstata, por isso sua ação antineoplásica foi avaliada com ênfase em pacientes com câncer de próstata. Outras atividades biológicas da SVR são parecidas com a de glicosaminoglicanos polianiaônicos similares. Apesar de inúmeras ações biológicas, a aplicação da SVR como agente terapêutico é bastante limitada devido a sua toxicidade associada com sua habilidade de se ligar a diversas proteínas entre elas proteínas plasmáticas (RAJ *et al.*, 1998).

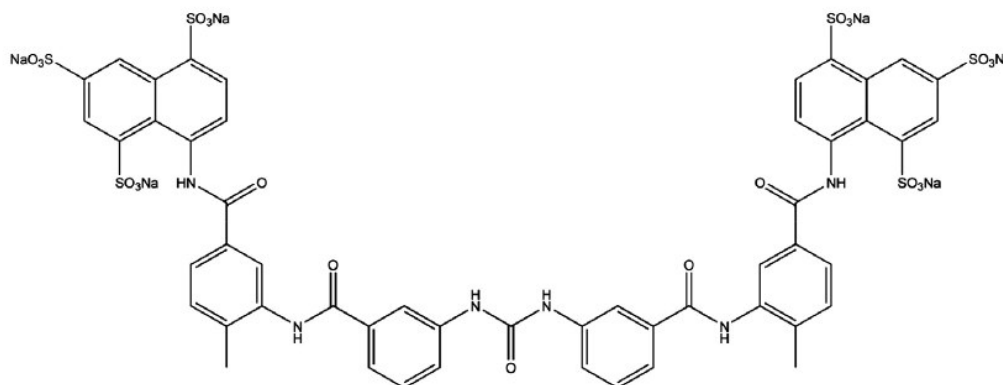


Figura 16. Estrutura planar da suramina - 8,8'-(Carbonilbis(imino-3,1-fenilenocarbonilimino-3,1-(4-metilfenileno)-carbonilimino))bis(naftaleno-1,3,5-ácido trissulfônico) sal hexasódico. Síntese descrita por Fourneau *et al.*, (1924), Bar (1948) e Wacker (1966).

A SVR geralmente funciona usando os seus grupos negativamente carregados (sulfonatos) na ligação a cadeias laterais básicas de alguns resíduos de proteínas, antagonizando, muitas vezes, a ligação dos substratos naturais de enzimas (GANESH *et al.*, 2005). Desse modo, é comum encontrar SVR se ligando a sítios de ligação de heparina em proteínas que são reguladas por esse glicosaminoglicano.

Por causa das propriedades farmacológicas não desejadas da SVR como, baixo índice terapêutico, alta estabilidade metabólica e efeitos tóxicos como anticoagulação (GANESH *et al.*, 2005), é que o planejamento de agentes terapêuticos derivados de SVR tem importância significativa e o melhor entendimento de suas conformações moleculares pode facilitar o desenvolvimento de gerações de análogos com maior especificidade de interação com alvos moleculares desejados.

1.5.1 Atividade de suramina sobre α -trombina humana e interação entre elas

Um dos efeitos tóxicos que a SVR causa com maior frequência é a indução do estado anticoagulante. Já foi mostrado que a SVR inibe uma série de proteínas da coagulação sanguínea incluindo os fatores V, VIII, IX, X, XI e XII (HORNE *et al.*, 1992), além de trombina (MONTEIRO *et al.*, 2004). Algumas das características da atuação da SVR sobre a α Th e da interação entre elas devem ser mostradas para ambientar esse trabalho, e expor o que nos norteou.

Pesquisas realizadas por Monteiro *et al.* (2004) mostraram que a SVR é capaz de atuar inibindo a atividade de α Th sobre fibrinogênio na formação de fibrina (substrato natural) com IC_{50} de $\sim 20 \mu M$ (Figura 17), e sobre S-2238 (substrato sintético) com IC_{50} de $\sim 40 \mu M$.

INTRODUÇÃO

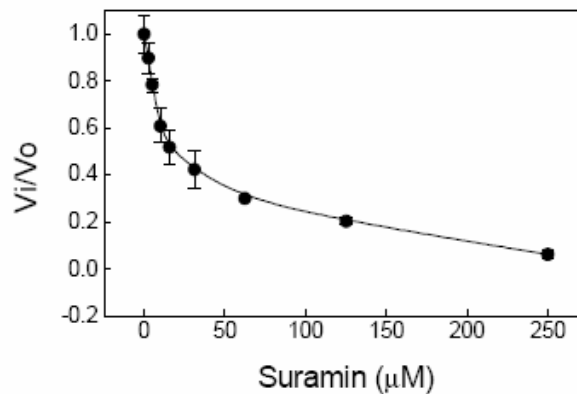


Figura 17. Efeito da suramina na atividade catalítica de α Th sobre fibrinogênio. V_i/V_0 - velocidade inicial de coagulação do fibrinogênio na presença de SVR/ velocidade inicial de coagulação do fibrinogênio na ausência de SVR. Fonte: Monteiro *et al.*,2004.

Nesse trabalho, também foi investigado se a α Th sofreria mudanças conformacionais induzidas pela SVR. Experimentos de dicroísmo circular (CD), realizados no *far-UV* e *near-UV*, sugeriram mudanças estruturais da trombina em função da ligação com suramina, mais expressivos em conteúdo de estrutura terciária que secundária (Figura 18B).

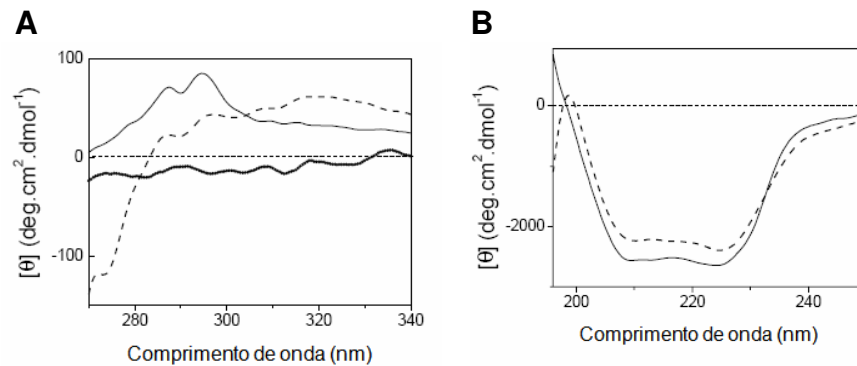


Figura 18. Espectros de dicroísmo circular de α Th com SVR. **A)** Near-UV CD. **B)** Far-UV CD. Espectro de α Th na ausência de SVR (linha sólida) e na presença de SVR (linha tracejada). Espectro da SVR em tampão (linha pontilhada). Fonte: Monteiro *et al.*,2004.

Mais um dado a ser destacado desse trabalho diz respeito ao experimento de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). O experimento foi realizado a 25°C e revelou

que a ligação é exotérmica. Claramente se observa uma interação com dois eventos diferentes. É sugerido então que uma mudança conformacional induzida por SVR afete a ligação da droga de modo que outro sítio de ligação fique acessível (MONTEIRO *et al.*, 2004) (Figura 19).

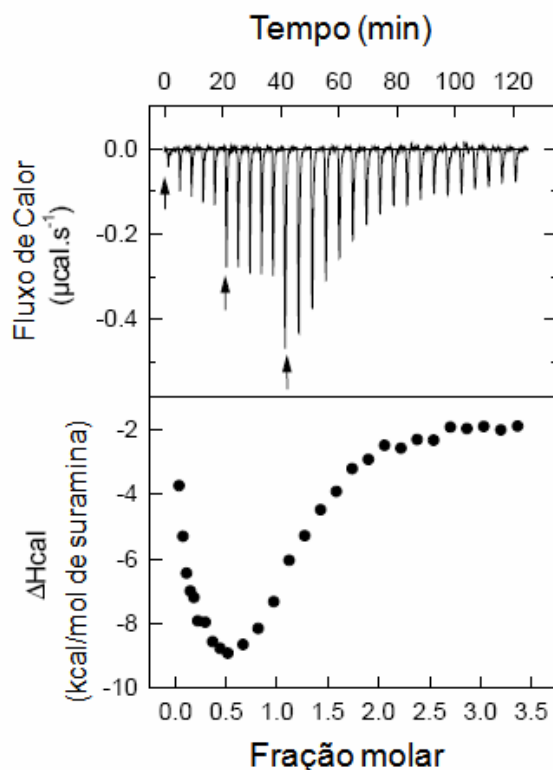


Figura 19. Calorimetria de titulação isotérmica da interação de SVR com αTh . SVR foi titulada em solução de αTh a 5 μM e o calor liberado foi monitorado. No painel superior dados brutos das injeções seqüenciais. Setas indicam mudanças no volume de injeção.

Num trabalho posterior ao citado acima, nosso grupo cristalizou o complexo de αTh com SVR (PDB ID 2H9T – 2,4 Å de resolução e 3BF6 – 2,5 Å de resolução), mostrando e confirmando a interação de SVR com o exosítio II de αTh (LIMA *et al.*, 2009 – Anexo 3). A análise da estrutura mostrou que a molécula de SVR, que interage com a de αTh na unidade assimétrica, também interage com outras moléculas de αTh simetricamente relacionadas em três regiões diferentes (Figuras 20 e 21). Apesar da formação do complexo as conformações da cadeia L e da cadeia H se mantiveram, de

modo geral, inalteradas e isso pode ser comprovado pelo valor de RMSD (desvio médio quadrático) que comparou a estrutura cristalográfica obtida com a estrutura de α Th de referência (a mesma que foi usada na substituição molecular) depositada sob o código 1PPB. Esse valor foi de $0,32 \pm 0,23$ Å para a cadeia L e de $0,32 \pm 0,28$ Å para a cadeia H.

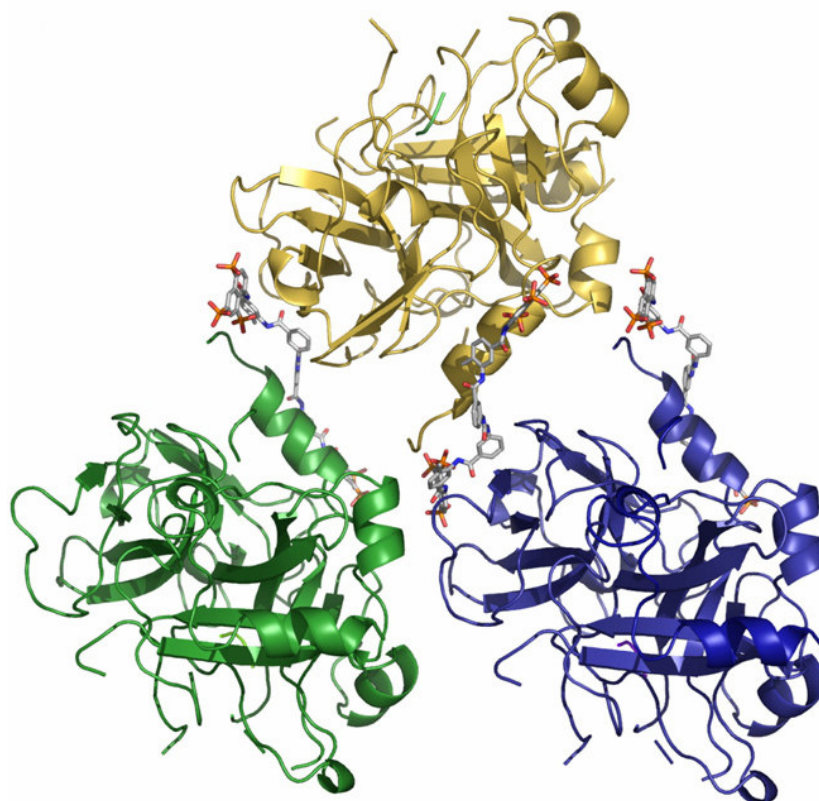


Figura 20. Representação da estrutura cristalográfica do complexo α Th:SVR. A unidade assimétrica compreende um complexo 1:1 (amarelo), as moléculas de proteína simetricamente relacionadas (verde e azul) revelam outros pontos de interação entre α Th e SVR. Fonte: Lima *et al.*, 2009.

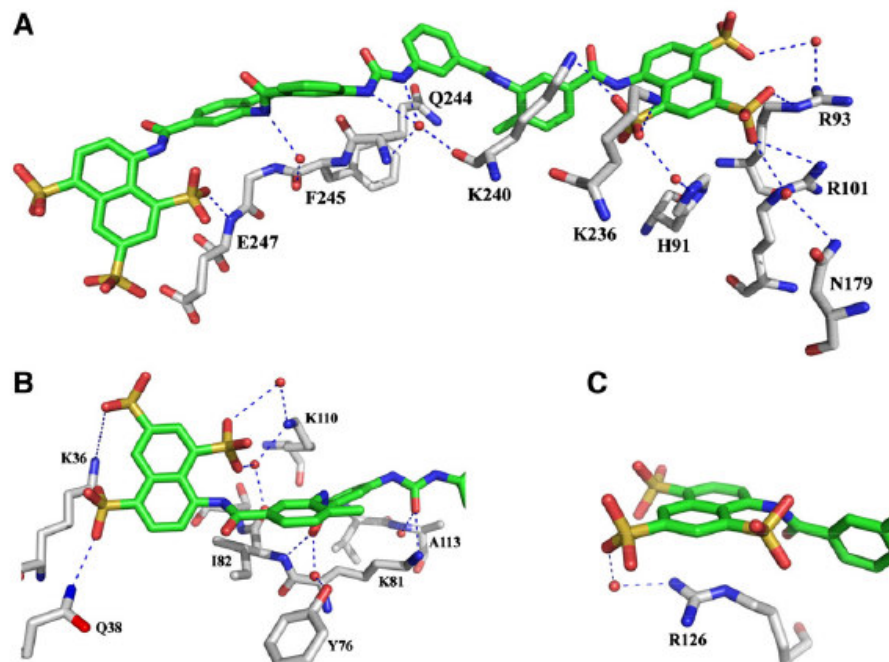


Figura 21. Detalhe dos contatos entre SVR (carbonos em verde) e α Th (carbonos em cinza). **A)** Ligação principal. **B)** Interação com proteína simetricamente relacionada. **C)** Interação com a outra proteína simetricamente relacionada. As esferas vermelhas são moléculas de água e as linha pontilhadas são ligações de hidrogênio. Atentar para interações com aminoácidos em comum com heparina. Fonte: Lima *et al.*, 2009.

Outro ponto importante, ressaltado nesse trabalho é a presença de uma cavidade próxima a um grupamento metil da SVR. Essa cavidade é ocupada por moléculas de água mediando interações entre a cadeia lateral da Gln224, hidroxila fenólica da Tyr89 e a carbonila amídica da Val241 (Figura 22). Apesar do ambiente polar em que esse metil da SVR se encontra e das forças repulsivas que tenderiam a afastá-lo de lá, essa interação se mantém estável possivelmente por interações compensatórias de outras regiões da SVR com a enzima. Isso leva a crer que a alteração desse grupamento pode diminuir a repulsão nessa área, aumentando a constante de afinidade para o complexo (LIMA *et al.*, 2009).

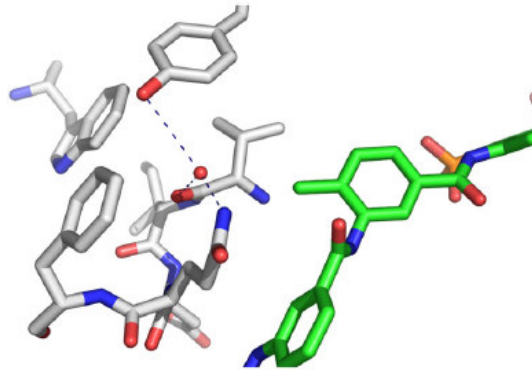


Figura 22. Região polar da estrutura cristalográfica próxima a grupamento metil da SVR. Carbonos em cinza são da α Th. Carbonos em verde são da SVR. Molécula de água (esfera vermelha) fazendo ligação de hidrogênio (linhas tracejadas) com Tyr89, Gln224 e Val241. Fonte: Lima *et al.*, 2009.

Simulação de dinâmica molecular (DM) também ajudou na caracterização estrutural dessa interação. Após 10 ns de simulação, pôde ser observada uma mudança bastante expressiva na conformação da enzima e na orientação da molécula de SVR. O RMSD geral entre a estrutura cristalográfica 2H9T e a estrutura no final da DM foi de $3,4 \pm 0,5$ Å para a enzima e de $4,3 \pm 0,6$ Å para a SVR. A molécula de SVR manteve a orientação em uma de suas extremidades, mas a outra extremidade se apresentou desviada para o lado, em direção ao exosítio I (Figura 23). Com essa mudança, alguns contatos foram feitos, incluindo aqueles com os resíduos Lys87, Lys107, Lys236, Trp237 e Phe245. Mas outros foram desfeitos como com Arg93, Asp243 e Glu247.

Um dos dados mais relevantes nesse trabalho foi obtido de experimentos de espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS). Na busca de esclarecimento sobre o estado oligomérico da proteína após a ligação da SVR, foi observado que o raio de giro (R_g) variou de 23 Å na α Th livre a 50 μ M e 100 μ M para 39 Å na α Th complexada com quantidades equimolares de SVR. Além do raio de giro, a distância máxima (D_{max}) também aumentou de 75 Å para 140 Å e a molécula, que na ausência de SVR era circular, adotou forma alongada na presença do ligante (Figura 24).

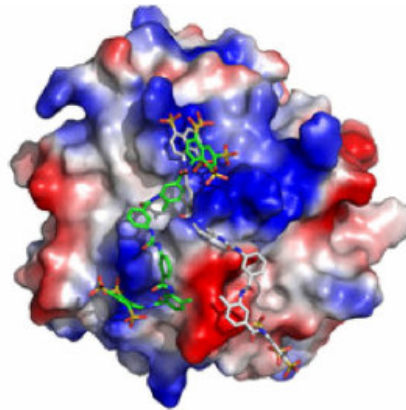


Figura 23. Representação de potencial eletrostático de superfície de α Th após 10 ns de simulação de DM em solução. Onde azul representa região carregada positivamente e vermelho região carregada negativamente. Mostra a orientação da SVR obtida de estrutura cristalográfica (carbonos em cinza) e depois da simulação de DM (carbonos em verde). Fonte: Lima et al., 2009.

Esses dados indicaram a dimerização da proteína induzida pela ligação de SVR em solução. Foi sugerido que a dimerização aconteceria preferencialmente em altas concentrações de um ou dos dois componentes (α Th ou SVR), de modo que a enzima não passaria de um estado monomérico livre para um estado dimérico ligado a SVR diretamente.

Parameter	α Th	α Th:SVR
I_0 :		
$I(q)$	$5.21e^{-3}$	$9.806e^{-3}$
$p(r)$	$5.21e^{-3}$	$9.808e^{-3}$
$R_g, \text{Å}$:		
$I(q)$	23.3	39.4
$p(r)$	23.4	39.8
$D_{max}, \text{Å}$	75 ± 2	140 ± 2
Discrepancy : χ^2		
Monomer	1.5	3.4
Dimer	2.6	1.5
Trimer	4.6	2.7

Figura 24. Tabela derivada de experimento de SAXS no trabalho publicado por Lima *et al.*, 2009.

Os resultados dos trabalhos descritos acima motivam a procura de mais detalhes a respeito da interação entre α Th e SVR e do efeito que essa interação causa na enzima. Sempre com o objetivo maior de aprimorar as propriedades farmacológicas da SVR através do planejamento de novas estruturas derivadas desse composto.

Objetivos

2 OBJETIVOS GERAIS

Tivemos como objetivos gerais deste trabalho, identificar que tipo de efeito os análogos de SVR exerciam sobre a atividade catalítica de α Th, e conhecer as bases estruturais que envolviam a interação enzima:ligante, buscando o entendimento do mecanismo de modulação da enzima por esses análogos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar nossos objetivos gerais pretendíamos:

- Avaliar atividade catalítica de α Th sobre fibrinogênio humano na presença dos 12 análogos de suramina disponíveis.
- Realizar *screening* de condições de cristalização de α Th:ligante.
- Otimizar as condições de cristalização de α Th:ligante.
- Resolver estruturas de α Th:ligante.
- Comparar as estruturas resolvidas com outras estruturas de α Th depositadas no PDB.

Material e Método

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

O plasma humano utilizado nas purificações de α Th foi doado pelo banco de sangue do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ. Os análogos de SVR (Anexo 1) foram doados pelo Prof. Matthias Kassack do Instituto de Farmácia, Departamento de Química Farmacêutica da Universidade de Bonn, Alemanha (ULLMANN, *et al.*, 2005). O fibrinogênio humano foi o Calbiochem (La Jolla, CA). O peptídeo FPRCK (Phe-Pro-Arg-clometilcetona) foi o Calbiochem (La Jolla, CA).

As soluções usadas nos ensaios de *screening* de cristalização foram dos *kits Cristal Screen I* (HCS 1) que possui 50 condições, *Cristal Screen II* (HCS 2) que possui 48 condições e *Peg/Ion Screen* (PIS) que também possui 48 condições. Todos são da *Hampton Research*. No anexo 2 estão listadas as 146 condições dos kits.

Os outros reagentes foram de grau analítico.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Purificação de α Th

Antes do desenvolvimento do método que utilizamos, um dos métodos de purificação de α Th era o empregado na preparação em larga escala da enzima (FENTON, *et al.*, 1977) a partir de pasta da Fração III de Cohn (pasta gerada do fracionamento do plasma humano, sub-produto da produção de albumina e γ -globulinas). Outros métodos utilizavam grande volume de plasma humano (10-20 litros) ou concentrados disponíveis comercialmente para, primeiro, purificar protrombina (MANN, 1976).

A técnica utilizada nesse trabalho permite a ativação do zimogênio diretamente em uma fração do plasma rica em protrombina e necessita de apenas um processo cromatográfico (NGAI E CHANG, 1991). A α Th purificada pode ser estocada a -70°C por aproximadamente 1 ano sem perder a atividade. Por isso ao longo do desenvolvimento deste trabalho bastaram 2 processos de purificação. As nossas purificações foram a partir de aproximadamente 1,2 L de plasma.

3.2.1.1 Fracionamento do plasma

O fracionamento do plasma foi todo realizado em recipientes de plástico e o transporte foi em isopor com gelo.

A purificação foi iniciada com o descongelamento do plasma em banho-maria a 37°C . Transferimos o material para uma câmara refrigerada a 4°C e adicionamos benzamida (5 mM, concentração final). Com auxílio de bomba peristáltica com fluxo de 1,5 mL/min adicionamos 60 mL de BaCl_2 1 M (numa proporção sal/plasma de 1:20 v/v), sob agitação. Os fatores de coagulação da família dos vitamina K-dependentes possuem afinidade por sais insolúveis de bário e magnésio. Para a adsorção da protrombina ao bário é que realizamos esse primeiro passo. Centrifugamos por 25 minutos, a 4.500 rpm, a 4°C . Ressuspendemos o pellet em 300 mL de tampão A (Tabela 1). Centrifugamos por 25 minutos, á 4.500 rpm, a 4°C novamente para lavagem do pellet. Ressuspendemos o pellet em 80 mL de EDTA 0,2 M, pH 7,5 . O material poderia se mostrar gelatinoso se o pH não estivesse corretamente ajustado.

Procedemos a diálise da solução viscosa e opaca em 1 L tampão B (Tabela 1) por 8h sob agitação. Trocamos a solução de diálise por 2 L de tampão C (Tabela 1), e está ocorreu *over night (o/n)*, também sob agitação. Após a diálise medimos o volume do material e fizemos precipitação de proteínas a 0-35% de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A adição de sal durou ~ 40 minutos sob agitação. Centrifugamos por 30 minutos, a 8.000 rpm, a 4°C. Precipitamos as proteínas do sobrenadante a 35-70% de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A adição de sal durou ~ 40 minutos sob agitação. Centrifugamos por 30 minutos, a 8.000 rpm, a 4°C. O precipitado foi ressuspendido em tampão D (Tabela 1) e posteriormente dialisado contra 1 L do mesmo tampão. No dia seguinte renovamos a solução de diálise colocando 1,6 L de tampão D e mantivemos a diálise *o/n*. No outro dia mais uma troca da solução de diálise foi efetuada adicionando novamente 1,6 L de tampão D e mantendo a diálise até o dia seguinte. Centrifugamos o material dialisado por 40 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C.

3.2.1.2 Ativação da protrombina

Como já se sabe, a protrombina pode ser ativada por alguns componentes de veneno de cobra (Meaume, 1966). Essa, então, foi a técnica utilizada no nosso processo para a formação de αTh .

Colocamos o sobrenadante em banho-maria a 36°C e adicionamos CaCl_2 (10 mM, concentração final). Incubamos a solução com veneno de *Oxyranus scutellatus* (numa proporção enzima/substrato de 1:80 p/p - ~ 1mg de veneno/L de plasma) por 50 minutos a 36°C. A reação de ativação foi interrompida pela adição de solução (pH ~ 8,0) preparada com 0,3g de EGTA em ~ 1 mL de NaOH 1 N.

3.2.1.3 Cromatografia de afinidade

O procedimento de cromatografia foi todo realizado em câmara refrigerada, a 4°C.

Colocamos o material na coluna de Heparina-Sepharose previamente equilibrada com tampão E, para cromatografia de afinidade. Incorporamos o material com auxílio de bomba peristáltica com fluxo de 30 mL/h. Lavamos a coluna com o mesmo tampão durante 5h (ou *o/n*). Eluimos a coluna com gradiente formado pelos tampões E e F

(Tabela 1) e recolhemos frações de 4 mL em tubos de plástico contendo 40 μ L de MES 1 M em cada. Cada fração foi monitorada através da absorvância a 280 nm.

Na figura 25 pode-se ver o perfil de eluição da coluna de afinidade de Heparina-Sepharose obtido em uma das purificações realizadas.

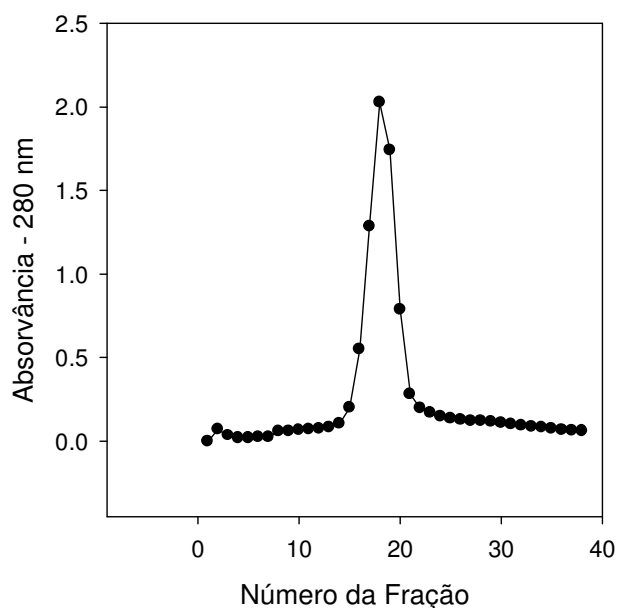


Figura 25. Perfil típico de eluição da coluna Heparina-Sepharose resultado da aplicação de gradiente de sal. Segunda purificação usada como exemplo.

3.2.1.4 Concentração e Quantificação

Depois da eluição da coluna de afinidade com gradiente de sal, juntamos as frações que corresponderam aos picos de absorvância e essa mistura foi submetida a processo de concentração.

A proteína foi concentrada em sistema *Amicon* até a obtenção de ~10 mL de retido.

Retiramos uma alíquota que foi diluída 20 vezes para leitura de absorvância em espectrofotômetro a 280 nm. A concentração foi estimada considerando o coeficiente de extinção 1,82 mg/mL/cm e a massa molecular 36.600.

Na nossa primeira purificação obtivemos um rendimento de 21 mg de proteína em 1,2 L de plasma. Na segunda purificação o rendimento foi de 22 mg em 1,2 L de

plasma.

Tabela 1. Lista de tampões usados na purificação de α Th

Tampão A	Tampão B	Tampão C	Tampão D	Tampão E	Tampão F
Tris-HCl 20mM	Tri -HCl 20mM	Tris-HCl 20mM	Tris-HCl 20mM	Tris-HCl 20mM	Tris-HCl 20mM
NaCl 150 mM	NaCl 150 mM	NaCl 150 mM	NaCl 100 mM	NaCl 100 mM	NaCl 1 M
EGTA 1,0 mM	EGTA 1,0 mM	EGTA 1,0 mM	EGTA 1,0 mM	EGTA 15 mM	EGTA 15 mM
BaCl ₂ 10 mM	EDTA 0,1 M	pH 7,5	pH 7,5	pH 7,5	pH 7,5
Benzamidina 5mM pH 7,5	pH 7,5				

3.2.1.5 Avaliação da pureza e Estocagem

A pureza da amostra foi avaliada através de SDS-PAGE 12,5% ou 15% (Figura 26).

Estocamos a amostra, a -70°C , em tubos com alíquotas de 0,8 – 1,0 mL cada.

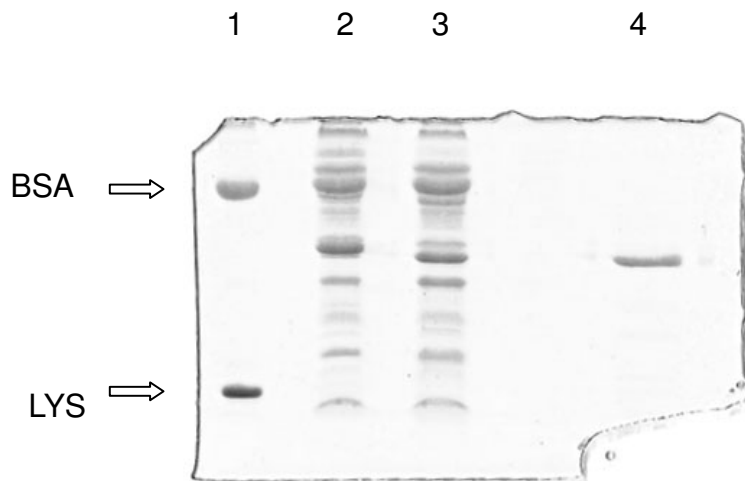


Figura 26. SDS-PAGE 15% da purificação de α Th. Banda 1, Padrão de massa molecular; 2, antes da ativação de protrombina; 3, após ativação (*input* da coluna de cromatografia); 4, proteína purificada. Segunda purificação usada como exemplo.

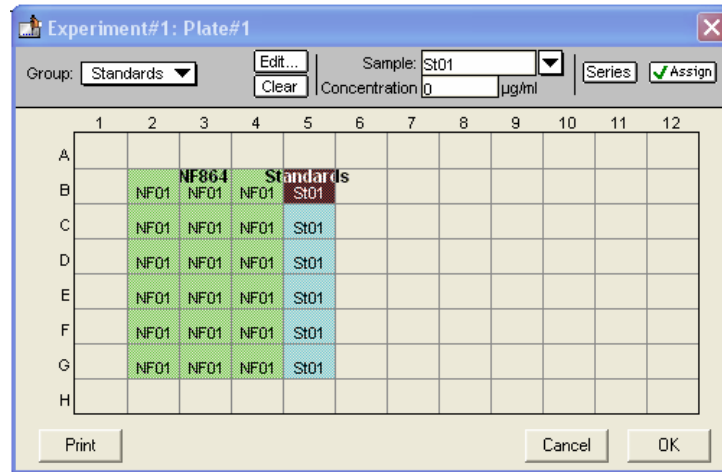
3.2.2 Atividade enzimática de α Th sobre fibrinogênio

A atividade enzimática de α Th foi medida (RIBEIRO *et al.*, 1995) através da determinação da velocidade inicial de coagulação de fibrinogênio humano (substrato fisiológico da α Th), assim foi possível a obtenção da Atividade Relativa (AR) desta enzima.

Realizamos os experimentos em leitor de microplacas VersaMax, utilizando o software Softmax Pro 4.3 LS. Neste ensaio incubamos a 37°C por 5 minutos, diferentes concentrações de análogo (previamente diluído em 20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; pH 7,5), com α Th a 4 nM (diluída em 50 mM Tris; 100 mM NaCl; 0,1 % PEG 6000; pH 7,5) Iniciamos a reação com a adição de fibrinogênio (diluído no mesmo tampão que a enzima, com concentração final de 2 mg/mL) de modo que a enzima ficasse com uma concentração final de 1 nM, num volume final de 100 μ L em cada poço. No início de cada experimento a placa era agitada (com a função *Automix* do aparelho) antes de começar a leitura. O tempo de reação observado foi de 20 minutos (FiguraS 27A e B). A velocidade de coagulação foi determinada através do coeficiente angular da reta que tangencia a curva de variação na absorvância a 405 nm em intervalos de 11 segundos (Figura 28). Para cada concentração diferente de análogo foram feitas medidas em triplicata. Medidas de velocidade inicial de coagulação do fibrinogênio na ausência de análogo foram executadas em cada ensaio para que obtivéssemos valores de referência, que foram utilizados no cálculo de AR. Calculamos as médias dos valores de velocidade para cada concentração de análogo e dividimos esse valor pela média dos valores de velocidade na ausência de análogo. O resultado obtido corresponde a AR da α Th, que foi plotada contra concentrações crescentes de análogo, utilizando o programa SigmaPlot 10.0 (*Systat. Software Inc*, Califórnia, Estados Unidos).

A partir das curvas de AR foram calculados os valores de EC_{50} e IC_{50} . EC_{50} foi considerada a concentração efetiva do análogo, necessária para que a α Th atinja a metade da atividade máxima proporcionada pelo mesmo (considerando a parte ascendente da curva, que envolve os valores de AR maiores que 1,0). IC_{50} é a concentração do análogo necessária para que a α Th atinja a metade da inibição máxima proporcionada por aquele análogo (considerando a parte descendente da curva que envolve os valores de AR menores que 1,0). Todos os valores são aproximações.

A



B

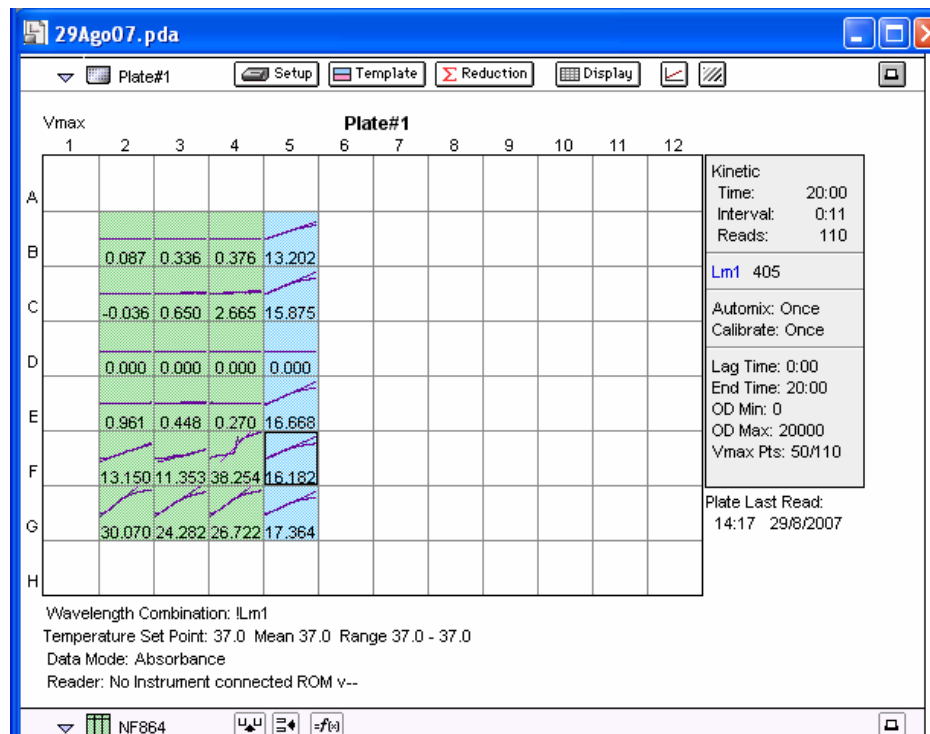


Figura 27. Exemplo de experimento de atividade enzimática. A) Esquema da placa identificando os poços usados e a localização das amostras. Preparação para iniciar o experimento. Verde: amostras de enzima + substrato + NF864. Azul: amostras de enzima + substrato. **B)** Dados brutos de velocidade após 20 minutos de cinética, nas mesmas amostras comentadas em (A). Detalhe dos parâmetros do ensaio no retângulo ao lado. Fonte: *Printscreen* do software Softmax Pro 4.3 LS.

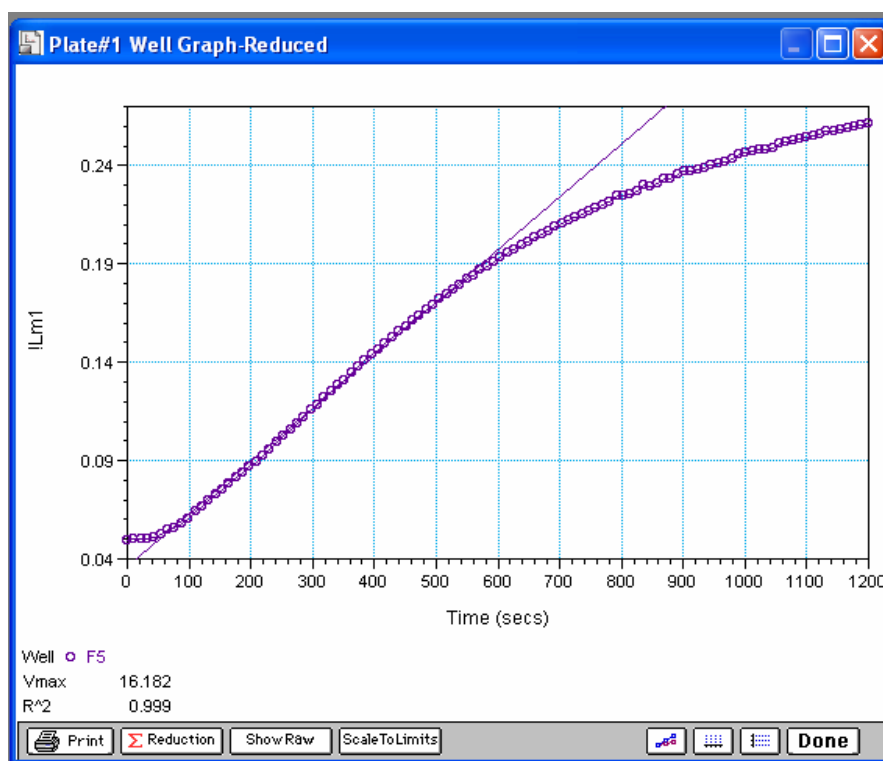


Figura 28. Exemplo de curva de absorvância. Demonstração da reta que tangencia a curva de absorvância, utilizando o *zoom* da curva obtida no poço F5 da figura 27B como exemplo. Fonte: *Printscreen* do software Softmax Pro 4.3 LS.

3.2.3 Cristalografia

A cristalografia é uma técnica bastante aplicada na determinação estrutural de proteínas assim como de outras macromoléculas. Essa técnica permite a obtenção de estrutura terciária e/ou quaternária de proteínas podendo chegar a níveis de resolução atômica (resoluções superiores ou próximas a 1,0 Å).

A cristalografia de proteínas foi tema de estudo no pós-doutorado do Prof. Luís Maurício e hoje está sendo aplicada no nosso laboratório.

3.2.3.1 *Cristalização*

3.2.3.1.1 Alguns conceitos

A cristalização da proteína é apenas o primeiro passo envolvido na obtenção de uma estrutura por cristalografia. O processo de obtenção do primeiro cristal da proteína de interesse pouco tem a ver com a racionalidade da ciência (pelo menos é o que parece), mas se assemelha à arte, já que o trabalho é minucioso e requer certo preciosismo. Deve-se estar atento a certas variáveis como pH das soluções de cristalização, concentrações e tipos de precipitantes, sais, tampão, temperatura, concentração da proteína, método de cristalização, entre outras. Também é necessário que a proteína esteja o mais pura possível e que a sua concentração (e/ou a concentração do precipitante) seja elevada o bastante para que durante o experimento se atinja um estado de supersaturação (Figura 29). A partir daí pode acontecer a formação de núcleos (que se caracterizam por algumas moléculas de proteína que saíram de solução) e com a diminuição da concentração de proteína em solução, o sistema chega a uma zona metaestável onde pode acontecer o crescimento desses núcleos, ou seja, a formação dos cristais. Porém, se a concentração de proteína ou de precipitante estiver elevada demais haverá apenas a formação precipitados amorfos.

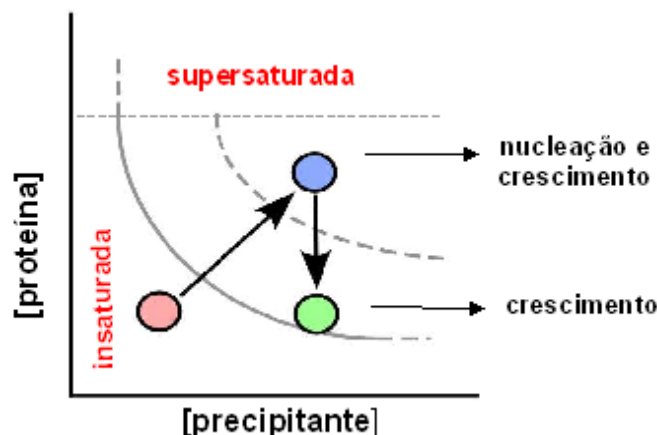


Figura 29. Diagrama de fases para cristalização mediada por precipitante. A região onde se encontra a esfera rosa representa concentrações de proteína e precipitante onde a solução não está saturada com a proteína (insaturada), então não ocorre nucleação nem crescimento. As regiões onde estão as esferas verde (região que suporta apenas crescimento) e azul (região que suporta nucleação e crescimento) representam soluções instáveis que estão supersaturadas com proteína. A estratégia ideal para crescimento de cristais é permitir a nucleação sob as condições presentes na região da esfera azul, e depois mudar para condições presentes na região da esfera verde até que o cristal pare de crescer. Fonte: Rhodes, p. 39, 2006.

De modo geral, os cristais devem crescer lentamente para otimizar a organização das moléculas em rede cristalina. Não é à toa que muitos pesquisadores veem esta etapa como um processo que requer alguma sorte, já que é necessário passar por tentativas e erros até que se consiga cristais de qualidade. (NAGEM, 2003).

Como se pode perceber, encontrar a condição ideal para cristalizar de determinada macromolécula pode ser um trabalho difícil. Uma maneira bastante eficiente de resolver este dilema é a aplicação do método da matriz esparsa onde diversas soluções diferentes são usadas para tentar cristalizar a macromolécula (JANCARIK & KIM, 1991). Os kits de cristalização que utilizamos para *screening* das condições são formados por soluções selecionadas baseando-se nas condições conhecidas de cristalização de macromoléculas. Estes facilitam o trabalho de encontrar a solução inicial de cristalização da nossa proteína utilizando o conceito de matriz esparsa (ESTEVES, 2007).

Dentre os métodos conhecidos para cristalização de macromoléculas está a difusão de vapor, o *microbatch*, a diálise, entre outros. Cada método tem suas limitações e suas vantagens. Todos eles envolvem a transição de fase citada

anteriormente e ilustrada pelo diagrama de fases (Figura 29).

A difusão de vapor é a técnica mais usada e a que mais produziu cristais de macromoléculas (Chayen, 1998). Essa foi a técnica utilizada em nosso trabalho através de dois métodos ligeiramente distintos, o Método da Gota Sentada (*sitting-drop method*) (Figura 30) e o Método da Gota Suspensa (*hanging-drop method*) (Figura 31).

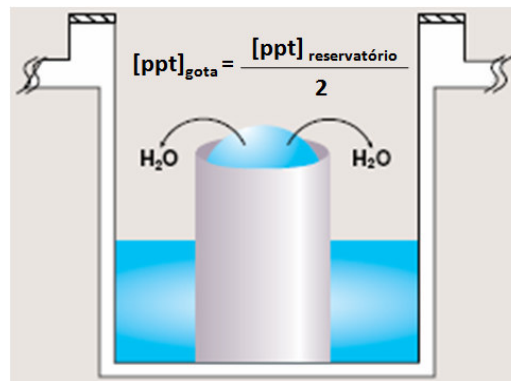


Figura 30. Esquema da placa utilizada no método *sitting-drop*. No poço (reservatório) maior coloca-se a solução de cristalização (solução-mãe), no poço menor e elevado mistura-se volumes iguais de proteína concentrada e solução de cristalização formando uma gota onde a concentração de precipitante ($[ppt]$) fica 2 vezes diluída em relação à $[ppt]$ do reservatório. Com o sistema fechado por fita adesiva transparente, o vapor de água se difunde da gota para o reservatório tornando a $[ppt]$ da gota mais elevada até que se estabeleça o equilíbrio. Ilustração de um dos 96 poços da placa. Fonte: Catálogo da *Hamptom Research*.

MATERIAL E MÉTODOS

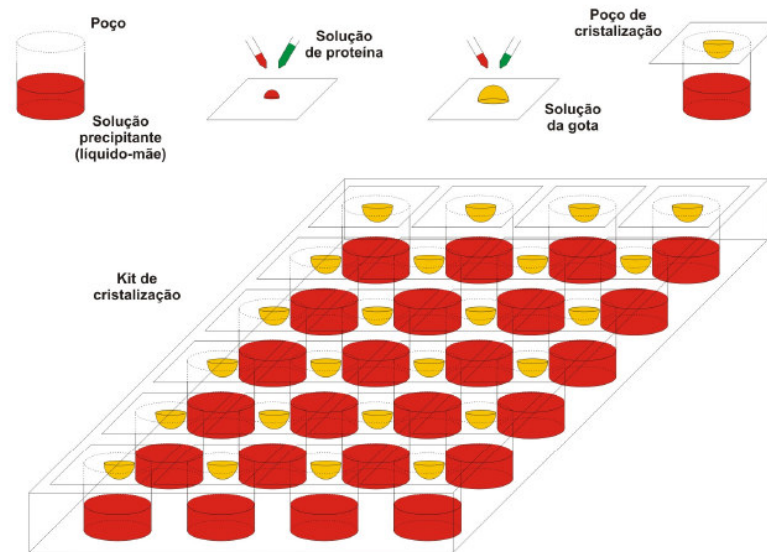


Figura 31. Esquema demonstrando o aparato utilizado para cristalização de proteínas pelo método *hanging-drop*. No poço coloca-se a solução de cristalização (solução-mãe), em uma lamínula siliconizada mistura-se volumes iguais de proteína concentrada e solução de cristalização formando uma gota onde a concentração de precipitante ([ppt]) fica 2 vezes diluída em relação à [ppt] do poço. Graxa de silicone é passada na borda do poço. A lamínula é colocada por cima do poço de modo a fechá-lo com a gota pendurada do lado de dentro. Com o sistema fechado o vapor de água se difunde da gota para o poço tornando a [ppt] da gota mais elevada até que se estabeleça o equilíbrio. Fonte: Nagem, 2003.

3.2.3.1.2 Detalhes experimentais

Primeiro realizávamos *screening* das condições de cristalização dos complexos α Th:análogo através do *sitting-drop* em microplaca de 96 poços usando soluções da *Hampton Research* (kits: HCS 1, HCS 2 e PIS) (Figura 30).

Depois, quando o objetivo era otimizar as condições de cristalização a fim de obter cristais que difratassem melhor ou com maior resolução, maiores ou de formas mais bem definidas, utilizávamos o *hanging-drop* em placa de 24 poços, fazendo combinações de variações discretas na condição de cristalização inicial (Figura 31).

Ambas as técnicas utilizadas são baseadas no princípio da difusão de vapor.

Por causa da atividade auto-catalítica da α Th, precisamos incubar a enzima com FPRCK (Phe-Pro-Arg- clorometilcetona) que é um peptídeo inibidor do sítio catalítico. Essa inibição foi realizada incubando a enzima com o inibidor numa proporção de 1:1,2 durante 20 minutos em banho de gelo.

Os experimentos de *sitting-drop* foram realizados adicionando ao poço maior aproximadamente 100 μL de solução de cristalização. No poço menor que fica junto do poço maior, misturamos 1,0 μL da proteína a 100 – 130 μM (em torno de 4 mg/mL de proteína) com 1,0 μL da solução de cristalização (Figura 30). Após completarmos o *screening* de um *kit*, fechamos a placa com fita adesiva transparente. As placas foram incubadas em ambiente climatizado, a 20 °C.

Para os experimentos de *hanging-drop* era necessária uma preparação. Primeiro, as lamínulas onde colocaríamos a solução de proteína deveriam ser siliconizadas para que a gota não se espalhasse. Para isso eram mergulhadas por aproximadamente 10 minutos em solução a 5% (v/v) de silicone líquido em álcool etílico e depois secavam em estufa a 37°C por pelo menos 2 horas. Segundo, em volta da borda de cada poço tinha de ser aplicada uma camada de graxa de silicone para que, colocando a lamínula por cima, criássemos um ambiente fechado dentro do poço. Terceiro, as 24 soluções de cristalização que seriam usadas para variar a condição inicial de crescimento de cristal deveriam ser preparadas imediatamente antes de montarmos as placas.

Iniciamos o experimento adicionando aproximadamente 1,0 mL de uma solução de cristalização no primeiro poço. Em uma lamínula siliconizada colocamos 1,0 μL de solução de proteína a 100-130 μM e misturamos com 1,0 μL da solução de cristalização adicionada no poço. Tampamos o poço com a lamínula de forma que a gota ficasse pendurada e voltada para o interior do poço. Seguimos o mesmo procedimento até completar a placa com as 24 condições (Figura 31). As placas foram incubadas em ambiente climatizado, a 20°C.

3.2.3.2 Coleta e resfriamento dos cristais

Para manter a integridade dos cristais até que sejam difratados, os mesmos são resfriados e mantidos em nitrogênio líquido (N_2). Mas para que não haja a formação de gelo (forma cristalina) na solução-mãe (solução de cristalização em que o cristal cresceu) é necessária a presença de agentes crioprotetores como glicerol, polietilenoglicol (PEG), ou etilenoglicol. A água em soluções contendo concentrações adequadas de um desses agentes, é vitrificada quando exposta a resfriamento. Com

isso, a ruptura da ordem interna do cristal e interferências no padrão de difração da proteína podem ser evitadas, já que são danos muitas vezes causados pela formação de gelo (GARMAN E OWEN, 2005).



Figura 32. Esquema da coleta do cristal com transferência para solução crioprotetora. Os cristais que devem ser submetidos à solução crioprotetora são capturados da gota onde cresceram (amarela) com auxílio de instrumentos apropriados (representados por uma alça) e transferidos para a solução crioprotetora (azul). Estes são novamente capturados e, então, transferidos para o nitrogênio líquido para que fiquem conservados até o momento da difração por raio-X. Fonte: Nagem, 2003.

Utilizamos a técnica de *soaking* para transferir o cristal da sua gota de crescimento para a solução crioprotetora (Figura 32). O agente que utilizamos foi o glicerol. De modo geral, nos casos em que o cristal cresceu na presença de alta concentração (mais de 20% (p/v)) de PEG este não era submetido a outra solução crioprotetora, pois o próprio PEG já faz o papel de agente crioprotetor. Nos casos de cristais crescidos nas soluções do *kit* HCS 1, preparávamos a solução crioprotetora adicionando á um pouco de solução de cristalização a porcentagem de glicerol sugerido pela *Hampton Research* em seu catálogo (*Crystal Screen Cryo Formulation*) (Anexo 2). Nos casos de cristais crescidos em outras condições de cristalização preparávamos a solução crioprotetora adicionando 10% (v/v) de glicerol em um pouco de solução de cristalização.

Os cristais foram coletados (Figura 33) com auxílio dos instrumentos apropriados e quando necessário, transferidos para gota de solução crioprotetora presente em lamínula siliconizada e novamente coletados. Após a coleta, os cristais foram mergulhados em N₂ líquido em colocados e recipientes especiais e estes colocados em tanque com N₂ de modo a mantê-los resfriados até que fossem difratados.

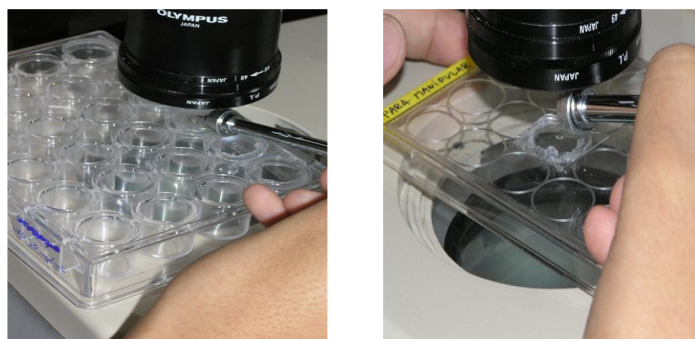


Figura 33. Fotos do processo de coleta de cristal.

3.2.3.3 Difração

3.2.3.3.1 Alguns conceitos

De forma resumida, um cristal é formado por inúmeras unidades de moléculas tridimensionalmente ordenadas e conectadas através de interações não-covalentes formando a rede cristalina.

Uma maneira simplificada de enxergar um cristal é pensar que ele é composto por objetos que se repetem ao longo de toda sua estrutura, sendo que um objeto se relaciona com outro por uma operação de translação. Esse objeto é o que chamamos de célula unitária. Se imaginarmos um ponto **O** na rede cristalina como sendo a origem dela, a célula unitária será o paralelepípedo formado pelos vetores **a**, **b** e **c** que saem da origem **O** e vão cada um para uma direção até encontrar um próximo ponto na rede cristalina (Figura 34). Para uma mesma rede podemos escolher várias células unitárias, mas para escolher a correta deve-se optar pela célula unitária mais simétrica. Células unitárias centradas devem ser escolhidas quando essas são mais simétricas do que qualquer outra célula primitiva possível. Outros pontos importantes sobre a célula unitária são os seus seis parâmetros geométricos. São eles: os comprimentos **a**, **b** e **c** e os ângulos α , β e γ (Figura 35). Dependendo dos valores desses parâmetros teremos um tipo de sistema cristalino (Figura 36).

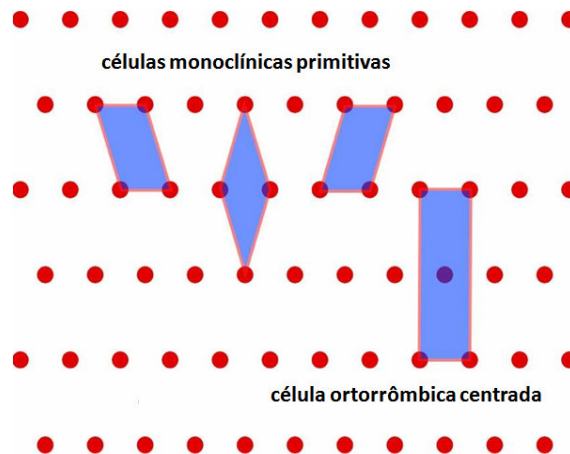


Figura 34. Algumas formas de dividir a rede cristalina em células unitárias. A escolha deve ser de preferência, pela célula unitária mais simétrica. Células unitárias centradas são escolhidas quando são mais simétricas do que qualquer célula primitiva possível. Fonte: Rhodes, p.67, 2006.

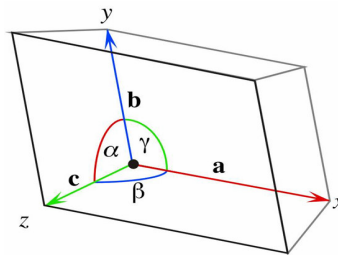


Figura 35. Célula unitária (triclínica) geral com as margens a, b e c e os ângulos α , β e γ . Fonte: Rhodes, p.50, 2006.

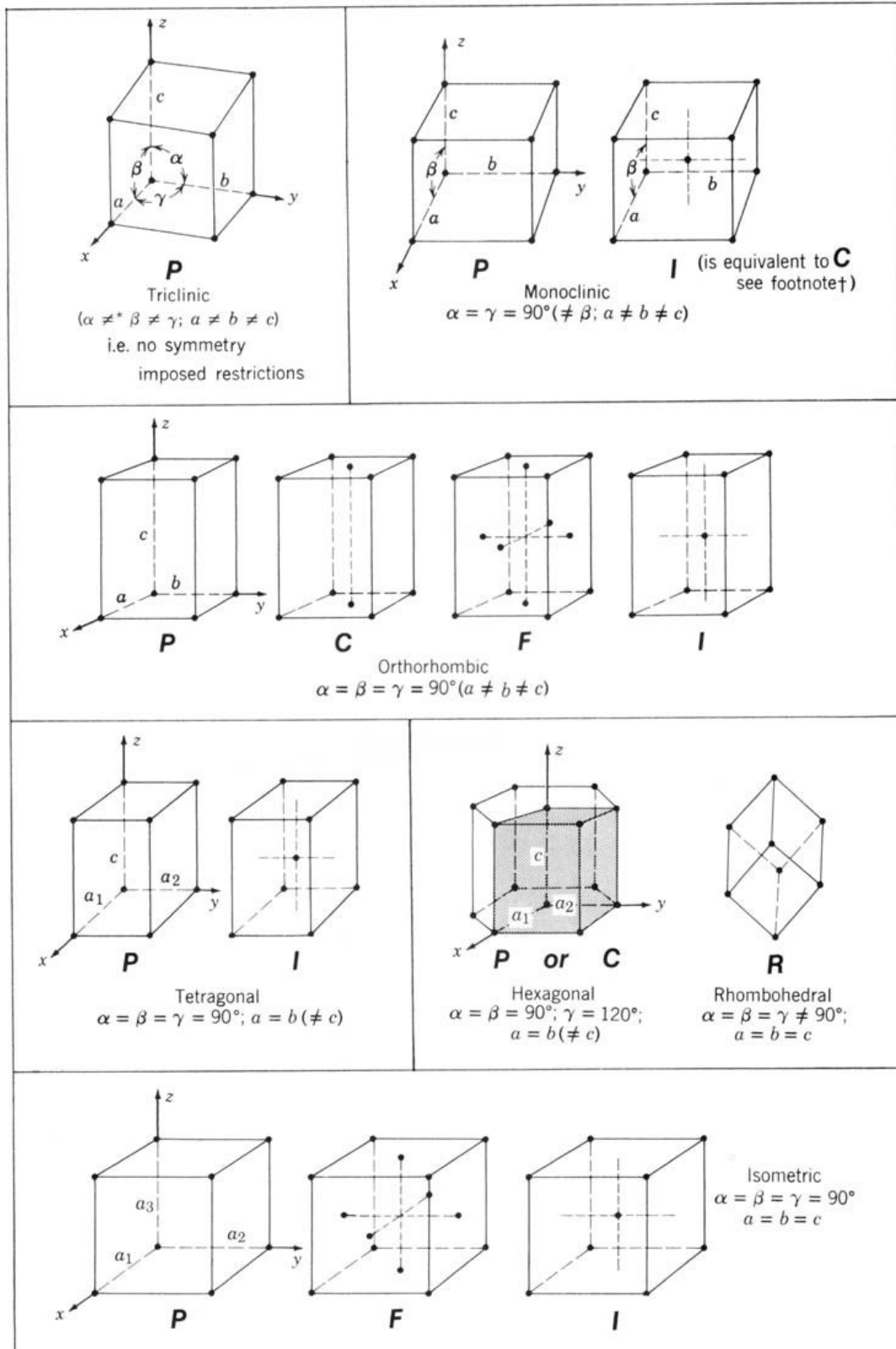


Figura 36. Sistemas cristalinos e suas propriedades geométricas. P – primitivo; C – bases centradas; F – faces centradas; I – corpo centrado. Fonte: Connolly, p.7, 2007.

Como dito anteriormente, as moléculas estão dispostas de maneira organizada em um cristal. A célula unitária poderá compreender diversas moléculas da proteína que foi cristalizada. Cada molécula estará relacionada com a outra através de operações de simetria (translação e/ou rotação), que são características de cada cristal. Em suma, a célula unitária também é composta por um "objeto" que se repete. Esse "objeto" é chamado de unidade assimétrica e ela varia de cristal para cristal. Pode ser que as unidades assimétricas de cristais formados pela mesma proteína sejam diferentes. Um pode ter uma molécula na unidade assimétrica e o outro duas, por exemplo. No caso de um cristal possuir mais de uma molécula na unidade assimétrica não significa que se trata de um oligômero, mas sim que as moléculas que determinam a unidade assimétrica são ligeiramente diferentes estruturalmente, ou seja, possuem uma simetria não-cristalográfica.

A simetria da célula unitária e a simetria interna de seus elementos são descritas pelo seu grupo espacial. O grupo espacial é representado por símbolos como $P2_12_12_1$, onde a letra maiúscula indica o tipo de rede e os outros símbolos representam as operações de simetria que ocorrem nos três eixos (x, y e z) (RHODES, p.66, 2006).

Quando expomos o cristal ao feixe de raios-X estamos buscando informações estruturais que virão através das imagens que obteremos quando o raios-X atingir o cristal e encontrar o detector ao ser difratado (Figura 37). Se mantivermos o cristal imóvel ao longo da coleta de imagens, estaremos perdendo informações importantes sobre sua estrutura já que nem todas as reflexões atingirão o plano do detector. Por isso, é fundamental rodar o cristal durante a coleta de dados. O goniômetro é um aparato que permite a rotação do cristal (que é colocado na cabeça do goniômetro) nos ângulos Φ (phi), χ (chi) e ω (omega) (Figura 38). Além disso, o detector também pode se mover aproximando-se ou afastando-se do cristal para facilitar a captação das reflexões.

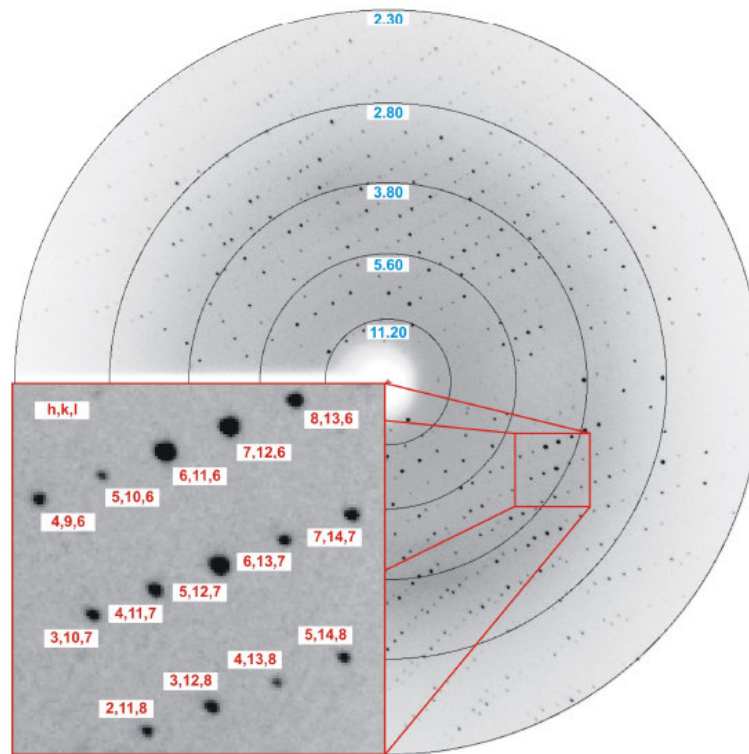


Figura 37. Exemplo de imagem de difração de um cristal de proteína. A resolução aumenta do centro para as bordas da imagem. Cada reflexão é definida por índices de Miller h , k , l (mostrados em maior aumento). Fonte: Nagem, 2003.

Cada ponto da imagem é uma reflexão correspondente a uma família de planos h , k , l (índices de Miller) que, por acaso, estão na posição em que se observa a difração. Com a rotação do cristal, outros planos se posicionam de forma que se pode observar suas difrações (MCPHERSON, 2009). Sendo assim, cada reflexão pode ser identificada pelos índices de Miller. (NAGEM, 2003)

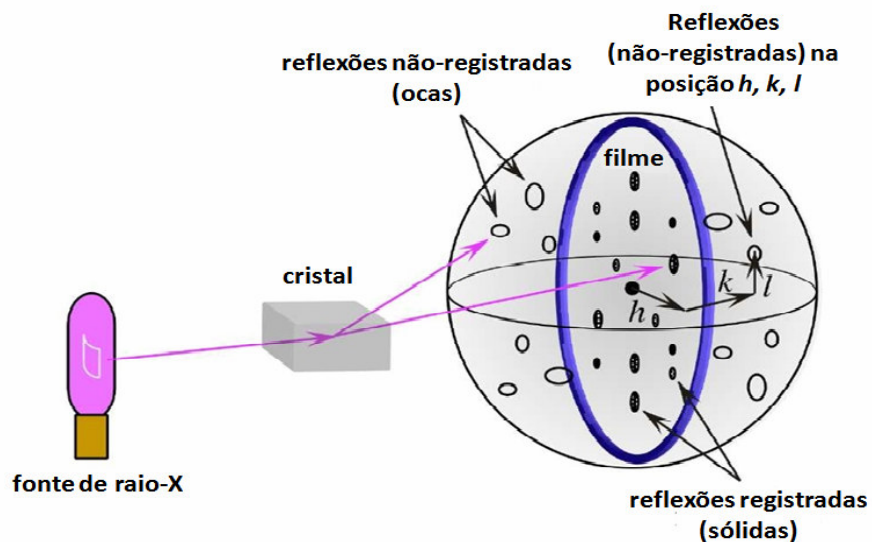


Figura 38. Representação de coleta de imagens. Mostra reflexões medidas em uma orientação do cristal (pontos sólidos no filme) e reflexões que poderiam ser registradas em outra orientação (pontos ocios dentro da esfera, mas fora do filme). Cada reflexão é localizada pelos seus índices h, k e l . Fonte: Rhodes, p. 19, 2006

Muitas vezes os cristais de macromoléculas são danificados pela exposição aos raios-X, principalmente quando se trata de linhas de luz síncrotron muito brilhantes (como as de terceira geração). Esses prejuízos incluem piora do padrão de difração, aumento do volume da célula unitária e danos estruturais específicos em ligações covalentes causados pela formação de radicais livres (Garman e Owen, 2005). Porém o tempo de vida dos cristais pode ser aumentado quando esses são resfriados durante a difração. Esse resfriamento é feito por um sistema criogênico onde um soprador de nitrogênio gasoso é apontado para a cabeça do goniômetro. Esse sistema mantém o cristal a uma temperatura aproximada de 100 K (Figura 39).

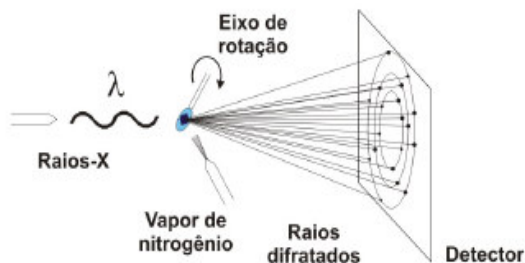


Figura 39. Esquema do equipamento utilizado nas linha de raios-X. O raio-X de comprimento de onda λ , incide no cristal que pode rodar (figura demonstra apenas um eixo de rotação) e está sendo atingido por vapor de nitrogênio. O raio-X é difratado e atinge o detector. Fonte: Nagem, 2003.

3.2.3.3.2 Detalhes experimentais

As coletas de dados de difração foram realizadas com uso de raios-X de anodo rotatório (*Rigaku*) do Instituto de Física de São Carlos, USP (Figuras 40C e D). Equipado com espelhos confocais (*Osmic*), placa de imagem MAR345dtb. Os cristais vitrificados em fluxo de nitrogênio gasoso com temperatura de 100 K produzido pelo Oxford 700 Cryo-system.

Também coletamos dados de difração nas linhas de cristalografia de proteínas D03B - MX1 (Figura 40B) (POLIKARPOV, *et al.*, 1998) e W01B -MX2 (GUIMARÃES *et al.*, 2009) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Fig.ura 40A) (LNLS, Campinas, conforme submissão e aprovação de projeto de pesquisa). A linha MX2 conta com espelho colimador vertical, monocromador de cristal duplo de Si(111) e espelho focalizador toroidal, sistema criogênico Oxford Nitrogen Cryojet XL. O detector é MarMosaic 225 (CCD com área de 225x225 mm²). A linha MX1 é equipada com espelho curvado cilíndricamente para focalização vertical e cristal-monocromador curvo para focalização no plano horizontal. Também possui sistema criogênico. O detector presente é do tipo CCD (*MarResearch*).

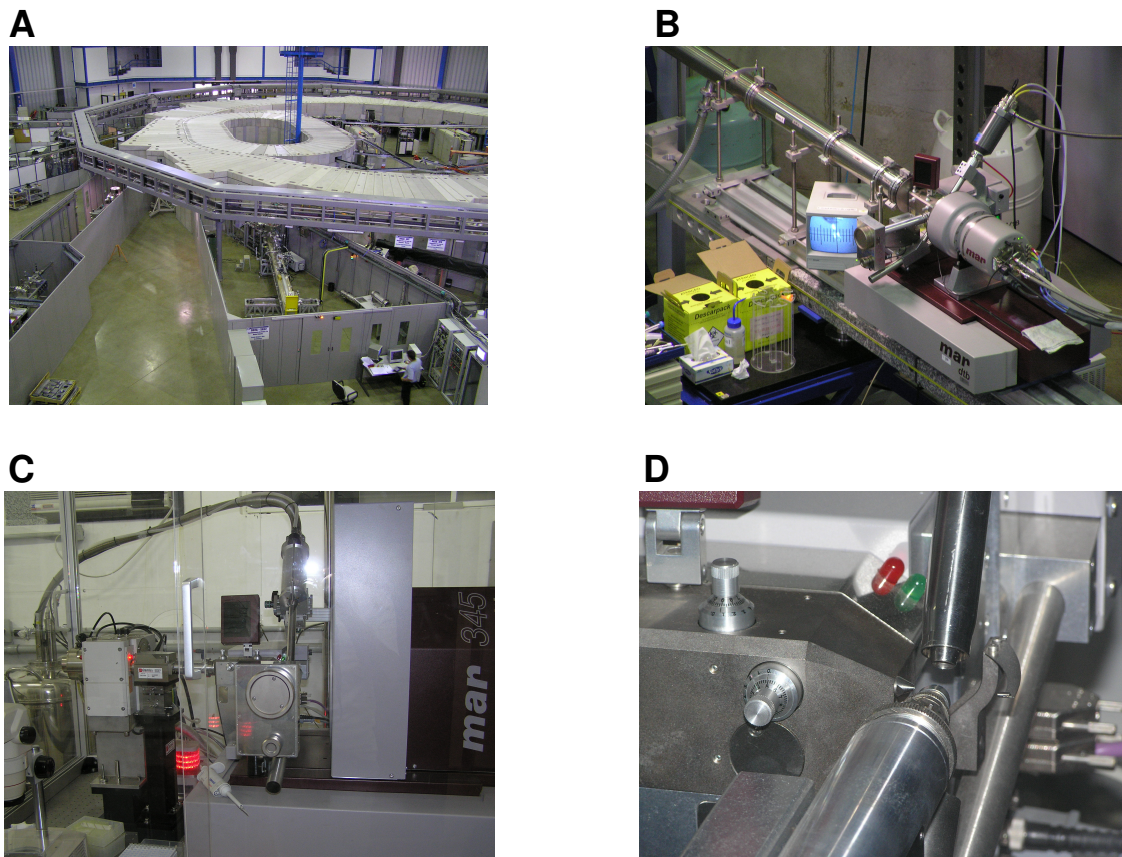


Figura 40. Fotos de equipamentos usados para difração dos cristais. **A)** Fonte de luz síncrotron, Prédio do Anel, LNLs. **B)** Linha D03B - MX1. **C)** e **D)** Anodo rotatório, Instituto de Física de São Carlos, USP. Imagens: Prof. Luís Maurício T. R. Lima

3.2.3.4 Processamento das imagens de difração e resolução de estruturas

3.2.3.4.1 Alguns conceitos

Para cada cristal de boa qualidade coletamos um conjunto de imagens. Cada imagem corresponde ao perfil de difração de uma orientação do cristal. Essas imagens devem ser indexadas e integradas, ou seja, em um primeiro momento, elas são analisadas uma a uma para a identificação de cada reflexão e para que suas intensidades sejam medidas. Depois, as imagens são agrupadas fazendo com que a escala dos seus valores de intensidade seja a mesma.

A difração do raios-X por um cristal é resultado da interação entre essa radiação eletromagnética e os elétrons dos átomos. Como esses elétrons oscilam, devido à atuação do campo elétrico, eles tornam-se fontes de ondas secundárias que sofrem

interferência. A equação que descreve a onda espalhada pela célula unitária é denominada equação do fator de estrutura e está demonstrada abaixo:

$$\mathbf{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j(hkl) \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] = F_{hkl} \exp[i\alpha_{hkl}], \quad (1)$$

onde, F_{hkl} e α_{hkl} são a amplitude e a fase do fator de estrutura \mathbf{F}_{hkl} , respectivamente. h , k e l são os índices de Miller. x_j , y_j , z_j e $f_j(hkl)$ são as coordenadas atômicas e o fator de espalhamento do j -ésimo átomo (de um total de n átomos) de dentro da célula unitária do cristal.

O que se pretende na cristalografia é obter um mapa de densidade eletrônica (Figura 41) que nada mais é do que o gráfico de uma função matemática. Essa função está relacionada com a equação do fator de estrutura da seguinte forma:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F_{hkl} \exp[i\alpha_{hkl}] \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (2)$$

onde, $\rho(x, y, z)$ é a densidade eletrônica dentro da célula unitária e V é o volume da célula unitária.

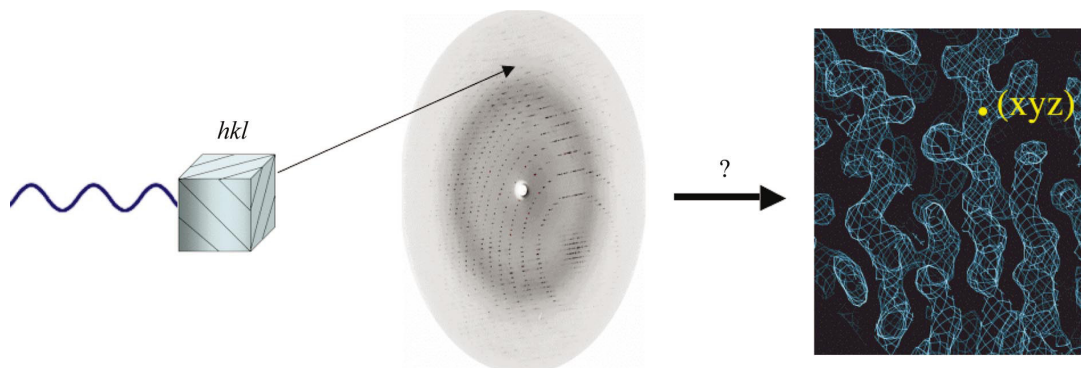


Figura 42. Esquema de um experimento de difração. Como obter o mapa de densidade eletrônica a partir da imagem de difração? Fonte: Taylor, 2003.

Como mostrado através da equação (1), F_{hkl} é uma função periódica por isso possui amplitude (F_{hkl}), frequência e fase (α_{hkl}). A amplitude é proporcional a raiz quadrada da intensidade de reflexão (I_{hkl}), que por sua vez, é obtida diretamente através do experimento de difração. As três frequências dessa função de onda são h , k e l , os índices dos planos que produzem a reflexão descrita por F_{hkl} . Logo, a única informação que falta para se calcular o fator de estrutura é a fase (Figura 42). Essa informação é perdida no experimento de cristalografia, por isso alguns métodos foram desenvolvidos para obter essa informação. Entre esses métodos estão a substituição isomorfa, os métodos diretos, os métodos baseados no espalhamento anômalo de átomos pesados e a substituição molecular. Esse último foi o método empregado nesse trabalho.

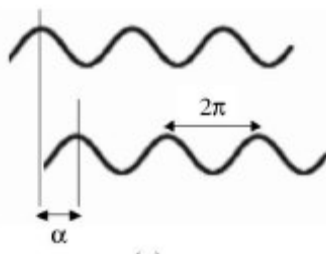


Figura 42. Esquema da definição de ângulo de fase (α). Fonte: Taylor, 2003.

A substituição molecular baseia-se na obtenção da fase através de uma estrutura-modelo já resolvida. Portanto, uma das limitações desse método é que haja um modelo, homólogo ao da proteína de interesse, disponível. De modo geral, a identidade de sequência deve ser de pelo menos 25% e o RMSD deve ser menor do que 2,0 Å entre os átomos de C α do modelo e da estrutura final (TAYLOR, 2003).

3.2.3.4.2 Detalhes experimentais

Os conjuntos de imagens adquiridas foram processados utilizando a suíte de programas CCP4i v. 6.1.1 (POTTERTON *et al.*, 2003). Usamos o iMosfilm (LESLIE, 1992) para indexar, refinar os parâmetros de célula e integrar as imagens. Posteriormente usamos o Scala (EVANS, 1993) para escalonar as imagens (ajustar os valores de intensidade para a mesma escala). O programa MolRep (VAGIN E

TEPLYACOV, 1997) foi usado para o faseamento por substituição molecular que foi efetuada utilizando a estrutura de α -trombina humana depositada no PDB com o código 1PPB como modelo. O Refmac (MURSHUDOV *et al.*, 1997) foi usado no refinamento do espaço recíproco e o Coot (EMSLEY E COLTAN, 2004), interface gráfica, foi usado no refinamento do espaço real através de inspeção visual dos mapas de densidade eletrônica ($2F_{\text{observado}} - F_{\text{calculado}}$ e $F_{\text{observado}} - F_{\text{calculado}}$ ou $2F_o - F_c$ e $F_o - F_c$)

Foi usado o programa *Superpose* da suíte CCP4i (POTTERTON *et al.*, 2003), para o cálculo de RMSD entre os aminoácidos de α Th:NF258 e α Th de PDB ID 1PPB. Os valores obtidos pelo *Superpose* foram usados para construção de gráficos a partir do programa SigmaPlot 10.0 (*Systat. Software Inc*, Califórnia, Estados Unidos).

O PyMol (DELANO, 2008) foi utilizado no alinhamento de estruturas e cálculo de RMSD geral entre elas.

Algumas figuras foram geradas pelo Pymol (DELANO, 2008) outras foram a partir de *Print Screen* do Coot (EMSLEY E COLTAN, 2004).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Tomando como inspiração os resultados de interação entre α Th e SVR obtidos por outro grupo de pesquisa do IBqM (MONTEIRO *et al.*, 2004) e posteriormente por nosso grupo no estudo (LIMA *et al.*, 2009), decidimos investigar o comportamento da enzima frente diversos análogos de SVR. Para isso realizamos ensaios de atividade enzimática em presença desses compostos, onde usamos o fibrinogênio humano como substrato (procedimento descrito em Material e Métodos).

Para tentar facilitar nossas observações decidimos dividir os 12 análogos em 3 grupos de 4, de acordo com as suas características estruturais. A SVR, como mostrado na introdução, possui um grupamento metil como substituinte na posição 4 de cada anel aromático (4-metilfenileno) que une os naftalenos sulfonados aos 3,1-fenilcaboniliminos posicionados no meio da molécula. A Série 1 é composta pelos análogos com substituintes do tipo hidrocarbonetos, a Série 2 é composta por substituintes com heteroátomo e a Série 3 é composta por análogos “contraídos”. (Estruturas em Anexo 1).

As figuras 46, 47 e 48 mostram os gráficos de atividade enzimática separadamente e todos estão em escala com o que mostra a mais alta atividade relativa (NF258). A maioria dos compostos inclusive a SVR (que foi analisada para fins de comparação), apresentou um comportamento bastante inesperado. Antes de inibir a enzima, esses compostos a ativaram. Alguns a ativaram de modo acentuado como foi o caso de NF198 (Série 1), NF258 (Série 2) e MK-HU1 (Série 3).

Os análogos NF058 e NF864 foram os únicos que não apresentaram comportamento bimodal. O primeiro ativou a enzima e o segundo inibiu. (Valores de IC_{50} , EC_{50} , etc. são mostrados nas Tabelas 2, 3 e 4).

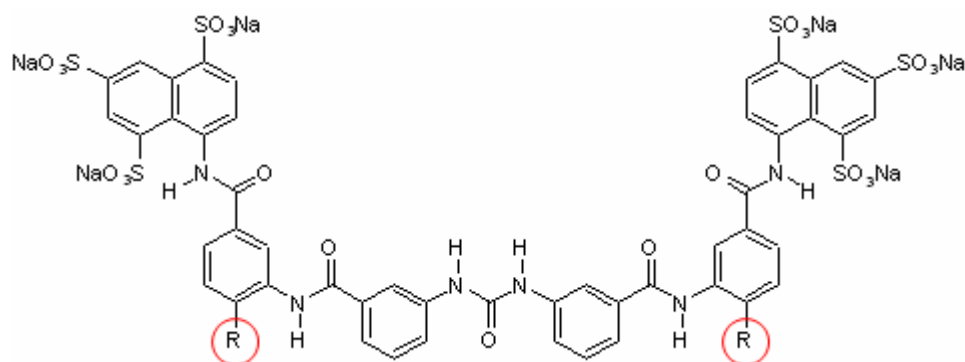
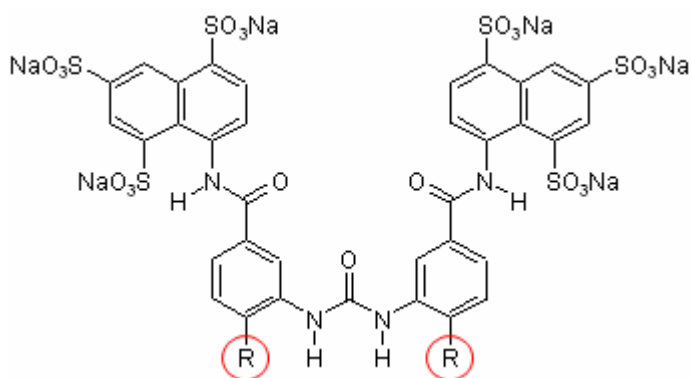


Figura 43. Estrutura geral dos análogos da Série 1 e 2.



ANÁLOGOS	R
NF023	H
NF058	CH ₃

Figura 44. Estrutura geral de alguns análogos "contraídos".

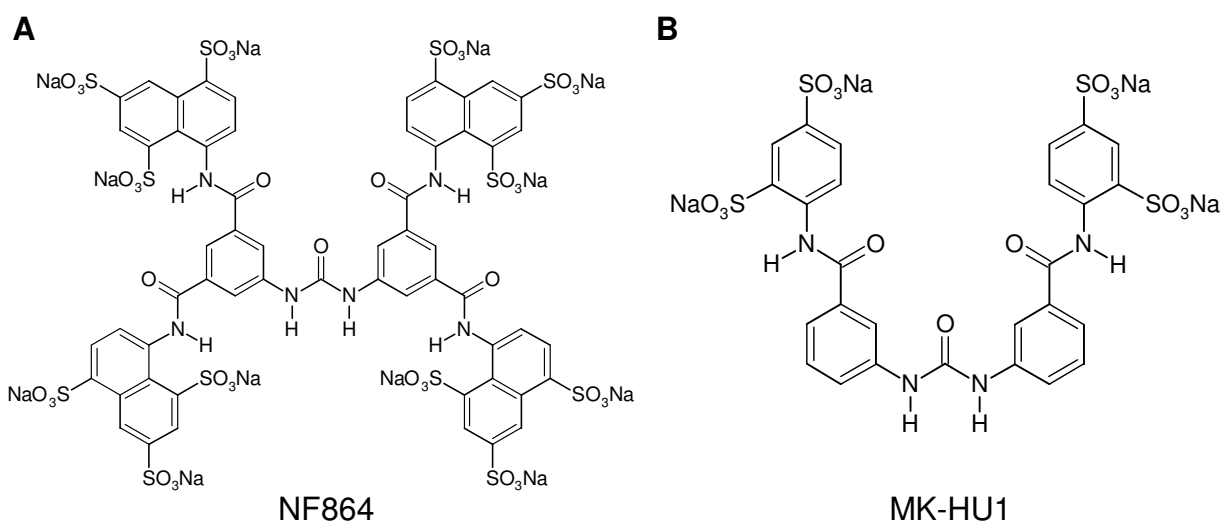


Figura 45. Estruturas dos análogos da Série 3.

Série 1

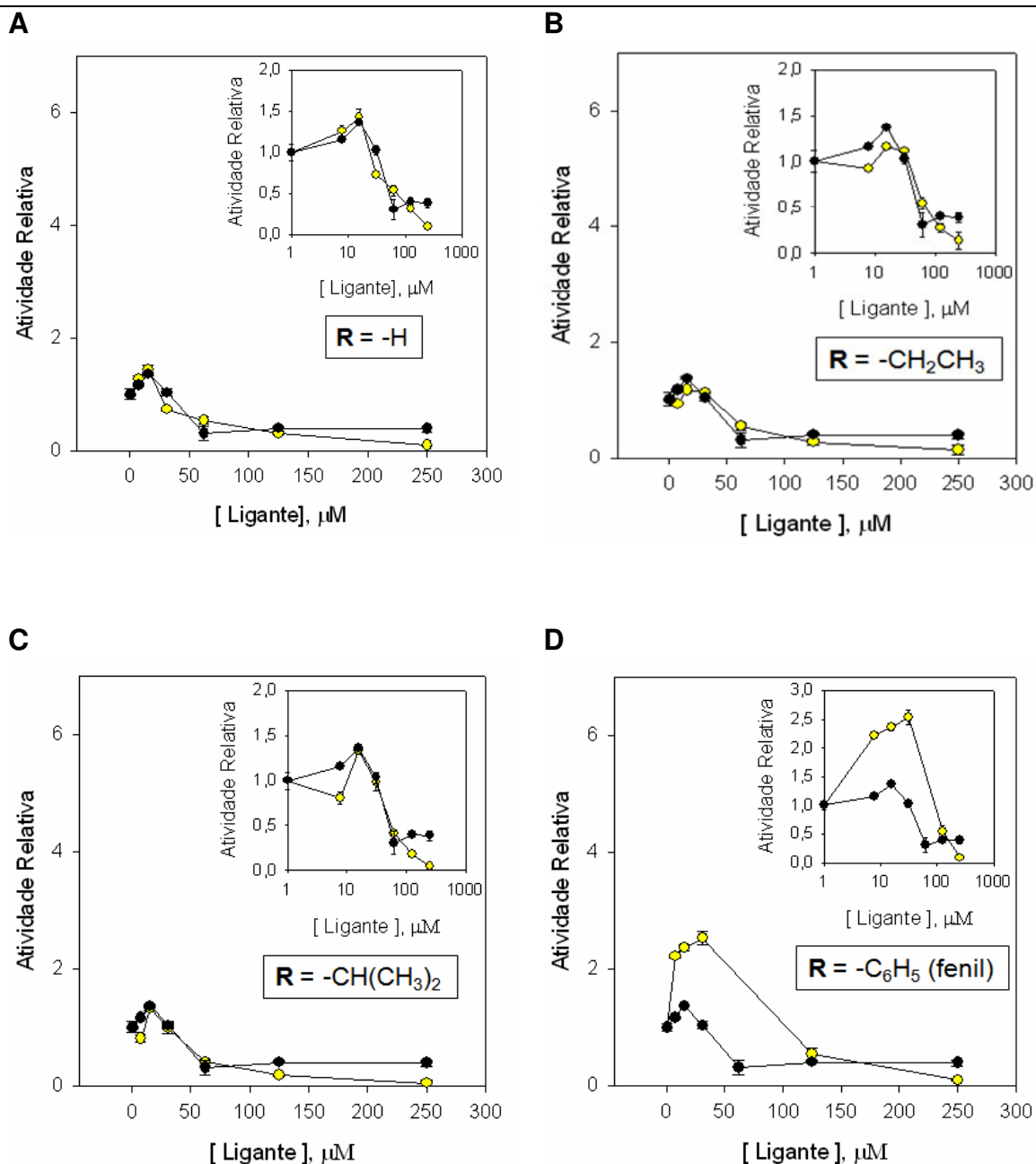


Figura 46. Efeito de concentrações crescentes dos compostos da Série 1 na atividade catalítica de αTh sobre fibrinogênio. Ordenada, Atividade Relativa, velocidade inicial de coagulação do fibrinogênio na presença de análogo de SVR / velocidade inicial de coagulação do fibrinogênio na ausência de análogo de SVR. Os insets mostram a [Ligante] em escala logarítmica. Cada painel está mostrando o desempenho da SVR (preto) e de um dos análogos de SVR (amarelo). O ponto de atividade representado em 1 μM de ligante corresponde a atividade medida na ausência deste. **A)** NF037. **B)** NF127. **C)** NF151. **D)** NF198. **R da figura 43.** Dados representam médias, com \pm Desvio Padrão, de três determinações.

Série 2

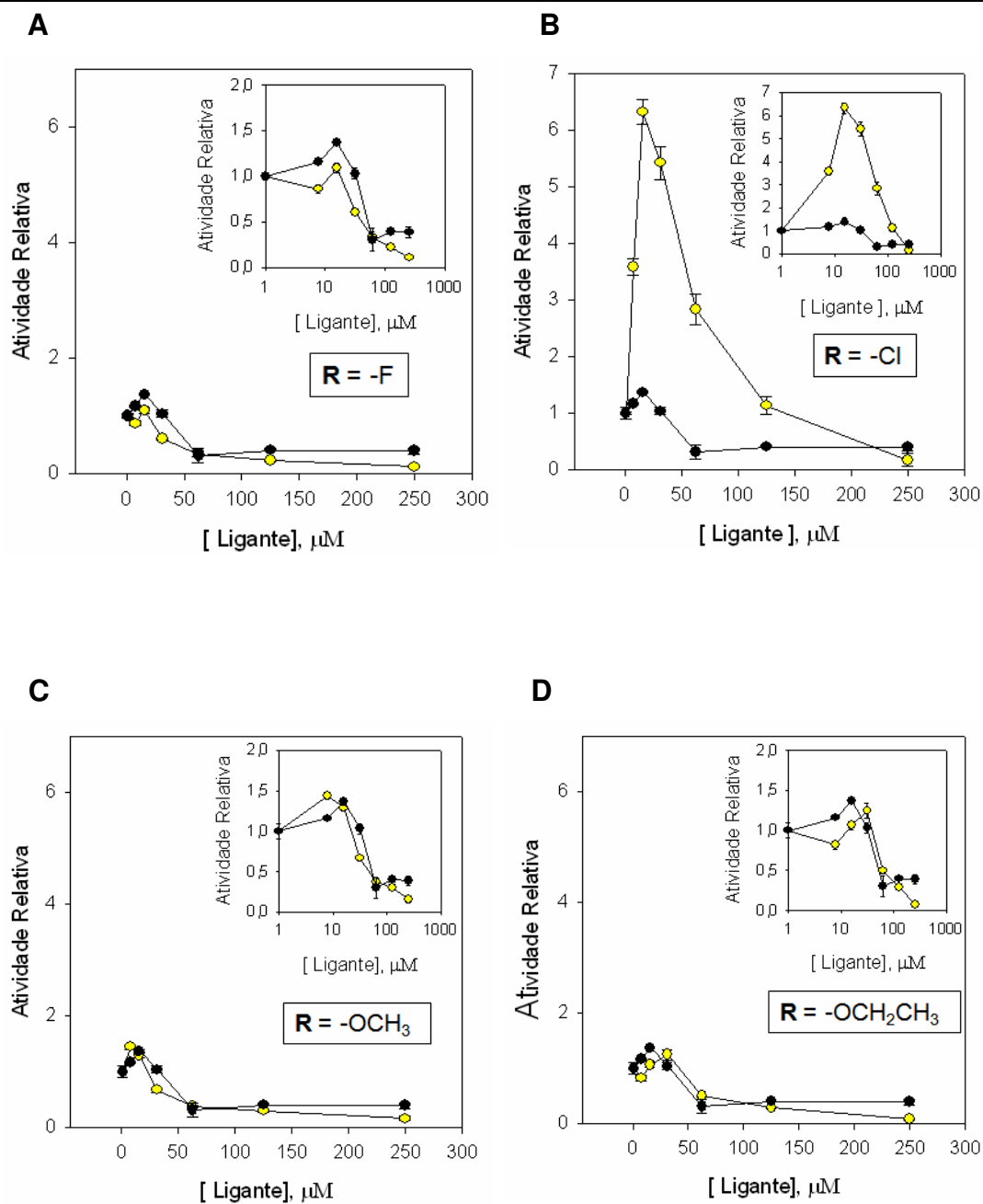


Figura 47. Efeito de concentrações crescentes dos compostos da Série 2 na atividade catalítica de αTh sobre fibrinogênio. Ordenada, Atividade Relativa, velocidade inicial de coagulação do fibrinogênio na presença de análogo de SVR / velocidade inicial de coagulação do fibrinogênio na ausência de análogo de SVR. Os insets mostram a [Ligante] em escala logarítmica. Cada painel está mostrando o desempenho da SVR (preto) e de um dos análogos de SVR (amarelo). O ponto de atividade representado em $1 \mu\text{M}$ de ligante corresponde a atividade medida na ausência deste. **A)** NF157. **B)** NF258. **C)** NF260. **D)** NF222. **R da figura 43.** Dados representam médias, com \pm Desvio Padrão, de três determinações

Série 3

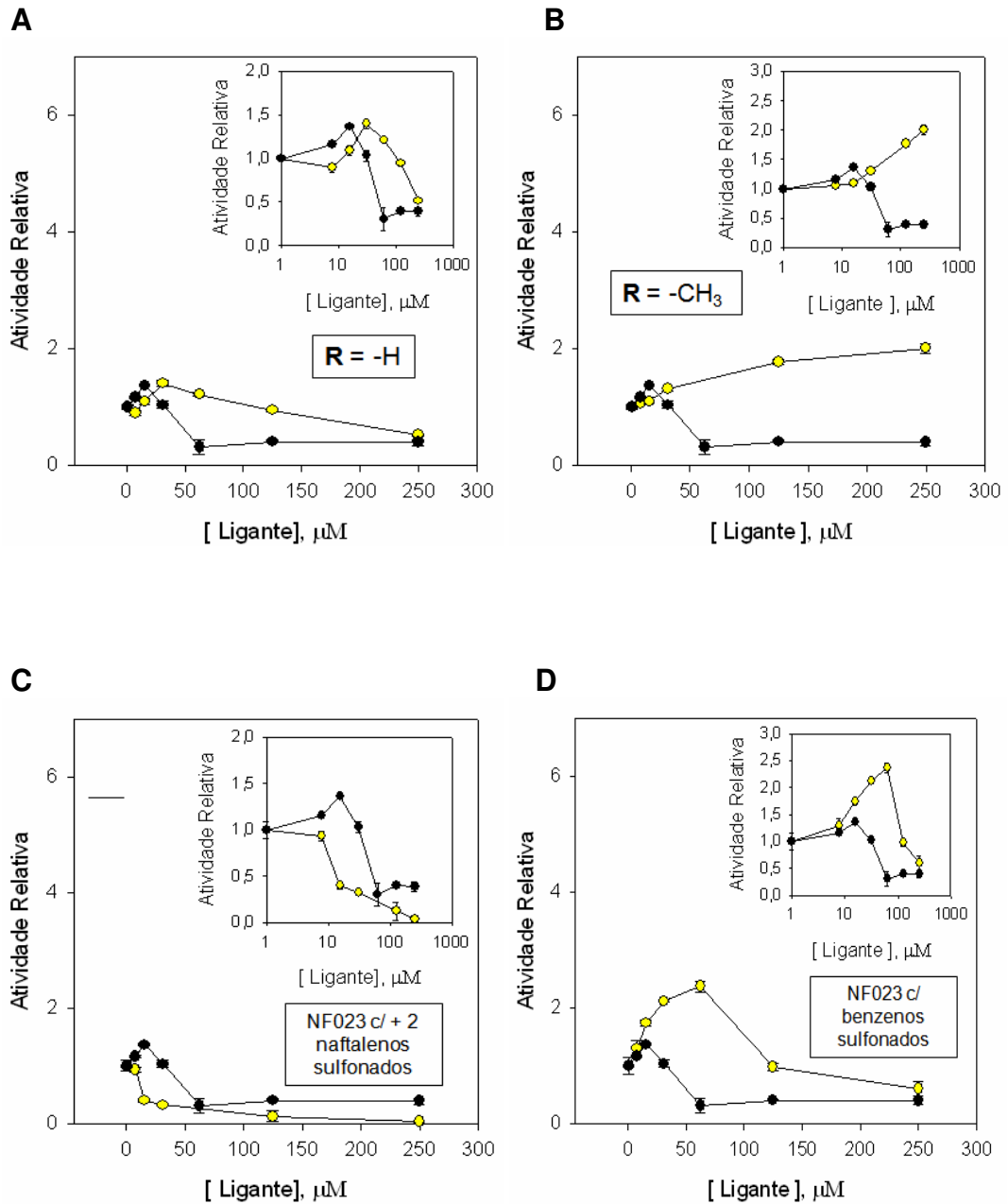


Figura 48. Efeito de concentrações crescentes dos compostos da Série 3 na atividade catalítica de αTh sobre fibrinogênio. Ordenada, Atividade Relativa, velocidade inicial de coagulação do fibrinogênio na presença de análogo de SVR / velocidade inicial de coagulação do fibrinogênio na ausência de análogo de SVR. Os *insets* mostram a [Ligante] em escala logarítmica. Cada painel está mostrando o desempenho da SVR (preto) e de um dos análogos de SVR (amarelo). O ponto de atividade representado em 1 μM de ligante corresponde a atividade medida na ausência deste. **A)** NF023. **B)** NF058. **C)** NF864. **D)** MK-HU1. **R da figura 44.** Dados representam médias, com \pm Desvio Padrão, de três determinações.

RESULTADOS

Analisando os dados mostrados nas tabelas 2, 3 e 4, observamos que dentre os compostos com comportamento bimodal, podemos distinguir dois perfis. Os que demonstram o máximo de sua ativação enzimática a uma concentração de 15,6 μM (NF037, NF127, NF151, NF157 e NF258) e os que demonstram o máximo de sua ativação enzimática a uma concentração de 31,2 μM (NF198, NF222, NF023 e MK-HU1). Apenas NF260 apresenta o comportamento similar aos anteriores mas o máximo de sua ativação se dá a uma concentração de 7,8 μM .

Para uma melhor observação dos perfis das curvas e análise dos resultados, resolvemos organizar os dados de forma a reunir os compostos que ativaram acentuadamente a enzima em um gráfico (Figura 49A), os que tiveram um comportamento similar ao da SVR (Figura 49B) em outro gráfico e os que apenas inibiram a enzima em um terceiro gráfico (Figura 49C).

Tabela 2. Análise quantitativa dos compostos da Série 1 e da SVR.

Compostos	R*	[] na Ativ. Máx. (μM)	Ativ. Rel. Máx.	EC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
NF037	H	15,6	1,43 \pm 0,09	6	63
SVR	-CH ₃	15,6	1,36 \pm 0,02	7	45
NF127	-CH ₂ CH ₃	15,6	1,16 \pm 0,007	13	61
NF151	-CH(CH ₃) ₂	15,6	1,33 \pm 0,04	14	56
NF198	-C ₆ H ₅	31,2	2,53 \pm 0,06	5	129

* R da figura 43.

Tabela 3. Análise quantitativa dos compostos da Série 2.

Compostos Série 2	R*	[] na Ativ. Máx. (μM)	Ativ. Rel. Máx.	EC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
NF157	-F	15,6	1,09 \pm 0,06	13	36
NF258	-Cl	15,6	6,32 \pm 0,21	7	197
NF260	-OCH ₃	7,8	1,44 \pm 0,04	4	41
NF222	-CH ₂ OCH ₃	31,2	1,24 \pm 0,09	21	60

* R da figura 43.

RESULTADOS

Tabela 4. Análise quantitativa dos compostos da Série 3.

Compostos Série 3	Estrutura	[] na Ativ. Máx. (μM)	Ativ. Rel. Máx.	EC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
NF023	NF037 compactado*	31,2	1,40 \pm 0,05	21	180
NF058	SVR compactada*	\geq 250	2,00 \pm 0,08	71	-
NF864	NF023 c/ + 2 naftalenos sulfonados [#]	-	-	-	14
MK-HU1	NF023 c/ benzenos sulfonados [#]	31,2	2,11 \pm 0,02	13	182

* Figura 44.

[#] Figura 45.

Em nossos experimentos, SVR a uma concentração de 15,6 μM foi capaz de levar a enzima a uma Atividade Relativa de até 1,36 \pm 0,02 (EC₅₀ \sim 7 μM), ou seja, promovendo a ativação, e posteriormente a inibiu com IC₅₀ de \sim 45 μM .

O experimento de atividade enzimática de αTh na presença de SVR foi repetido mais de 10 vezes, todos em triplicata, variando-se sistematicamente todos os componentes do ensaio (ex; lote de enzima, solvente, reagentes, tampões, etc), de modo a garantir a reprodutibilidade dos resultados, já que não estávamos conseguindo obter uma curva de atividade relativa com o perfil parecido com o da curva obtida por Monteiro *et al.*, 2004. Ao longo de tantas tentativas, observamos que a inibição da enzima aconteceu posteriormente a ativação da mesma, como o que aconteceu na presença da maioria dos outros análogos de SVR.

Somente NF157, NF260 e NF864 foram capazes de inibir a atividade de αTh sobre fibrinogênio de modo mais eficiente do que a SVR. Estes apresentaram IC₅₀ mais baixos do que o da SVR (36 μM , 41 μM e 14 μM , respectivamente), mas considerando que em nossos resultados a SVR apresentou um IC₅₀ de \sim 45 μM , apenas o NF864 realmente se destacou nesse aspecto.

RESULTADOS

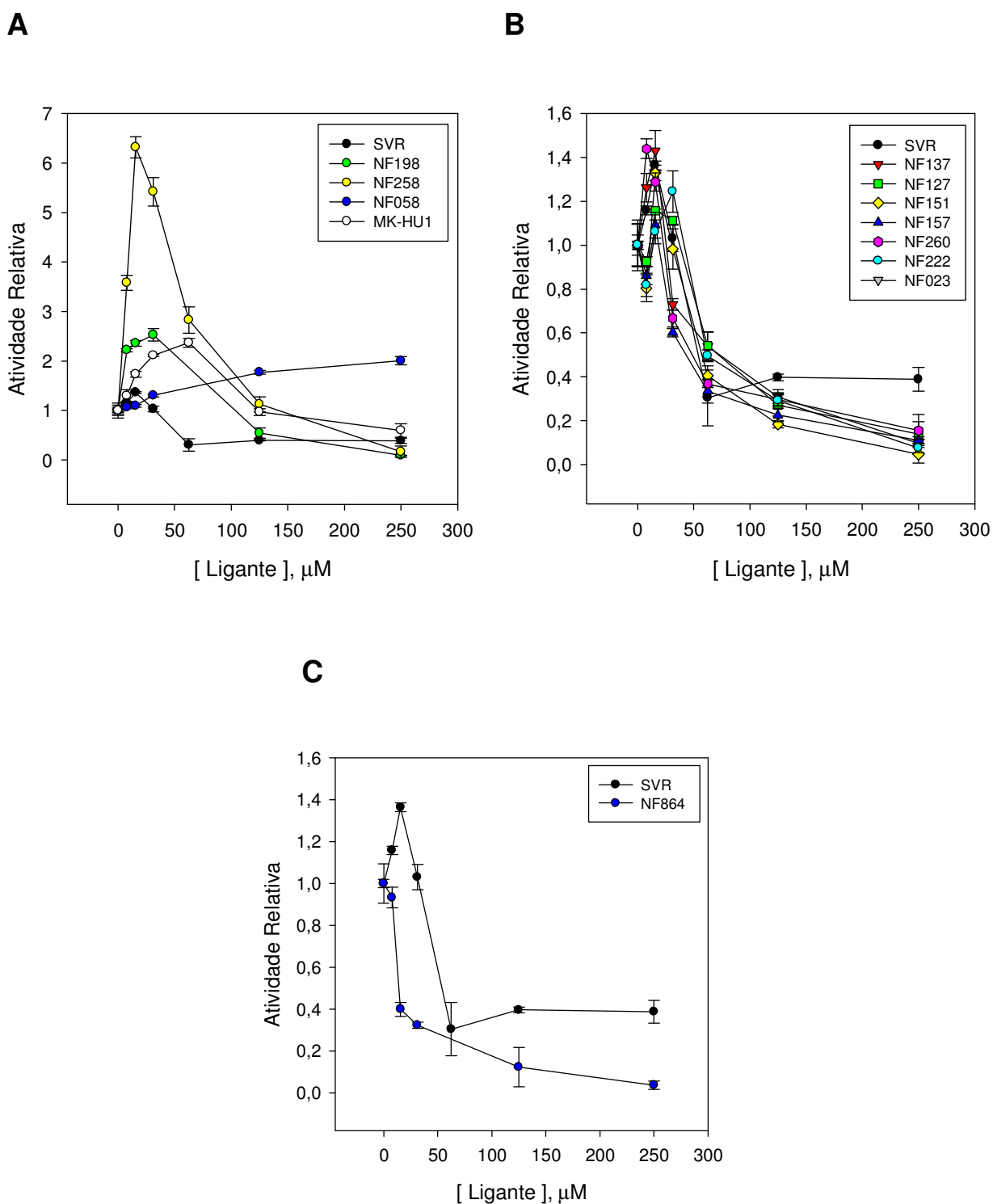


Figura 49. Efeito de concentrações crescentes de análogos de SVR na atividade catalítica de αTh (1 nM) sobre fibrinogênio humano (2 mg/mL). Ordenada, Atividade Relativa, velocidade inicial de coagulação do fibrinogênio na presença de análogo de SVR / velocidade inicial de coagulação do fibrinogênio na ausência de análogo de SVR. **A)** Análogos de alta ativação. **B)** Análogos com mesmo perfil de SVR. **C)** Análogos estritamente inibidores. Dados representam médias, com \pm Desvio Padrão, de três determinações.

4.2 CRISTALOGRAFIA

4.2.1 Cristalização

Em paralelo com os ensaios de atividade enzimática, realizamos testes de cristalização dos complexos de α Th com os análogos de SVR. O objetivo era obter cristais que difratassem com qualidade. Sabíamos que conseguir bons cristais dos 12 complexos seria uma tarefa desafiadora, mas mesmo assim investimos nessa técnica por se tratar de um instrumento poderoso de determinação de estrutura tridimensional de moléculas. Também porque a estrutura de α Th:SVR já havia sido resolvida por nosso grupo.

Os testes foram realizados utilizando 3 dos kits da *Hampton Research*, como já foi descrito anteriormente. O kit HCS 1 foi o mais eficiente para cristalização dos nossos complexos, por isso suas condições foram as mais exploradas em tentativas de otimização dos cristais (Tabela 5). Gostaríamos de ter envolvido outras variáveis das condições de cristalização no processo de otimização dos cristais, mas infelizmente o tempo só nos permitiu alterar a concentração dos reagentes e/ou no pH das soluções. Mas, mesmo usando apenas essa estratégia, não conseguimos otimizar todas as condições.

Observa-se, através da tabela 5, que alguns complexos são mais suscetíveis a cristalização nas condições estudadas, como é o caso do complexo formado pelo ligante NF023. Já outros são mais resistentes e não cristalizaram com facilidade, como o com NF157. Observa-se também que ao contrário do HCS 1 o kit PIS não se mostrou tão eficiente na cristalização dos nossos complexos, já que cristalizamos apenas 5 complexos com esse kit.

RESULTADOS

Tabela 5. Cristalização dos complexos α Th:ligante usando kits da *Hampton Research*.

	Ligante	Cristalizado nas condições do kit HCS 1	Cristalizado nas condições do kit HCS 2	Cristalizado nas condições do kit PIS
SÉRIE 1	NF037	6, 22, 28*, 30*, 31*	-	-
	NF127	11*	31	6, 13, 18, 22
	NF151	10*, 22, 28*	45	26, 40, 44, 46
	NF198	6, 22, 28*, 30*, 31*	-	-
SÉRIE 2	NF157	6, 30*, 31*	-	-
	NF258	4, 6, 22, 30*, 31*	40*	-
	NF260	22, 30*, 31*	40*	-
	NF222	6, 22, 30*, 31*	1, 29, 40*	-
SÉRIE 3	NF023	5, 6, 9, 10*, 5, 17, 21, 22, 28*, 41, 42, 45	26	26
	NF058	22, 30*, 31*	22, 40*, 48	-
	NF864	11*, 40	15	12, 23, 24
	MK-HU1	2, 6, 14, 22, 28*, 36	22, 34, 38, 44, 48	26, 40

* Condições que já foram otimizadas.

A figura 50 mostra algumas fotos de cristais que obtivemos ao longo do trabalho. É importante destacar que a forma externa de um cristal está pouco relacionada com a organização das moléculas que o compõe. Isso quer dizer que, nem sempre um cristal de formas aparentemente perfeitas está com sua rede de moléculas organizada de modo satisfatório para que o perfil de difração seja claro e único. O inverso também é verdadeiro.

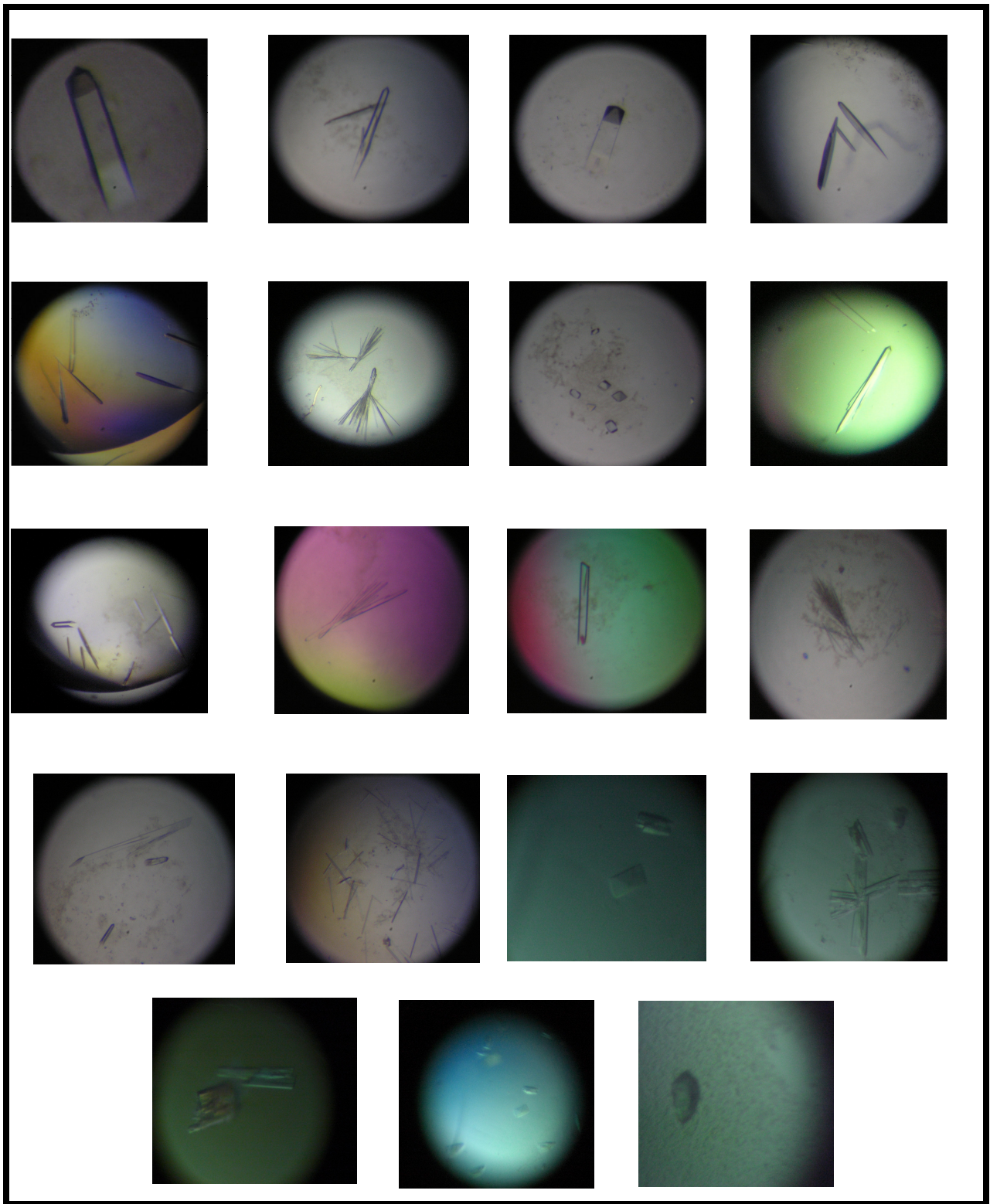


Figura 50. Fotos de alguns cristais obtidos em nossos ensaios. Dimensões típicas de 100 a 200 micrometros.

4.2.2 Difração e coleta de dados

Após a observação do crescimento de cristais, estes eram resfriados em N₂ líquido, atentando para a necessidade de submetê-los a solução crioprotetora. Estes eram mantidos resfriados até que fossem difratados em laboratório apropriado (LNLS ou IFSC).

Ao observarmos o cristal na lupa não podemos ter certeza de que se trata de um cristal de proteína. Pode ser que seja apenas um componente da solução-mãe que cristalizou (geralmente sais inorgânicos). Só saberemos se estamos diante de um cristal de proteína, após observarmos uma imagem da difração produzida por ele. As proteínas possuem um perfil bastante característico de modo que, geralmente, é fácil distingui-la dos componentes da solução de cristalização. Mesmo assim, pode ser que por algum motivo, o cristal de proteína não difrate. Por essas razões, todo cristal deve ser levado para o teste de difração.

Tivemos alguns casos de cristais que não difrataram. Pode-se ver na tabela 6 que os cristais formados pelos complexos de α Th com os ligantes NF127 e MK-HU1 são exemplos desses casos (como demonstrado pelo sinal (-)).

Mesmo que tenhamos um cristal de proteína, algumas vezes, ele não nos proporcionará um conjunto de dados de qualidade por se apresentar muito mosaico, por difratar a uma resolução muito baixa (acima de 3,0 Å), entre outros. Características como essas podem fazer com que os dados sejam pobres a ponto de não valer a pena coletar um conjunto de imagens daquele cristal. Por isso, alguns dos nossos cristais que difrataram não tiveram suas imagens coletadas. Foi o que aconteceu com os complexos da enzima com NF037, NF260, NF222, NF023 e NF864 (Tabela 6).

Optamos por coletar imagens de cristais que difrataram a resolução de 3,0 Å ou melhor. Ao todo, coletamos conjuntos de imagens de α Th em complexo com NF151 (2 conjuntos – um a 2,4 Å e outro a 1,9 Å), NF198 (um conjunto a 3,0 Å), NF157 (três conjuntos a 3,0 Å), NF258 (um conjunto a 1,9 Å) e NF058 (dois conjuntos – um a 3,0 Å e outro a 2,7 Å). Apenas o conjunto com o complexo α Th:NF058 de resolução 2,7 Å foi coletado no anodo rotatório do IFSC, USP. As outras imagens foram coletadas no LNLS na linha MX1, com exceção do conjunto com o complexo α Th:NF258 e do conjunto com complexo α Th:NF151 de resolução 2,4 Å, que foram coletados na linha MX2 do LNLS

(Tabela 6).

Os dois conjuntos de α Th:NF151 e o de α Th:NF258 já passaram por resolução e estão em fase de refinamento de estrutura (Tabela 6).

Tabela 6. Informações resumidas sobre a qualidade dos cristais e os dados que obtivemos com eles.

Ligante	Difração	Coletado	Resolução	Refinamento
NF037	+	-	-	-
NF127	-	-	-	-
NF151	+	+	2,4 Å	✓
		+	1,9 Å	✓
NF198	+	+	3,0 Å	-
NF157	+	+	3,0 Å	-
		+	3,0 Å	-
		+	3,0 Å	-
NF258	+	+	1,9 Å	✓
NF260	+	-	-	-
NF222	+	-	-	-
NF023	+	-	-	-
NF058	+	+	3,0 Å	-
		+	2,7 Å	-
NF864	+	-	-	-
MK-HU1	-	-	-	-

4.2.3 Refinamento de estruturas

Ao todo, conseguimos apenas 4 conjuntos de dados com resolução melhor que 3,0 Å, desses iniciamos o processamento de 3, por isso só esses serão detalhados aqui. São eles: α Th:NF258 e os dois de α Th:NF151. Somente o conjunto de dados de α Th:NF258 teve o seu processamento e refinamento finalizado a tempo, mas cada um

do três será apresentado separadamente indicando a situação atual do refinamento dos que não foram finalizados.

Alinhamos 239 estruturas de α Th humana, depositadas no PDB, com a α Th de referência (1PPB, através do PyMol). Esse programa calculou os valores de RMSD gerais entre elas e esses valores foram tabelados (Anexo 4). Alinhamos também as 3 estruturas que entraram em fase de refinamento com a estrutura de referência e os valores de RMSD calculados foram: 0,569 Å para α Th:NF258, 0,473 Å para α Th:NF151 de resolução 1,9 Å (#1) e 0,548 Å para α Th:NF151 de resolução 2,4 Å (#2).

Os valores de RMSD indicaram que a maioria as moléculas de α Th humana depositadas no PDB não apresentam grandes diferenças conformacionais entre si. O mesmo acontece com nossas 3 estruturas.

Os três cristais cresceram na presença de Na^+ de modo que é possível observar a presença desse modulador alostérico no seu sítio característico de ligação, coordenado com diversas moléculas de H_2O (Figura 51).

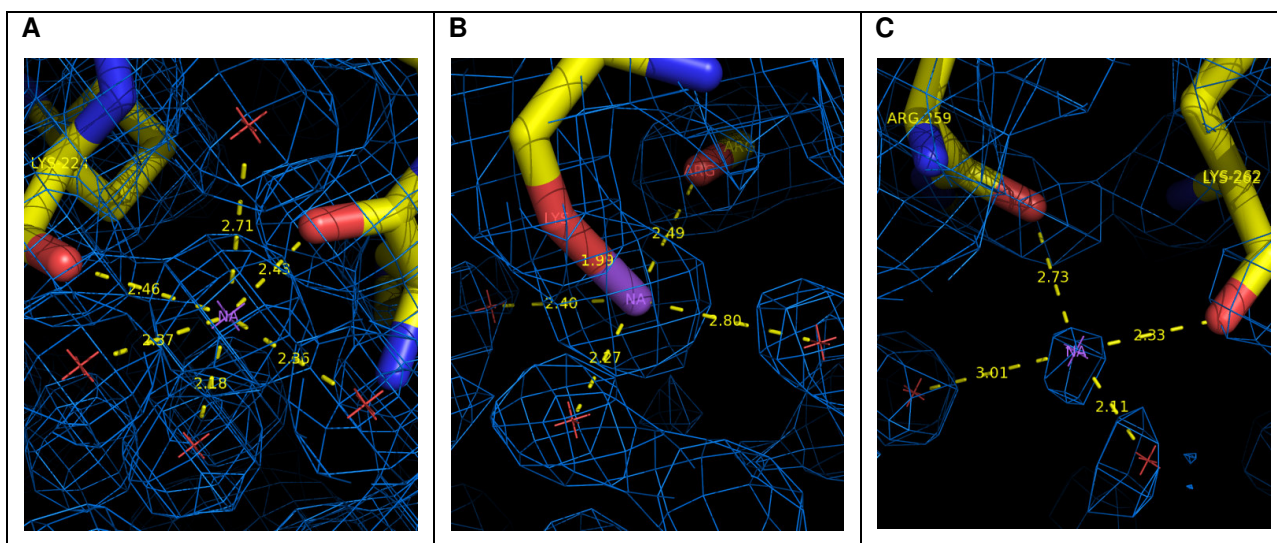


Figura 51. Sítio de ligação de Na^+ nas três estruturas que entraram em processo de refinamento. Nas figuras, asteriscos vermelhos – moléculas de H_2O ; roxo - íon Na^+ . Mapa azul – $2\text{F}_\text{o}-\text{F}_\text{c}$ ($1,0\sigma$ ou $0,43\text{elétrons}/\text{Å}^3$). **A)** Na estrutura α Th:NF258; **B)** na estrutura α Th:NF151 #1. **C)** na estrutura α Th:NF151 #2.

4.2.3.1 Sobre α Th:NF258

O cristal que nos proporcionou as imagens usadas para obter essa estrutura cresceu sob uma condição que continha 0,2 M de acetato de sódio tri-hidratado, 0,1 M de tris pH 8,5 e 30% (p/v) de PEG 4000 (HCS 1 #22), depois de 27 dias de incubação á 20 °C. Esse cristal foi difratado na linha MX2 do LNLS sob feixe de raio-X de comprimento de onda 1.4586 Å, onde coletamos 120 imagens com rotação de 1º para cada imagem. As imagens difrataram com resolução de 1,7Å, mas a resolução foi cortada durante o refinamento em 1,9 Å. A Figura 52 é um exemplo de uma das imagens.

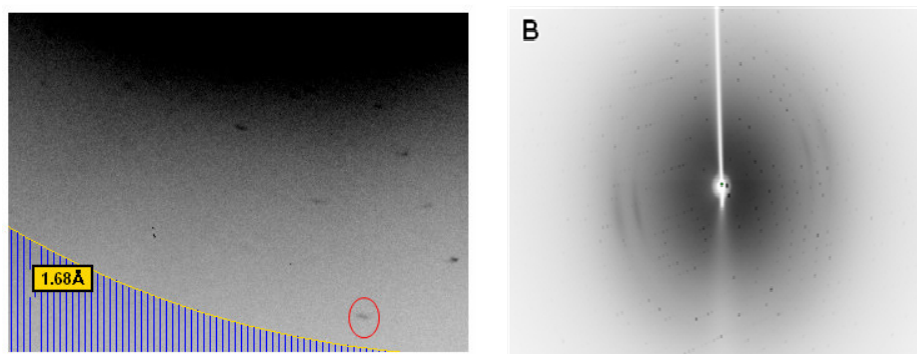


Figura 52. Imagens de difração do cristal que foi usado na resolução da estrutura α Th:NF258. A) Destaque para alguns dos pontos em resoluções mais altas. Linha amarela mostra o limite de resolução (1,68 Å); **B)** Destaque para os pontos em resoluções mais baixas.

O grupo espacial foi determinado $P2_12_12_1$ e os parâmetros de célula são: $a = 44,97$ Å; $b = 74,63$ Å e $c = 98,03$ Å e $\alpha = \beta = \gamma = 90,00^\circ$ (caracterizando sistema ortorrômbico). A tabela 7 mostra outros detalhes da coleta de dados e do refinamento da estrutura.

RESULTADOS

Tabela 7. Estatística de coleta e refinamento parcial dos dados de difração de raios-X do cristal de α Th:NF258

Coleta de dados	αTh:NF258
Fonte de raio-X	síncrotron
Detector	MarMosaic
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parâmetros de célula unitária, Å	a = 44,97 b = 74,63 c = 98,03
Monômeros/Unidade assimétrica	1
Completeza, %	99,7
I/ σ (I)	20 (2,50)
Número de reflexões únicas	25.288
Refinamento de estrutura - parcial	
Faixa de resolução, Å	59,38 – 1,90
R _{work}	0,19980
R _{free}	0,23757
B fator geral, Å ²	15,857
RMSD distância de ligação, Å	0,009
RMSD Ângulo de ligação, °	1,243

A estrutura de α Th:NF258 foi superposta a de α Th humana inibida com FPRCK depositada no PDB sob o código 1PPB (mesma usada na substituição molecular) e o RMSD geral foi de 0,580 (Figura 53).

Nos gráficos a seguir (Figura 54) estão plotados os valores de RMSD de cada aminoácido. Altos desvios em relação às porções C-terminal e N-terminal das cadeias são normais devido ao grau de liberdade de movimento que tais regiões possuem. Mas além desses desvios pode-se observar 3 grupos de aminoácidos com RMSD maiores que 1,0 Å na cadeia H. O grupo 1 corresponde aos aminoácidos 34, 35, 36, 36A, 37A e 37. O grupo 2 corresponde aos aminoácidos 60, 60A, 60B, 60C, 60D, 60E, 60F, 60G, 60H, 60I, 61 e 62. O grupo 3 corresponde aos aminoácidos 143, 144, 145, 146, 147, 148 e 149. Além desses grupos, alguns aminoácidos isolados também apresentaram desvios maiores do que 1,0 Å, caso da Ser72, da Arg73 e da Leu105. Os grupos 1 e 2

formam *loops* intimamente relacionados (formando o bolsão) com o sítio ativo da enzima, onde se encontra o inibidor FPRCK.



Figura 53. Estruturas sobrepostas de α Th:NF258 (vermelho) e α Th humana de código 1PPB (verde). Em azul está o inibidor do sítio catalítico FPRCK (Phe-Pro-Arg-clorometilcetona), presente em ambas as estruturas. Figura gerada pelo PyMol.

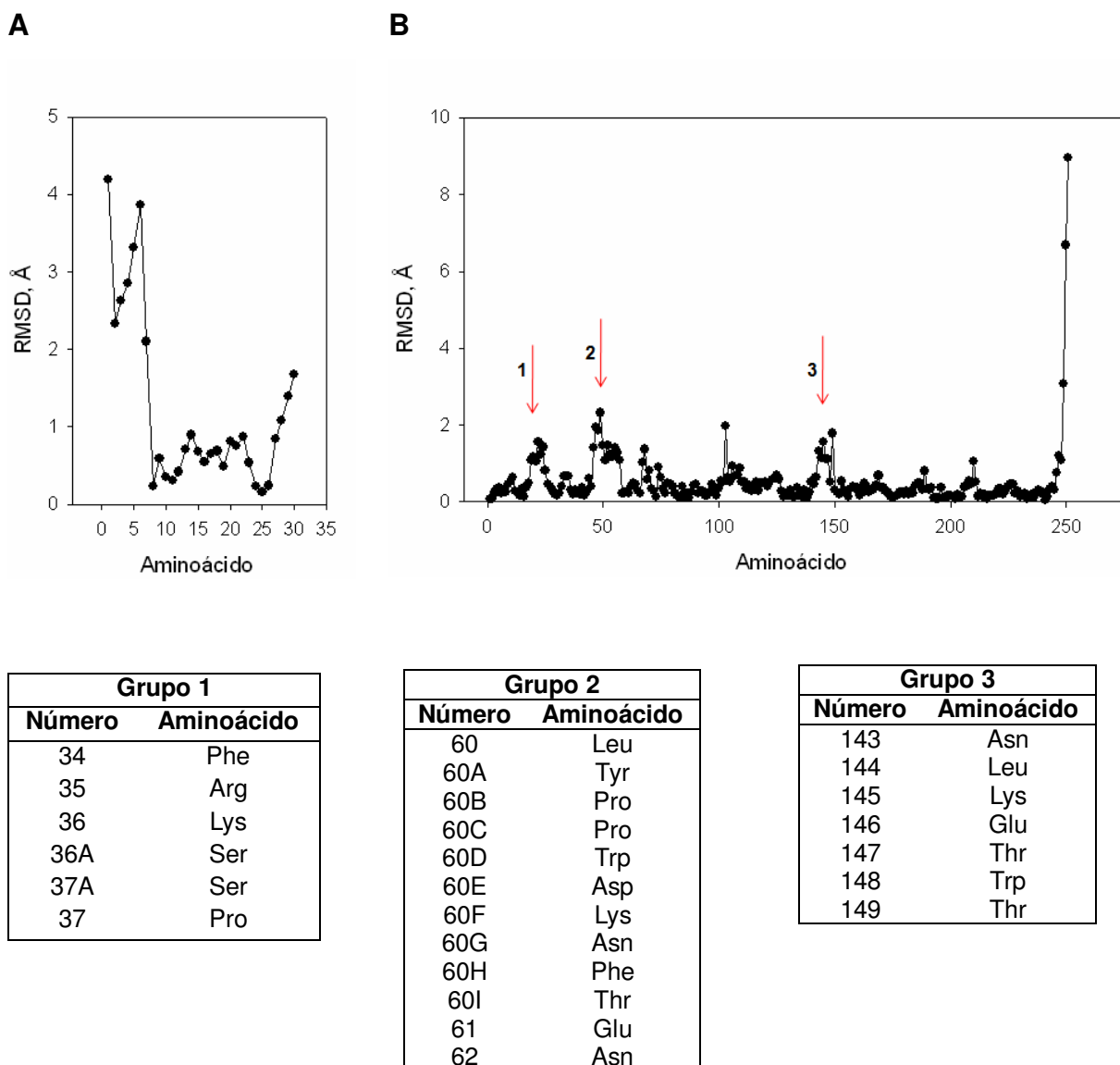


Figura 54. Gráficos de RMSD (alinhamento entre α Th:NF258 e α Th de 1PPB) por aminoácidos com os 3 grupos de aminoácidos que apresentaram RMSD maior que 1,0 Å. (setas vermelhas). **A)** Cadeia L. **B)** Cadeia H.

Os três grupos de aminoácidos foram inspecionados após superposição da estrutura α Th:NF258 com a 1PPB, através do Coot, usando a função *SSM Superpose* (*Secondary Structure Matching*) e selecionando as cadeias H de cada estrutura. O *loop* formado pelo grupo 1 e o *loop* formado pelo grupo 2 realmente estão deslocados quando comparamos com os respectivos loops da estrutura 1PPB e isso pode ser

observado nas figuras 55A e 57A.

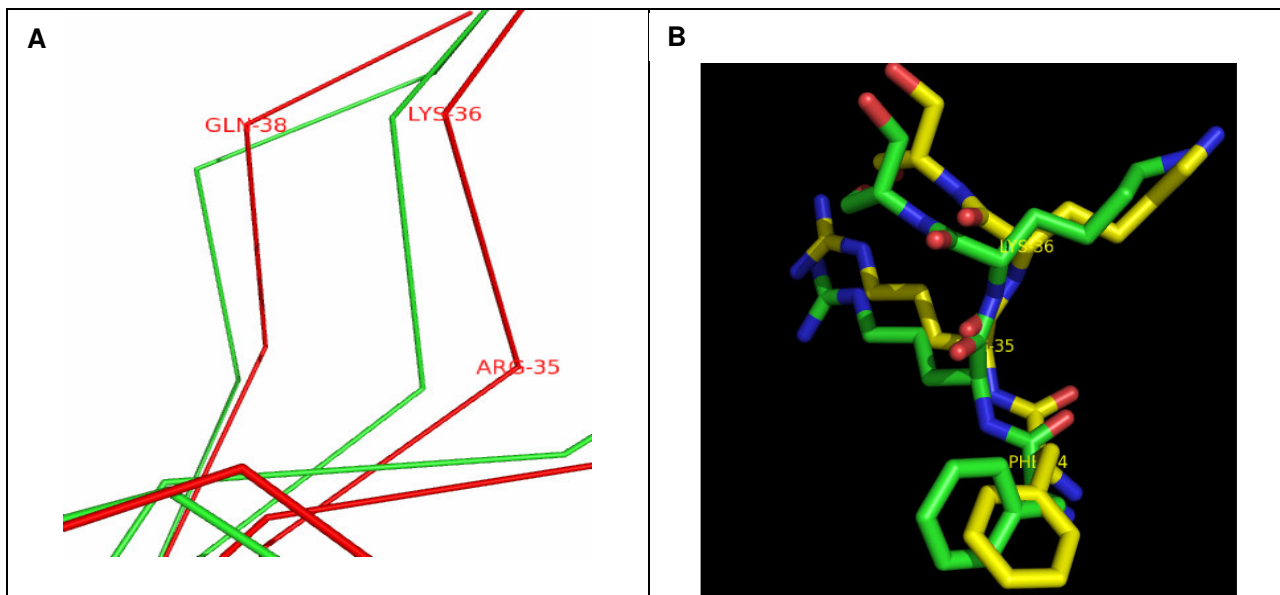


Figura 55. Estruturas sobrepostas de α Th:NF258 e α Th humana de código 1PPB. Destaque para o grupo 1 de aminoácidos. A) Cadeias principais α Th:NF258 (vermelho) e α Th humana 1PPB (verde). Figura gerada pelo PyMol. B) Cadeias principais e laterais. α Th:NF258 (cadeia carbônica em amarelo) e α Th humana 1PPB (cadeia carbônica em verde).

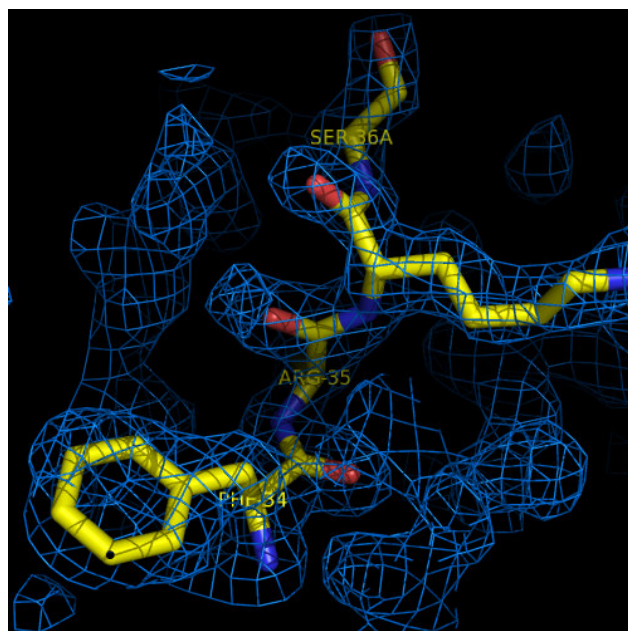


Figura 56. Estrutura de α Th:NF258 contornada pelos mapas de densidade eletrônica $2F_o-F_c$ a $1,0\sigma$ (azul) e F_o-F_c a $3,00\sigma$ (verde – pico positivo e vermelho – pico negativo). Destaque para o grupo 1 de aminoácidos.

O *loop* formado pelo grupo 1 pode ser visto mais detalhadamente na Figura 55B. Nela observa-se o deslocamento das cadeias laterais dos aminoácidos o que é reflexo do deslocamento da cadeias principais (amarelas). A fenilalanina 34, por exemplo, experimentou uma mudança na orientação do seu anel aromático que pode ser observada na figura 55B e confirmada na figura 56. Essa última mostra a região com o contorno bem definido do mapa de densidade eletrônica ($2F_o - F_c$) a $1,0 \sigma$ ($0,43 \text{ e}^- / \text{\AA}^3$).

A figura 57B mostra a região do *loop* formado pelo grupo 2 que está em contato com o inibidor do sítio ativo, FPRCK. Nesse *loop* observa-se uma mudança drástica na orientação do triptofano 60D que na nossa estrutura (cadeia principal amarela), se afastou do inibidor.

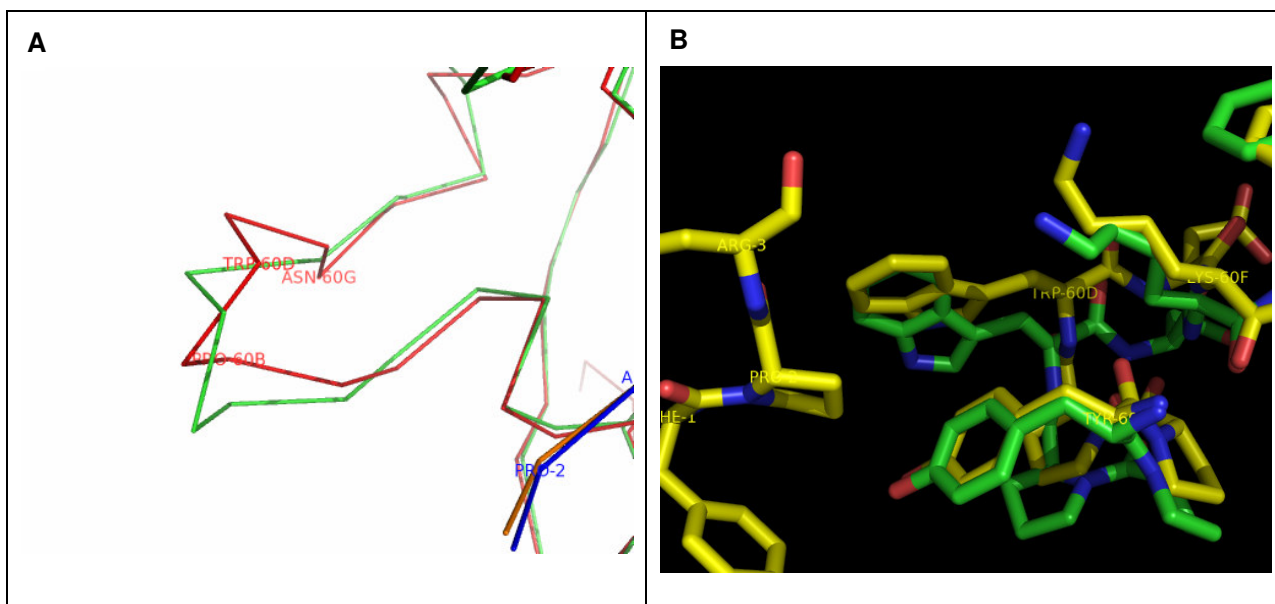


Figura 57. Estruturas sobrepostas de α Th:NF258 e α Th humana de código 1PPB. Destaque para o grupo 2 de aminoácidos. A) Cadeias principais α Th:NF258 (vermelho) e α Th humana 1PPB (verde). Em azul e laranja estão o inibidor FPRCK na estrutura α Th:NF258 e α Th 1PPB, respectivamente. Figura gerada pelo PyMol. B) Cadeias principais e laterais. α Th:NF258 (cadeia carbônica em amarelo) e α Th humana 1PPB (cadeia carbônica em verde).

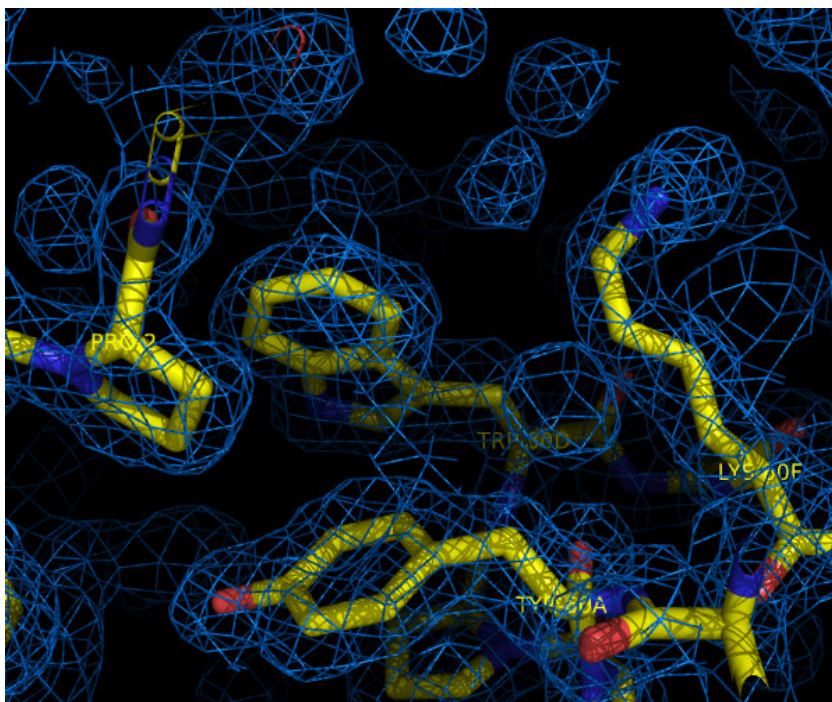


Figura 58. Estrutura de α Th:NF258 contornada pelos mapas de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ a $1,0\sigma$ (azul) e $F_o - F_c$ a $3,0\sigma$ (verde – pico positivo e vermelho – pico negativo). Destaque para Tyr 60A e Trp 60D do grupo 2 de aminoácidos da (cadeia H-heavy) e para Pro 2 da cadeia I (inibidor FPRCK).

A figura 58 mostra essa mesma região da nossa estrutura contornada pelo mapa de densidade eletrônica ($2F_o - F_c$) a $1,0 \sigma$ ($0,43 \text{ elétrons} / \text{Å}^3$). Essa região está muito bem contornada pelo mapa, confirmando a mudança na orientação desse aminoácido e o deslocamento de outros aminoácidos desse *loop*, como a tirosina 60A.

Já a região formada pelo grupo 3 de aminoácidos, apresenta o RMSD maior que $1,0^\circ$ como as outras duas regiões, mas ao analisar as cadeias principais, não observamos deslocamentos significativos como nos outros casos (Figura 59).

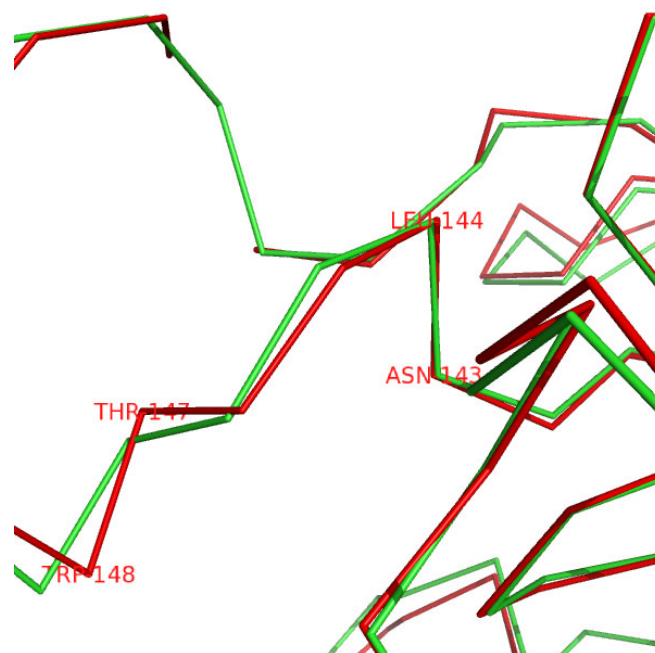


Figura 59. Estruturas sobrepostas de α Th:NF258 e α Th humana de código 1PPB. Destaque para o grupo 3 de aminoácidos. Cadeias principais α Th:NF258 (vermelho) e α Th humana 1PPB (verde). Em azul e laranja estão o inibidor FPRCK na estrutura α Th:NF258 e α Th 1PPB, respectivamente. Figura gerada pelo PyMol.

Esse grupo de aminoácidos, assim como os outros dois, também está relacionado com o sítio catalítico. Os três grupos de aminoácidos que mais sofreram mudanças conformacionais estão próximos uns dos outros e ao redor do sítio catalítico da enzima. Esse fato pode ser reflexo da interação da α Th com ligante.

A figura 60 mostra como essas três regiões estão relacionadas entre si e com o sítio catalítico.

Apesar dessas pequenas mudanças entre as estruturas de α Th humana, não conseguimos identificar a presença do ligante análogo de SVR na nossa estrutura. Após a resolução da estrutura e do refinamento, buscamos uma região de densidade eletrônica não modelada, onde fosse possível (considerando a lógica do ambiente químico) a modelagem de NF258. Observamos também a região do exosítio II onde a SVR se liga a enzima de acordo com a estrutura cristalografia (PDB ID 2H9T) e com a estrutura gerada na dinâmica molecular (LIMA *et al.*, 2009), mas também não foi possível encontrar sinais que indicassem a presença do ligante.

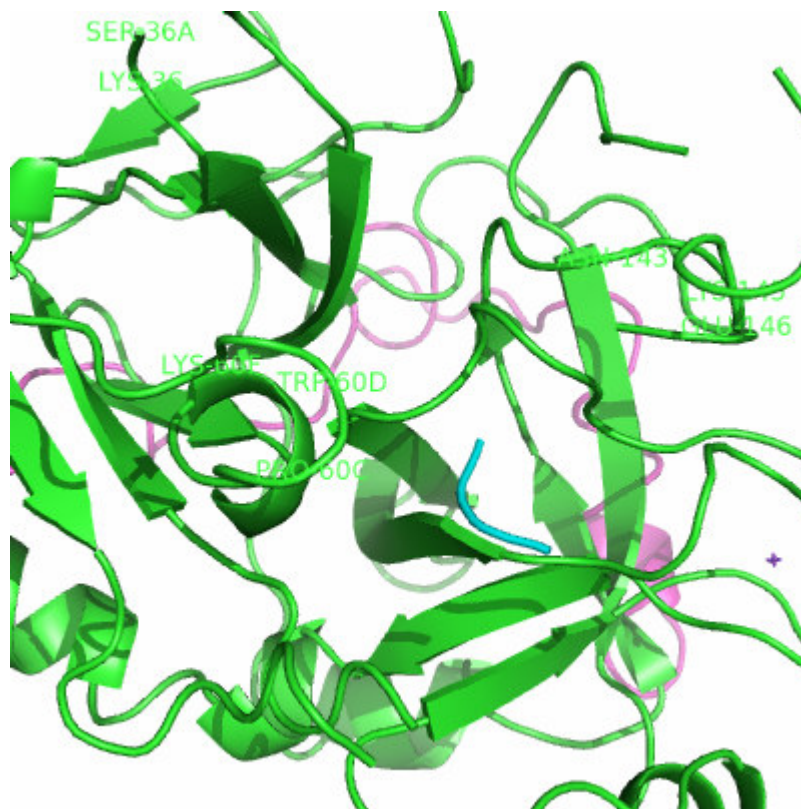


Figura 60. Visão do sítio catalítico da α Th inibido por FPRCK (azul). Destacados, na cadeia H (verde), alguns resíduos que compõe os grupos 1 (Lys36 e Ser36A), 2 (Pro60C, Trp60D e Lys60F) e 3 (Asn143, Lys145 e Glu146). Observar a proximidade entre os três grupos de aminoácidos e entre o sítio catalítico. Os grupos 1 e 3 formam *loops* que delimitam o sítio catalítico. A cadeia L está representada na cor rosa. Figura gerada pelo PyMol.

Apenas encontramos uma região relativamente grande, com pico positivo (mapa verde) de densidade eletrônica, próxima aos aminoácidos do grupo 2. Apesar deste pico não apresentar tamanho diretamente compatível com o do ligante NF258 (Figura 61), vale ressaltar que isto não significa a sua ausência neste local, visto que o mapa está contornado a 1 sigma e, por vezes, ligantes e segmentos macromoleculares são inicialmente refinados a contornos menores, visto que o melhoramento do mapa numa dada região depende de fase global e local.

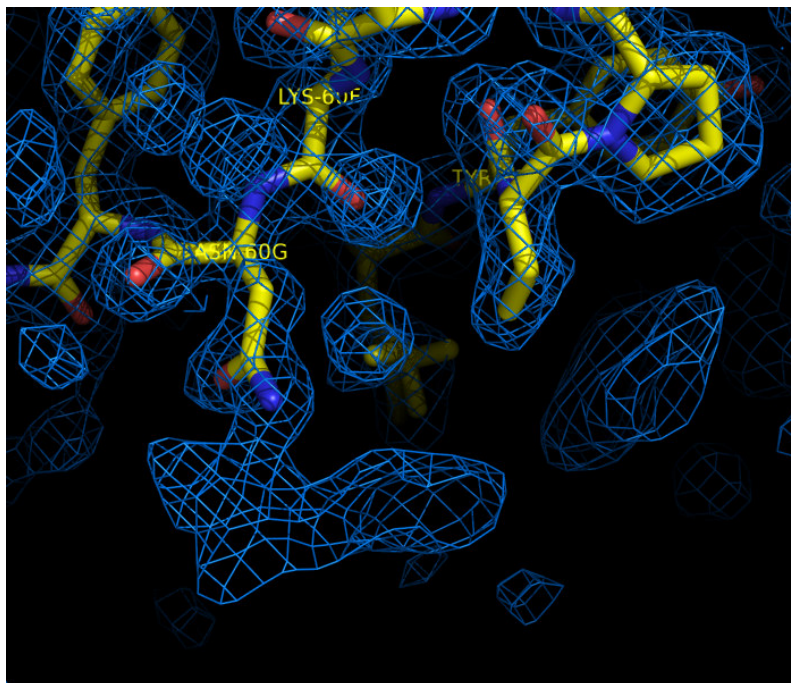


Figura 61. Estrutura de α Th:NF258 com de densidade eletrônica não modelada próxima ao *loop* composto pelos aminoácidos do grupo 2. Mapa de $2F_o-F_c$ a $1,0\sigma$ ou $0,43$ elétrons/ Å^3 (azul) e F_o-F_c a $3,0\sigma$ ou $0,24$ elétrons/ Å^3 (verde – pico positivo e vermelho – pico negativo).

4.2.3.2 Sobre α Th:NF151 #1 e α Th:NF151 #2

Em nosso trabalho obtivemos dois cristais do complexo α Th:NF151 com qualidade de difração e esses foram coletados. Chamarei de **α Th:NF151 #1** o cristal, o conjunto de dados e a estrutura com resolução de $1,9 \text{ \AA}$ e de **α Th:NF151 #2** o cristal, o conjunto de dados e a estrutura com resolução de $2,4 \text{ \AA}$.

O cristal de α Th:NF151 #1 cresceu em solução-mãe que continha $0,2 \text{ M}$ de acetato de amônio, $0,05 \text{ M}$ de acetato de sódio tri-hidratado e 34% de PEG 3350. Essa condição fez parte de um experimento de otimização da condição #10 do HCS 1. O cristal cresceu com 2 dias em ambiente a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Difratamos esse cristal na linha MX1 do LCLS com comprimento de onda de $1,4586 \text{ \AA}$. Coletamos 150 imagens com rotação de 1° para cada imagem. Um exemplo de imagem desse cristal é a figura 62.

Após o processamento das imagens o grupo espacial foi determinado $P2_1$ e os parâmetros de célula unitária são $a = 44,48 \text{ \AA}$; $b = 73,97 \text{ \AA}$ e $c = 86,32 \text{ \AA}$; $\alpha = \gamma = 90,00^\circ$ e $\beta = 89,95^\circ$, que são característicos de sistema monoclinico.

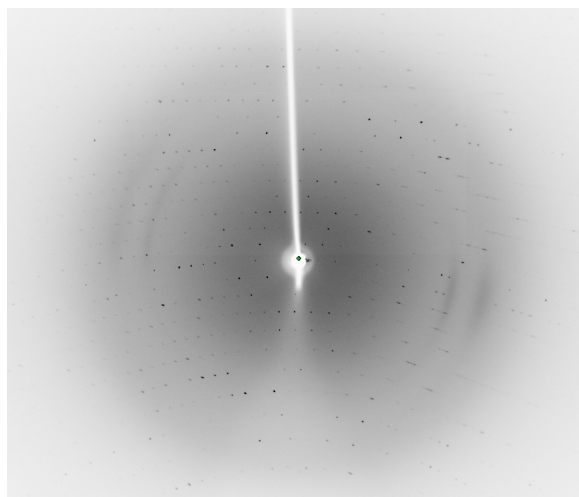


Figura 62. Imagem representativa do conjunto de dados de difração coletado para resolução da estrutura α Th:Nf151 #1.

Já o cristal de α Th:Nf151 #2 cresceu na presença de 0,2 M de acetato de amônio, 0,05 M de acetato de sódio tri-hidratado e 32% de PEG3350, depois de aproximadamente 2 meses a temperatura de 20 °C. Essa condição também fez parte do experimento de otimização da condição #10 do HCS 1 (o mesmo em que cresceu o cristal #1). Esse cristal foi levado para o LNLS onde foi difratado na linha MX2 com raio-X cujo comprimento de onda era 1,4672 Å. As imagens chegaram à resolução máxima de 2,0 Å, mas o refinamento foi feito até 2,4 Å usando-se como parâmetro de corte I/σ integrada $\geq 2,0$ e preferencialmente $R_{merge} \leq 0,3$. Coletamos 360 imagens rotacionando o cristal 1° por imagem (Figura 63).

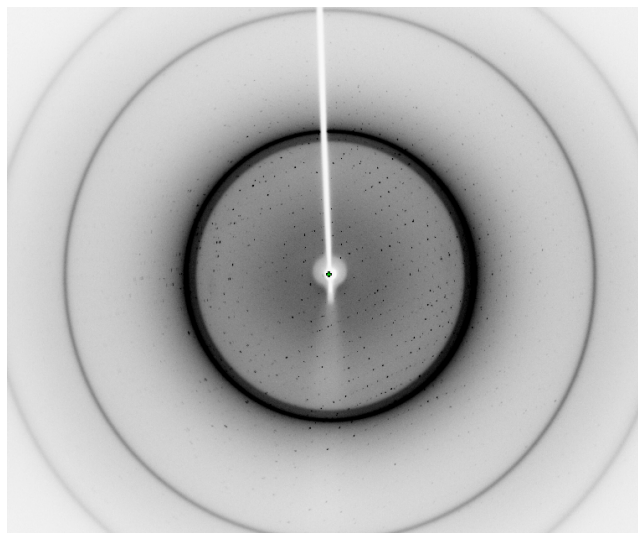


Figura 63. Imagem representativa do conjunto de dados de difração coletado para resolução da estrutura α Th:NF151 #2.

O processamento das imagens nos levou ao grupo espacial $P2_1$, e os parâmetros de célula $a = 44,90 \text{ \AA}$; $b = 74,93 \text{ \AA}$ e $c = 87,58 \text{ \AA}$; $\alpha = \gamma = 90,00^\circ$ e $\beta = 93,58^\circ$, que são característicos de sistema monoclinico.

Mais detalhes da coleta de dados e do refinamento dos 2 cristais de α Th:NF151, estão na tabela 8.

O refinamento dessas estruturas ainda não foi concluído, ainda precisamos melhorar estatísticas como R_{work} e R_{free} . Precisamos também inspecionar os aminoácidos que estão em regiões não permitidas no plot de Ramchandran para verificar se podem ter a conformação otimizada.

Nos canais de solvente de ambas as estruturas estão cheios de densidades eletrônicas vazias e sabemos que nem todas devem ser modeladas com moléculas de água. Já adicionamos algumas moléculas de água onde encontramos de densidade eletrônica acima de $1,0 \sigma$ para o mapa de $2|F_o| - |F_c|$.

RESULTADOS

Tabela 8. Estatística de coleta e refinamento parcial dos dados de difração de raios-X do cristal de α Th:NF151 #1 e α Th:NF151 #2.

Coleta de dados	αTh:NF151 #1	αTh:NF151 #2
Fonte de raio-X	síncrotron	síncrotron
Detector	MarCCD	MarMosaic
Grupo espacial	P2 ₁	P2 ₁
Parâmetros de célula unitária, Å	a = 44,48 b = 73,97 c = 86,32	a = 44,90 b = 74,93 c = 87,58
Monômeros/Unidade assimétrica	2	2
Completeza, %	96,66	99,51
I/ σ (I)	20 (2,50)	20 (2,50)
Número de reflexões únicas	40.566	21.543
Refinamento de estrutura - parcial		
Faixa de resolução, Å	28,56 - 1,90	34,53 - 2,40
R _{work}	0,33538	0,30899
R _{free}	0,43120	0,40852
B fator geral, Å ²	13,228	12,822
Não permitidos no Ramachandran	4	9
RMSD distância de ligação, Å	0,016	0,012
RMSD Ângulo de ligação, °	1,954	1,557

Mesmo não tendo terminado o refinamento, analisamos as regiões de densidade eletrônica não modelada que foram consideradas pelo Coot grandes demais para serem moléculas de água. Usamos essa função para buscar indícios da presença do ligante NF151.

Na estrutura α Th:NF151 #1 encontramos 31 regiões de densidade eletrônica não modeladas e na estrutura α Th:NF151 #2 encontramos 43. Esses números elevados se devem, em parte, aos canais de solvente com muito ruído que podemos observar. Nas figuras 64 e 65 são apresentados exemplos dessas regiões nas estruturas α Th:NF151 #1 e α Th:NF151 #2, respectivamente, que foram encontrados em locais próximos aos de ligação de SVR na α Th humana (de acordo com a estrutura cristalográfica 2H9T). Entretanto, nesta etapa do refinamento ainda não é possível se confirmar a presença do ligante nos cristais que nos forneceram tais estruturas.

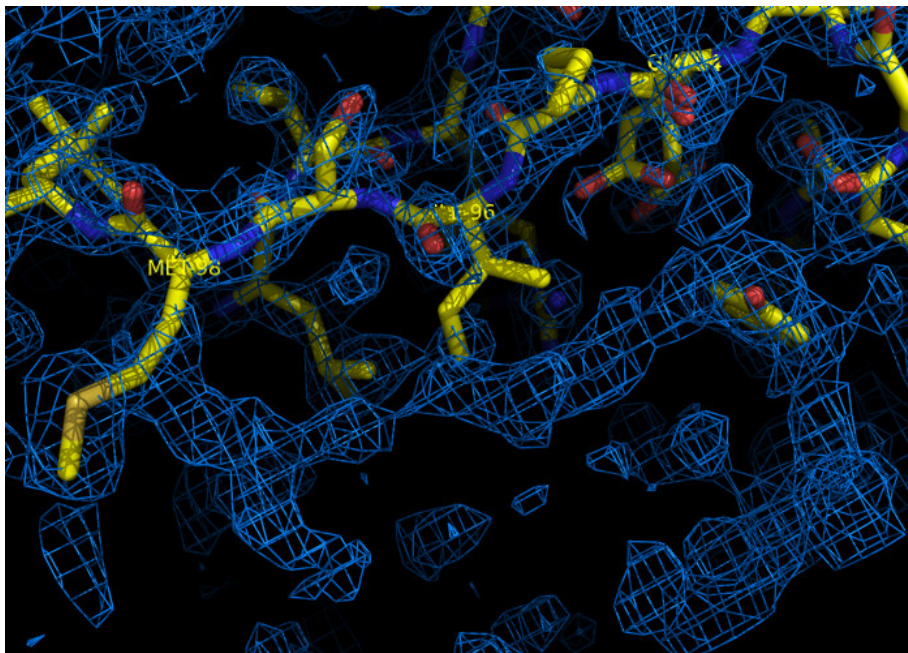


Figura 64. Densidade eletrônica não modelada na estrutura $\alpha\text{Th:NF151 \#1}$. Mapa de $2F_o-F_C$ a $1,0\sigma$ ou $0,43\text{elétrons}/\text{\AA}^3$ (azul) e F_o-F_C a $3,0\sigma$ ou $0,24\text{elétrons}/\text{\AA}^3$ (verde – pico positivo e vermelho – pico negativo).

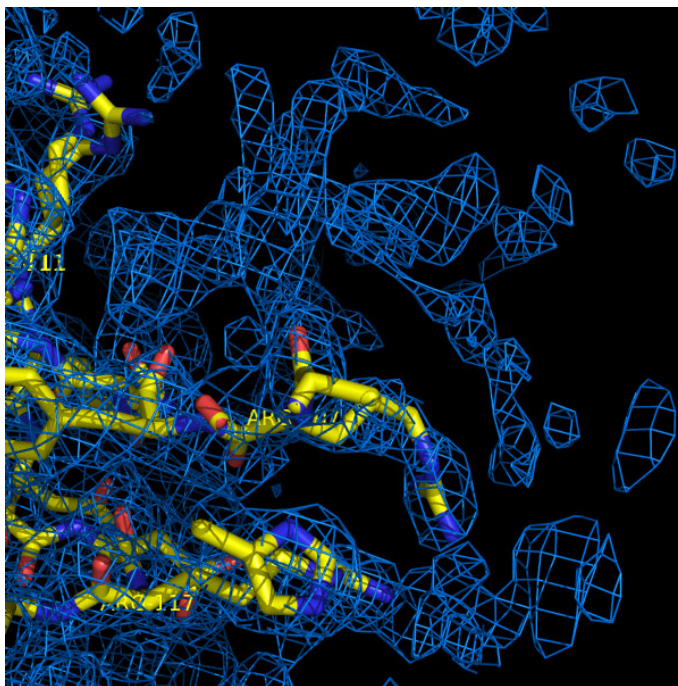


Figura 65. Densidade eletrônica não modelada na estrutura $\alpha\text{Th:NF151 \#2}$. Mapa de $2F_o-F_C$ a $1,0\sigma$ ou $0,43\text{elétrons}/\text{\AA}^3$ (azul) e F_o-F_C a $3,0\sigma$ ou $0,24\text{elétrons}/\text{\AA}^3$ (verde – pico positivo e vermelho – pico negativo).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Apesar da variedade de medicamentos disponíveis no mercado para tratamento de distúrbios de coagulação excessiva, seus efeitos colaterais são frequentes e muito graves. A pesquisa de novas moléculas para tal fim, que estejam relacionadas a riscos menores, é de grande importância. Ou seja, o entendimento de mecanismos de inibição de trombina e de interação de trombina com inibidores é essencial para o planejamento de novos fármacos na classe dos anticoagulantes.

Dados nos mostram que SVR é capaz de inibir a atividade catalítica de α Th humana sobre fibrinogênio humano com IC_{50} de aproximadamente 20 μ M (MONTEIRO *et al.*, 2004).

Quando iniciamos esse trabalho, buscávamos um inibidor de α Th mais potente que a SVR entre os 12 análogos desse composto que analisamos. Mas os nossos achados não foram exatamente esses. Os análogos realmente têm a tendência de inibir a α Th (com a exceção de NF058 que não nos mostrou isso nas concentrações experimentadas), mas, a despeito dessa inibição, praticamente todos compostos analisados tiveram um componente de ativação quando em concentrações mais baixas do que as necessárias para a inibição. Inclusive SVR, quando testada inúmeras vezes por nosso grupo, apresentou esse componente de ativação antes da inibição esperada, que em nosso caso, aconteceu com IC_{50} de aproximadamente 45 μ M.

Apenas NF864 não ativou a enzima antes de inibi-la e foi capaz de inibir α Th com uma potência que se destaca, já que apresentou IC_{50} de aproximadamente 14 μ M. Provavelmente devido à presença dos vários sulfonatos que essa molécula apresenta e da atividade conhecida que cargas negativas exercem sobre a atividade anticoagulante da α Th, como no caso do cofator II da heparina (HORTIN, *et al.*, 1986) e da região C-terminal da hirudina (MERAGANORE, *et al.*, 1989) que se ligam no exossítio I da α Th e da heparina que se liga no exossítio II (SHEEHAN, *et al.*, 1994).

Ao contrário do que esperávamos, nos deparamos com alguns ativadores de α Th bastante expressivos, o NF198 que a uma concentração aproximada de 30 μ M proporcionou atividade 2 vezes maior do que o controle (atividade de trombina sobre fibrinogênio na ausência de análogo) e o NF 258 que a ~15 μ M aumentou em 6 vezes a atividade da enzima em relação ao controle. Não encontramos relação entre as

estruturas desses compostos e suas funções. NF198 apresenta substituinte ($R = C_6H_5$) mais volumoso que os outros e hidrofóbico. Já NF258 apresenta substituinte ($R = -Cl$) de pequeno volume e com caráter polar. Provavelmente mecanismos distintos norteiam esses análogos para a ativação da enzima. Percebemos ainda, que esses análogos que ativaram fortemente a enzima são os piores inibidores. O NF198 inibe a atividade com IC_{50} de $\sim 129 \mu M$ e o NF258 inibe a atividade com IC_{50} de $\sim 197 \mu M$. Isso parece ser uma tendência entre os compostos homólogos (Série 1 e 2) com perfil bimodal de modulação da αTh , como pode ser observado pela figura 66.

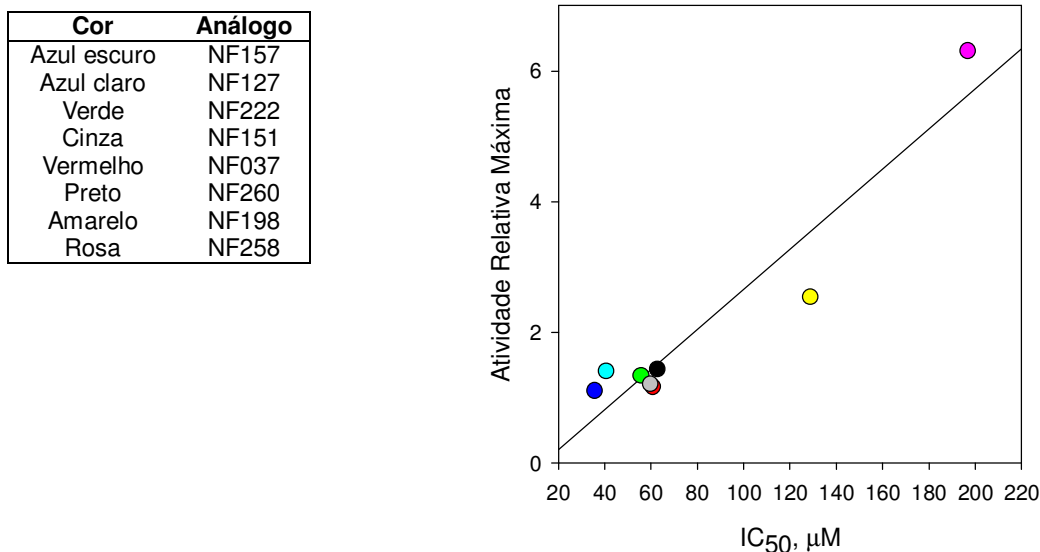


Figura 66. Gráfico de Atividade Relativa Máxima versus IC_{50} (μM). Análise dos compostos da Série 1 e 2.

De modo geral, nossos dados indicam a ocorrência de dois eventos quando a αTh interage com a SVR ou com alguns de seus análogos. Um, seria a ativação dessa enzima frente ao substrato natural, em concentrações baixas na faixa μM , e outro, seria a inibição dela em concentrações mais altas, ainda na faixa μM . Esse comportamento bifásico da enzima também já foi observado em ensaios de atividade catalítica de αTh sobre S-2238 na presença de diferentes concentrações de uréia (Lima, *et al.*, 2004). Com 2 M de uréia a hidrólise do substrato aumentou em 35% e também foi

acompanhada de efeitos mínimos na emissão de fluorescência do Trp e ligação a bis-ANS. A hidrólise, então, foi gradualmente extinguida com o aumento da concentração a partir de 2 M de uréia. Os dados desse trabalho indicaram a ocorrência de um estado intermediário durante o desenovelamento da enzima causado por uréia que é um agente caotrópico que, na maioria das vezes, induz a transição da proteína entre dois estados, o nativo e o desnaturado. No caso da α Th a transição passa por um estado intermediário ativo.

Os dados publicados anteriormente nos mostram a inibição da α Th na presença de SVR em concentrações na faixa μ M. Mostram-nos também que 2 eventos distintos podem estar acontecendo quando da interação entre essas duas moléculas, ou seja, pode ser que existiam 2 sítios de ligação de SVR na α Th, isso devido à forma da isoterma obtida em experimento de calorimetria de titulação isotérmica (MONTEIRO, *et al.*, 2004).

Na pesquisa desenvolvida por nosso grupo anteriormente, observamos na estrutura cristalográfica, a ligação de SVR no exossítio II de α Th, e a presença de contatos cristalinos promovidos pela molécula de SVR e as moléculas de proteína simetricamente relacionadas. Observamos em experimentos de simulação de dinâmica molecular, a mudança de orientação de uma parte da molécula de SVR na enzima. Os resultados obtidos nos experimentos de SAXS indicam a formação de um dímero de α Th a 50 μ M e a 100 μ M quando na presença de concentrações equimolares de SVR (LIMA *et al.* 2009).

Diante dos dados aqui relatados e das informações que possuímos na literatura, sugerimos que o componente de ativação que observamos nas curvas de atividade relativa de α Th sobre fibrinogênio na presença de SVR e de praticamente todos os análogos dessa molécula que analisamos, se deve a formação de um complexo $[\alpha$ Th:ligante]₁ que se forma em concentrações mais baixas de ligante, e que essa interação se dê de forma semelhante a interação observada de SVR sobre α Th depois de 10 ns de simulação de dinâmica molecular (Figura 67).

Já os componentes de inibição, observados nas mesmas curvas de atividade relativa da enzima em concentrações mais altas de ligante, acreditamos que ocorram por conta de oligomerização da enzima a partir de dois complexos $[\alpha$ Th:liagnte]₁

formando dímeros do tipo $[\alpha\text{Th:ligante}]_2$, onde as moléculas do ligante formariam uma ponte para a união das duas macromoléculas (Figura 67), fazendo com que diminuísse a mobilidade da enzima e/ou a interação do fibrinogênio com os seus sítios de ligação (exosítio 1 e sitio catalítico). Provavelmente nesse complexo os ligantes se encontrariam orientados como a SVR na estrutura cristalográfica de $\alpha\text{Th:SVR}$ resolvida por nosso grupo, interagindo com aminoácidos do exosítio II. Talvez a presença de mais grupamentos sulfonatos na estrutura de NF864, faça com que sua interação com a enzima seja mais acentuada com isso a tendência a dimerização seja maior, resultando em um perfil exclusivamente inibitório desse composto diante de αTh .

Nossas sugestões explicariam a presença de dois sítios de ligação de SVR, a ocorrência de dois eventos a partir da interação da αTh com SVR, a dimerização da enzima observada anteriormente nos experimentos de SAXS, além do comportamento bifásico da SVR e de seus análogos quanto à atividade de αTh observada aqui.

Até o momento, não podemos tirar conclusões a respeito de nossos dados de cristalografia. Ainda possuímos 1 conjunto de dados em processamento com resolução de 2,7 Å, além dos outros 5 com resolução de 3,0 Å. A estrutura de $\alpha\text{Th:NF258}$ mostrada nesse trabalho, passará por buscas mais criteriosas a fim de identificar a presença do ligante análogo de SVR, que pode ser a causa das mudanças conformacionais ao redor do sítio catalítico que foram observadas e descritas aqui.

Em breve estaremos terminando o refinamento das estruturas de $\alpha\text{Th:NF151}$ e talvez possamos detectar uma relação entre a estrutura do composto e sua função como modulador da atividade catalítica de αTh .

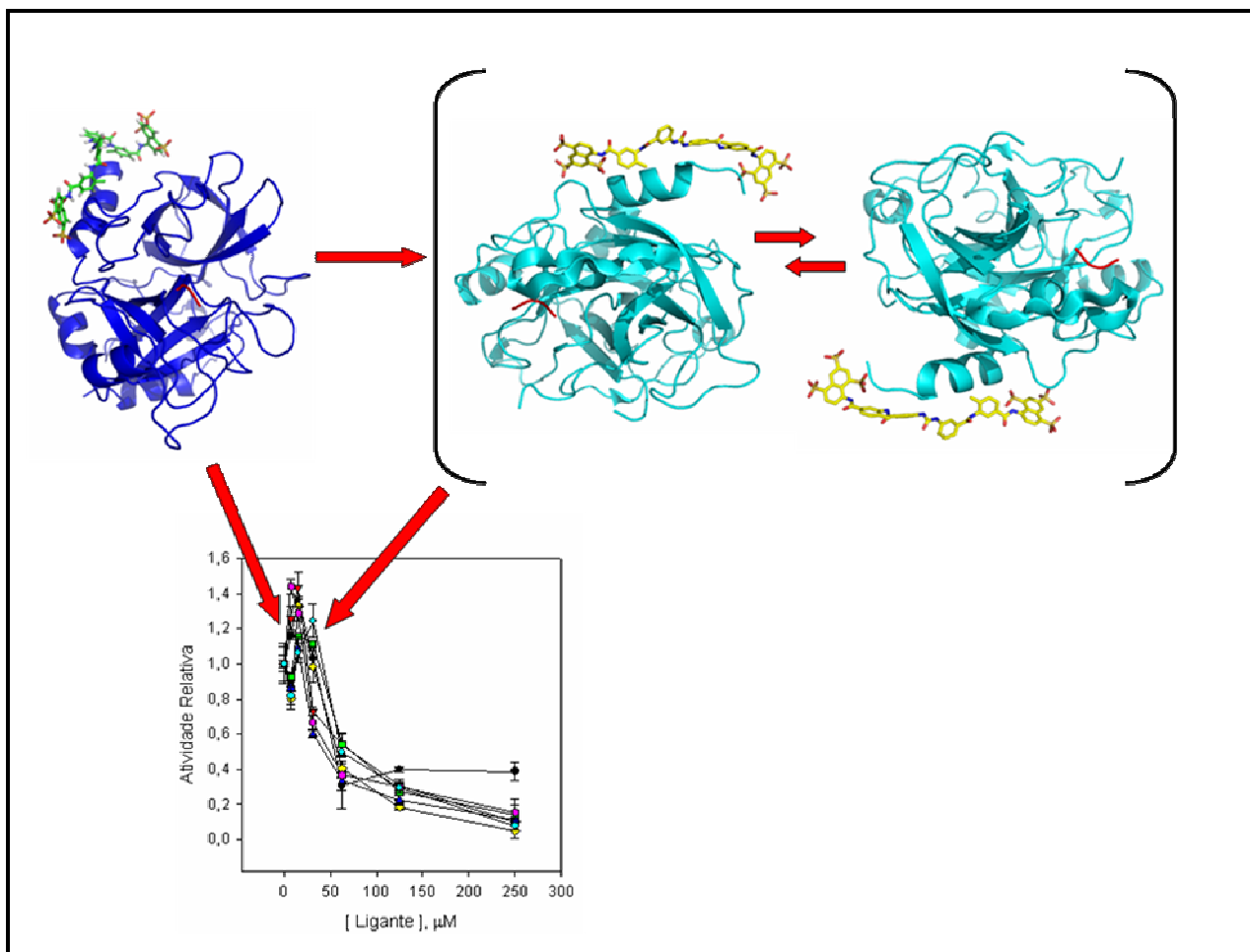


Figura 67. Esquema sugerido para explicação de componente de ativação seguido de componente de inibição no efeito de SVR e análogos na atividade de α Th sobre fibrinogênio. α Th azul escura com SVR de carbonos verdes – estrutura obtida após 10 ns de simulação de dinâmica molecular (Lima, *et al.*, 2009). α Th azul clara com SVR de carbonos amarelos – estrutura cristalográfica de α Th:SVR depositada sob código 2H9T. As moléculas dentro dos colchetes representam a formação do oligômero $[\alpha$ Th:SVR]₂. Estruturas geradas pelo PyMol.

Outro ponto que ainda pode ser explorado em nosso trabalho diz respeito a otimização das condições de cristalização. Algumas condições já passaram por tentativas de otimização e nos renderam cristais de qualidade e bons conjuntos de dados, como foi o caso dos cristais de α Th:NF151 #1 e α Th:NF151 #2. Mas a grande maioria das condições ainda não foram suficientemente otimizadas. Obtivemos cristais de enzima na presença de todos os análogos de SVR algumas condições já foram refinadas, mas diante do número elevado de compostos a serem estudados, não foi

possível dedicar o tempo necessário a todas as condições que proporcionaram o crescimento de cristais. Nossas tentativas de otimização de condições envolveram variações de concentrações de precipitantes e, em alguns casos, variações de pH das soluções de cristalização. Mesmo assim não pudemos abranger todas as condições promissoras. Sabemos que a variação de concentração de proteína, do método de cristalização, da temperatura são algumas das variáveis que ainda podem render bons frutos (RHODES, 2006).

A busca por novos fármacos capazes de inibir a coagulação sanguínea é, sem dúvida, motivo de pesquisas ao redor do mundo. Ainda não dispomos de um tratamento eficiente e seguro para os que sofrem de distúrbios de coagulação excessiva. Não apenas inibidores diretos de α Th, mas inibidores de outros fatores da coagulação e também compostos com características antiplaquetárias são objetivos dessas pesquisas.

Diante desse cenário, ativadores da coagulação não ficam sem um contexto. Episódios de sangramentos são rotina em certas áreas clínicas e comprometem gravemente a vida dos pacientes. Medicamentos anticoagulantes usados no tratamento e na prevenção de doenças cardiovasculares, são causadores bastante conhecidos de sangramentos como efeito colateral. Pacientes que se submetem a cirurgias cardíacas com o uso da circulação extra corpórea podem sofrer hemorragias pós-operatórias decorrentes de trombocitopenia, fibrinólise, resíduos de heparina e outros anticoagulantes na circulação (medicamentos usados para evitar que o sangue coagule durante o procedimento) (SHARP E EGGLETON, 1963). A própria protamina usada para neutralizar o efeito anticoagulante causado pela heparina, está associada a aumento de sangramento (MCLAUGHLIN E DUNNING, 2003).

A protamina é um polipeptídeo positivamente carregado (~60% de resíduos de Arg), extensamente usado na prática clínica. O mecanismo de interação molecular entre a protamina e heparina ainda não é bem definido, mas essa interação causa a neutralização do efeito anticoagulante da heparina mediado pela antitrombina. O uso da protamina está associado a inúmeros efeitos adversos como hipotensão arterial pulmonar e sistêmica (HORROW, 1985) além do sangramento que pode ocorrer com o uso excessivo.

DISCUSSÃO

Estudos recentes demonstraram que doses farmacológicas de protamina prolongaram o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), além de atenuar significativamente a geração de trombina induzida por FT em plasma humano devido à inibição da ativação do fator V (AINLE, *et al.*, 2009).

Já que vários efeitos indesejáveis de anticoagulação estão relacionados com o uso da protamina, ativadores de α Th que se ligam no exosítio da heparina (exosítio II), podem ter futuro como alternativas dessa droga, ou seja, funcionando como antídoto para heparina.

Uma retrospectiva das atividades realizadas no nosso trabalho nos permite perceber que muito do que foi inicialmente planejado, foi realizado. Estudos funcionais foram realizados através de avaliação da atividade catalítica de α Th sobre fibrinogênio humano, diante dos 12 análogos de SVR. Os estudos cristalográficos, que também faziam parte de nossos objetivos, renderam um grande número de cristais de α Th na presença dos análogos, em diferentes condições. Boa parte dessas condições passou por otimizações e nos levaram a alguns cristais com boas resoluções. Com isso foi possível resolver 3 estruturas de α Th na presença de análogos de SVR, sendo uma delas já refinada e as outras duas em fase de refinamento, até o momento. Mesmo faltando localizar o ligante na estrutura refinada, e estando as outras duas em fase de refinamento, comparamos as três estruturas resolvidas com várias estruturas de α Th humana depositadas no PDB (Anexo 4). Com isso, concluímos que os objetivos iniciais foram, em boa parte, alcançados.

Referências Bibliográfica

REFERÊNCIAS

- AINLE, F. N., Preston, J. S., Jenkins, V. Nel, H. J., Johnson, J. A., Smith, O. P., White, B., Fallon, P. G., e O'Donnell, J. S. (2009). Protamine sulphate downregulates thrombin generation by inhibiting factor V activation. *Blood*, doi:10.1182/blood-2009-05-222109.
- BAH, A., Garvey, L. C., Ge, J., e Di Cera, E. (2006). Rapid kinetics of Na⁺ binding to thrombin. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40049-40056.
- BHARGAVA, S., Hotz, B., Hines, O. J., Reber, H. A., Buhr, H. J., e Hotz, H. G. (2007). Suramin inhibits not only tumor growth factor and metastasis but also angiogenesis in experimental pancreatic câncer. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, **11**, 171-178.
- BODE, W., Mayr, I., Baumann, U., Huber, R., Stone, S. R., e Hofsteenge, J. (1989). The refined 1.9 Å crystal structure of human α-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg cloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *The EMBO Journal*, **8(11)**, 3467-3475.
- CARTER, W. J., Cama, E., e Huntington, J. A. (2005). Crystal structure of thrombin bound to heparin. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2745-2749.
- CASTRO, H. C., Silva, D. M., Craik, C., e Zingali, R. B. (2001). Structural features of snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochimica et Biophysica Acta*, **1547**, 183-195.
- CHAYEN, E. N. (1998). Comparative study of protein crystallization by vapor-diffusion and microbath techniques. *Acta Crystallographyca*, **D54**, 8-15.
- CHEW, D. P., Bhatt D.L., Shelly, S., e Topol, E. J. (2001). Increased Mortality With Oral Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists: A Meta-Analysis of Phase III Multicenter Randomized Trials. *Circulation*, **103(2)**, 201-6.
- COBEL-GEARD, R. J. e Hassouna, H. I. (1983). Interaction of protamine sulfate with thrombin. *American Journal of Hematology*, **14(3)**, 227-233.
- CONNOLLY, J. R. (2007). Introduction to X-ray powder diffraction. *Elementary Crystallography for X-Ray Diffraction*, p.7.
- CUSHMAN, M. (2007). Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin. Hematol.* **44(2)**, 62-69.
- CUSHMAN, M., O'Meara, E. S., Folsom, A. R., e Heckbert, S. R. (2009). Coagulation factors IX through XII and the risk of future venous thrombosis: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Blood*, doi:10.1182/blood-2009-05-

REFERÊNCIAS

- 219915.
- DANG, Q. D., Guinto, E. R., e Di Cera, E. (1997). Rational engineering of activity and specificity in a serine protease. *Nature Biotechnology*, **15**, 146-149.
- DAVIE, E. W., Fujikawa, K., e Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, **30**, 10363-10370.
- DELANO, W. (2008). The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific LLC*, San Carlos, CA, USA, <http://www.pymol.org>.
- DEL CONDE, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P. e López, J. A. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, **106**, 1606-1611.
- DI CERA, E. (2003). Thrombin interactions. *Chest*, **124(3)**, 11S-17S.
- DUQUEL, F. L. V. (1998). Aterosclerose: aterogênese e fatores de risco. *Revista de Angiologia e Cirurgia Vacular – SBACV/RJ*, **7**.
- EMSLEY, P. e Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica*, **D60**, 2126-2131.
- ESTEVES, G. F. (2007). Resolução da estrutura cristalográfica e análise da estabilidade estrutural da hemoglobina de *Cerdocyon thous*. Dissertação de Mestrado. Brasília/DF. p. 22-30.
- EVANS, P. R. (1993). Data reduction, Proceedings of CCP4 Study Weekend. *Data Collection & Processing*, 114-122.
- FENTON II, J. W., Fasco, M. J., Stackrow, A. B., Aroson, D. L., Young, A. M., e Finlayson, J. S. (1977). Human thrombins: production, evaluation and properties of alpha-thrombin. *Journal of Biological Chemistry*, **252**, 3587-3598.
- FERNANDES, R. S., Assafim, M., Arruda, E. Z., Melo, P. A., Zingali, R. B. e Monteiro, R. Q. (2007). Suramin counteracts the haemostatic disturbances produced by *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, **49**, 931-938.
- FRANCO, R. F. (2001) Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto*, **34**, 229-237.
- FEKRAZAD, M. H., Lopes, R. D., Stashenko, G. J., Alexander, J. H., e Garcia, D. (2009). Treatment of venous thromboembolism: guidelines translated for the clinician. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*,
- GANDHI, P. S., Chen, Z., Mathews, F. S. e Di Cera, E. (2008). Structural identification of the pathway of long-range communication in an allosteric enzyme. *PNAS*, 105(6),

REFERÊNCIAS

1832-1837.

- GANESH, V. K., Muthuvel, S. K., Smith, S. A., Kotwal, G. J. e Murthy, K. H. M. (2005). Structural basis for antagonism by suramin of heparin binding to vaccinia complement protein. *Biochemistry*, **44**, 10757-10765.
- GARMAN, E. F. e Owen, R. L. (2006). Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica*, **D62**, 32-47.
- GUIMARÃES, B. G., Sanfelici, L., Neuenschwander, R. T., Rodrigues, F., Grizolli, W. C., Raulik, M. A., et al. (2009). The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. *Journal of synchrotron radiation*, **16(Pt 1)**, 69-75.
- GROSSER, T., Fries, S., e FitzGerald, G. A., (2006). Biological bases for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *The Journal of Clinical Investigation*, **116**, 4-15.
- HE, X., Ye, J., Esmon, C. T., e Rezaie, A. R. (1997). Influences of arginines 93,97, and 101 of thrombin to its functional specificity. *Biochemistry*, **36**, 8969-8976.
- HORNE, M. K., Wilson, O. J., Gralnick, H. R. e Myers, C. E. (1992). The effect of suramin on laboratory tests of coagulation. *Thrombosis and Haemostasis*, **67**, 434-439.
- HORROW, J. C. (1985). Protamine: a review of its toxicity. *Anesth Analg*, **64**, 348-361.
- HORTIN, G., Tollefsen, D. M. e Strauss, A. W. (1986). Identification of two sites of sulfation of human heparin cofactor II. *Journal of Biological Chemistry*, **261**, 15827-15830.
- JANCARIK, J. e Kim, S. H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization protein. *Journal of Applied Crystallography*, **24**, 409-411.
- JANKUN, E. S., Carperos, V. E., Ravichandran, K. G., e Tulinsky, A. (1991). Structure of the hirugen and hirulog 1 complexes of α -thrombin. *Journal of Molecular Biology*, **221**, 1379-1393.
- KAUR, M., Reed, E., Sartor, O., Dahut, W., e Figg, W. D., (2002). Suramin's development: what did we learn? *Investigational New Drugs*, **20**, 209-219.
- KORT, M., Buijsman, R. C., e van Boeckel, C. A. A. (2005). Synthetic heparin derivatives as new anticoagulant drugs. *Drug Discovery Today*, **10(11)**, 769-779.
- LAI, M. T., Di Cera, E., e Shafer, J. A. (1997). Kinetic pathway for the slow to fast transition of thrombin. *The Journal of Biological Chemistry*, **272(48)**, 30275-

REFERÊNCIAS

- 30282.
- LANE, D. A., Phillippou, H., e Huntigton, J. A. (2005). Directing thrombin. *Blood*, **106(8)**, 2605-2612.
- LAWSON, C. A., Yan, S. D., Yan, S. F., Liao, H., Zhou, Y. S. e Sobel, J. (1997). Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *Journal of Clinical Investigation*, **99**, 1729-1738.
- LESLIE, A. G. W. (1992). Recent changes to the MOSFILM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography*, 26.
- LILIENFELD, D. E. (2000). Decreasing mortality from pulmonary embolism in the United States, 1979-1996. *International Journal of Epidemiology*, 29, 465-469.
- LIMA, L. M. T. R., Becker, C. F., Giesel, G. M., Marques, A. F., Cargnelutti, M. T., Neto, M. O., Monteiro, R. Q., Verli, H. e Polikarpov, I. (2009). Structural and therodynamic analysis of thrombin:suramin interaction in solution and crystal phases. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1794**, 873-881.
- LIMA, L. M. T. R., Zingali, R. B., Foguel, D., e Monteiro, R. Q. (2004). New insights into conformational and functional stability of human α -thrombin probed by high hydrostatic pressure. *European Journal of Biochemistry*, **271**, 3580-3587.
- LI, W., Johnson, D. J. D., Esmon, C. T., e Huntington, J. A. (2004). Structure of antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithombotic mechanism of heparin. *Nature Structural & Molecular Biology*, **11(9)**, 857-862.
- LÓPEZ, J. A. e Chen, J. (2009). Pathophysiology of venous thrombosis. *Thrombosis Research*, **123(4)**, S30-S34.
- MACKMAN, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, **451**, 914-918.
- MANN, K. G. (1976). Prothrombin. *Methods Enzymol.* **45**, 123-156.
- MAURICIO, I., Francischetti, B., Monteiro, R. Q., e Guimarães, J. A. (1997). Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **235**, 259-263.
- MCPHERSON, A. (2009). Introduction to Macromolecular Crystallography. Second Edition. Wiley Blackwell, Danvers, MA, USA. p. 125.
- MCLAUGHLIN, K. E. e Dunning, J. (2003). In patients post cardiac surgery do high doses of protamin cause increased bleeding? *Interact Cardivasc Thorac Surg*, **2(4)**, 424-426.

REFERÊNCIAS

- MEAUME, J. (1966). Snake venoms as modifying agents of blood coagulation. *Toxicon* **4**, 25-28.
- MERAGANORE, J. M., Chao, B., Joseph, M. L., Jablonski, J. e Ramachandran, K. L. (1989). Anticoagulant activity of synthetic hirudin peptides. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 8692-8698.
- MEYER, S. F., Vanhoorelbeke, K., Broos, K., Salles, I. I., e Deckmyn, H. (2008). Antiplatelet drugs. *British Journal of Haematology*, **142**, 515-528.
- MONTEIRO, R. Q., Campana, P. T., Melo, P. A. e Bianconi, M. L. (2004). Suramin interaction with human α -thrombin: inhibitory effects and binding studies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**, 2077-2085.
- MURSHUDOV, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographyca*, **D53**, 240-255.
- NEGEM, R. A. P., (2003). Otimização das condições para aquisição de dados de derivados e para determinação das fases dos fatores de estruturas de cristais de proteínas por meio da difração da luz síncrotron. Tese de Doutorado. Campinas/SP. P. 17-36.
- NGAI, P. K. e Chang, J. Y. (1991). A novel one-step purification of human α -thrombin after direct activation of crude prothrombin enriched from plasma. *Biochemical Journal*, **280**, 805-808.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (2008). Indicadores básicos para La salud em Brasil: Conceptos y aplicaciones. Brasília/DF, 2ª Edição, 122-123.
- PINEDA, A. O., Chen, Z. W., Bah, A., Garvey, L. C., Mathews, F. S., Di Cera, E. (2006). Crystal structure of thrombin in a self-inhibited conformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32922-32928.
- PINEDA, A. O., Christopher, C. J., Bush, L. A., Prasad, S., Caccia, S., Chen, Z. W., Mathews, F. S., e Di Cera, E. (2004). Molecular dissection of Na⁺ binding to thrombin. *The Journal of Biological Chemistry*, **279(30)**, 31842-31853.
- POLIKARPOV, I., Perles, L. A., de Oliveira, R. T., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R. C., et al. (1998). Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. *Journal of synchrotron radiation*, **5P(t 2)**, 72-6.
- POLIKARPOV, I., Perles, L. A., de Oliveira, R. T., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt R.

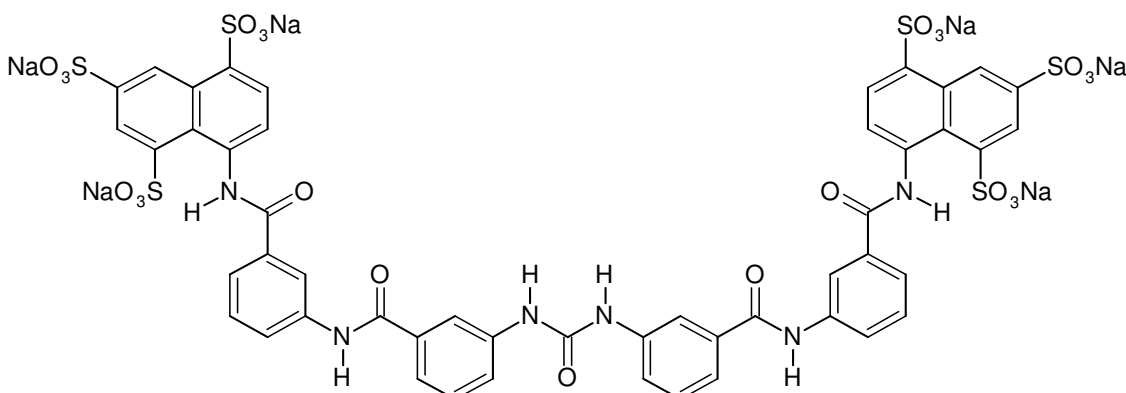
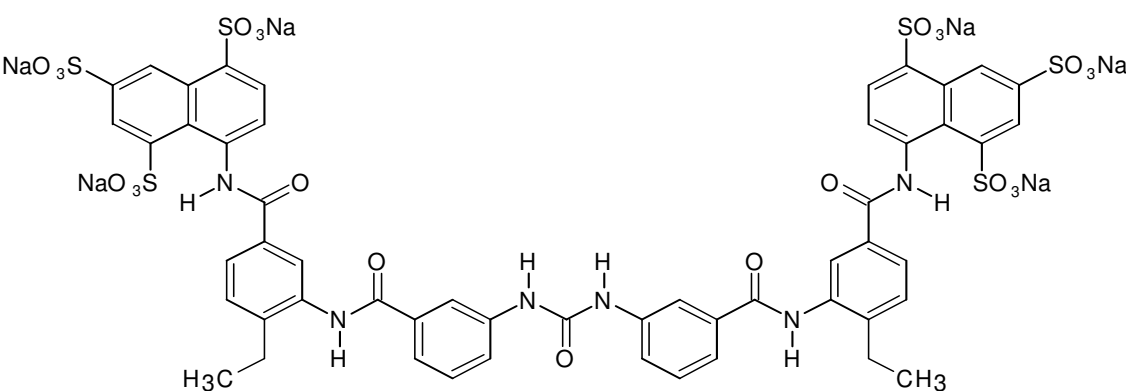
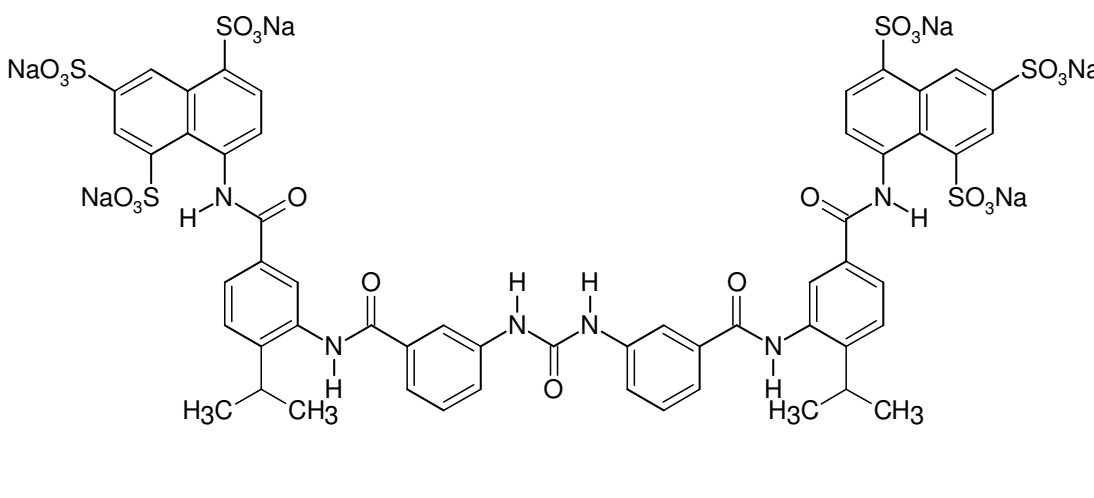
- C. e Craievich, A. (1998). Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. *Journal of Synchrotron Radiation*, **5(Pt 2)**, 72-76.
- POTTERTON, E., Briggs, P., Turkenburg, M. e Dodson, E. (2003). A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallographica*, **D59**, 1131-1137.
- RAJ, P. A., Marcus, E., e Rein, R. (1998). Conformational requirements of suramin to target angiogenic growth factor. *Angiogenesis*, **2**, 183-199.
- RHODES, G. (2006). Crystallography made crystal clear: A guide for users of macromolecular models. Terceira Edição. Oxford: Elsevier.
- RIBEIRO, J. M., Schneider, M. e Guimarães, J. A. (1995). Purification and characterization of prolixin S (nitrophenol 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochemical Journal*, **308**, 243-249.
- SCHUETTEKOPF, A. W., Aalten, D.M.F. (2004). PRODRG – a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica* **D60**, 1355-1363.
- SHARP, A. A e Eggleton M. J. (1963). Haematology and extracorporeal circulation. *Journal of Clinical Pathology*, **16**, 551-557.
- SHEEHAN, J. P., Sadler, J. E. (1994). Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5518-5522.
- SHEN, G. X. (2006). Inhibition of thrombin: relevance to anti-thrombosis strategy. *Frontier in Bioscience*, **11**, 113-120.
- SOLOMONS, G., e Fryhle, C. (2002). Química Orgânica. Volume 2. Sétima Edição. Livros Técnicos e Científicos Editora S. A. , Rio de Janeiro/RJ. p. 428-430.
- SRIVASTAVA, S., Goswami, L. N., e Dikshit, D. K., (2004). Progress in the design of low molecular weight thrombin inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, **20(1)**, 66-92.
- TAYLOR, G. (2003). The phase problem. *Acta Crystallographyca*, **D59**, 1881-1890.
- ULLMANN, H., Meis, S., Hongwiset, D., Marzian, C., Wiese, M., Nickel, P., Communi, D., Boeynaems, J. M., Wolf, C., Hausmann, R., Schmalzing, G., e Kassack, M. U. (2005). Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived P2Y₁₁ receptor antagonists with nanomolar potency. *Journal of Med. Chemistry*, **48**, 7040-7048.

REFERÊNCIAS

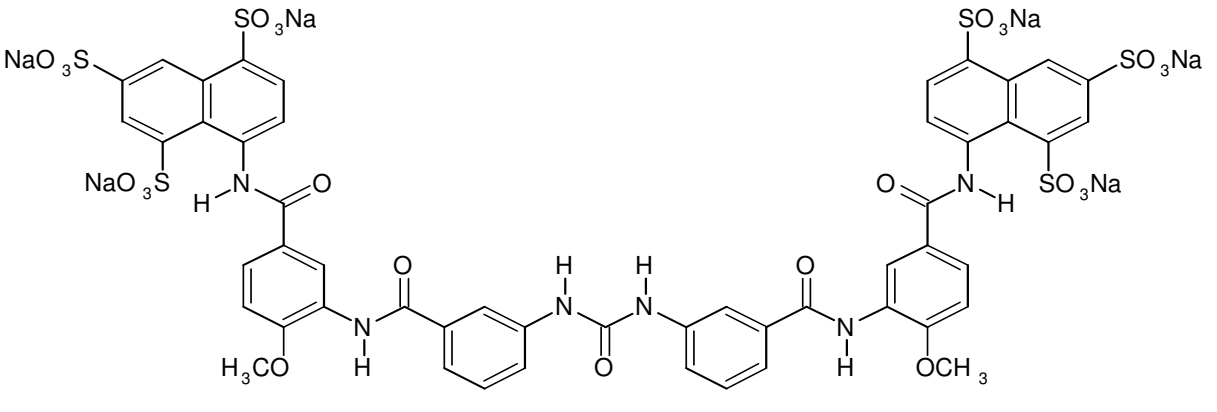
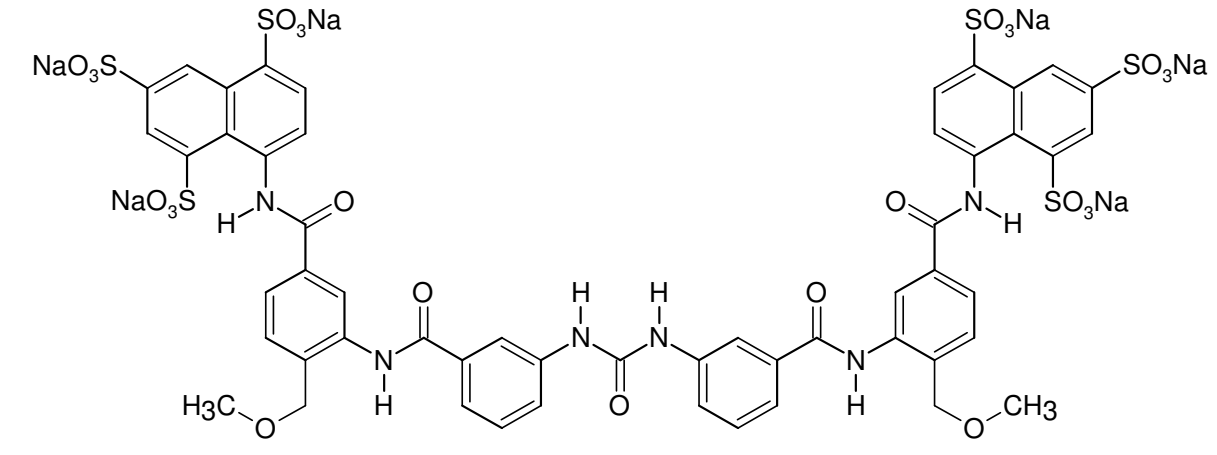
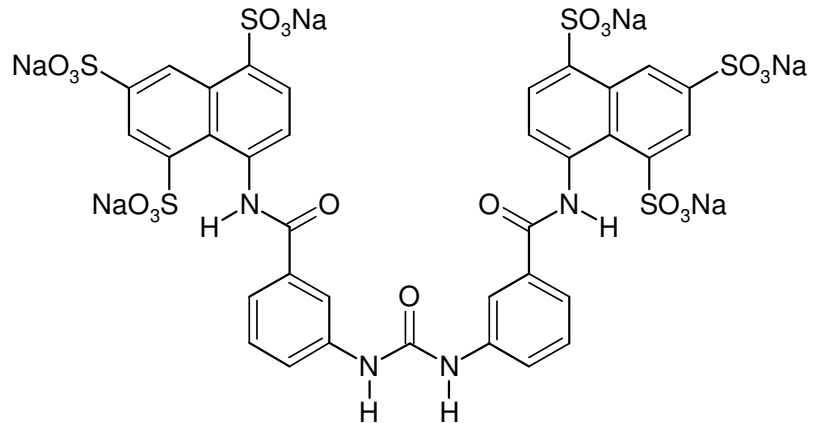
- VAGIN, A. e Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography*, **30(6)**, 1022-102.
- VOOGD, T. E., Vansterkenburg, E. L. M., Wilting, J. e Janssen, L. H. M. (1993). Recent research on biological activity of suramin. *Pharmacological Rev.*, **45(2)**, 177-203.

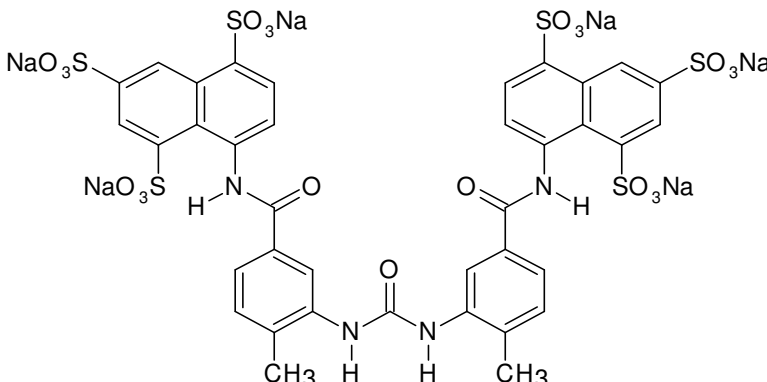
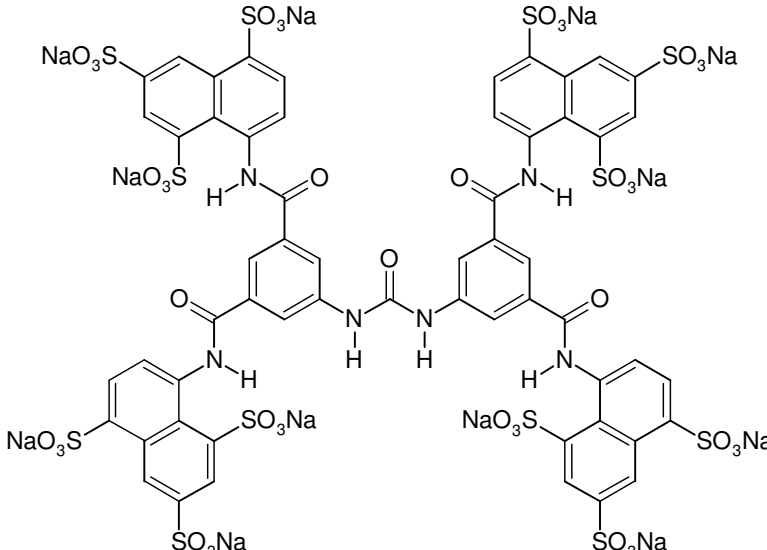
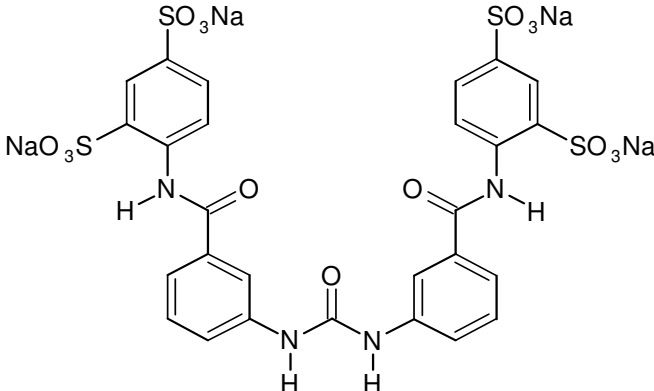
Anexo 1

Estruturas planas dos análogos de suramina usados no trabalho

NF037	$C_{49}H_{30}N_6O_{23}S_6Na_6$ (1.401,1) 8,8'-(Carbonilbis(imino-3,1-fenilenocarbonilimino-3,1-fenilenocarbonilimino))bis(naftaleno-1,3,5-ácido trisulfônico) sal hexasódico
	
NF127	$C_{53}H_{38}N_6O_{23}S_6Na_6$ (1.457,20) 8,8'-(Carbonilbis(imino-3,1-fenilenocarbonilimino-3,1-(4-etilfenileno)-carbonilimino))bis(naftaleno-1,3,5-ácido trisulfônico) sal hexasódico
	
NF151	$C_{55}H_{42}N_6O_{23}S_6Na_6$ (1.485,26) 8,8'-(Carbonilbis(imino-3,1-fenilenocarbonilimino-3,1-(4-isopropilfenileno)carbonilimino))bis(naftaleno-1,3,5-ácido trisulfônico) sal hexasódico
	

NF198	C ₆₁ H ₃₈ N ₆ O ₂₃ S ₆ Na ₆ (1.553,29) 8,8'-(Carbonilbis(imino-3,1-fenilenocarbonilimino-3,1-(4-fenilfenileno)carbonilimino))bis(naftaleno-1,3,5-ácido trisulfônico) sal hexasódico
NF157	C ₄₉ H ₂₈ F ₂ N ₆ O ₂₃ S ₆ Na ₆ (1.437,08) 8,8'-(Carbonilbis(imino-3,1-fenilenocarbonilimino-3,1-(4-fluorofenileno)-carbonilimino))bis(naftaleno-1,3,5-ácido trisulfônico) sal hexasódico
NF258	C ₄₉ H ₂₈ Cl ₂ N ₆ O ₂₃ S ₆ Na ₆ (1.469,99) 8,8'-(Carbonilbis(imino-3,1-fenilenocarbonilimino-3,1-(4-clorofenileno)carbonilimino))bis(naftaleno-1,3,5-ácido trisulfônico) sal hexasódico

NF260	$C_{51}H_{34}N_6O_{25}S_6Na_6$ (1.461,15) 8,8'-(Carbonilbis(imino-3,1-fenilenocarbonilimino-3,1-(4-metoxifenileno)carbonilimino))bis(naftaleno-1,3,5-ácido trisulfônico) sal hexasódico
	
NF222	$C_{53}H_{38}N_6O_{25}S_6Na_6$ (1.489,20) 8,8'-(Carbonilbis(imino-3,1-fenilenocarbonilimino-3,1-(4-metoximetil)fenileno)carbonilimino))bis(naftaleno-1,3,5-ácido trisulfônico) sal hexasódico
	
NF023	$C_{35}H_{20}N_4O_{21}S_6Na_6$ (1.162,85) 8,8'-(Carbonilbis(imino-3,1-fenilenocarbonilimino))bis(naftaleno-1,3,5-ácido trisulfônico) sal hexasódico
	

NF058	C ₃₇ H ₂₄ N ₄ O ₂₁ S ₆ Na ₆ (1.190,91) 8,8'-(Carbonilbis(imino-3,1-(4-metilfenileno)carbonilimino))bis(naftaleno-1,3,5-ácido trissulfônico) sal hexasódico
	
NF864	C ₅₇ H ₂₈ N ₆ O ₄₁ S ₁₂ Na ₁₂ (2.112,46) 8,8',8'',8'''-(Carbonilbis(imino-5,1,3-benzenotril-bis(carbonilimino))tetraquis(naftaleno-1,3,5-ácido trissulfônico) sal dodecasódico
	
MK-HU1	C ₂₇ H ₁₈ N ₄ O ₁₅ S ₄ Na ₄ (858,67) 4,4'-(Carbonilbis(imino-3,1-fenilenocarbonilimino))bis(benzeno-1,3-ácido disulfônico) sal tetrasódico
	

Anexo 2

Listas dos reagentes usados nos ensaios de cristalização

ANEXO 2

Crystal Screen™

HR2-110 Reagent Formulation

Tube #	Salt	Tube #	Buffer ◊	Tube #	Precipitant
1.	0.02 M Calcium chloride dihydrate	1.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	1.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
2.	None	2.	None	2.	0.4 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
3.	None	3.	None	3.	0.4 M Ammonium phosphate monobasic
4.	None	4.	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5	4.	2.0 M Ammonium sulfate
5.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	5.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	5.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
6.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	6.	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5	6.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000
7.	None	7.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	7.	1.4 M Sodium acetate trihydrate
8.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	8.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	8.	30% v/v 2-Propanol
9.	0.2 M Ammonium acetate	9.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	9.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000
10.	0.2 M Ammonium acetate	10.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	10.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000
11.	None	11.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	11.	1.0 M Ammonium phosphate monobasic
12.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	12.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	12.	30% v/v 2-Propanol
13.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	13.	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5	13.	30% v/v Polyethylene glycol 400
14.	0.2 M Calcium chloride dihydrate	14.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	14.	28% v/v Polyethylene glycol 400
15.	0.2 M Ammonium sulfate	15.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	15.	30% w/v Polyethylene glycol 8,000
16.	None	16.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	16.	1.5 M Lithium sulfate monohydrate
17.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	17.	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5	17.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000
18.	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate	18.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	18.	20% w/v Polyethylene glycol 8,000
19.	0.2 M Ammonium acetate	19.	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5	19.	30% v/v 2-Propanol
20.	0.2 M Ammonium sulfate	20.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	20.	25% w/v Polyethylene glycol 4,000
21.	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate	21.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	21.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
22.	0.2 M Sodium acetate trihydrate	22.	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5	22.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000
23.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	23.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	23.	30% v/v Polyethylene glycol 400
24.	0.2 M Calcium chloride dihydrate	24.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	24.	20% v/v 2-Propanol
25.	None	25.	0.1 M Imidazole pH 6.5	25.	1.0 M Sodium acetate trihydrate
26.	0.2 M Ammonium acetate	26.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	26.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
27.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	27.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	27.	20% v/v 2-Propanol
28.	0.2 M Sodium acetate trihydrate	28.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	28.	30% w/v Polyethylene glycol 8,000
29.	None	29.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	29.	0.8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate
30.	0.2 M Ammonium sulfate	30.	None	30.	30% w/v Polyethylene glycol 8,000
31.	0.2 M Ammonium sulfate	31.	None	31.	30% w/v Polyethylene glycol 4,000
32.	None	32.	None	32.	2.0 M Ammonium sulfate
33.	None	33.	None	33.	4.0 M Sodium formate
34.	None	34.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	34.	2.0 M Sodium formate
35.	None	35.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	35.	0.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 0.8 M Potassium phosphate monobasic
36.	None	36.	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5	36.	8% w/v Polyethylene glycol 8,000
37.	None	37.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	37.	8% w/v Polyethylene glycol 4,000
38.	None	38.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	38.	1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate
39.	None	39.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	39.	2% v/v Polyethylene glycol 400 2.0 M Ammonium sulfate
40.	None	40.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	40.	20% v/v 2-Propanol 20% w/v Polyethylene glycol 4,000
41.	None	41.	0.1 M HEPES sodium pH 7.5	41.	10% v/v 2-Propanol 20% w/v Polyethylene glycol 4,000
42.	0.05 M Potassium phosphate monobasic	42.	None	42.	20% w/v Polyethylene glycol 8,000
43.	None	43.	None	43.	30% w/v Polyethylene glycol 1,500
44.	None	44.	None	44.	0.2 M Magnesium formate dihydrate
45.	0.2 M Zinc acetate dihydrate	45.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	45.	18% w/v Polyethylene glycol 8,000
46.	0.2 M Calcium acetate hydrate	46.	0.1 M Sodium cacodylate trihydrate pH 6.5	46.	18% w/v Polyethylene glycol 8,000
47.	None	47.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	47.	2.0 M Ammonium sulfate
48.	None	48.	0.1 M TRIS hydrochloride pH 8.5	48.	2.0 M Ammonium phosphate monobasic
49.	1.0 M Lithium sulfate monohydrate	49.	None	49.	2% w/v Polyethylene glycol 8,000
50.	0.5 M Lithium sulfate monohydrate	50.	None	50.	15% w/v Polyethylene glycol 8,000

◊ Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components; pH with HCl or NaOH.

Crystal Screen contains fifty unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
E-mail: tech@hrmail.com
Website: www.hamptonresearch.com

HAMPTON
RESEARCH

Solutions for Crystal Growth

© 2000-2007 Hampton Research Corp. all rights reserved
Printed in the United States of America. This guide or parts thereof may not be reproduced in any form without the written permission of the publishers.

ANEXO 2

Crystal Screen 2™

HR2-112 Reagent Formulation

Tube #	Salt	Tube #	Buffer ◊	Tube #	Precipitant
1.	2.0 M Sodium chloride	1.	None	1.	10% w/v Polyethylene glycol 6,000
2.	0.5 M Sodium chloride 0.01 M Magnesium chloride hexahydrate	2.	None	2.	0.01 M Hexadecyltrimethylammonium bromide
3.	None	3.	None	3.	25% v/v Ethylene glycol
4.	None	4.	None	4.	35% v/v 1,4-Dioxane
5.	2.0 M Ammonium sulfate	5.	None	5.	5% v/v 2-Propanol
6.	None	6.	None	6.	1.0 M Imidazole pH 7.0
7.	None	7.	None	7.	10% w/v Polyethylene glycol 1,000 10% w/v Polyethylene glycol 8,000
8.	1.5 M Sodium chloride	8.	None	8.	10% v/v Ethanol
9.	None	9.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	9.	2.0 M Sodium chloride
10.	0.2 M Sodium chloride	10.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	10.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
11.	0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	11.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	11.	1.0 M 1,6-Hexanediol
12.	0.1 M Cadmium chloride hydrate	12.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	12.	30% v/v Polyethylene glycol 400
13.	0.2 M Ammonium sulfate	13.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6	13.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
14.	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	14.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	14.	2.0 M Ammonium sulfate
15.	0.5 M Ammonium sulfate	15.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	15.	1.0 M Lithium sulfate monohydrate
16.	0.5 M Sodium chloride	16.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	16.	2% v/v Ethylene imine polymer
17.	None	17.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	17.	35% v/v tert-Butanol
18.	0.01 M Iron(III) chloride hexahydrate	18.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	18.	10% v/v Jeffamine M-600®
19.	None	19.	0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6	19.	2.5 M 1,6-Hexanediol
20.	None	20.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	20.	1.6 M Magnesium sulfate heptahydrate
21.	0.1 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 0.1 M Potassium phosphate monobasic	21.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	21.	2.0 M Sodium chloride
22.	None	22.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	22.	12% w/v Polyethylene glycol 20,000
23.	1.6 M Ammonium sulfate	23.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	23.	10% v/v 1,4-Dioxane
24.	0.05 M Cesium chloride	24.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	24.	30% v/v Jeffamine M-600®
25.	0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	25.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	25.	1.8 M Ammonium sulfate
26.	0.2 M Ammonium sulfate	26.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	26.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
27.	0.01 M Zinc sulfate heptahydrate	27.	0.1 M MES monohydrate pH 6.5	27.	25% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
28.	None	28.	None	28.	1.6 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 6.5
29.	0.5 M Ammonium sulfate	29.	0.1 M HEPES pH 7.5	29.	30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
30.	None	30.	0.1 M HEPES pH 7.5	30.	10% w/v Polyethylene glycol 6,000 5% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
31.	None	31.	0.1 M HEPES pH 7.5	31.	20% v/v Jeffamine M-600®
32.	0.1 M Sodium chloride	32.	0.1 M HEPES pH 7.5	32.	1.6 M Ammonium sulfate
33.	None	33.	0.1 M HEPES pH 7.5	33.	2.0 M Ammonium formate
34.	0.05 M Cadmium sulfate hydrate	34.	0.1 M HEPES pH 7.5	34.	1.0 M Sodium acetate trihydrate
35.	None	35.	0.1 M HEPES pH 7.5	35.	70% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
36.	None	36.	0.1 M HEPES pH 7.5	36.	4.3 M Sodium chloride
37.	None	37.	0.1 M HEPES pH 7.5	37.	10% w/v Polyethylene glycol 8,000 8% v/v Ethylene glycol
38.	None	38.	0.1 M HEPES pH 7.5	38.	20% w/v Polyethylene glycol 10,000
39.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	39.	0.1 M Tris pH 8.5	39.	3.4 M 1,6-Hexanediol
40.	None	40.	0.1 M Tris pH 8.5	40.	25% v/v tert-Butanol
41.	0.01 M Nickel(II) chloride hexahydrate	41.	0.1 M Tris pH 8.5	41.	1.0 M Lithium sulfate monohydrate
42.	1.5 M Ammonium sulfate	42.	0.1 M Tris pH 8.5	42.	12% v/v Glycerol
43.	0.2 M Ammonium phosphate monobasic	43.	0.1 M Tris pH 8.5	43.	50% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
44.	None	44.	0.1 M Tris pH 8.5	44.	20% v/v Ethanol
45.	0.01 M Nickel(II) chloride hexahydrate	45.	0.1 M Tris pH 8.5	45.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
46.	0.1 M Sodium chloride	46.	0.1 M BICINE pH 9.0	46.	20% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
47.	None	47.	0.1 M BICINE pH 9.0	47.	2.0 M Magnesium chloride hexahydrate
48.	None	48.	0.1 M BICINE pH 9.0	48.	2% v/v 1,4-Dioxane 10% w/v Polyethylene glycol 20,000

◊ Buffer pH is that of a 1.0 M (0.5 M for MES monohydrate) stock prior to dilution with other reagent components: pH with HCl or NaOH.

Crystal Screen 2 contains forty-eight unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
E-mail: tech@hrmail.com
Website: www.hamptonresearch.com

**HAMPTON
RESEARCH**

Solutions for Crystal Growth

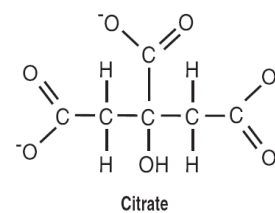
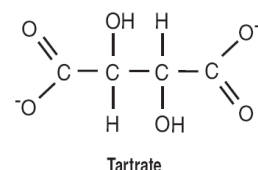
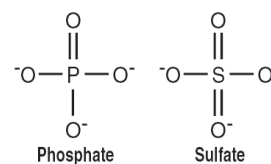
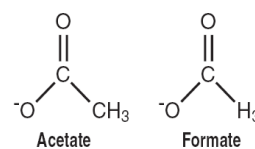
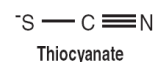
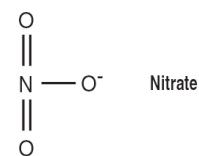
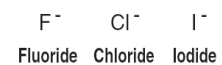
© 2000-2007 Hampton Research Corp. all rights reserved
Printed in the United States of America. This guide or parts thereof may not be reproduced in any form without the written permission of the publishers.

ANEXO 2

PEG/Ion Screen™

HR2-126 Reagent Formulation

Tube #	Salt	Tube #	Polymer	Tube #	pH \diamond
1.	0.2 M Sodium fluoride	1.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	1.	7.3
2.	0.2 M Potassium fluoride	2.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	2.	7.3
3.	0.2 M Ammonium fluoride	3.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	3.	6.2
4.	0.2 M Lithium chloride	4.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	4.	6.8
5.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	5.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	5.	5.9
6.	0.2 M Sodium chloride	6.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	6.	6.9
7.	0.2 M Calcium chloride dihydrate	7.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	7.	5.1
8.	0.2 M Potassium chloride	8.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	8.	7.0
9.	0.2 M Ammonium chloride	9.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	9.	6.3
10.	0.2 M Sodium iodide	10.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	10.	7.0
11.	0.2 M Potassium iodide	11.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	11.	7.0
12.	0.2 M Ammonium iodide	12.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	12.	6.2
13.	0.2 M Sodium thiocyanate	13.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	13.	6.9
14.	0.2 M Potassium thiocyanate	14.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	14.	7.0
15.	0.2 M Lithium nitrate	15.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	15.	7.1
16.	0.2 M Magnesium nitrate hexahydrate	16.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	16.	5.9
17.	0.2 M Sodium nitrate	17.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	17.	6.8
18.	0.2 M Potassium nitrate	18.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	18.	6.8
19.	0.2 M Ammonium nitrate	19.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	19.	6.2
20.	0.2 M Magnesium formate dihydrate	20.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	20.	7.0
21.	0.2 M Sodium formate	21.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	21.	7.2
22.	0.2 M Potassium formate	22.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	22.	7.3
23.	0.2 M Ammonium formate	23.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	23.	6.6
24.	0.2 M Lithium acetate dihydrate	24.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	24.	7.9
25.	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate	25.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	25.	7.9
26.	0.2 M Zinc acetate dihydrate	26.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	26.	6.4
27.	0.2 M Sodium acetate trihydrate	27.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	27.	8.0
28.	0.2 M Calcium acetate hydrate	28.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	28.	7.5
29.	0.2 M Potassium acetate	29.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	29.	8.1
30.	0.2 M Ammonium acetate	30.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	30.	7.1
31.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	31.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	31.	6.0
32.	0.2 M Magnesium sulfate heptahydrate	32.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	32.	6.0
33.	0.2 M Sodium sulfate decahydrate	33.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	33.	6.7
34.	0.2 M Potassium sulfate	34.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	34.	6.8
35.	0.2 M Ammonium sulfate	35.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	35.	6.0
36.	0.2 M Sodium tartrate dibasic dihydrate	36.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	36.	7.3
37.	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	37.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	37.	7.4
38.	0.2 M Ammonium tartrate dibasic	38.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	38.	6.6
39.	0.2 M Sodium phosphate monobasic monohydrate	39.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	39.	4.7
40.	0.2 M Sodium phosphate dibasic dihydrate	40.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	40.	9.1
41.	0.2 M Potassium phosphate monobasic	41.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	41.	4.8
42.	0.2 M Potassium phosphate dibasic	42.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	42.	9.2
43.	0.2 M Ammonium phosphate monobasic	43.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	43.	4.6
44.	0.2 M Ammonium phosphate dibasic	44.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	44.	8.0
45.	0.2 M Lithium citrate tribasic tetrahydrate	45.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	45.	8.4
46.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	46.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	46.	8.3
47.	0.2 M Potassium citrate tribasic monohydrate	47.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	47.	8.3
48.	0.2 M Ammonium citrate dibasic	48.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350	48.	5.1



\diamond Measured pH at 25 °C

PEG/Ion Screen contains forty-eight unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
E-mail: tech@hrmail.com
Website: www.hamptonresearch.com

HAMPTON
RESEARCH

Solutions for Crystal Growth

© 2000-2006 Hampton Research Corp. all rights reserved
Printed in the United States of America. This guide or
parts thereof may not be reproduced in any form without
the written permission of the publishers.

ANEXO 2

Crystal Screen Cryo™

HR2-122 Reagent Formulation

Tube Number	Salt	Tube Number	Buffer †	Tube Number	Precipitant	Tube Number	Glycerol anhydrous
1.	0.02 M Calcium Chloride dihydrate	1.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	1.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	1.	None
2.	None	2.	None	2.	0.26 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate	2.	35% v/v
3.	None	3.	None	3.	0.26 M Ammonium dihydrogen Phosphate	3.	35% v/v
4.	None	4.	0.075 M Tris Hydrochloride pH 8.5	4.	1.5 M Ammonium Sulfate	4.	25% v/v
5.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	5.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	5.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	5.	None
6.	0.16 M Magnesium Chloride hexahydrate	6.	0.08 M Tris Hydrochloride pH 8.5	6.	24% w/v Polyethylene Glycol 4000	6.	20% v/v
7.	None	7.	0.07 M Sodium Cacodylate pH 6.5	7.	0.98 M Sodium Acetate trihydrate	7.	30% v/v
8.	0.14 M tri-Sodium Citrate dihydrate	8.	0.07 M Sodium Cacodylate pH 6.5	8.	21% v/v iso-Propanol	8.	30% v/v
9.	0.17 M Ammonium Acetate	9.	0.085 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	9.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 4000	9.	15% v/v
10.	0.17 M Ammonium Acetate	10.	0.085 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	10.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 4000	10.	15% v/v
11.	None	11.	0.07 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	11.	0.7 M Ammonium dihydrogen Phosphate	11.	30% v/v
12.	0.18 M Magnesium Chloride hexahydrate	12.	0.09 M HEPES - Na pH 7.5	12.	27% v/v iso-Propanol	12.	10% v/v
13.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	13.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	13.	30% v/v Polyethylene Glycol 400	13.	None
14.	0.19 M Calcium Chloride dihydrate	14.	0.095 M HEPES - Na pH 7.5	14.	26.6% w/v Polyethylene Glycol 400	14.	5% v/v
15.	0.17 M Ammonium Sulfate	15.	0.085 M Sodium Cacodylate pH 6.5	15.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 8000	15.	15% v/v
16.	None	16.	0.075 M HEPES - Na pH 7.5	16.	1.125 M Lithium Sulfate monohydrate	16.	25% v/v
17.	0.17 M Lithium Sulfate monohydrate	17.	0.085 M Tris Hydrochloride pH 8.5	17.	25.5% Polyethylene Glycol 4000	17.	15% v/v
18.	0.16 M Magnesium Acetate tetrahydrate	18.	0.08 M Sodium Cacodylate pH 6.5	18.	16% Polyethylene Glycol 8000	18.	20% v/v
19.	0.16 M Ammonium Acetate	19.	0.08 M Tris Hydrochloride pH 8.5	19.	24% v/v iso-Propanol	19.	20% v/v
20.	0.16 M Ammonium Sulfate	20.	0.08 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	20.	20% w/v Polyethylene Glycol 4000	20.	20% v/v
21.	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	21.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	21.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	21.	None
22.	0.17 M Sodium Acetate trihydrate	22.	0.085 M Tris Hydrochloride pH 8.5	22.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 4000	22.	15% v/v
23.	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	23.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	23.	30% v/v Polyethylene Glycol 400	23.	None
24.	0.14 M Calcium Chloride dihydrate	24.	0.07 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	24.	14% v/v iso-Propanol	24.	30% v/v
25.	None	25.	0.07 M Imidazole pH 6.5	25.	0.7 M Sodium Acetate trihydrate	25.	30% v/v
26.	0.2 M Ammonium Acetate	26.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	26.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	26.	None
27.	0.14 M tri-Sodium Citrate dihydrate	27.	0.07 M HEPES - Na pH 7.5	27.	14% v/v iso-Propanol	27.	30% v/v
28.	0.17 M Sodium Acetate trihydrate	28.	0.085 M Sodium Cacodylate pH 6.5	28.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 8000	28.	15% v/v
29.	None	29.	0.065 M HEPES - Na pH 7.5	29.	0.52 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate	29.	35% v/v
30.	0.17 M Ammonium Sulfate	30.	None	30.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 8000	30.	15% v/v
31.	0.17 M Ammonium Sulfate	31.	None	31.	25.5% w/v Polyethylene Glycol 4000	31.	15% v/v
32.	None	32.	None	32.	1.5 M Ammonium Sulfate	32.	25% v/v
33.	None	33.	None	33.	3.6 M Sodium Formate	33.	10% v/v
34.	None	34.	0.07 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	34.	1.4 M Sodium Formate	34.	30% v/v
35.	None	35.	0.075 M HEPES - Na pH 7.5	35.	0.6 M Sodium dihydrogen phosphate 0.6 M Potassium dihydrogen phosphate	35.	25% v/v
36.	None	36.	0.065 M Tris Hydrochloride pH 8.5	36.	5.2% w/v Polyethylene Glycol 8000	36.	35% v/v
37.	None	37.	0.07 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	37.	5.6% w/v Polyethylene Glycol 4000	37.	30% v/v
38.	None	38.	0.09 M HEPES - Na pH 7.5	38.	1.26 M tri-Sodium Citrate dihydrate	38.	10% v/v
39.	None	39.	0.085 M HEPES - Na pH 7.5	39.	1.7% v/v Polyethylene Glycol 400, 1.7 M Ammonium Sulfate	39.	15% v/v
40.	None	40.	0.095 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	40.	19% v/v iso-Propanol, 19% w/v Polyethylene Glycol 4000	40.	5% v/v
41.	None	41.	0.085 M HEPES - Na pH 7.5	41.	8.5% v/v iso-Propanol, 17% w/v Polyethylene Glycol 4000	41.	15% v/v
42.	0.04 M Potassium dihydrogen Phosphate	42.	None	42.	16% w/v Polyethylene Glycol 8000	42.	20% v/v
43.	None	43.	None	43.	24% w/v Polyethylene Glycol 1500	43.	20% v/v
44.	None	44.	None	44.	0.1 M Magnesium Formate	44.	50% v/v
45.	0.16 M Zinc Acetate dihydrate	45.	0.08 M Sodium Cacodylate pH 6.5	45.	14.4% w/v Polyethylene Glycol 8000	45.	20% v/v
46.	0.16 M Calcium Acetate trihydrate	46.	0.08 M Sodium Cacodylate pH 6.5	46.	14.4% w/v Polyethylene Glycol 8000	46.	20% v/v
47.	None	47.	0.08 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	47.	1.6 M Ammonium Sulfate	47.	20% v/v
48.	None	48.	0.08 M Tris Hydrochloride pH 8.5	48.	1.6 M Ammonium dihydrogen Phosphate	48.	20% v/v
49.	0.8 M Lithium Sulfate monohydrate	49.	None	49.	1.6% w/v Polyethylene Glycol 8000	49.	20% v/v
50.	0.4 M Lithium Sulfate monohydrate	50.	None	50.	12% w/v Polyethylene Glycol 8000	50.	20% v/v

† Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components. pH with HCl or NaOH.

Crystal Screen Cryo contains fifty unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.

HAMPTON
RESEARCH

Solutions for Crystal Growth

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
e-mail: tech@hrmail.com
Website: www.hamptonresearch.com

© 2000-2006 Hampton Research Corp. all rights reserved
Printed in the United States of America. This guide or parts thereof may not be reproduced in any form without the written permission of the publishers.

Anexo 3

Artigo recente publicado por nosso grupo



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapap

Structural and thermodynamic analysis of thrombin:suramin interaction in solution and crystal phases

Luis Maurício T.R. Lima^{a,*}, Camila Franco Becker^{b,c}, Guilherme Menegon Giesel^b,
Adriana Fonseca Marques^{a,d,1}, Maria Thereza Cargnelutti^{a,d,1}, Mario de Oliveira Neto^e,
Robson Queiroz Monteiro^d, Hugo Verli^{b,c}, Igor Polikarpov^{e,*}

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bss34, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Bento Gonçalves 9500, CEP 15005, Porto Alegre 91500-970, RS, Brazil

^c Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Av Ipiranga 2752, Porto Alegre, 90610-000, RS, Brazil

^d Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^e Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Saocarlene, 400, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2008

Received in revised form 24 February 2009

Accepted 9 March 2009

Available online 28 March 2009

Keywords:

Thrombin

Suramin

Crystallography

Molecular dynamic simulation

Small-angle X-ray scattering

ABSTRACT

Suramin is a hexasulfonated naphthylurea which has been recently characterized as a non-competitive inhibitor of human alpha-thrombin activity over fibrinogen, although its binding site and mode of interaction with the enzyme remain elusive. Here, we determined two X-ray structure of the thrombin:suramin complex, refined at 2.4 Å resolution. While a single thrombin:suramin complex was found in the asymmetric unit cell of the crystal, some of the crystallographic contacts with symmetrically related molecules are mediated by both the enzyme and the ligand. Molecular dynamics simulations with the 1:1 complex demonstrate a large rearrangement of suramin in the complex, but with the protein scaffold and the more extensive protein–ligand regions keep unchanged. Small-angle X-ray scattering measurements at high micromolar concentration demonstrate a suramin-induced dimerization of the enzyme. These data indicating a dissimilar binding mode in the monomeric and oligomeric states, with a monomeric, 1:1 complex to be more likely to exist at the thrombin physiological, nanomolar concentration range. Collectively, close understanding on the structural basis for interaction is given which might establish a basis for design of suramin analogues targeting thrombin.

Crown Copyright © 2009 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Thrombin is a serine protease that plays key roles in coagulation, anticoagulation, and fibrinolytic pathways and thus represents an important target for novel antithrombotic compounds. Although resembling trypsin, thrombin is a specific enzyme that acts upon only a small range of physiological substrates due to residues surrounding the active site as well as other surface domains involved

in the recognition of cofactors, substrate, and inhibitors [1]. The coagulant form of thrombin, alpha-thrombin (α Th), is composed of two disulfide-linked chains (light, L, with 36 amino acids, and heavy, H, with 259 amino acids), with the catalytic site located in chain H, which contains three additional disulfide bonds as well as nine tryptophan residues distributed throughout the molecule.

Many efforts have been devoted to the development of more specific, direct, and indirect thrombin inhibitors [2–3], with some of these compounds entering clinical trials. Suramin (SVR) is a hexasulfonate compound that has been frequently used in the treatment of African trypanosomiasis and filariasis, and has served as a lead compound in the development of derivatives designed for the treatment of malaria, cancer, and haemostatic effects of snake venom, among others [4–8] (Fig. 1).

Recently, SVR was found to inhibit α Th [9]. This interaction was suggested to occur through the anion binding site (exosite) 2, and with inhibition constant in the low micromolar range. Further improvements in affinity and specificity of SVR by thrombin require the knowledge of any structural evidence for this interaction. In this work, we report the crystal structure of this complex, which allows

Abbreviations: TBS, tris-buffered saline (20 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5); FPRCK, D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone- α -thrombin; Suramin, 8, 8'-[carbonylbis [imino-3,1-phenylenecarbonylimino(4-methyl-3,1-phenylene)carbonylimino]]bis-1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid

* Corresponding authors. L.M.T.R. Lima is to be contacted at Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bss34, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel./fax: +55 21 2562 6639. I. Polikarpov, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Saocarlene, 400, São Carlos, SP, Brazil.

E-mail addresses: mauricio@pharma.ufrj.br (L.M.T.R. Lima), ipolikarpov@ifsc.usp.br (I. Polikarpov).

¹ Tel./fax: +55 21 2562 6639.

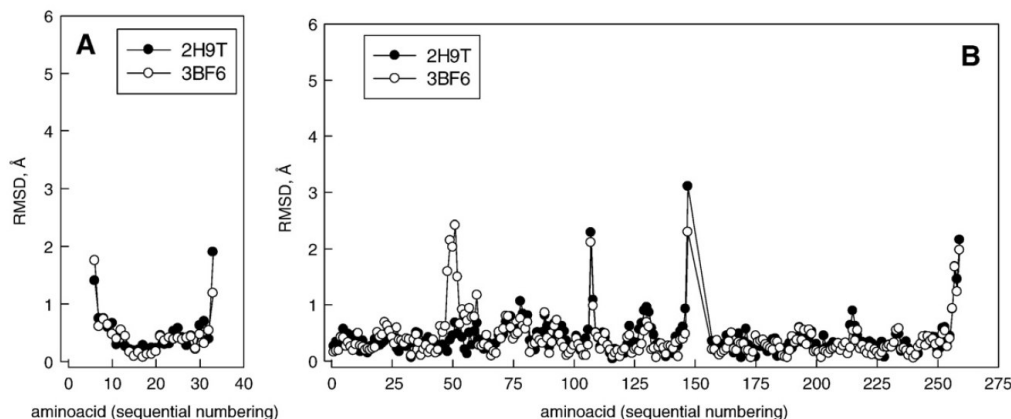


Fig. 2. Comparative analysis between apo and α Th:SVR structures. PPACK-thrombin (PDB entry 1PPB) and α Th:SVR complexes were superposed (with program *LSQKAB* from the CCP4 suite) and the RMSDs of C α are displayed for the 2H9T.pdb (closed circles) and 3BF6 (open circles) and for (A) light chain and (B) heavy chain.

[21]. Real space refinement was conducted by visual inspection of both the map and model with *Coot* [22], which was also used for the addition of water molecules. A summary of crystal parameters and data collection and refinement statistics are presented in Table 1. Atomic coordinates have been deposited with the Protein Data Bank and have been assigned the code 2H9T.pdb (collected at LNLS) and 3BF6.pdb (collected at home source X-ray generator). We present here the classic numbering of α Th based on the topological similarities with chymotrypsinogen [19].

The precision in atomic location of both structures is better than 0.35 Å (Table 1) [23]. Structural validation of the model performed with PROCHECK [24] showed that all main-chain dihedral angles were in the allowed regions. All residues were found in favorable Ramachandran regions. A detailed report of structure statistics can be found in Table 1. Omit maps were generated with the *Omit* program [25–26] from CCP4 suite [27]. All figures were generated with PyMol [28].

Coordinates and structure factors were deposited in the Protein Data Bank under ID codes 2H9T and 3BF6, and may also be found in external sites such as the Electron Density Server (<http://eds.bmc.uu.se/eds/>).

2.4. Small-angle X-ray scattering

Small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments were carried out at two α Th concentrations – 50 μ M and 100 μ M – inhibited by 1.2 molar excess of FPRCK in the presence or absence of equimolar amounts of SVR. All samples were prepared in 400 mM NaCl, 20 mM MES pH 6.0, centrifuged for 15 min at 15,000 g at 4 °C and maintained in ice until data collection.

SAXS data were collected at 25 °C using a one-dimensional position-sensitive detector (PSD 1D) with two instrumental setups:

- i) the D11-SAS1 beam line [29] on the LNLS (National Synchrotron Light Laboratory, Campinas, SP, Brazil) with wavelength 1.488 Å with a sample-detector distance providing a q -range from 0.02 Å⁻¹ to 0.25 Å⁻¹, and
- ii) a rotating anode (CuK α , λ = 1.5418 Å; Rigaku) with line focus, and sample-detector distance providing a q -range from 0.02 Å⁻¹ to 0.25 Å⁻¹,

where q is the modulus of the scattering vector (calculated according to $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$, where λ is the wavelength used and 2θ is the scattering angle). The scattering curves of the protein solutions and buffers were collected in several successive frames of 900 s each to monitor for radiation-induced protein oxidation. The data reduction

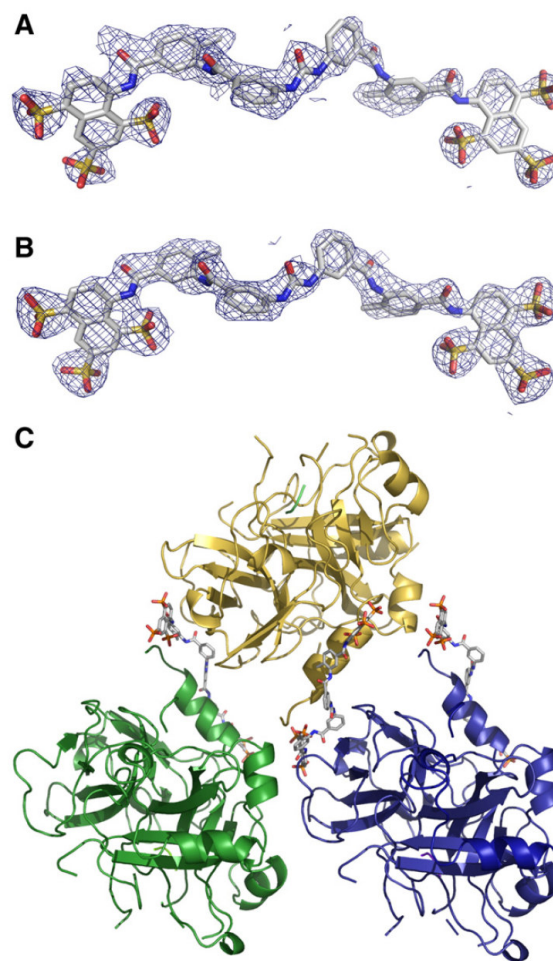


Fig. 3. Mapping SVR contacts with α Th. Electron density map of SVR in (A) 2H9T.pdb and (B) 3BF6.pdb. Grids correspond to the Omit 2F_o-F_c map contoured at 1 σ . (C) α Th:SVR complex (PDB entry 2H9T) crystallized to a 1:1 complex in the asymmetric unit (yellow; SVR#1), but symmetry-related structures (green, SVR#2, and blue, SVR #3) reveal other SVR-binding sites in α Th. Figures generated with PyMol.

routine included normalization of the one-dimensional scattered data to the intensity of the transmitted incident beam, correction for the detector response, incident beam intensity, sample absorption, sample concentration and blank subtraction. Measurements were performed using at least three different protein batches.

Guinier analysis [30] was applied to evaluate the monodispersity of the specimen and to determine the radius of gyration (R_g) of α Th and α Th:SVR in solution. The R_g and the scattered intensity, $I_0(q)$, were inferred, respectively, from the slope and the intercept of the linear fit of $\ln[I(q)]$ versus q^2 in the q -range $q * R_g < 1.3$ [30]. The same parameter was also obtained from the data fit of the merged curve by the indirect Fourier transform program GNOM [31], also evaluating the distance-distribution function, $p(r)$, of α Th. The maximum dimension, D_{max} , was estimated from the $p(r)$, with the limiting distance r where $p(r)$ first converges down to zero. The oligomeric states of α Th and α Th:SVR in SAXS measurements were confirmed from the extrapolated values of scattering intensity at zero scattering angle (I_0) and normalized by sample concentration C according to I_0/C using bovine serum albumin and egg hen lysozyme as reference standards [32–33].

2.5. Molecular dynamic simulation

The MD simulation was performed with the α Th:SVR complex in the asymmetric unit of PDB entry 2H9T. The GROMACS simulations suite [34] and GROMOS96 force field were used, employing an MD protocol based on previous studies [35]. This complex was solvated in a triclinic box using periodic boundary conditions and an SPC water model [36]. Counter ions were added to neutralize the system. The Lincs method was applied to constrain covalent bond lengths, allowing an integration step of 2fs after an initial energy minimization step using the Steepest Descents algorithm. Electrostatic interactions were calculated with Particle-Mesh Ewald [37]. Temperature and pressure were kept constant by separately coupling protein, ligand, ions, and solvent to external temperature and pressure baths [38] with coupling constants of $\tau = 0.1$ and 0.5 ps, respectively. The reference

temperature was adjusted to 310 K. The system was slowly heated from 50 to 310 K in steps of 5 ps, each one increasing the reference temperature by 50 K. SVR topology was built using the Prodrgr server [39] and Löwdin atomic charges, as previously described [40–41]. Interaction energies represent the sum of Coulomb and Lennard-Jones components over the MD trajectory.

3. Results

We have solved independently two crystal structures of the complex from two distinct crystals grown under same crystallization conditions. This strategy allows one to attain better clarity of our crystal structure of the α Th:SVR complex and to minimize the uncertainty caused by interpretation of a single model [15].

Distinct data collection strategies were used for each data set: one of them collected in a home source and the other at a synchrotron facility, resulting in data with final resolutions of 2.5 Å and 2.4 Å, respectively. Both structures were solved by molecular replacement with a reference thrombin structure (PDB entry 1PPB). Overall data collection, processing and refinement statistics are given in Table 1. Both structures consist of one α Th monomer and one SVR molecule per asymmetric unit.

The overall conformation of light and heavy chains of the α Th:SVR complex is similar to the reference thrombin structure used in molecular replacement (Fig. 2). Both complexes (2H9T.pdb and 3BF6.pdb) are similar, differing by less than 0.5 Å in their respective C α positions (chain L: RMSD = 0.32 ± 0.23 Å; chain H: RMSD = 0.32 ± 0.28 Å), except for a distal loop that is not in contact with SVR. The largest deviation between the two structures is 2 Å RMSD (Fig. 2)

A strong electron density for SVR was found, as shown in Fig. 3. As previously suggested by functional studies (9), SVR was supposed to be bound to the anion binding site (exosite) 2. Therefore, SVR recognition by α Th involves some aminoacids residues known to mediate the complex with heparin [42].

Although only one α Th:SVR complex is present in the asymmetric unit, SVR mediates interactions with the symmetry-related molecules

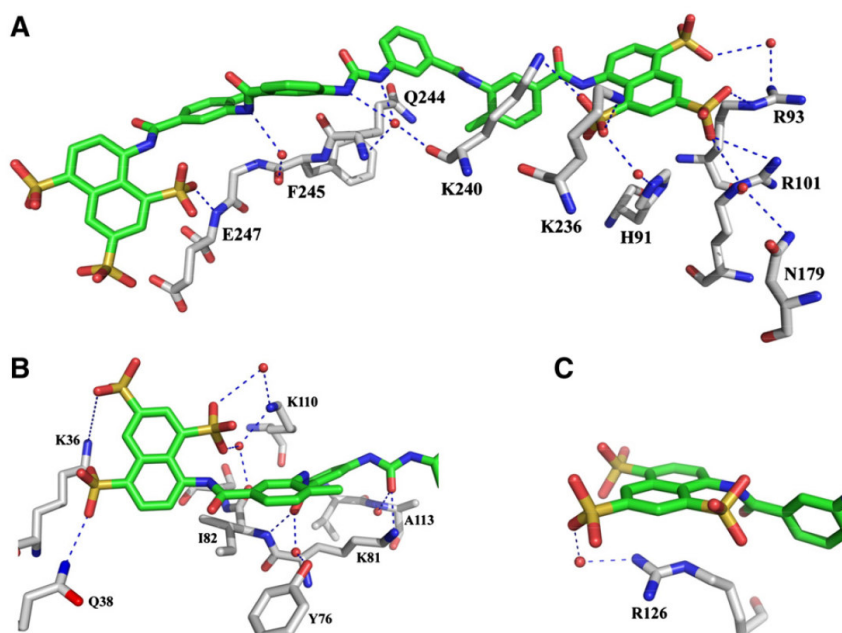


Fig. 4. SVR contacts with α Th. Details of the three possible SVR interaction with α Th according to crystal packing are shown here for (A) SVR#1, (B) SVR#2 and (C) SVR#3. Carbon atoms are represented in green for SVR and in gray for α Th. Water molecule is depicted as a red sphere. Dashed lines indicate contacts with distances between 2.2 and 3.2 Å. Figure

of α Th, contacting the enzyme in three different regions as a result of crystal packing (Fig. 3C). A closer analysis of these contacts immediately unravels a clear hierarchy of α Th:SVR interaction, numbered according to the extension of interaction between SVR and α Th: SVR#1, SVR#2 and SVR#3 (Fig. 3C), all of them with the heavy chain (chain H).

Two main features can be observed from the crystal structure for SVR#1 interaction with α Th (Fig. 4A). First, several basic aminoacid side chains (e.g., Arg, Lys, His) are involved in contacts with the naphthalene sulfonates, among others direct and water-mediated interactions with additional aminoacid side chains and amide groups. Second, although ionic contacts contribute extensively in binding, as corroborated by the high dependence of binding on the ionic strength [9], hydrophobic interactions and hydrogen bonding between the α Th amide and SVR also play roles in the maintenance of the complex.

Another important insight coming from this structure is the presence of a shallow cavity close to one of the SVR#1 methyl groups (Fig. 5). This cavity is occupied by a water molecule bridged within interactions with Gln244 side chain, the phenolic hydroxyl from Tyr89 and the amidic carbonyl from Val241. These features create a polar environment in this cavity, providing a repulsive interaction with the SVR methyl group. Maintenance of stable interaction between SVR and α Th at these regions is likely to be possible due to thermodynamic compensation by other interactions of SVR with α Th. We believe that functionalization at this position in SVR molecule would diminish the repulsive component, providing further favorable contacts between SVR and α Th and thus increasing the affinity constant for the complex.

SVR#2 interacts with α Th, through a large diversity of direct and water-mediated contacts (Fig. 4B), both from aminoacids side chains of Lys36, Gln38 Tyr76, Lys81 and Lys 110, the amide nitrogen from Ile 82 and Ala113, and the carbonyl from Ile82.

In opposition, SVR#3 interacts with α Th solely between Arg126 side chain and naphthalene sulfonates from SVR (Fig. 4C). This limited interaction seems to be a consequence of crystal packing, providing none or only minor contribution for interaction in solution.

3.1. Molecular dynamics simulations

Crystal environments can influence protein conformations, particularly at the regions of crystal contacts [43], and, consequently, they can bias the assignment of biological functions of a given macromolecule based on its X-ray structure. To gain better insights into the dynamic and crystal lattice-free conformation of the α Th:SVR complex, we decided to use molecular dynamics (MD) simulations.

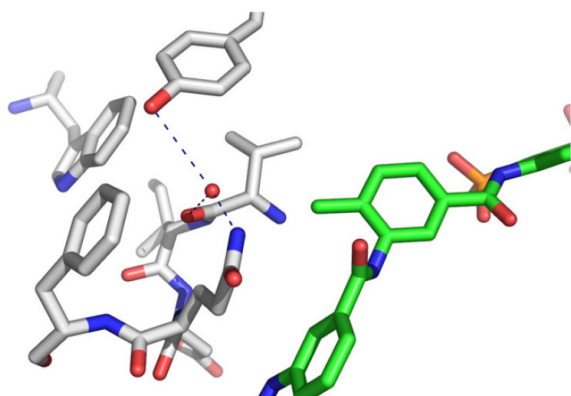


Fig. 5. Details of SVR methylene group interaction with α Th. Carbon atoms are represented in green for SVR and in gray for α Th. Water molecule is depicted as a red sphere. Dashed lines indicate contacts with distances between 2.2 and 3.2 Å. Figure generated with PyMol using the 2H9T.pdb entry.

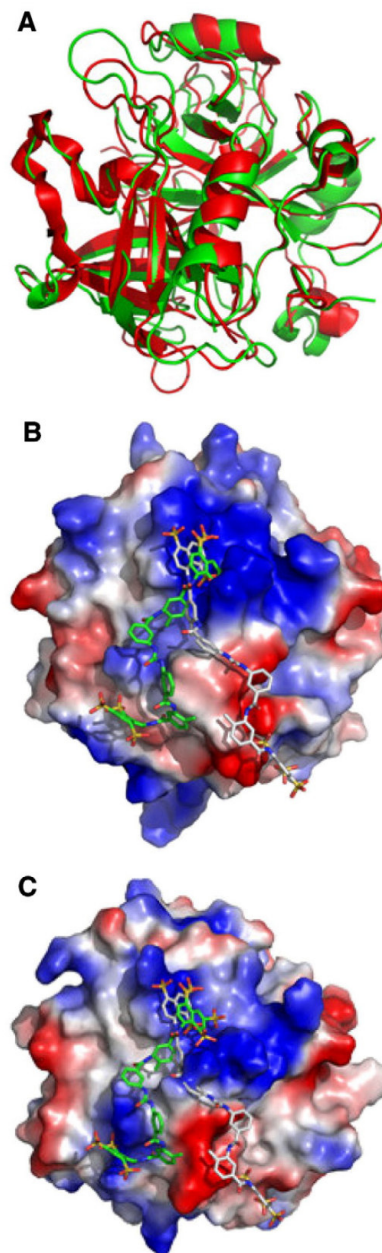


Fig. 6. Comparison of the crystal and MD conformations of the α Th:SVR complex. (A) Alignment of the crystal (red) and MD simulation (green) (final frame after 10 ns) conformations; crystallographic orientation of SVR; Surface electrostatic potential for crystal structure (B) and in solution after 10 ns simulation (C), showing SVR molecule both before (in crystal; carbons in gray) and after (carbons in green) 10 ns MD simulation. All structures are in the same orientation. Figure generated with PyMol.

Indeed, by separating the α Th:SVR complex from its crystallographic environment and replacing the crystal contacts by water molecules, we were able to evaluate the extent of conformational modifications induced by non-biological contacts [41; 44–45].

A 10 ns MD simulation was performed with the α Th:SVR complex. The simulation was stable during the performed time scale, with an

Table 2
Average interaction energy between SVR and α Th.

Thrombin residues	Average interaction energy (kJ/mol) ^a
Lys87	-28.2 ± 22.6
Pro92	-15.7 ± 3.3
Arg93	-19.4 ± 12.9
Arg101	-26.7 ± 11.2
Lys107	-5.9 ± 8.0
Lys236	-46.8 ± 18.2
Trp237	-60.9 ± 13.4
Lys240	-56.4 ± 24.4
Asp243	-2.7 ± 4.0
Gln244	-52.8 ± 6.6
Phe245	-45.5 ± 10.4
Glu247	-14.6 ± 11.9
Total	-492.0 ± 51.7

^a Average values from the sum of Coulomb and Lennard-Jones components sampled over entire 10 ns MD simulation.

average RMSD for the protein moiety of about 3 Å. Increased flexibilities were observed for the α Th light chain (average value = 3.4 ± 0.5 Å) and for SVR (average value = 4.3 ± 0.6 Å). Such deviations are due to a large modification of SVR orientation at the binding site (Fig. 6). Through this process, a series of contacts are formed, including those with residues Lys87, Lys107, Lys236, Trp237, and Phe245, and others are lost, including those with Arg93, Asp243, and Glu247, resulting in an increase of about -300 kJ/mol in SVR interaction with α Th (Table 2). In addition, the comparison between the final MD simulation model and the X-ray data suggests that the origin for the SVR behavior in the performed simulations lies in crystal contacts. In fact, in the MD model, one part of SVR occupies the same region as in the crystal, while the opposite part modifies its orientation. The fixed part of SVR is held in the crystal by a series of contacts with the Glu14C-Ser14I helix and is tightly packed against Asp186A-Glu186B of the neighboring α Th molecule in the crystal cell, which induces conformational restrictions in the orientation of SVR in the crystallographic structure. Upon removal of these contacts and inclusion of water molecules, the L chain accommodates in solution, originating the increased RMSD value observed in the simulations (Fig. 7). In opposition, a 10 ns simulation of a [α Th:SVR]₂ system as shown in Fig. 3C, generated by symmetry operation according to crystal space group, shows a lower mobility of suramin molecule, with RMSD of 4.2 ± 0.8 Å for [α Th:SVR]₁ versus 2.5 ± 0.4 Å for [α Th:SVR]₂ (not shown). This data confirm the role of crystallographic forces on SVR orientation at the α Th binding site.

3.2. Small-angle X-ray scattering

X-ray crystallography is capable of providing detailed tertiary structure information at atomic levels, but it frequently fails to correctly identify the quaternary organization of macromolecules. For example, both yeast hexokinase and bovine beta-lactoglobulin, were observed as monomers in crystal in spite of being capable to form dimers in solution [46–51]. Although a single α Th:SVR complex was found in the asymmetric unit cell, the interaction of SVR with α Th occurs as a combination of at least two separate events. The shape of the binding isotherms obtained from isothermal titration calorimetry (ITC) experiments indicates that the binding is complex, possibly involving two distinct binding sites [9]. ITC results, however, leave unclear whether the binding sites are independent or interacting. In the present X-ray structures, several crystallographic contacts with symmetrically related molecules are mediated by both α Th and SVR (Fig. 3) and, thus, might support a ligand-induced oligomerization [9].

To address this issue, we performed small-angle X-ray scattering (SAXS) measurements to gain insight into the oligomeric state of α Th upon SVR binding. SAXS data allow for estimation of structural parameters and studies of overall particle measures, distribution, and dynamics in solution as well as insights through a comparative analysis of scattering data against crystal structures and molecular models [52].

SAXS measurements demonstrate that free α Th is a globular particle with a radius of gyration of 23 Å and a maximum size (D_{max}) of 75 Å (Fig. 8; Table 3), as obtained by the Guinier approximation and by the pair-distribution function $p(r)$. The radii of gyration (R_g) and maximum distance (D_{max}) obtained from scattering profile of free α Th is equivalent to those calculated from monomeric α Th as seen in crystal structures (such as 1PPB, and those solved in this article), suggesting a close identity between α Th in solution during SAXS measurements and crystallographic models. In fact, SAXS data from free α Th can be adjusted with crystal structures of monomeric α Th (Fig. 8A, closed symbols), revealing discrepancy value of 1.5 (Table 3).

Upon binding to SVR, α Th oligomerization occurs, as demonstrated by the increase in R_g to 32 Å (Fig. 8A, inset; Table 3) and D_{max} to 140 Å (Fig. 8B; Table 3), adopting an elongated form, as evidenced by the $p(r)$ function. The Kratky plot of scattering functions indicates that α Th is well folded with a typical pattern for a globular particle, both in free and SVR-bound forms (Fig. 8C). Additionally, $I(0)/C$, the extrapolated scattering intensity at zero angle also doubles up, as calculated from real (pair-distribution function $p(r)$) and reciprocal space ($I(q)$). Such behavior is a direct indication of a dimerization event in solution,

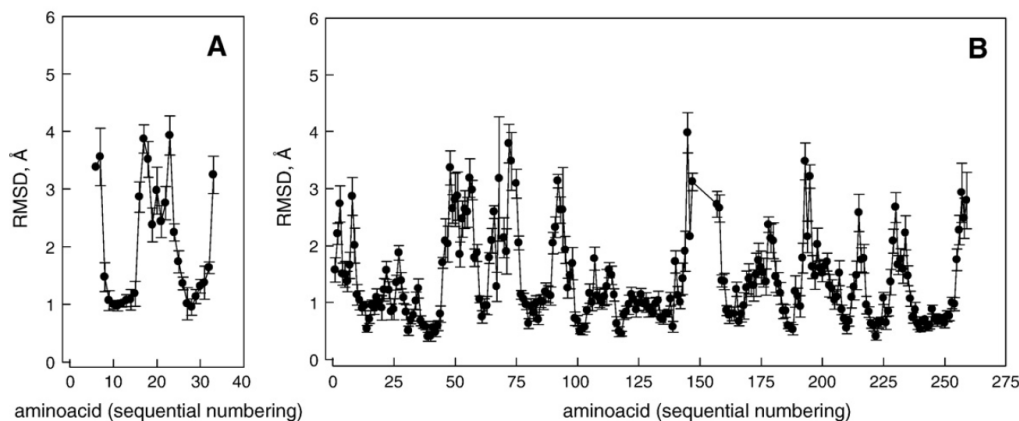


Fig. 7. Structural analysis of crystallographic and MD α Th:SVR models. Crystallographic α Th in complex with SVR (2H9T.pdb) and 10 MD simulation snapshots models, 1 ns intervals each, were superposed, and the mean RMSD and standard error of C α distances are calculated for the (A) light chain and (B) heavy chain. Alignment was performed by secondary-structure matching [61].

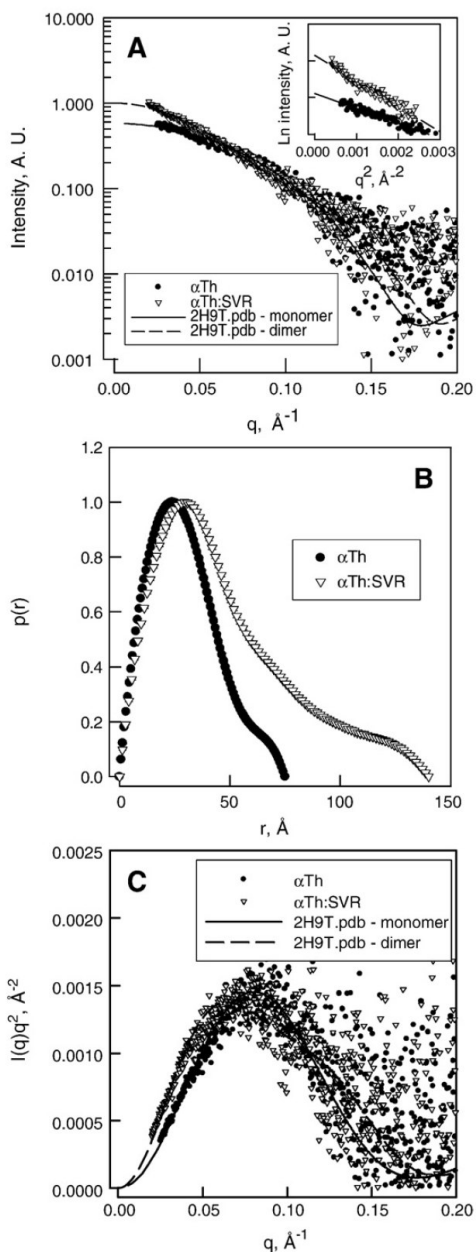


Fig. 8. Small-angle X-ray scattering of α Th. SAXS measurements of 100 μ M α Th (closed circles) and 100 μ M α Th in the presence of 100 μ M SVR (open triangles) indicate a SVR-induced dimerization of α Th in solution. (A) Normalized scattering curves of α Th and α Th:SVR (absolute scattering intensity at angle zero, I_0 , obtained by *Gnom* [31] and Guinier [30] analysis can be found in Table 3); lines are the theoretical scattering intensities computed using *Crysol* [62] and α Th crystal structure (PDB code 2H9T) in the monomeric (solid, lower curve) and dimeric (dashed, upper curve) forms. *Inset* Guinier plot of the scattering function; lines correspond to first order linear regression of data. The linearity of the Guinier plot indicates that both samples are monodispersed. (B) Distance pair distribution functions $p(r)$ of α Th alone (closed circles) and α Th in the presence of SVR (open triangles); (C) Kratky plot of α Th alone (closed circles) and α Th in the presence of SVR (open triangles). Solid lines correspond to theoretical curves obtained with *Crysol* as in panel A. Same results were obtained for measurements performed with 50 μ M α Th (1.8 mg/mL) both in absence and presence of equimolar amount of SVR (not shown).

Table 3
Structural parameters derived from SAXS data.

Parameter	α Th	α Th:SVR
I_0 :		
$I(q)$	$5.21e^{-3}$	$9.806e^{-3}$
$p(r)$	$5.21e^{-3}$	$9.808e^{-3}$
R_g , Å:		
$I(q)$	23.3	39.4
$p(r)$	23.4	39.8
D_{max} , Å	75 ± 2	140 ± 2
Discrepancy: χ^2		
Monomer	1.5	3.4
Dimer	2.6	1.5
Trimer	4.6	2.7

^a Calculated using *Crysol* [62] and α Th crystal structure PDB ID 2H9T and oligomers generated by crystallographic symmetry-operations (as in Fig. 3). Details in Materials and methods and in Fig. 8.

since the scattering intensity at zero angles doubles upon SVR binding [32–33]. SAXS data of α Th in the presence of SVR can be well adjusted with a dimeric model of α Th (Fig. 8A, open symbols) comprising any two α Th monomers out of the three in Fig. 3C (joint by two SVR), with discrepancy value of 1.5 (Table 3). Attempt to adjust this SAXS curve with α Th monomer or trimer is not satisfactory, resulting in higher discrepancy values of 3.4 and 2.7, respectively (Table 3).

Same results were obtained for measurements performed either at 50 μ M (1.8 mg/mL) or 100 μ M (3.7 mg/mL) of α Th both in absence and presence of equimolar amount of SVR. The lack of protein concentration dependence on structural parameters obtained by SAXS indicates a monodisperse system and thus ruling out the existence of multiple oligomeric states in solution. Taken together, these data demonstrate a protein dimerization event induced by SVR binding in solution.

The complexation of α Th with SVR is a calorimetric biphasic event that takes place before a 1:1 stoichiometric coefficient in the low micromolar concentration range [9]. In this context, it is not reasonable to affirm that α Th would directly transition from a free, monomeric species to a SVR-bound dimeric structure. We believe that dimerization would take place preferably at a high concentration of one or both molecules (α Th and SVR) and that, at even higher SVR concentrations, an aggregation process would occur. Moreover, at the low nanomolar α Th concentration range found in plasma [53], the formation of a 1:1 α Th:SVR complex is more likely to occur.

4. Discussion

For many decades, a search for better antithrombotic drugs has been pursued by several research groups, and, due to the limited options and considerable side-effects associated with the currently available drug therapeutic approaches, continuous development in this area is still needed.

SVR has been investigated due to its interaction with a diversity of targets [6; 54–58], and crystallographic characterization has accounted for SVR in complex with two enzymes [6; 59–60]. SVR recognition by the vaccinia complement protein, for example, is due to several electrostatic interactions and minor contributions from hydrophobic and van-der-Waals contacts. Although SVR can bind to a number of proteins, it does not seem to have sufficient molecular, chemical, and structural complementarities, and thus has very limited binding specificity.

Inhibition of α Th-induced fibrinogen clotting by SVR occurs with an IC_{50} of 20 μ M [9], a relatively low-affinity character. SVR interaction with α Th is highly ionic, but it is also extensive in hydrophobic and van-der-Waals interactions. Comparatively, most features of the α Th:SVR interaction are comparable with those between α Th and heparin, which are also non-specific and involve α Th oligomerization. The α Th:heparin interaction has a slightly higher affinity than α Th:SVR,

with a mean apparent K_d of 7 μM [47], a consequence of increased sulfonation involved in binding to exosite 2.

The MD simulations of the αTh :SVR complex were employed to rectify the consequences of crystal packing effects capable of distorting the protein and/or ligand conformations. After 10 ns of MD simulations, which is usually long enough to monitor conformational changes in macromolecules [40–41, 44–45], a significant re-orientation of SVR was observed (Fig. 6). Such modification in ligand orientation is probably caused by non-biological interactions in the crystal structure and non-physiological conditions used for crystallization (Fig. 3C). The final structure converged after MD simulation is more likely to represent the model of a more relaxed αTh :SVR complex (Figs. 6–7).

In a previous work, a calorimetric assay of the αTh :SVR interaction revealed a biphasic behavior, which is a typical indicator of at least two binding and/or events occurring. In this assay, the first transition occurs at submicromolar concentration range, indicating that binding at this concentration range might occur though with low inhibitory effect.

Our SAXS measurements corroborate the biphasic calorimetric behavior, clearly demonstrating a dimerization phenomenon induced by SVR as seen by the two-fold increase in scattering intensity. Additionally, the high resolution structure reported here reveals that SVR is involved in mediation of crystalline contacts through other αTh molecules, supporting the mechanism of αTh dimerization upon SVR binding. This is most likely an attribute of the 2-fold symmetry in the SVR molecule, assuming the predominance of more contacts between SVR and αTh in this region. Based on the evidences collected to date, we propose an interaction equilibrium through the following species that αTh might experience:

Oligomeric state	αTh	\rightleftharpoons	αTh :SVR	\rightleftharpoons	$[\alpha\text{Th}:SVR]_2$
αTh activity	High	-	-	-	low
SVR concentration range	nM	-	-	-	μM

Further investigation describing the detailed mechanism of noncompetitive modulation of thrombin activity by each of the possible oligomeric states, and whether the exact stoichiometric species at the biological matrix (i.e., serum) is $[(\alpha\text{Th})_1:(\text{SVR})_1]$ or $[(\alpha\text{Th})_2:(\text{SVR})_2]$ is of great interest. Moreover, we do not rule out that binding within the biological matrix (i.e., serum) might recruit other macromolecular partners.

SVR cannot be immediately used as an αTh inhibitor in therapeutic practice without improvements in its pharmacologic and biopharmaceutical properties. However, it represents an interesting scaffold for future rational drug development. The structural and thermodynamic evidence provided through the αTh :SVR X-ray structure is capable of modifying the SVR conformation and/or orientation from those expected from solution studies. Furthermore, the content of the asymmetric unit cell does not reflect all the possible oligomeric forms for the complex existing in solution. Additionally, our results indicate that MD simulations can provide important structural insights and that they represent an important tool for systematic analysis and refinement of crystallographic structures as well as accounting for solvent effects and the influence of other molecules in the biological environment of interest.

Acknowledgements

We would like to thank Hemotherapy Unit (HUCFF-UFRJ) for providing the human plasma used for αTh purification, Mr. José Geraldo Catarino and Mr. José Augusto Lopes da Rocha from IFSC (USP) and Dr. Tomas S. Plivelic, Fernando Q. Reis and Dr. Lucas Sanfelici for excellent technical assistance in LNLS beamlines (SAS1 and MX1). This research was supported by Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, IMBEBB, INCTBEB); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho (FAPERJ), PRONEX, Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- [1] M.T. Stubbs, W. Bode, A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure, *Thromb. Res.* 69 (1993) 1–58.
- [2] M. de Kort, R.C. Buijsman, C.A. van Boeckel, Synthetic heparin derivatives as new anticoagulant drugs, *Drug Discov. Today* 10 (2005) 769–779.
- [3] S. Srivastava, L.N. Goswami, D.K. Dikshit, Progress in the design of low molecular weight thrombin inhibitors, *Med. Res. Rev.* 25 (2005) 66–92.
- [4] S.L. Fleck, B. Birdsall, J. Babon, A.R. Dluzewski, S.R. Martin, W.D. Morgan, E. Angov, C.A. Kettleborough, J. Feeney, M.J. Blackman, A.A. Holder, Suramin and suramin analogues inhibit merozoite surface protein-1 secondary processing and erythrocyte invasion by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 47670–47677.
- [5] S. Dhar, J. Gullbo, K. Csoka, E. Eriksson, K. Nilsson, P. Nickel, L. Larsson, P. Nygren, Antitumour activity of suramin analogues in human tumour cell lines and primary cultures of tumour cells from patients, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 803–809.
- [6] M.T. Murakami, E.Z. Arruda, P.A. Melo, A.B. Martinez, S. Calil-Eliás, M.A. Tomaz, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, R.K. Ami, Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypansomal drug suramin, *J. Mol. Biol.* 350 (2005) 416–426.
- [7] H. Ullmann, S. Meis, D. Hongwiset, C. Marzian, M. Wiese, P. Nickel, D. Communi, J.M. Boeynaems, C. Wolf, R. Hausmann, G. Schmalzing, M.U. Kassack, Synthesis and structure-activity relationships of suramin-derived P2Y11 receptor antagonists with nanomolar potency, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 7040–7048.
- [8] R.S. Fernandes, M. Assafim, E.Z. Arruda, P.A. Melo, R.B. Zingali, R. Q. Monteiro, Suramin counteracts the haemostatic disturbances produced by *Bothrops jararaca* snake venom, *Toxicon* 49 (2007) 931–938.
- [9] R.Q. Monteiro, P.T. Campana, P.A. Melo, M.L. Bianconi, Suramin interaction with human alpha-thrombin: inhibitory effects and binding studies, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 2077–2085.
- [10] P.K. Ngai, J.Y. Chang, A novel one-step purification of human α -thrombin after direct activation of crude prothrombin enriched from plasma, *Biochem. J.* 280 (1991) 805–808.
- [11] J.W. Fenton II, M.J. Fasco, A.B. Stackrow, D.L. Aronson, A.M. Young, J.S. Finlayson, Human thrombins. Production, evaluation, and properties of alpha-thrombin, *J. Biol. Chem.* 252, 3587–3598.
- [12] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.* 4 (1977) 2411–2423 1995.
- [13] I. Polikarpov, G. Oliva, E.E. Castellano, R.C. Garratt, P. Arruda, A. Leite, A. Craievich, The protein crystallography beamline at LNLS, the Brazilian National Synchrotron Light Source, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res., A* 405 (1998) 159–164.
- [14] I. Polikarpov, L.A. Perles, R.T. de Oliveira, G. Oliva, E.E. Castellano, R.C. Garratt, A. Craievich, Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory, *J. Synchr. Rad.* 5 (1998) 72–76.
- [15] N. Furnham, T.L. Blundell, M.A. DePristo, T.C. Terwilliger, Is one solution good enough? *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13 (2006) 184–185.
- [16] A. G. W. Leslie, Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography, 26 (1992).
- [17] P. R. Evans, Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography, 33 (1997) 22–24.
- [18] A. Vagin, A. Teplyakov, MOLREP: an automated program for molecular replacement, *J. Appl. Cryst.* 30 (1997) 1022–1025.
- [19] W. Bode, I. Mayr, U. Baumann, R. Huber, S.R. Stone, J. Hofsteenge, *EMBO J.* 8 (1989) 3467–3475.
- [20] W. Bode, D. Turk, A. Karshikov, The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Trp insertion segment, *Protein Sci.* 1 (1992) 426–471.
- [21] G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr., D: Biol. Crystallogr.* 53 (Pt 3) (1997) 240–255.
- [22] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D60* (2004) 2126–2132.
- [23] V. Luzzati, Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines, *Acta Crystallogr.* 5 (1952) 802–810.
- [24] R. Laskowski, M. MacArthur, D. Moss, J. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [25] B.W. Bhat, Calculation of an omit map, *J. Appl. Crystallogr.* 21 (1988) 279–281.
- [26] F.M.D. Vellieux, B.W. Dijkstra, Computation of Bhat's OMIT maps with different coefficients, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 396–399.
- [27] Collaborative Computational Project, Number 4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr. D50* (1994) 760–763.
- [28] W. L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA (<http://www.pymol.org>), 2002.
- [29] G. Kellermann, F. Vicentin, E. Tamura, M. Rocha, H. Tolentino, A. Barbosa, A. Craievich, I. Torriani, The small-angle X-ray scattering beamline of the Brazilian synchrotron light laboratory, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 880–883.

- [30] A. Guinier, G. Fournet, Small-angle scattering of X-rays, Small-angle Scattering of X-rays, John Wiley and Sons, NY, 1995.
- [31] D.I. Svergun, Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Crystallogr.* 25 (1992) 495–503.
- [32] M. Gralle, M.M. Botelho, C.L. de Oliveira, I. Torriani, S.T. Ferreira, Solution studies and structural model of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein, *Biophys. J.* 83 (2002) 3513–3524.
- [33] E. Mylonas, D.I. Svergun, Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering, *J. Appl. Crystallogr.* 40 (Supplement) (2007) s245–s249.
- [34] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, GROMACS: fast, flexible and free, *J. Comp. Chem.* 26 (2005) 1701–1718.
- [35] B.L. de Groot, H. Grubmüller, Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF, *Science* 294 (2001) 2353–2357.
- [36] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W. van Gunsteren, J. Hermans, Interaction models for water in relation to protein hydration, *Intermolecular Forces*, Reidel, Dordrecht, The Netherlands, 1981, pp. 331–342.
- [37] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald – an $N \log(N)$ method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 10089–10092.
- [38] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, A. DiNola, J.R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684–3690.
- [39] D.M.F. van Aalten, B. Bywater, J.B.C. Findlay, M. Hendlich, R.W.W. Hoof, G. Vriend, PRODRG, a program for generating molecular topologies and unique molecular descriptors from coordinates of small molecules, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 10 (1996) 255–262.
- [40] H. Verli, J.A. Guimaraes, Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 281–290.
- [41] H. Verli, J.A. Guimaraes, Insights into the induced fit mechanism in antithrombin-heparin interaction using molecular dynamics simulation, *J. Mol. Graph. Model.* 24 (2005) 203–212.
- [42] W.J. Carter, E. Cama, J.A. Huntington, Crystal structure of thrombin bound to heparin, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 2745–2749.
- [43] E. Eyal, S. Gerzon, V. Potapov, M. Edelman, V. Sobolev, The limit of accuracy of protein modeling: influence of crystal packing on protein structure, *J. Mol. Biol.* 351 (2005) 431–442.
- [44] H. Verli, A. Calazans, R. Brindeiro, A. Tanuri, J.A. Guimaraes, Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein: clarifying differences between crystallographic and solution structures, *J. Mol. Graph. Model.* 26 (2007) 62–68.
- [45] R.M.S. Terra, J.A. Guimaraes, H. Verli, Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin, *J. Mol. Graph. Model.* 25 (2007) 767–772.
- [46] I.T. Schulze, S.P. Colowick, The modification of yeast hexokinases by proteases and its relationship to the dissociation of hexokinase into subunits, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 2306–2316.
- [47] J.G. Hoggett, G.L. Kellett, Kinetics of the monomer–dimer reaction of yeast hexokinase PI, *Biochem. J.* 287 (1992) 567–572.
- [48] G. Kontopidis, C. Holt, L. Sawyer, Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function, *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 785–796.
- [49] W.S. Bennett Jr., T.A. Steitz, Structure of a complex between yeast hexokinase A and glucose. I. Structure determination and refinement at 3.5 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 140 (1980) 183.
- [50] P.R. Kuser, S. Krauchenco, O.A. Antunes, I. Polikarpov, The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 20814–20821.
- [51] K.M. Oliveira, V.L. Valente-Mesquita, M.M. Botelho, L. Sawyer, S.T. Ferreira, I. Polikarpov, Crystal structures of bovine beta-lactoglobulin in the orthorhombic space group C222(1). Structural differences between genetic variants A and B and features of the Tanford transit, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 477–483.
- [52] M.V. Petoukhov, D.I. Svergun, Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions, *Curr. Op. Str. Biol.* 17 (2007) 562–571.
- [53] R. Machovich, *The thrombins*, P. 166, CRC Press, Boca Raton, FL, 1984.
- [54] F. Manetti, V. Cappello, M. Botta, F. Corelli, N. Mongelli, N. Biasoli, A.L. Borgia, M. Ciomei, Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor, *Bioorg. Med. Chem.* 6 (1998) 947–958.
- [55] M.O. Meyers, A.R. Gagliardi, G.J. Flattmann, J.L. Su, Y.Z. Wang, E.A. Woltering, Suramin analogs inhibit human angiogenesis *in vitro*, *J. Surg. Res.* 91 (2000) 130–134.
- [56] M.U. Kassack, P. Högger, D.A. Gschwend, K. Kameyama, T. Haga, R.C. Graul, W. Sadée, Molecular modeling of G-protein coupled receptor kinase 2: docking and biochemical evaluation of inhibitors, *AAPS PharmSci.* 2 (2000) E2.
- [57] H. Ullmann, S. Meis, D. Hongwiset, C. Marzian, M. Wiese, P. Nickel, D. Communi, J.M. Boeynaems, C. Wolf, R. Hausmann, G. Schmalzing, M.U. Kassack, Synthesis and structure–activity relationships of suramin-derived P2Y₁₁ receptor antagonists with nanomolar potency, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 7040–7048.
- [58] I. Wolner, M.U. Kassack, H. Ullmann, A. Karel, M. Hohenegger, Use-dependent inhibition of the skeletal muscle ryanodine receptor by the suramin analogue NF676, *Br. J. Pharmacol.* 146 (2005) 525–533.
- [59] M.T. Murakami, L.M. Gava, S.P. Zela, E.Z. Arruda, P.A. Melo, J.M. Gutierrez, R.K. Arni, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of suramin, a highly charged polysulfonated naphthylurea, complexed with a myotoxic PLA₂ from *Bothrops asper* venom, *Biochim. Biophys. Acta* 1703 (2004) 83–85.
- [60] V.K. Ganes, S.K. Muthuvel, S.A. Smith, G.J. Kotwal, K.H.M. Murthy, Structural basis for antagonism by suramin of heparin binding to vaccinia complement protein, *Biochemistry* 44 (2005) 10757–10765.
- [61] E. Krissinel, K. Henrick, Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions, *Acta Crystallogr., D-Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 2256–2268 Part 12 Sp. Iss. 1.
- [62] D. Svergun, C. Barberato, M.H.J. Koch, CRYSOLE – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Cryst.* (1995) 768–773.

Anexo 4

Tabela de RMSD de alinhamento de estruturas de α Th do PDB

PDB ID	DESCRIÇÃO	RMSD
1A2C	STRUCTURE OF THROMBIN INHIBITED BY AERUGINOSIN298-A FROM A BLUE-GREEN ALGA	0,628
1A3B	COMPLEX OF HUMAN ALPHA-THROMBIN WITH THE BIFUNCTIONAL BORONATE INHIBITOR BOROLOG1	0,537
1A3E	COMPLEX OF HUMAN ALPHA-THROMBIN WITH THE BIFUNCTIONAL BORONATE INHIBITOR BOROLOG2	0,504
1A46	THROMBIN COMPLEXED WITH HIRUGEN AND A BETA-STRAND MIMETIC INHIBITOR	0,566
1A4W	CRYSTAL STRUCTURES OF THROMBIN WITH THIAZOLE-CONTAINING INHIBITORS: PROBES OF THE S1' BINDING SITE	0,506
1A5G	HUMAN THROMBIN COMPLEXED WITH NOVEL SYNTHETIC PEPTIDE MIMETIC INHIBITOR AND HIRUGEN	0,545
1A61	THROMBIN COMPLEXED WITH A BETA-MIMETIC THIAZOLE-CONTAINING INHIBITOR	0,549
1ABI	STRUCTURE OF THE HIRULOG 3-THROMBIN COMPLEX AND NATURE OF THE S' SUBSITES OF SUBSTRATES AND INHIBITORS	0,589
1ABJ	STRUCTURE OF THE HIRULOG 3-THROMBIN COMPLEX AND NATURE OF THE S' SUBSITES OF SUBSTRATES AND INHIBITORS	0,353
1AD8	COMPLEX OF THROMBIN WITH AND INHIBITOR CONTAINING A NOVEL P1 MOIETY	0,528
1AE8	HUMAN ALPHA-THROMBIN INHIBITION BY EOC-D-PHE-PRO-AZALYS-ONP	0,632
1AFE	HUMAN ALPHA-THROMBIN INHIBITION BY CBZ-PRO-AZALYS-ONP	0,627
1AHT	CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ALPHA-THROMBIN COMPLEXED WITH HIRUGEN AND P-AMIDINOPHENYLPYRUVATE) AT 1.6 ANGSTROMS RESOLUTION	0,558
1AI8	HUMAN ALPHA-THROMBIN TERNARY COMPLEX WITH THE EXOSITE INHIBITOR HIRUGEN AND ACTIVE SITE INHIBITOR PHCH2OCO-D-DPA-PRO-BOROMPG	0,544
1AIX	HUMAN ALPHA-THROMBIN TERNARY COMPLEX WITH EXOSITE INHIBITOR HIRUGEN AND ACTIVE SITE INHIBITOR PHCH2OCO-D-DPA-PRO-BOROVAL	0,577
1AWF	NOVEL COVALENT THROMBIN INHIBITOR FROM PLANT EXTRACT	0,594
1AWH	NOVEL COVALENT THROMBIN INHIBITOR FROM PLANT EXTRACT	0,699
1AY6	THROMBIN INHIBITOR FROM THEONALLA, CYCLOTHEANAMIDE-BASED MACROCYCLIC TRIPEPTIDE MOTIF	0,486
1B7X	STRUCTURE OF HUMAN ALPHA-THROMBIN Y225I MUTANT BOUND TO D-PHE-PRO-ARG-CHLOROMETHYLKETONE	0,591
1BA8	THROMBIN INHIBITOR WITH A RIGID TRIPEPTIDYL ALDEHYDES	0,479
1BB0	THROMBIN INHIBITORS WITH RIGID TRIPEPTIDYL ALDEHYDES	0,377
1BCU	ALPHA-THROMBIN COMPLEXED WITH HIRUGEN AND PROFLAVIN	0,488
1BHX	X-RAY STRUCTURE OF THE COMPLEX OF HUMAN ALPHA THROMBIN WITH THE INHIBITOR SDZ 229-357	0,54
1BMM	HUMAN ALPHA-THROMBIN COMPLEXED WITH [S-(R*,R*)]-4-[(AMINOIMINOMETHYL)AMINO]-N-[[1-[3-HYDROXY-2-[(2-NAPHTHALENYLSULFONYL)AMINO]-1-OXOPROPYL]-2-PYRROLIDINYL]METHYL]BUTANAMIDE (BMS-186282)	0,746
1BTH	STRUCTURE OF THROMBIN COMPLEXED WITH BOVINE PANCREATIC TRYPSIN INHIBITOR	1,742
1C4U	SELECTIVE NON ELECTROPHILIC THROMBIN INHIBITORS WITH CYCLOHEXYL MOIETIES.	0,57
1C4V	SELECTIVE NON ELECTROPHILIC THROMBIN INHIBITORS WITH CYCLOHEXYL MOIETIES.	0,532
1C4Y	SELECTIVE NON-ELECTROPHILIC THROMBIN INHIBITORS	0,683
1CA8	THROMBIN INHIBITORS WITH RIGID TRIPEPTIDYL ALDEHYDES	0,38
1D3D	CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ALPHA THROMBIN IN COMPLEX WITH BENZOTHIOPHENE INHIBITOR 4	0,629
1D3P	CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN APLHA-THROMBIN IN COMPLEX WITH BENZO[B]THIOPHENE INHIBITOR 3	0,61
1D3Q	CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ALPHA THROMBIN IN COMPLEX WITH BENZO[B]THIOPHENE INHIBITOR 2	0,617
1D3T	CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ALPHA THROMBIN IN COMPLEX WITH BENZO[B]THIOPHENE INHIBITOR 1	0,614
1D4P	CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ALPHA THROMBIN IN COMPLEX WITH 5-AMIDINOINDOLE-4-BENZYLPIPERIDINE INHIBITOR	0,533
1D6W	STRUCTURE OF THROMBIN COMPLEXED WITH SELECTIVE NON-ELECTROPHILIC INHIBITORS HAVING CYCLOHEXYL MOIETIES AT P1	0,591
1D9I	STRUCTURE OF THROMBIN COMPLEXED WITH SELECTIVE NON-	0,671

ANEXO 4

Accession	Description	Resolution (Å)
	ELECTOPHILIC INHIBITORS HAVING CYCLOHEXYL MOIETIES AT P1	
	INTERACTION OF FACTOR XIII ACTIVATION PEPTIDE WITH ALPHA-THROMBIN: CRYSTAL STRUCTURE OF THE ENZYME-SUBSTRATE COMPLEX	
1DE7		1,192
1DIT	COMPLEX OF A DIVALENT INHIBITOR WITH THROMBIN	0,423
1DM4	SER195ALA MUTANT OF HUMAN THROMBIN COMPLEXED WITH FIBRINOPEPTIDE A (7-16)	0,75
1DOJ	CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ALPHA-THROMBIN*RWJ-51438 COMPLEX AT 1.7 Å	0,532
1DWB	CRYSTALLOGRAPHIC ANALYSIS AT 3.0-ANGSTROMS RESOLUTION OF THE BINDING TO HUMAN THROMBIN OF FOUR ACTIVE SITE-DIRECTED INHIBITORS	0,753
1DWC	CRYSTALLOGRAPHIC ANALYSIS AT 3.0-ANGSTROMS RESOLUTION OF THE BINDING TO HUMAN THROMBIN OF FOUR ACTIVE SITE-DIRECTED INHIBITORS	0,766
1DWD	CRYSTALLOGRAPHIC ANALYSIS AT 3.0-ANGSTROMS RESOLUTION OF THE BINDING TO HUMAN THROMBIN OF FOUR ACTIVE SITE-DIRECTED INHIBITORS	0,766
1DWE	CRYSTALLOGRAPHIC ANALYSIS AT 3.0-ANGSTROMS RESOLUTION OF THE BINDING TO HUMAN THROMBIN OF FOUR ACTIVE SITE-DIRECTED INHIBITORS	0,751
1DX5	CRYSTAL STRUCTURE OF THE THROMBIN-THROMBOMODULIN COMPLEX	0,658
1E0F	CRYSTAL STRUCTURE OF THE HUMAN ALPHA-THROMBIN-HAEMADIN COMPLEX: AN EXOSITE II-BINDING INHIBITOR	0,942
1EB1	COMPLEX STRUCTURE OF HUMAN THROMBIN WITH N-METHYL-ARGININE INHIBITOR	0,547
1EGT	THROMBIN-BOUND STRUCTURE OF AN EGF SUBDOMAIN FROM HUMAN THROMBOMODULIN DETERMINED BY TRANSFERRED NUCLEAR OVERHAUSER EFFECTS	3,282
1EOJ	DESIGN OF P1' AND P3' RESIDUES OF TRIVALENT THROMBIN INHIBITORS AND THEIR CRYSTAL STRUCTURES	0,431
1EOL	DESIGN OF P1' AND P3' RESIDUES OF TRIVALENT THROMBIN INHIBITORS AND THEIR CRYSTAL STRUCTURES	0,437
1FPC	ACTIVE SITE MIMETIC INHIBITION OF THROMBIN	0,556
1FPH	THE INTERACTION OF THROMBIN WITH FIBRINOGEN: A STRUCTURAL BASIS FOR ITS SPECIFICITY	0,672
1G30	THROMBIN INHIBITOR COMPLEX	0,509
1G32	THROMBIN INHIBITOR COMPLEX	0,499
1G37	CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ALPHA-THROMBIN COMPLEXED WITH BCH-10556 AND EXOSITE-DIRECTED PEPTIDE	0,569
1GHW	A NOVEL SERINE PROTEASE INHIBITION MOTIF INVOLVING A MULTI-CENTERED SHORT HYDROGEN BONDING NETWORK AT THE ACTIVE SITE	0,627
1GHX	A NOVEL SERINE PROTEASE INHIBITION MOTIF INVOLVING A MULTI-CENTERED SHORT HYDROGEN BONDING NETWORK AT THE ACTIVE SITE	0,668
1GHY	A NOVEL SERINE PROTEASE INHIBITION MOTIF INVOLVING A MULTI-CENTERED SHORT HYDROGEN BONDING NETWORK AT THE ACTIVE SITE	0,653
1GI7	A NOVEL SERINE PROTEASE INHIBITION MOTIF INVOLVING A MULTI-CENTERED SHORT HYDROGEN BONDING NETWORK AT THE ACTIVE SITE	1,513
1GI8	A NOVEL SERINE PROTEASE INHIBITION MOTIF INVOLVING A MULTI-CENTERED SHORT HYDROGEN BONDING NETWORK AT THE ACTIVE SITE	1,506
1GI9	A NOVEL SERINE PROTEASE INHIBITION MOTIF INVOLVING A MULTI-CENTERED SHORT HYDROGEN BONDING NETWORK AT THE ACTIVE SITE	1,517
1H8D	X-RAY STRUCTURE OF THE HUMAN ALPHA-THROMBIN COMPLEX WITH A TRIPEPTIDE PHOSPHONATE INHIBITOR.	0,619
1H8I	X-RAY CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ALPHA-THROMBIN WITH A TRIPEPTIDE PHOSPHONATE INHIBITOR.	0,602
1HAG	THE ISOMORPHOUS STRUCTURES OF PRETHROMBIN2, HIRUGEN-AND PPACK-THROMBIN: CHANGES ACCOMPANYING ACTIVATION AND EXOSITE BINDING TO THROMBIN	0,82
1HAH	THE ISOMORPHOUS STRUCTURES OF PRETHROMBIN2, HIRUGEN-AND PPACK-THROMBIN: CHANGES ACCOMPANYING ACTIVATION AND EXOSITE BINDING TO THROMBIN	0,599
1HAI	THE ISOMORPHOUS STRUCTURES OF PRETHROMBIN2, HIRUGEN-AND PPACK-THROMBIN: CHANGES ACCOMPANYING ACTIVATION AND EXOSITE BINDING TO THROMBIN	0,436
1HAO	COMPLEX OF HUMAN ALPHA-THROMBIN WITH A 15MER OLIGONUCLEOTIDE GGTTGGTGTGGTTGG (BASED ON NMR MODEL OF DNA)	0,681
1HAP	COMPLEX OF HUMAN ALPHA-THROMBIN WITH A 15MER OLIGONUCLEOTIDE GGTTGGTGTGGTTGG (BASED ON X-RAY MODEL OF	0,676

ANEXO 4

	DNA)	
1HBT	HUMAN ALPHA-THROMBIN COMPLEXED WITH A PEPTIDYL PYRIDINIUM METHYL KETONE CONTAINING BIVALENT INHIBITOR	0,497
1HDT	STRUCTURE OF A RETRO-BINDING PEPTIDE INHIBITOR COMPLEXED WITH HUMAN ALPHA-THROMBIN	0,869
1HGT	STRUCTURE OF THE HIRUGEN AND HIRULOG 1 COMPLEXES OF ALPHA-THROMBIN	0,637
1HLT	THE STRUCTURE OF A NONADECAPEPTIDE OF THE FIFTH EGF DOMAIN OF THROMBOMODULIN COMPLEXED WITH THROMBIN	1,16
1HUT	THE STRUCTURE OF ALPHA-THROMBIN INHIBITED BY A 15-MER SINGLE-STRANDED DNA APTAMER	0,872
1HXF	HUMAN THROMBIN COMPLEX WITH HIRUDIN VARIANT	0,557
1IHS	CRYSTAL STRUCTURE OF THE COMPLEX OF HUMAN ALPHA-THROMBIN AND NON-HYDROLYZABLE BIFUNCTIONAL INHIBITORS, HIRUTONIN-2 AND HIRUTONIN-6	0,49
1IHT	CRYSTAL STRUCTURE OF THE COMPLEX OF HUMAN ALPHA-THROMBIN AND NON-HYDROLYZABLE BIFUNCTIONAL INHIBITORS, HIRUTONIN-2 AND HIRUTONIN-6	0,499
1JMO	Crystal Structure of the Heparin Cofactor II-S195A Thrombin Complex	0,778
1JOU	Crystal Structure of Native S195A Thrombin with an Unoccupied Active Site	1,945
1JWT	CRYSTAL STRUCTURE OF THROMBIN IN COMPLEX WITH A NOVEL BICYCLIC LACTAM INHIBITOR	0,608
1K21	HUMAN THROMBIN-INHIBITOR COMPLEX	0,617
1K22	HUMAN THROMBIN-INHIBITOR COMPLEX	0,675
1KTS	Thrombin Inhibitor Complex	0,536
1KTT	Thrombin inhibitor complex	0,502
1LHC	HUMAN ALPHA-THROMBIN COMPLEXED WITH AC-(D)PHE-PRO-BOROARG-OH	0,504
1LHD	HUMAN ALPHA-THROMBIN COMPLEXED WITH AC-(D)PHE-PRO-BOROLYS-OH	0,55
1LHE	HUMAN ALPHA-THROMBIN COMPLEXED WITH AC-(D)PHE-PRO-BORO-N-BUTYL-AMIDINO-GLYCINE-OH	0,528
1LHF	HUMAN ALPHA-THROMBIN COMPLEXED WITH AC-(D)PHE-PRO-BORO-HOMOLYS-OH	0,635
1LHG	HUMAN ALPHA-THROMBIN COMPLEXED WITH AC-(D)PHE-PRO-BOROORNITHINE-OH	0,56
1MH0	Crystal structure of the anticoagulant slow form of thrombin	0,57
1MU6	Crystal Structure of Thrombin in Complex with L-378,622	0,519
1MU8	thrombin-hirugen_l-378,650	0,516
1MUE	Thrombin-Hirugen-L405,426	0,537
1NM6	thrombin in complex with selective macrocyclic inhibitor at 1.8A	0,545
1NO9	Design of weakly basic thrombin inhibitors incorporating novel P1 binding functions: molecular and X-ray crystallographic studies.	0,623
1NRN	CRYSTALLOGRAPHIC STRUCTURES OF THROMBIN COMPLEXED WITH THROMBIN RECEPTOR PEPTIDES: EXISTENCE OF EXPECTED AND NOVEL BINDING MODES	0,63
1NRO	CRYSTALLOGRAPHIC STRUCTURES OF THROMBIN COMPLEXED WITH THROMBIN RECEPTOR PEPTIDES: EXISTENCE OF EXPECTED AND NOVEL BINDING MODES	0,842
1NRP	CRYSTALLOGRAPHIC STRUCTURES OF THROMBIN COMPLEXED WITH THROMBIN RECEPTOR PEPTIDES: EXISTENCE OF EXPECTED AND NOVEL BINDING MODES	0,801
1NRQ	CRYSTALLOGRAPHIC STRUCTURES OF THROMBIN COMPLEXED WITH THROMBIN RECEPTOR PEPTIDES: EXISTENCE OF EXPECTED AND NOVEL BINDING MODES	0,817
1NRR	CRYSTALLOGRAPHIC STRUCTURES OF THROMBIN COMPLEXED WITH THROMBIN RECEPTOR PEPTIDES: EXISTENCE OF EXPECTED AND NOVEL BINDING MODES	0,352
1NRS	CRYSTALLOGRAPHIC STRUCTURES OF THROMBIN COMPLEXED WITH THROMBIN RECEPTOR PEPTIDES: EXISTENCE OF EXPECTED AND NOVEL BINDING MODES	0,592
1NT1	thrombin in complex with selective macrocyclic inhibitor	0,509
1NU7	Staphylocoagulase-Thrombin Complex	1,949
1NY2	Human alpha thrombin inhibited by RPPGF and hirugen	0,677
1NZQ	D-Phe-Pro-Arg-Type Thrombin Inhibitor	0,417

ANEXO 4

1O0D	Human Thrombin complexed with a d-Phe-Pro-Arg-type Inhibitor and a C-terminal Hirudin derived exo-site inhibitor	0,528
1O0K	Crystal Structure of the Complex of Platelet Receptor GPIb-alpha and Human alpha-Thrombin	0,443
1OYT	COMPLEX OF RECOMBINANT HUMAN THROMBIN WITH A DESIGNED FLUORINATED INHIBITOR	0,605
1P8V	CRYSTAL STRUCTURE OF THE COMPLEX OF PLATELET RECEPTOR GPIB-ALPHA AND ALPHA-THROMBIN AT 2.6A	0,434
1PPC	GEOMETRY OF BINDING OF THE NALPHA-TOSYLATED PIPERIDIDES OF M-AMIDINO-, P-AMIDINO-AND P-GUANIDINO PHENYLALANINE TO THROMBIN AND TRYPSIN: X-RAY CRYSTAL STRUCTURES OF THEIR TRYPSIN COMPLEXES AND MODELING OF THEIR THROMBIN COMPLEXES	1,079
1PPH	CRYSTAL STRUCTURE OF THROMBIN COMPLEXED WITH AN GUANIDINE-MIMETIC INHIBITOR	1,1
1QBV	NOVEL COVALENT ACTIVE SITE THROMBIN INHIBITORS	0,392
1QHR	NOVEL COVALENT ACTIVE SITE THROMBIN INHIBITORS	0,432
1QJ1	NOVEL COVALENT ACTIVE SITE THROMBIN INHIBITORS	0,442
1QJ6	NOVEL COVALENT ACTIVE SITE THROMBIN INHIBITORS	0,419
1QJ7	NOVEL COVALENT ACTIVE SITE THROMBIN INHIBITORS	0,433
1QUR	HUMAN ALPHA-THROMBIN IN COMPLEX WITH BIVALENT, BENZAMIDINE-BASED SYNTHETIC INHIBITOR	0,762
1RD3	2.5A Structure of Anticoagulant Thrombin Variant E217K	2,083
1RIW	Thrombin in complex with natural product inhibitor Oscillarin	0,592
1SB1	Novel Non-Covalent Thrombin Inhibitors Incorporating P1 4,5,6,7-Tetrahydrobenzothiazole Arginine Side Chain Mimetics	0,588
1SFQ	Fast form of thrombin mutant R(77a)A bound to PPACK	0,644
1SG8	Crystal structure of the procoagulant fast form of thrombin	0,642
1SGI	Crystal structure of the anticoagulant slow form of thrombin	0,564
1SHH	Slow form of Thrombin Bound with PPACK	0,782
1SL3	crystal structue of Thrombin in complex with a potent P1 heterocycle-Aryl based inhibitor	0,54
1T4U	Crystal Structure Analysis of a novel Oxyguanidine bound to Thrombin	0,541
1T4V	Crystal Structure Analysis of a novel Oxyguanidine bound to Thrombin	0,51
1TA2	Crystal structure of thrombin in complex with compound 1	0,524
1TA6	Crystal structure of thrombin in complex with compound 14b	13,294
1TB6	2.5A Crystal Structure of the Antithrombin-Thrombin-Heparin Ternary Complex	1,123
1TBQ	CRYSTAL STRUCTURE OF INSECT DERIVED DOUBLE DOMAIN KAZAL INHIBITOR RHODNIIN IN COMPLEX WITH THROMBIN	1,002
1TBR	CRYSTAL STRUCTURE OF INSECT DERIVED DOUBLE DOMAIN KAZAL INHIBITOR RHODNIIN IN COMPLEX WITH THROMBIN	1,568
1TBZ	HUMAN THROMBIN WITH ACTIVE SITE N-METHYL-D PHENYLALANYL-N-[5-(AMINOIMINOMETHYL)AMINO]-1-{{BENZOTHAZOLYL}CARBONYL} BUTYL]-L-PROLINAMIDE TRIFLUOROACETATE AND EXOSITE-HIRUGEN	0,565
1THP	STRUCTURE OF HUMAN ALPHA-THROMBIN Y225P MUTANT BOUND TO D-PHE-PRO-ARG-CHLOROMETHYLKETONE	0,556
1THR	STRUCTURES OF THROMBIN COMPLEXES WITH A DESIGNED AND A NATURAL EXOSITE INHIBITOR	0,594
1THS	STRUCTURES OF THROMBIN COMPLEXES WITH A DESIGNED AND A NATURAL EXOSITE INHIBITOR	0,675
1TMB	MOLECULAR BASIS FOR THE INHIBITION OF HUMAN ALPHA-THROMBIN BY THE MACROCYCLIC PEPTIDE CYCLOTHEONAMIDE A	0,607
1TMT	CHANGES IN INTERACTIONS IN COMPLEXES OF HIRUDIN DERIVATIVES AND HUMAN ALPHA-THROMBIN DUE TO DIFFERENT CRYSTAL FORMS	0,61
1TMU	CHANGES IN INTERACTIONS IN COMPLEXES OF HIRUDIN DERIVATIVES AND HUMAN ALPHA-THROMBIN DUE TO DIFFERENT CRYSTAL FORMS	0,651
1TOM	ALPHA-THROMBIN COMPLEXED WITH HIRUGEN	0,53
1TQ7	Crystal structure of the anticoagulant thrombin mutant W215A/E217A bound to PPACK	0,593
1TWX	Crystal structure of the thrombin mutant D221A/D222K	0,517

ANEXO 4

1UMA	ALPHA-THROMBIN (HIRUGEN) COMPLEXED WITH NA-(N,N-DIMETHYLCARBAMOYL)-ALPHA-AZALYSINE	0,632
1VZQ	COMPLEX OF THROMBIN WITH DESIGNED INHIBITOR 7165	0,605
1W7G	ALPHA-THROMBIN COMPLEX WITH SULFATED HIRUDIN (RESIDUES 54-65) AND L-ARGININE TEMPLATE INHIBITOR CS107	0,604
1WAY	ACTIVE SITE THROMBIN INHIBITORS	0,429
1WBG	ACTIVE SITE THROMBIN INHIBITORS	0,444
1XM1	Nonbasic Thrombin Inhibitor Complex	0,717
1XMN	Crystal structure of thrombin bound to heparin	1,559
1YPE	Thrombin Inhibitor Complex	0,603
1YPG	Thrombin Inhibitor Complex	0,596
1YPJ	Thrombin Inhibitor Complex	0,624
1YPK	Thrombin Inhibitor Complex	0,598
1YPL	X-ray crystal structure of thrombin inhibited by synthetic cyanopeptide analogue RA-1008	0,58
1YPM	X-ray crystal structure of thrombin inhibited by synthetic cyanopeptide analogue RA-1014	0,611
1Z71	thrombin and P2 pyridine N-oxide inhibitor complex structure	0,554
1Z8I	Crystal structure of the thrombin mutant G193A bound to PPACK	0,506
1Z8J	Crystal structure of the thrombin mutant G193P bound to PPACK	0,523
1ZGI	thrombin in complex with an oxazolopyridine inhibitor 21	0,533
1ZGV	Thrombin in complex with an oxazolopyridine inhibitor 2	0,52
1ZRB	Thrombin in complex with an azafluorenyl inhibitor 23b	,559
2A0Q	Structure of thrombin in 400 mM potassium chloride	1,173
2A2X	Orally Active Thrombin Inhibitors in Complex with Thrombin Inh12	0,524
2A45	Crystal structure of the complex between thrombin and the central "E" region of fibrin	1,284
2AFQ	1.9 angstrom crytal structure of wild-type human thrombin in the sodium free state orally active thrombin inhibitors in complex with thrombin and an exosite	1,821
2ANK	decapeptide	0,517
2ANM	Ternary complex of an orally active thrombin inhibitor with human thrombin and a c-terminal hirudin derived exo-sit inhibitor	0,516
2B5T	2.1 Angstrom structure of a nonproductive complex between antithrombin, synthetic heparin mimetic SR123781 and two S195A thrombin molecules	1,254
2BDY	thrombin in complex with inhibitor	0,564
2BVR	HUMAN THROMBIN COMPLEXED WITH FRAGMENT-BASED SMALL MOLECULES OCCUPYING THE S1 POCKET	0,42
2BVS	HUMAN THROMBIN COMPLEXED WITH FRAGMENT-BASED SMALL MOLECULES OCCUPYING THE S1 POCKET	0,584
2BVX	DESIGN AND DISCOVERY OF NOVEL, POTENT THROMBIN INHIBITORS WITH A SOLUBILIZING CATIONIC P1-P2-LINKER	0,706
2BXT	DESIGN AND DISCOVERY OF NOVEL, POTENT THROMBIN INHIBITORS WITH A SOLUBILIZING CATIONIC P1-P2-LINKER	0,547
2BXU	DESIGN AND DISCOVERY OF NOVEL, POTENT THROMBIN INHIBITORS WITH A SOLUBILIZING CATIONIC P1-P2-LINKER	0,617
2C8W	THROMBIN INHIBITORS	0,438
2C8X	THROMBIN INHIBITORS	0,416
2C8Y	THROMBIN INHIBITORS	0,432
2C8Z	THROMBIN INHIBITORS	0,449
2C90	THROMBIN INHIBITORS	0,478
2C93	THROMBIN INHIBITORS	0,411
2CF8	THROMBIN-METHOXY	0,599
2CF9	THROMBIN-METHOXY2	0,638
2CN0	COMPLEX OF RECOMBINANT HUMAN THROMBIN WITH A DESIGNED INHIBITOR	0,592
2FEQ	orally active thrombin inhibitors	0,467
2FES	Orally active thrombin inhibitors	0,5
2GDE	Thrombin in complex with inhibitor	0,536
2GP9	Crystal structure of the slow form of thrombin in a self-inhibited conformation	0,853
2H9T	Crystal structure of human alpha-thrombin in complex with suramin	0,469

ANEXO 4

2HGT	STRUCTURE OF THE HIRUGEN AND HIRULOG 1 COMPLEXES OF ALPHA-THROMBIN	0,558
2HPP	STRUCTURES OF THE NONCOVALENT COMPLEXES OF HUMAN AND BOVINE PROTHROMBIN FRAGMENT 2 WITH HUMAN PPACK-THROMBIN	0,536
2HPQ	STRUCTURES OF THE NONCOVALENT COMPLEXES OF HUMAN AND BOVINE PROTHROMBIN FRAGMENT 2 WITH HUMAN PPACKTHROMBIN	0,544
2HWL	Crystal structure of thrombin in complex with fibrinogen gamma' peptide	1,269
2JH0	HUMAN THROMBIN HIRUGEN INHIBITOR COMPLEX.	0,439
2JH6	HUMAN THROMBIN HIRUGEN INHIBITOR COMPLEX.	0,428
2OD3	Human thrombin chimera with human residues 184a, 186, 186a, 186b, 186c and 222 replaced by murine thrombin equivalents.	0,487
2PGB	Inhibitor-free human thrombin mutant C191A-C220A	0,556
2PGQ	Human thrombin mutant C191A-C220A in complex with the inhibitor PPACK	0,553
2PKS	Thrombin in complex with inhibitor	0,551
2PW8	Crystal structure of sulfo-hirudin complexed to thrombin	0,586
2R2M	2-(2-Chloro-6-Fluorophenyl)Acetamides as Potent Thrombin Inhibitors	0,373
2THF	STRUCTURE OF HUMAN ALPHA-THROMBIN Y225F MUTANT BOUND TO D-PHE-PRO-ARG-CHLOROMETHYLKETONE	0,479
2UUF	THROMBIN-HIRUGEN BINARY COMPLEX AT 1.26A RESOLUTION	0,459
2UUJ	THROMBIN-HIRUGEN-GW473178 TERNARY COMPLEX AT 1.32A RESOLUTION	0,509
2UUK	THROMBIN-HIRUGEN-GW420128 TERNARY COMPLEX AT 1.39A RESOLUTION	0,465
2UWL	SELECTIVE AND DUAL ACTION ORALLY ACTIVE INHIBITORS OF THROMBIN AND FACTOR XA	1,153
2UWO	SELECTIVE AND DUAL ACTION ORALLY ACTIVE INHIBITORS OF THROMBIN AND FACTOR XA	1,116
2V3H	THROMBIN WITH 3-CYCLE NO F	0,395
2V3O	THROMBIN WITH 3-CYCLE WITH F	0,402
2ZC9	Thrombin in complex with Inhibitor	0,596
2ZDA	Exploring Thrombin S1 pocket	0,59
2ZDV	Exploring Thrombin S1 pocket	0,572
2ZF0	Exploring Thrombin S1 Pocket	0,653
2ZFF	Exploring Thrombin S1-pocket	0,576
2ZFP	Thrombin Inhibition	0,621
2ZFQ	Exploring thrombin S3 pocket	0,58
2ZFR	Exploring thrombin S3 pocket	0,565
2ZG0	Exploring thrombin S3 pocket	0,546
2ZGB	Thrombin Inhibition	0,568
2ZGX	Thrombin Inhibition	0,556
2ZHQ	Thrombin Inhibition	0,596
2ZI2	Thrombin Inhibition	0,564
2ZIQ	Thrombin Inhibition	0,567
3B9F	1.6 A structure of the PCI-thrombin-heparin complex	0,495
3BEF	Crystal structure of thrombin bound to the extracellular fragment of PAR1	1,245
3BEI	Crystal structure of the slow form of thrombin in a self_inhibited conformation	0,895
3BF6	Thrombin:suramin complex	0,471
3BIU	Human thrombin-in complex with UB-THR10	0,625
3BIV	Human thrombin-in complex with UB-THR11	0,64
3BV9	Structure of Thrombin Bound to the Inhibitor FM19	0,65
3C1K	Crystal structure of thrombin in complex with inhibitor 15	0,442
3DD2	Crystal structure of an RNA aptamer bound to human thrombin	0,566
3E6P	Crystal structure of human meizothrombin desF1	0,629
3HAT	ACTIVE SITE MIMETIC INHIBITION OF THROMBIN	0,575
3HTC	THE STRUCTURE OF A COMPLEX OF RECOMBINANT HIRUDIN AND HUMAN ALPHA-THROMBIN	0,482
4HTC	THE REFINED STRUCTURE OF THE HIRUDIN-THROMBIN COMPLEX	0,774
4THN	THE CRYSTAL STRUCTURE OF ALPHA-THROMBIN-HIRUNORM IV COMPLEX	0,693

ANEXO 4

REVEALS A NOVEL SPECIFICITY SITE RECOGNITION MODE.

5GDS	HIRUNORMS ARE TRUE HIRUDIN MIMETICS. THE CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ALPHA-THROMBIN:HIRUNORM V COMPLEX	0,52
7KME	CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ALPHA-THROMBIN INHIBITED WITH SEL2711.	0,547
8KME	CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ALPHA-THROMBIN INHIBITED WITH SEL2770.	0,579

Anexo 5
CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITAE

Nome: Maria Thereza Cargnelutti do Carmo
Nascimento: 03/11/1983
Naturalidade: Várzea Grande – MT

✓ Formação Acadêmica

-Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Agosto de 2003 a Agosto de 2007.

-Mestrado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

✓ Comunicação em Congresso

3 comunicações em congressos nacionais.

✓ Publicações

LIMA, L. M. T. R. ; BECKER, C. F. ; GIESEL, G. M. ; MARQUES, A. F. ; CARGNELUTTI, M. T. ; OLIVEIRA NETO, M. ; MONTEIRO, R. Q. ; VERLI, H. ; POLIKARPOV, I. . Structural and thermodynamic analysis of thrombin:suramin interaction in solution and crystal phases. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, v. 1794, p. 873-881, 2009.

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](#)