



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MÁRCIO VIEIRA MACHADO

111512972

DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO CRISTALOGRÁFICA E FUNCIONAL DE NOVO SÍTIO ALOSTÉRICO EM
TROMBINA HUMANA: interação com 1,8-anilinaftaleno sulfonato**

RIO DE JANEIRO

2014

Márcio Vieira Machado

CARACTERIZAÇÃO CRISTALOGRÁFICA E FUNCIONAL DE NOVO SÍTIO ALOSTÉRICO EM
TROMBINA HUMANA: interação com 1,8-anilinoftaleno sulfonato

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,
Centro de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima

Coorientadora: Dr^a Vívian Almeida Silva

Rio de Janeiro

2014

Machado, Márcio Vieira.

Caracterização cristalográfica e funcional de novo sítio alostérico em trombina humana: interação com 1,8-anilinoftaleno sulfonato / Márcio Vieira Machado.– Rio de Janeiro : UFRJ/FF, 2014.

xii, 49 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima e Vívian Almeida Silva.

Dissertação (mestrado) -- UFRJ/FF, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

Referências bibliográficas: f. 61-66

1. Trombina. 2. Cristalografia. 3. Corantes Fluorescentes. 4. Sítio Alostérico. 5. Regulação Alostérica. 6. Humano. 7. Ciências Farmacêuticas - Tese. I. Lima, Luís Maurício Trambaioli da Rocha. II. Silva, Vívian Almeida. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, FF, Programa de Pós-

MÁRCIO VIEIRA MACHADO

CARACTERIZAÇÃO CRISTALOGRÁFICA E FUNCIONAL DE NOVO SÍTIO ALOSTÉRICO EM
TROMBINA HUMANA: interação com 1,8-anilinoftaleno sulfonato

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Rio de Janeiro: 07 / 05 / 2014

Orientadores:

Orientador – Dr. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima
Faculdade de Farmácia-CCS/UFRJ

Coorientadora – Dr^a. Vivian de Almeida Silva
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – IFRJ

Examinadores:

Dr^a. Carolina de Azeredo Braga
Polo Xerém, UFRJ (externo)

Dr. Anderson de Sá Pinheiro
Instituto de Química, UFRJ (externo)

Dr. Fábio Cenevada Lacerda Almeida
Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ (suplente externo)

Dr^a. Ana Luiza Palhares de Miranda
Faculdade de Farmácia, UFRJ (interno)

Dr^a. Yraima Moura Lopes Cordeiro
Faculdade de Farmácia – UFRJ (suplente interno)

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente ao Prof. Luís Maurício, pela oportunidade dada a mim, os muitos ensinamentos acadêmicos que levarei por toda vida, e ainda a amizade construída.

Aos professores que de alguma forma contribuíram com a construção desse trabalho como Prof^a Víviam de Almeida Silva, Prof^a.Yraima Cordeiro, Prof. Robson Monteiro e Prof^a. Sheila Garcia.

Aos amigos do pbiotech, Adriana, Bruno, Cássio, Diogo, Emeli, Leonardo, Luana, Luiz Henrique, Luíza, Maely, Margareth e Raquel, que fizeram esse trabalho ficar mais fácil e prazeroso.

A minha noiva Estella que me incentivou e não permitiu que eu desistisse nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim e nunca deixaram nada faltar para que eu construísse esse sonho.

Aos meus amigos e parentes que me fizeram companhia nos momentos em que precisei.

**“Não existem métodos fáceis para resolver
problemas difíceis.”**

René Descartes

RESUMO

MACHADO, Márcio Vieira. **Caracterização cristalográfica e funcional de novo sítio alostérico em trombina humana:** interação com 1,8-anilinoftaleno sulfonato. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A trombina é a enzima chave na regulação da hemostasia. Tem sido descrito dois exossítios que podem modular a atividade por interação com uma diversidade de ligantes naturais. Com objetivo de elucidar novos sítios regulatórios nós mostramos a interação da trombina com um pequeno ligante, o 1,8-anilinoftaleno sulfonato (1,8-ANS). Realizamos meta-análise estrutural cristalográfica de trombina humana nativa e medimos sua interação com potencial ligante modulador alostérico. Através de titulação isotérmica monitorada pela fluorescência do ligante pudemos perceber a interação entre as moléculas, e consequente alteração da funcionalidade da enzima. Análises cristalográficas com posterior difração em raios-X elucidaram a estrutura e o sítio de ligação. A trombina apresenta um sítio de ligação simples com o 1,8-ANS, com constante de dissociação de 5 μ M. Esta interação ocorre por inibição não competitiva da atividade de trombina frente ao substrato cromogênico S-2238 (IC_{50%} = 40 μ M). A estrutura cristalográfica do complexo permite a identificação de 1,8-ANS ligado a trombina mediado pela Arg126 e o Glu127, indicando que a localização na trombina é diferente da região do sítio ativo e dos exossítios I e II. Uma reorganização no novo exossítio regulador ocorre após ligação, tal como revelado, por comparação com a estrutura de cristal da trombina na forma apo no mesmo estado de cristalização. Estes dados revelam um novo sítio de ligação obrigatório em trombina com potente efeito regulatório sobre a atividade enzimática, o que pode estabelecer uma nova perspectiva na coagulação sanguínea, bem como o possível desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos mediados pela trombina.

Palavras-chave: trombina; atividade; 1,8-ANS; cristalografia.

ABSTRACT

MACHADO, Márcio Vieira. **Caracterização cristalográfica e funcional de novo sítio alostérico em trombina humana:** interação com 1,8-anilinoftaleno sulfonato. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Thrombin is a key enzyme in the regulation of hemostasis. It has been reported that two exosites can modulate the activity by interacting with a variety of natural ligands. In order to elucidate new regulatory sites we show the interaction of thrombin with a small ligand, 1,8-anilinoftaleno sulfonato (1,8-ANS). We performed crystallographic structural meta-analysis of native human thrombin and measured its interaction with potential ligand allosteric modulator. By isothermal titration monitored by fluorescence ligand could perceive the interaction between the molecules, and the resultant change in functionality of the enzyme. Crystallographic analysis with subsequent X-ray diffraction elucidated the structure and binding site. Thrombin has a simple website link with 1,8-ANS, with dissociation constant of 5 μ M. This interaction occurs through noncompetitive inhibition of thrombin activity against the chromogenic substrate S-2238 (IC 50 % = 40 μ M). The crystal structure of the complex allows for the identification of 1,8-ANS bound thrombin mediated Glu127 and Arg126, indicating that the thrombin is different in location from the active site region and the exosites I and II. A regulator in the new reorganization occurs upon binding exosite as revealed by comparison with the crystal structure of the apo form of thrombin in the state of crystallization. These data reveal a novel binding site on thrombin binding with potent regulatory effects on the enzymatic activity, which may provide a new perspective on blood coagulation as well as the possible development of new antithrombotic drugs mediated by thrombin.

Keywords: thrombin; activity; 1,8-ANS; crystallography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Plaqueta (fragmento anucleado de megacariócito), receptores e ligantes.....	14
Figura 2 Ilustração da atividade resumida do sistema hemostático quando um vaso é lesionado..	15
Figura 3 Cascata de coagulação proposta na década de 1960.	16
Figura 4 Cascata de coagulação proposto na década de 1990.	18
Figura 5 Representação dos complexos pró-coagulantes.....	19
Figura 6 Esquema representativo do mecanismo anticoagulante da proteína C ativada (PCa).....	20
Figura 7 Representação esquemática da regulação da fibrinólise.....	21
Figura 8 Representação da estrutura cristalográfica de α Th humana inibida por PPACK (Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) depositada no <i>Protein Data Bank</i> (PDB) sob o código 1PPB.	25
Figura 9 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.....	27
Figura 10 Complexo ternário formado por antitrombina-heparina-trombina.	29
Figura 11 Interações da heparina com as moléculas de trombina e antitrombrina.	30
Figura 12 Representação esquemática das formas de trombina ligada a Na (rápida-vermelha) e não ligada a Na (lenta-azul).....	31
Figura 13 Visão dos mapas de densidade eletrônica preenchidos na região de mudança estrutural mais significativa ao redor da região de interação do Na^+	32
Figura 14 Estrutura de ANS.	33
Figura 15 Figura de célula unitária.	34
Figura 16 Esquema de coleta de dados Cristalográficos.....	35
Figura 17 Exemplos de sistemas tridimensionais em cristais.	36
Figura 18 Gráfico da eluição por gradiente realizada.	41
Figura 19 Recorte de gel SDS-PAGE 15% da purificação de α Th.....	42
Figura 20 <i>PrintScreen</i> do ensaio de medida de atividade de α Th contra S-2238.	43
Figura 21 Parâmetros de medida no programa Softmax [®] Pro 5.4.....	44
Figura 22 <i>PrintScreen</i> de ensaio de atividade de α -Trombina humana contra substrato natural fibrinogênio.	44
Figura 23 Diagrama de placa 96/3 poços no método <i>sitting-drop</i>	47
Figura 24 Diagrama de poço no método <i>Hanging-Drop</i>	47
Figura 25 Atividade enzimática Trombina x 1,8-ANS.	50
Figura 26 Gráfico V_{max} x [S-2238], Abs a 405nm.	51
Figura 27 Gráfico $1/V$ x $[1/S-2238]$, Abs a 405nm.....	52
Figura 28 Gráficos F_{ANS} x [α Th].	53
Figura 29 Titulação isotérmica de trombina com ANS.....	53
Figura 30 Gráfico de titulação estequiométrica.....	54
Figura 31 Imagem do cristal de trombina em complexo com 1,8-ANS (em HCSI06).....	55

Figura 32 Imagem de difração de Raio X.....	56
Figura 33 Exemplo da qualidade do mapa de densidade eletrônico de $2F_0-F_C$ contornado a 1 sigma, demonstrando a qualidade do mesmo à resolução de 1.9 Å.	57
Figura 34 Superposição das estruturas de trombina na forma apo (1PPB.pdb) e ligada a ANS.	57
Figura 35 Detalhes da interação entre trombina e ANS.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tampões usados nas etapas de purificação de α Th.	40
Tabela 2 Esquema de montagem da placa de ensaio para medida de atividade α Th/S-2238.	43
Tabela 3 Esquema de montagem da placa em duplicata para medida de atividade α Th/Fibrinogênio.	44
Tabela 4 Demonstração dos dados da titulação isotérmica entre ANS e trombina monitorados pela intensidade de fluorescência de ANS.	46
Tabela 5 Ensaios cristalográficos realizados onde houve crescimento de cristal.	49
Tabela 6 Coleta de dados e estatísticas de refinamento das formas apo e complexo [alfa-trombina humana]:[ANS].	59

LISTA DE ABREVIATURAS

2Fo-Fc	2 Fobservado - Fcalculado , onde F-fator de estrutura
ABE	Exosítio de ligação de ânion (do inglês <i>anion binding exosite</i>)
ADP	Difosfato de adenosina
ANS	Ácido 8-anilino-1-naftalenossulfônico
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
AT	Antitrombina
α Th	α -Trombina humana
α_2 AP	α_2 -Antiplasmina
BaCl ₂	Cloreto de bário
BSA	Albumina sérica bovina (da sigla em inglês Bovine Serum Albumin)
CAPM	Cininogênio de alto peso molecular
COX	Ciclooxigenase
CS 1	Crystal Screen 1
CS 2	Crystal Screen 2
CYP2C9	Citocromo P450
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etileno glycol tetra-acético
EPCR	Receptor endotelial de proteína C (do inglês Endothelial PC Receptor)
F _{ANS}	Fluorescência observada de ANS
Fo-Fc	Fobservado - Fcalculado , onde F-fator de estrutura
FT	Fator tecidual
FvW	Fator de von Willebrand
Glu	Glutamina
His	Histidina
IC ₅₀	Concentração inibitória na metade da atividade máxima
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INS	Insulina
Kd	Constante de dissociação
LMWH	Heparina de baixo peso molecular (do inglês Low molecular weigh heparin)
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
LYS	Lisozima

Lys	Lisina
NAG	N-galactosamina
N ₂	Nitrogênio
PAI Inibitor)	Inibidor do ativador de plasminogênio (do inglês Plasminogen Activator Inhibitor)
PAR	Receptor ativado por protease (do inglês protein activated receptor)
PC	Proteína C
Pca	Proteína C ativada
PDB	Banco de dados de proteína (Sigla do inglês Protein Data Bank)
PDF	Produtos de degradação de fibrina
PEG	Polietilenoglicol
PGI ₂	Prostaciclina
Phe	Fenilalanina
PIS	PEG Ion Screen
PK	Pré-caliceína
PL	Fosfolipídeos
PPACK	Fenilalanina-Prolina-Arginina-Clorometilcetona
Pro	Prolina
PS	Proteína S
S-2238	Substrato cromogênico de trombina
Ser	Serina
TEV	Tromboembolismo venoso
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual (do inglês Tissue Factor Pathway Inhibitor)
TM	Trombomodulina
t-PA	Ativador de plasminogênio tecidual
Tris	Hidroximetil aminometano
Trp	Triptofano
TXA ₂	Tromboxano A ₂
Tyr	Tirosina
u-PA	Ativador de plasminogênio uroquinase
Vmax	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Coagulação sanguínea	13
1.1.1. O papel das plaquetas	13
1.1.2. A cascata de coagulação de 1964	14
1.1.3. O processo de coagulação atual	17
1.1.4. A regulação da coagulação	19
1.2. Tratamentos farmacológicos das trombooses	21
1.2.1. Fármacos antiplaquetários	22
1.2.2. Fármacos anticoagulantes	23
1.3. Trombina	25
1.4. ANS	32
1.5. Elucidação estrutural de proteínas por cristalografia e difração de raios x	33
2. OBJETIVOS GERAIS.....	38
2.1. Objetivos específicos	38
3. MATERIAL E MÉTODO	39
3.1. Material	39
3.2. Métodos.....	39
3.2.1. Purificação de α trombina humana	39
3.2.2. Concentração e quantificação	41
3.2.3. Avaliação de pureza.....	42
3.2.4. Atividade enzimática de α Th	42
3.2.5. Proporção estequiométrica entre α Th e ANS.....	45
3.2.6. Análises cristalográficas.....	46
4. RESULTADOS	49
4.1. Ensaio cristalográfico de trombina livre	49
4.2. Influência do ANS na atividade enzimática	49
4.3. Interação entre alfa trombina humana e 1,8-ANS	52
4.4. Estrutura de alfa trombina humana e 1,8-ANS	54
5. Conclusão.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

A complexidade existente em nosso sistema hemostático confere uma necessidade de que o mesmo seja muito bem regulado, e assim manter a fluidez do sangue, alternando entre processos pró-coagulantes e anticoagulantes. Para evitar tanto processos trombóticos quanto hemorragias um delicado equilíbrio deve coexistir, e este é chamado de hemostasia.

1.1.1. O papel das plaquetas

Em uma lesão vascular os processos pró-coagulantes predominam para evitar a perda sanguínea, sendo assim as plaquetas iniciam esses processos se aderindo à região subendotelial do vaso através de ligação com colágeno e fator de von Willebrand (FvW - molécula que adere proteínas de membrana). Continuando as plaquetas começam a se agregar para formar um tampão no local através de ligações com o fibrinogênio ou a fibronectina. Conjuntamente as plaquetas vão sendo ativadas e recrutando mais plaquetas ao local, contribuindo para o rápido crescimento do trombo (MACKMAN, 2008).

A ligação da protease chamada trombina às plaquetas é responsável pela ativação plaquetária, e com isso ocorre a liberação de grânulos oriundos das plaquetas recrutando novas plaquetas que são aderidas, agregadas e ativadas. Esses grânulos são principalmente constituídos de difosfato de adenosina (ADP). Enzimas plaquetárias formam o tromboxano A_2 (TXA₂), que são liberados e junto com o ADP são responsáveis pela ativação das plaquetas vizinhas através de seus receptores específicos (GUYTON, 2006).

A adesão de plaquetas ao endotélio ocorre nos locais de lesão vascular através da ligação dos receptores GP a proteínas da matriz extracelular expostas (colágeno e FvW). A ativação das plaquetas ocorre por processos de sinalização intracelular e os compostos liberados são formados por vários agonistas, incluindo TXA₂ e ADP. Estes fatores ligam-se a seus respectivos receptores acoplados à proteína G juntamente com trombina circulante. Além disso, eles potencializam as ações uns dos outros (por ex., sinalização P2Y₁₂ modula a geração de trombina). A principal integrina plaquetária GPIIb/IIIa participa da etapa final comum de ativação, que gera uma mudança conformacional na plaqueta que proporciona a ligação ao fibrinogênio e FvW levando a agregação plaquetária. O resultado dessas

interações é a formação de trombos por interações entre plaquetas e destas com a fibrina (Figura 1)(ANGIOLILLO; CAPODANNO; GOTO, 2010).

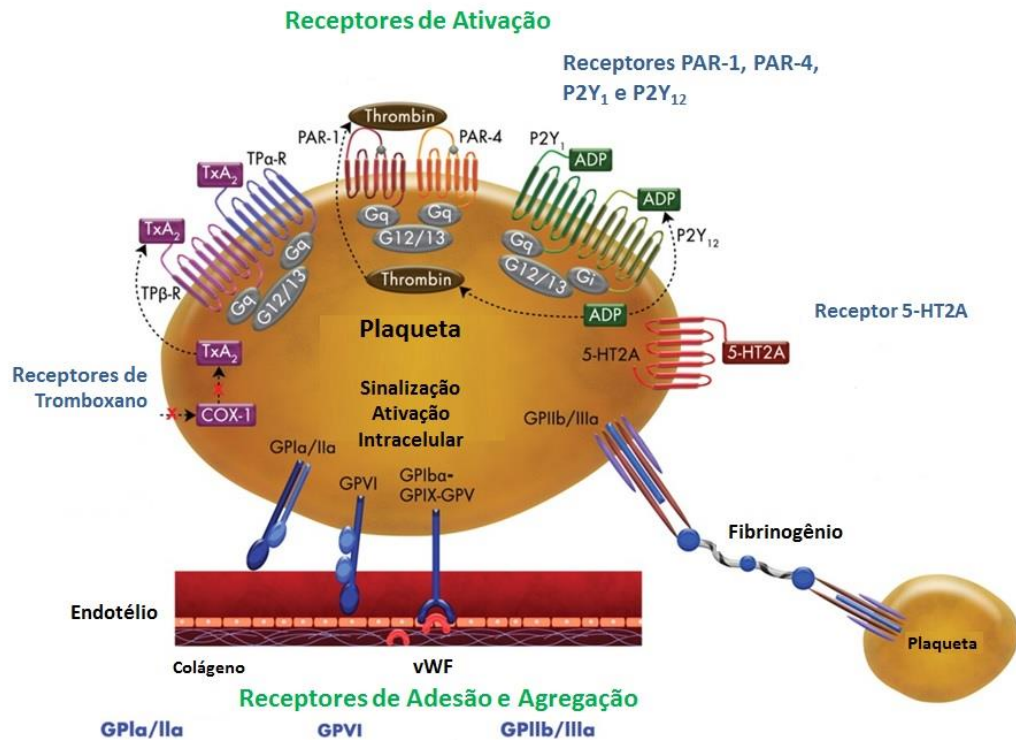


Figura 1 Plaqueta (fragmento nucleado de megacariócito), receptores e ligantes. Receptores responsáveis pela ativação (parte superior), adesão e agregação (parte inferior). As plaquetas se aderem à superfície endotelial através da interação de colágeno aos receptores do tipo GPIa/IIa e GPVI, e através da ligação de Fator de von Willebrand ao receptor GPIIb-GPIX-GPV. A agregação ocorre com a ligação de fibronectina ou fibrinogênio ao receptor GPIIb/IIIa ou $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrina. Com a interação de trombina com o receptor PAR-1 ocorre a ativação das plaquetas e a consequente liberação de agonistas 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. Adaptado de (ANGIOLILLO, *et. al.* 2010).

1.1.2. A Cascata de coagulação de 1964

Para manter o trombo e evitar a hemorragia temos o processo de coagulação. Esse processo complexo tem como objetivo principal a formação de fibrina (Figura 2), um produto insolúvel da clivagem do fibrinogênio (solúvel) pela trombina, através de interações entre proteases plasmáticas e seus cofatores.

Em 1964 Macfarlane e Davie & Ratnoff, propuseram o que chamaram de “cascata” de coagulação, para explicar a fisiologia da formação do trombo, denominada deste modo por se tratar de uma sequência de sucessivas reações proteolíticas onde um zimogênio é ativado por clivagem de uma enzima presente no plasma até a formação da rede de fibrina (Figuras 3 e 4)(FRANCO, R. F., 2001).

O processo foi dividido em duas vias distintas, a intrínseca ou via ativada por contato, e a extrínseca ou via ativada pelo fator tecidual, sugere ainda que a via extrínseca seja a principal responsável pela formação de fibrina, e a intrínseca seja responsável pelo crescimento do trombo e manter a rede de fibrina, sendo que a partir da ativação do fator X inicia-se o ponto comum (FRANCO, R. F., 2001).

Para desencadear o processo de coagulação pela via extrínseca é necessário o fator tecidual (FT) que está presente na adventícia do tecido e entra em contato com o sangue no momento que um vaso é lesionado (também pode ser expressado por células endoteliais e monócitos em algumas doenças). O FT é uma glicoproteína integral de membrana que está fortemente associada aos fosfolipídios (PL). Na presença de Ca^{2+} o FT 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 também uma serinoprotease (GUYTON, 2006).

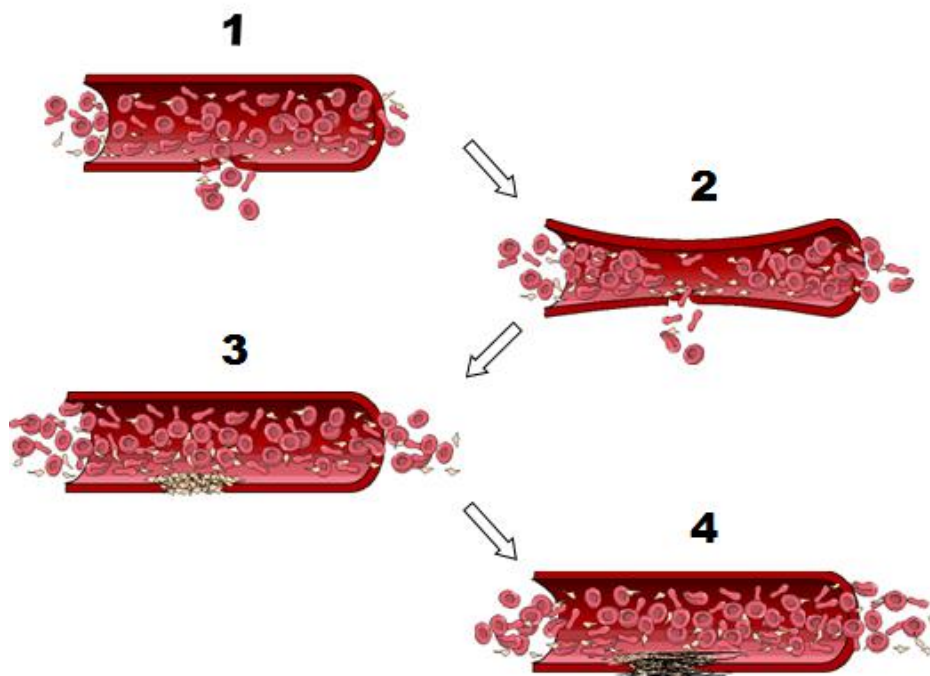


Figura 2 Ilustração da atividade resumida do sistema hemostático quando um vaso é lesionado. 1) A lesão vascular e o extravasamento de sangue. **2)** Vasoconstrição para diminuir o fluxo sanguíneo na região. **3)** Formação do tampão hemostático de plaquetas. **4)** Formação do trombo com a presença da rede de fibrina que deve permanecer no local até que o tecido se regenere. Adaptado de (GUYTON, 2006).

Na via intrínseca, a ativação do fator XII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície, contendo cargas elétricas negativas. Tal processo é denominado “ativação por contato” e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (PK – uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (CAPM – um cofator não enzimático). O fator XIIa ativa o fator XI, que, por sua vez, ativa o fator IX na presença de Ca^{+2} . O fator IXa, na presença de fator VIII e Ca^{+2} , ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e subsequente formação de fibrina (FRANCO, R. F., 2001).

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.

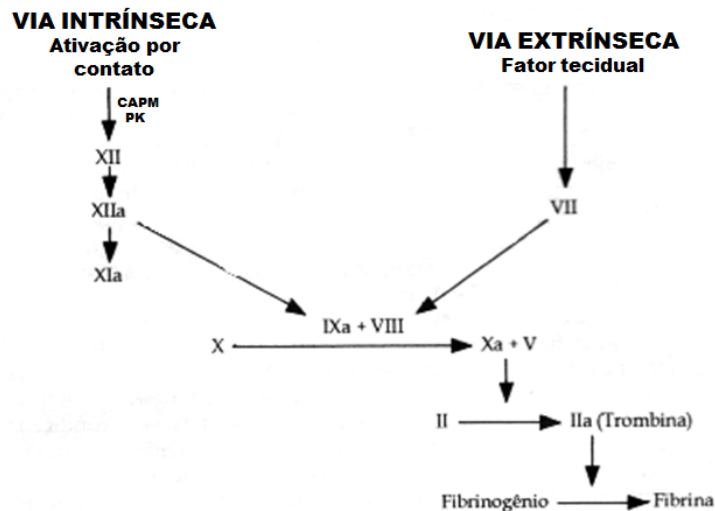


Figura 3 Cascata de coagulação proposta na década de 1960. A via intrínseca é iniciada com a “ativação por contato” do fXII, na presença de cininogênio de alto peso molecular (CAPM) e pré-caliceína (PK) e segue com reações sucessivas de ativação de zimogênios que se tornam enzimas ativas até que se forme fXa e, então, é iniciada a via comum. A via extrínseca se inicia com a interação entre fVIIa e fator tecidual e consequente 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, R. F., 2001).

A divisão do sistema de coagulação em vias extrínseca e intrínseca, hoje em dia se tornou inadequada para explicar a fisiologia, sendo usada apenas como mais didática, visto que essa divisão não ocorre no organismo, sendo que ambas vias interagem para formar fibrina.

1.1.3. O processo de coagulação atual

(DAVIE, *et. al.* 1991)propuseram na década de 1990 novas interpretações da cascata de coagulação, onde reconheceu-se a trombina como a enzima chave já que é capaz de regular vários pontos do processo e estimular a sua própria formação. Apesar da forma mais didática de separação das vias, uma visão atualizada do processo observa pontos de conexão entre elas. 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 4)(DAVIE, *et. al.* 1991).

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 5). Essa superfície de membrana pode ser a de um vaso lesado, a de células inflamatórias ou a de plaquetas ativadas (mais comum)(FRANCO, R. F., 2001).

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. (DAVIE; *et al.* 1991)

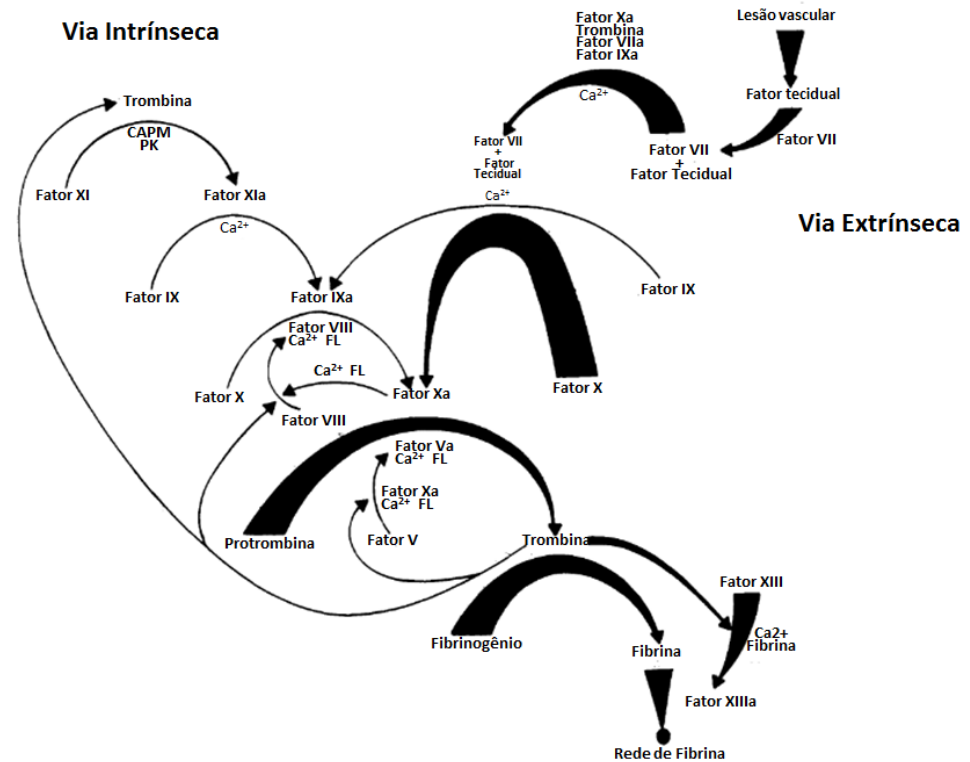


Figura 4 Cascata de coagulação proposto na década de 1990. A via intrínseca (setas finas) é iniciada com a “ativação por contato” do fXI, na presença de cininogênio de alto peso molecular (CAPM) e précalicreína (PK) e segue com reações sucessivas de ativação de zimogênios que se tornam enzimas ativas até que se forme fXa e, então, é iniciada a via comum. A via extrínseca (setas grossas) se inicia com a interação entre fVII e fator tecidual (FT) exposto após lesão vascular e consequente formação de fVIIa através de clivagem por resquílios 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 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; FUJIKAWA; KISIEL, 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.

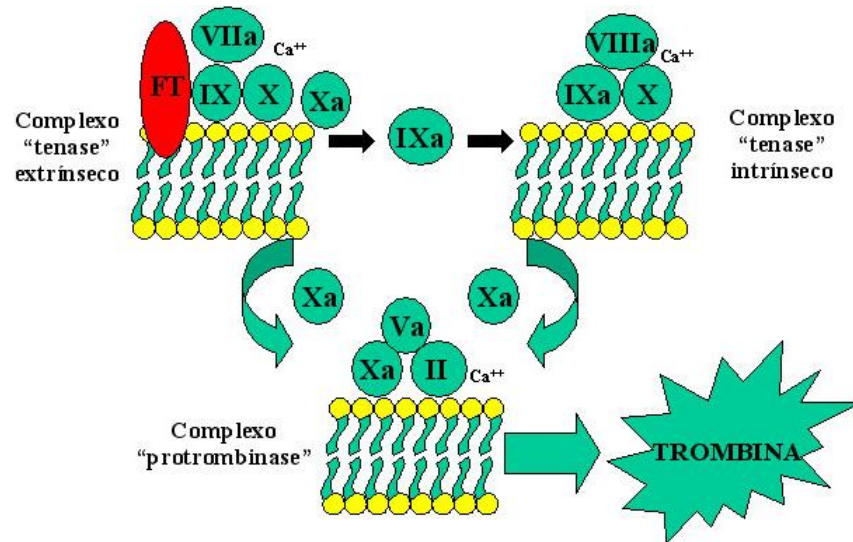


Figura 5 Representação dos complexos pró-coagulantes. O início da coagulação se dá com a interação entre o fVIIa (fator VII ativo) e o FT (fator tecidual) que ativam o FIX e o fX. O fIXa compõe o complexo fVIIIa - fIXa que ativa o fX com maior eficiência. O fXa interage com o fVa formando outro complexo que tem a função de ativar o fII (protrombina) transformando em fIIa (trombina). Fonte: (FRANCO, R. F., 2001).

1.1.4. A Regulação da coagulação

Para que não ocorra uma obstrução do vaso com a formação do trombo, é importante que o processo de coagulação seja revertido através de fibrinólise e de inibição dos processos pró-coagulantes. 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 protagonistas (CHU, 2005).

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 (CHU, 2005).

A PC precisa ser ativada para exercer o seu papel anticoagulante. Sendo assim essa proteína 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 (TM). 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 6). 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 (REZAI, 2010).

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-VIIIa. 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 (HUNTINGTON, 2006).

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 pró-coagulante com o objetivo de manter o sangue fluido (HUNTINGTON, 2006).

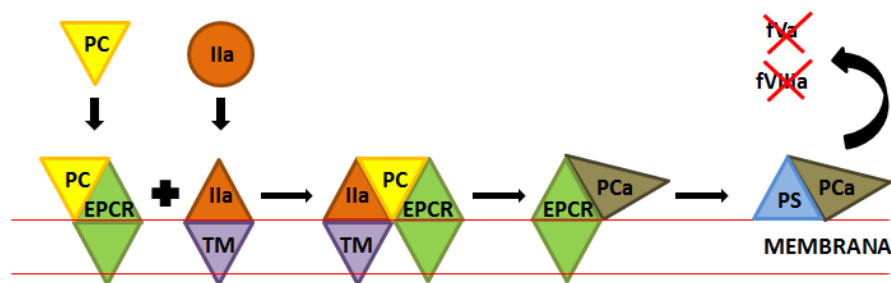


Figura 6 Esquema representativo do mecanismo anticoagulante da proteína C ativada (PCa). A PC (triângulo amarelo) se liga ao seu receptor endotelial (EPCR – losângulos verdes). A trombina (IIa – círculo laranja) se liga ao seu receptor endotelial trombosmodulina (TM – triângulo lilás) e sofre modificações (IIa – triângulo laranja) que permitem que a PC - EPCR interaja com ela e seja ativada (triângulo marrom claro). A PCa se liga a proteína S (triângulo azul) que atua como cofator e inativa os fatores Va e VIIIa. Adaptado da fonte: Franco, R. F., (2001).

Outro modo de regular a coagulação é a fibrinólise. 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 7) (FRANCO, R. F., 2001).

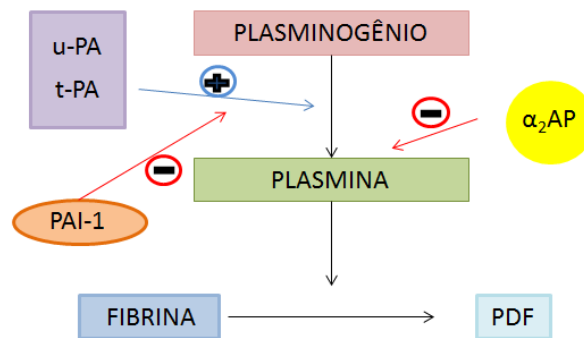


Figura 7 Representação esquemática da regulação da fibrinólise. O plasminogênio se transforma em plasmina pela ação do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA) e do ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA). A plasmina cliva a fibrina gerando produto de degradação da fibrina (PDF). 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).

1.2. 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 (MACKMAN, 2008).

1.2.1. Fármacos Antiplaquetários

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

1.2.1.1. Inibidores de ciclooxigenase (COX)

A COX é uma enzima necessária para a síntese de tromboxano-A₂ (TXA₂), que atua ativando as plaquetas (Figura 1). 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 (HENNEKENS et al., 2006).

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”, 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, 2005).

1.2.1.2. Antagonistas do receptor de ADP

O ADP que se liga no receptor P2Y₁₂ tem função de ativação plaquetária (Meyer et al., 2008) (Figura 1). 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*)(SABATINE et al., 2005). 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 (WIVIOTT et al., 2007).

1.2.1.3. Inibidores de PAR-1

O PAR-1 é o receptor de trombina das plaquetas que também atua na ativação dessas (Figura 1). Esse receptor é um novo alvo da terapia antiplaquetária. Camundongos *knock-out* para PAR-1 (expressam PAR-3 e PAR-4) são protegidos contra trombose arterial, indicando que inibir o receptor PAR-1, anulando sua função pode ser um tratamento promissor para

trombose em humanos (DE MEYER et al., 2008). As drogas E5555 e SCH 530348 estão em fase de teste em humanos (MEADOWS; BHATT, 2007).

1.2.1.4. *Inibidores de $\alpha_{IIb}\beta_3$ - integrina*

Esse receptor de fibrinogênio tem a função de promover a agregação das plaquetas (Figura 1). 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, sugere-se que isso se deva ao fato deles se comportarem como agonistas parciais (CHEW et al., 2001).

1.2.2. **Fármacos Anticoagulantes**

O tratamento das trombooses venosas consiste no uso de anticoagulantes, mas assim como os antiplaquetários usados nas trombooses 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:

1.2.2.1. *Antagonistas de vitamina K*

Antagonistas da vitamina K são os anticoagulantes orais mais utilizados no mundo hoje, a warfarina mantém-se no topo desde sua descoberta em 1954 (WARDROP; KEELING, 2008). 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). Estes fármacos têm uma janela terapêutica estreita, e vários alimentos e medicamentos, bem como certos estados fisiológicos, podem interagir com o seu metabolismo, muitas vezes com consequências desastrosas, necessitando de monitoramento cuidadoso para evitar sangramento (PALARETI et al., 1996). 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 de warfarina (KRYNETSKIY; MCDONNELL, 2007).

1.2.2.2. Heparinas

O anticoagulante clássico, heparina, foi descoberto em 1916 por McLean e permanece até hoje um dos compostos mais eficazes e amplamente utilizado. 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 tromboembolismo venoso (TEV). Heparinas fracionadas, na forma de heparinas de baixo peso molecular (LMWH, do inglês *low molecular weight heparin*), também se ligam a fXa e trombina, mas seu uso está menos associado a episódios de sangramento do que as não fracionadas (QUINLAN; MCQUILLAN; EIKELBOOM, 2004).

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 (TURPIE et al., 2003).

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 (O'BRIEN; MUREEBE, 2011).

1.2.2.3. 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. O PEG-hirudina é um híbrido da hirudina nativa conjugada com polietilenoglicol (PEG), esta pegulação prolonga significativamente a meia-vida do plasma, estes inibidores são bivalentes, e bloqueiam conjuntamente o sítio de ligação ao substrato e o exosítio I (sítio de ligação a Antitrombina). Estudos com essa nova combinação tem mostrado inibir a trombose arterial

em modelos de culturas de células, mas ainda necessita de estudos mais detalhados (O'BRIEN; MUREEBE, 2011).

Vários agentes de administração oral estão em desenvolvimento incluindo o inibidores diretos de trombina dabigatran (ERIKSSON et al., 2007), argatroban e ximelagatran (O'BRIEN; MUREEBE, 2011) e inibidor de fXa rivaroxaban (ERIKSSON et al., 2008). Estudos tem mostrado que esses fármacos tem grandes chances de serem mais seguros que warfarina e heparina, mas também contém riscos com alta incidência de infarto do miocárdio (O'BRIEN; MUREEBE, 2011).

1.3. TROMBINA

Como os aspectos funcionais da trombina já foram expostos anteriormente 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 semelhança (principalmente estrutural) em relação a essa última. É formada por duas cadeias polipeptídicas 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 8). 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 (SOLOMONS, 2011).

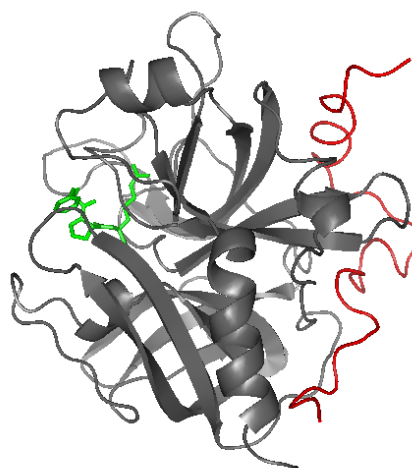


Figura 8 Representação da estrutura cristalográfica de α Th humana inibida por PPACK (Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) depositada no *Protein Data Bank* (PDB) sob o código 1PPB. Verde - PPACK; Vermelho - cadeia L; Grafite - cadeia H. Figura gerada pelo programa PyMol.

As serinoproteases são assim denominadas, pois o mecanismo da sua atividade proteolítica envolve um resíduo de serina essencial para tal atividade. Esse resíduo na trombina 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, 2011).

A cavidade 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; PHILIPPOU; HUNTINGTON, 2005) (Figura 9A).

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 opostas (Figura 9B). 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, Arg75, Tyr76, Arg77a, Lys109 e Lys110 e o exosítio II nos resíduos Arg93, Lys236, 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 três 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 da sanguessuga *Hirudus medicinalis*), do receptor PAR-1, da fibrina, da trombomodulina, etc (DI CERA, 2003).

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

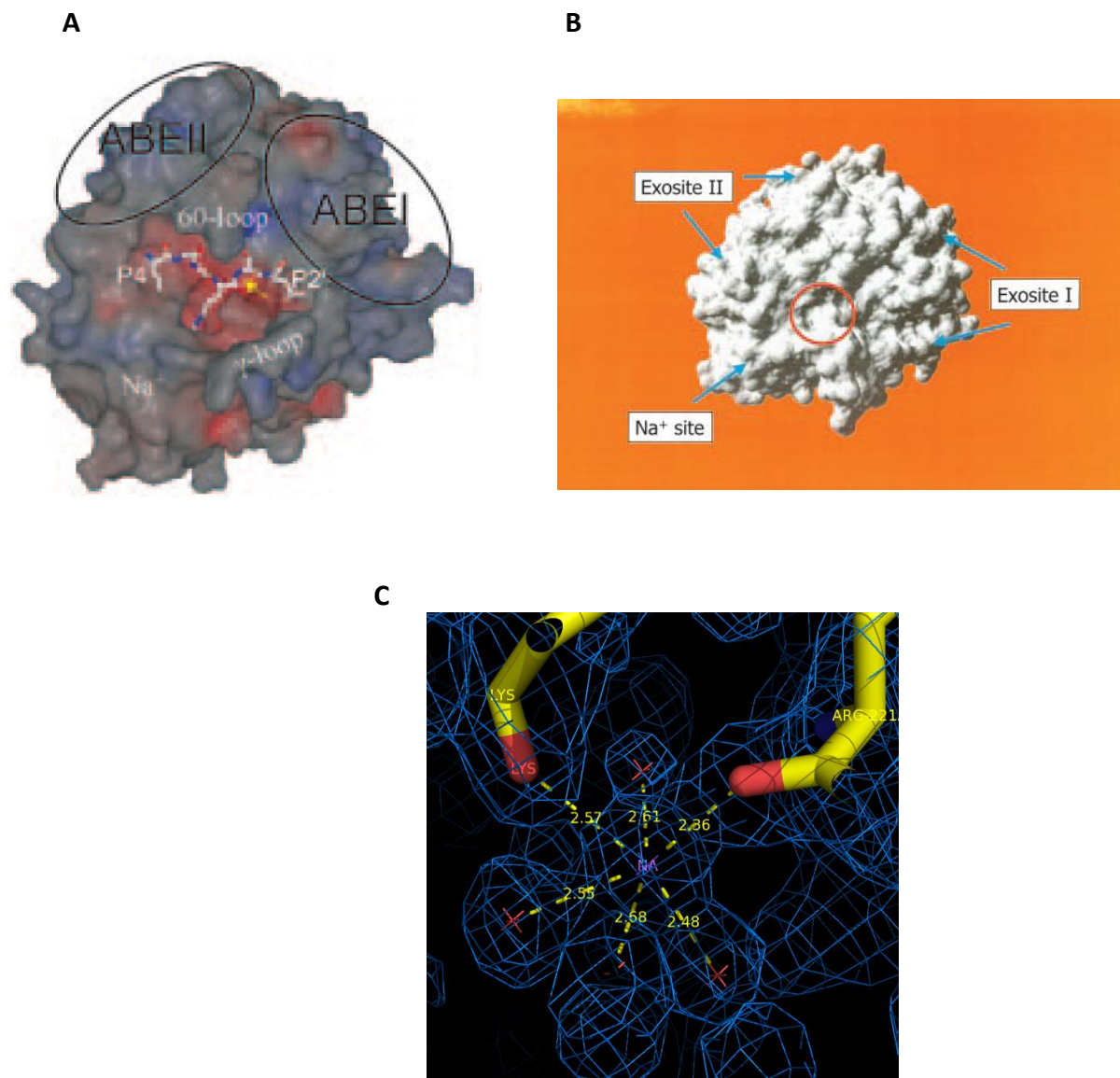


Figura 9 Representação esquemática da superfície acessível ao solvente da molécula de trombina com a localização dos seus sítios e detalhe estrutural de um sítio de Na^+ típico. **A)** Localização de ABE I e II (Anion binding exosite I e II - exossítio de ligação de ânion I e II). Localização sítio catalítico (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 localização dos exossítios 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.

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. A heparina se liga à antitrombina de maneira específica e ativa a serpina através de modificação alostérica da estrutura (Figura 10A) fornecendo um molde para que a antitrombina possa interagir com a trombina (Figura 10B).

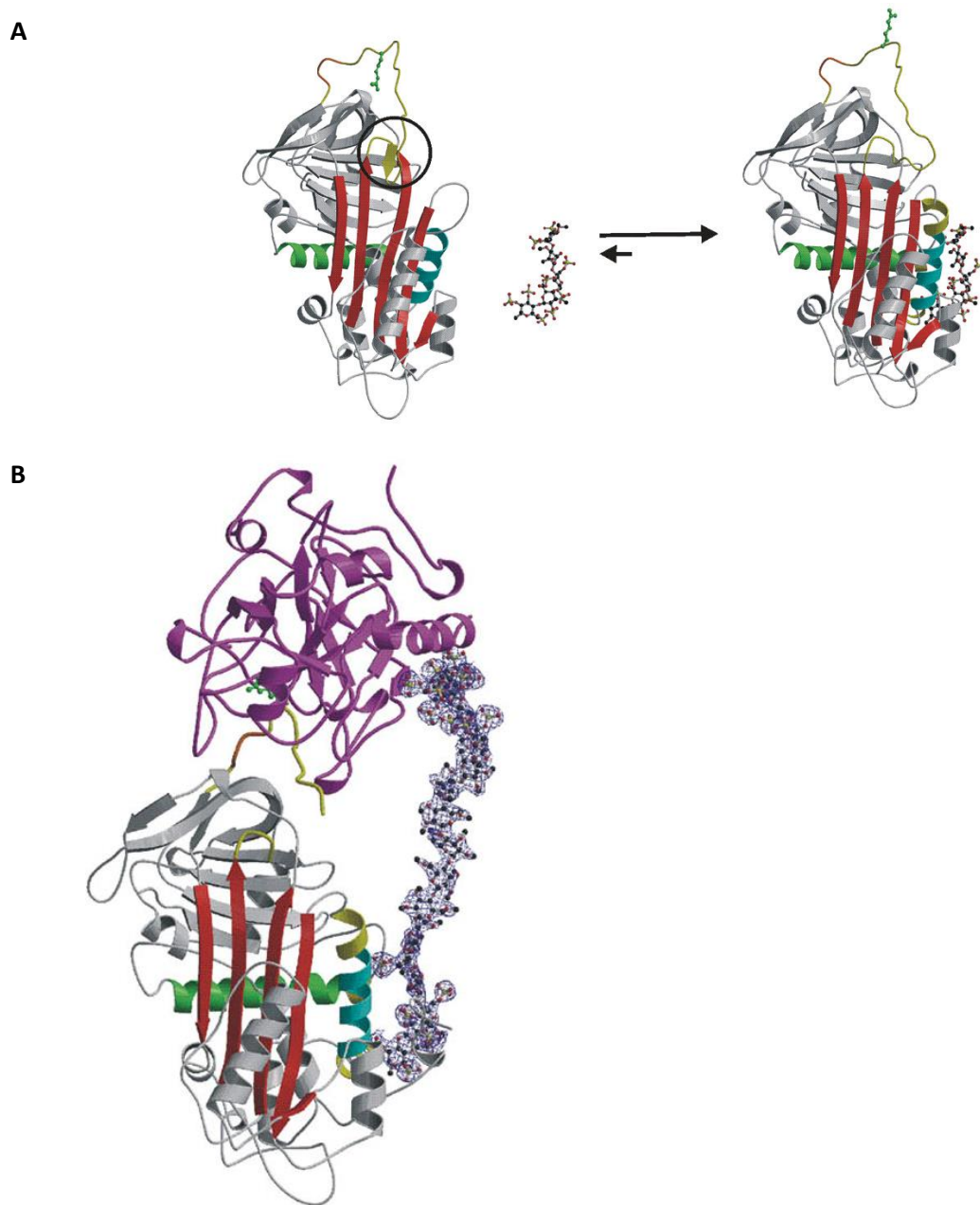


Figura 10 Complexo ternário formado por antitrombina-heparina-trombina. A) A ligação da heparina a antitrombina induz a mudança conformacional envolvendo a expulsão em alça do loop central reativo (amarelo) da folha- β A (vermelha) e extensão das hélices A (verde) e D (azul e amarela). **B)** Representação da estrutura cristalográfica (PDB ID 1NQ9) do complexo ternário, antitrombina (cinza), trombina (roxo) e heparina (envolvida pelo mapa de densidade eletrônica). A heparina age como molde, formando uma ponte para facilitar a inibição de trombina mediada pela antitrombina. Fontes: (LI et al., 2004) - A e B; (DE KORT; BUIJSMAN; VAN BOECKEL, 2005) - C.

As maneiras direta e indireta de inibição são aproveitadas para inibir trombina, mas a última é responsável por uma inibição muito maior de trombina, quando é formado o complexo ternário antitrombina, trombina e heparina (Figura 10A e 10B), onde a heparina é a responsável pela aproximação das duas moléculas, a habilidade da heparina de promover essa interação é dependente do seu tamanho que precisa ser de no mínimo 18 sacarídeos

(Figura 11). Sem a presença de heparina essa inibição acontece em ritmo 1000 vezes mais lento, aproximadamente (LI et al., 2004).

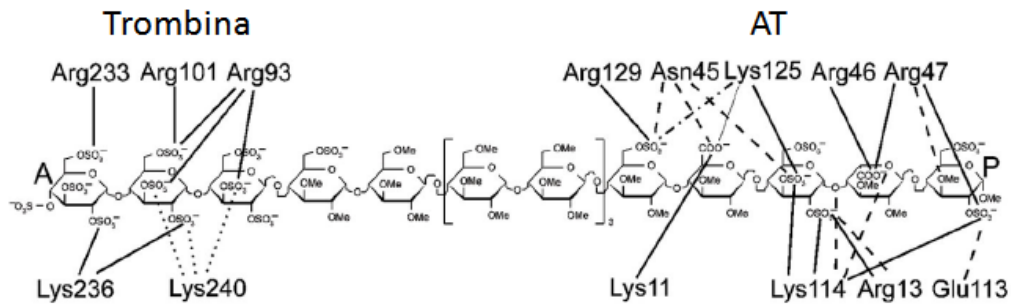


Figura 11 Interações da heparina com as moléculas de trombina e antitrombina. Molécula de heparina destacada com A na ponta não redutora e com P na ponta redutora. As interações com trombina e antitrombina são representadas por linhas, onde as linhas sólidas indicam ponte salina, linhas tracejadas ligações 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 dois *loops* próximos do sítio catalítico (Figura 9C). 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, 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, 2004)), por isso as duas formas da enzima são bem populadas em situações normais com uma leve vantagem de 3:2 para forma rápida (Figura 12)(DI CERA, 2003).

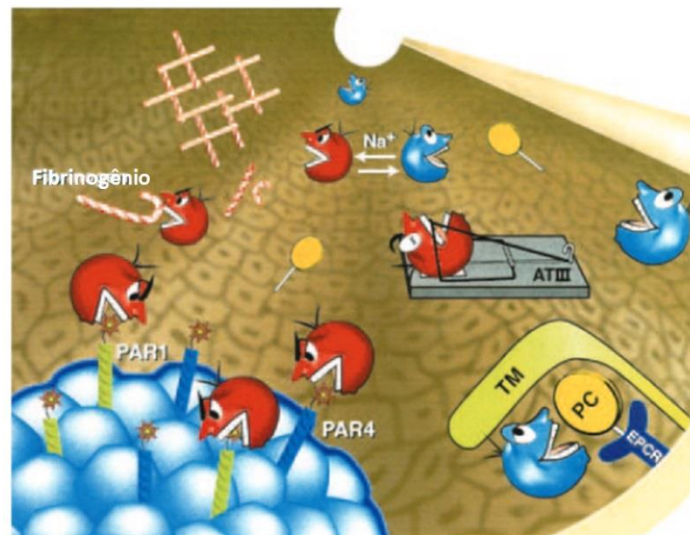


Figura 12 Representação esquemática das formas de trombina ligada a Na⁺ (rápida-vermelha) e não ligada a Na⁺ (lenta-azul). Mostrando que a forma rápida tem alta especificidade de ligação ao fibrinogênio, aos receptores PAR-1 e PAR-4 e a PC (proteína C), e que também essa forma é facilmente inibida pela TM (trombomodulina). Adaptado da fonte: (DI CERA, 2003).

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⁺ aumenta 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 (PINEDA, 2004).

Quando o organismo passa por situações que desestabilizam a ligação de Na⁺, como em episódios de hiponatremia ([Na⁺] < 135 mM -(PINEDA, 2004)), a forma lenta é estabilizada e o equilíbrio é deslocado para a anticoagulação. No caso de hipernatremia ([Na⁺] > 145 mM -(PINEDA, 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 *loops*-220 e 186, que contribuem para a especificidade da serinoprotease. Os resíduos envolvidos na ligação de Na⁺ (Figura 13) 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 PPACK) (Figuras 13 A e B)(PINEDA, 2004).

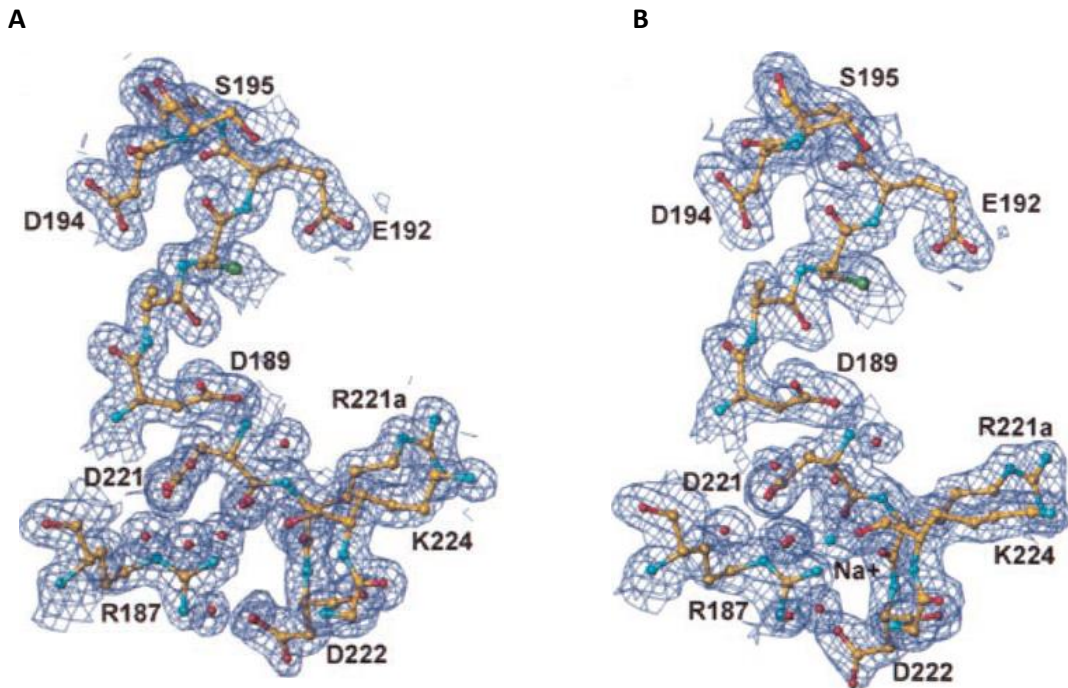


Figura 13 Visão dos mapas de densidade eletrônica preenchidos na região de mudança estrutural mais significativa ao redor da região de interação do Na^+ . **A)** Forma lenta (1SHH). **B)** Forma rápida (1SFQ). O íon Na^+ está representado com uma esfera azul. Ambas as estruturas são de αTh inibida com FPACK. Os mapas estão contornados a $1,0\sigma$. Fonte: (PINEDA, 2004).

Além do mais é importante lembrar que o enovelamento bastante conservado entre as serinoproteases nos remete a uma estrutura rígida, onde perturbações funcionais drásticas são difíceis de 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 por estruturas cristalográficas. O contrário também acontece, grandes transições estruturais podem vir acompanhadas de pequenos saltos energéticos (PINEDA, 2004).

1.4. ANS

Ácido 8-anilino-1-naftalenossulfônico (ANS) (figura 14) é uma sonda fluorescente amplamente utilizada para a caracterização dos sítios de ligação de proteína. A literatura

está repleta de dados sobre ligação a sítios hidrofóbicos de proteínas onde o ANS fica internalizado. As principais características observadas do ANS é um deslocamento para o vermelho do máximo de emissão de fluorescência e um aumento da intensidade de fluorescência, geralmente atribuída à hidrofobicidade do local de ligação e a mobilidade restrita do ligante. Apresenta também ligação a sítios externos de proteínas, que estão expostas à fase aquosa, mas a contribuição da fluorescência do ANS a partir dos locais de ligação externos é muito menor quando comparada com a ligação a sítios hidrofóbicos. A capacidade para detectar e caracterizar numerosos locais de ligação (interna e externa) para ANS fornece uma ferramenta valiosa para a análise de uma variedade de ligantes (GASYMOV; GLASGOW, 2007).

Sendo o ANS uma sonda de fácil visualização nos métodos de fluorescência (disponível no laboratório) decidimos utilizá-la para analisar sítios hidrofóbicos de trombina.

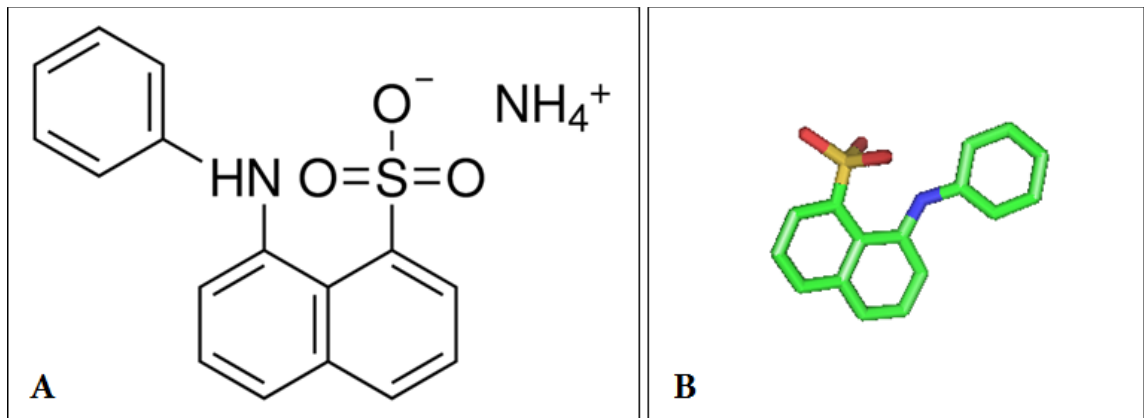


Figura 14 Estrutura de ANS. A) Representação da fórmula estrutural mostrando a presença de um grupo naftaleno e um grupo fenil. **B)** Representação gerada pelo programa Pymol mostrando os carbonos em verde, nitrogênio em azul, enxofre em amarelo e oxigênios em vermelho.

1.5. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE PROTEÍNAS POR CRISTALOGRAFIA E DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A cristalografia é a ciência que estuda o arranjo dos átomos em estado sólido. Antigamente a cristalografia era feita estudando-se os cristais com base em sua geometria, o que envolve a medição dos ângulos das faces cristalinas em relação aos eixos de referência teórica ou eixos cristalográficos, estabelecendo a simetria do cristal.

A cristalografia é, portanto, uma metodologia *ab-initio* que, é fundamental para solucionar uma vasta gama de problemas encontrados na natureza, cuja resolução exige como pré-requisito a determinação das posições atômicas com relativa precisão e a estrutura eletrônica da molécula. Sendo de grande importância para resolução de estrutura de proteínas (SAPIÊNCIA, 2010).

O estudo de cristais de macromoléculas por difração de raios-X é atualmente a principal ferramenta para determinação de estrutura de proteínas. Basta acessar o Protein Data Bank (PDB) para ver que a maioria das estruturas atualmente depositadas foram resolvidas por difração de raios-X.

A cristalografia pode ser considerada o passo mais difícil para determinação da estrutura, visto que a formação de um monocristal de tamanho e qualidade adequados para os experimentos depende de um grande número de parâmetros como pH, temperatura, agente precipitante, solubilidade dentre inúmeros outros (CORDEIRO, 2001).

Para se obter um cristal é necessário acondicionar a macromolécula, de modo que ela passe de um estado “desordenado” e com alta liberdade em solução e se organize em um padrão de interação com suas moléculas vizinhas. Essa organização se dá de tal forma que uma unidade elementar (chamada célula unitária) se repita por todo o cristal, podendo ou não haver translações nos três eixos tridimensionais x, y e z (GIACOVAZZO, 1992).

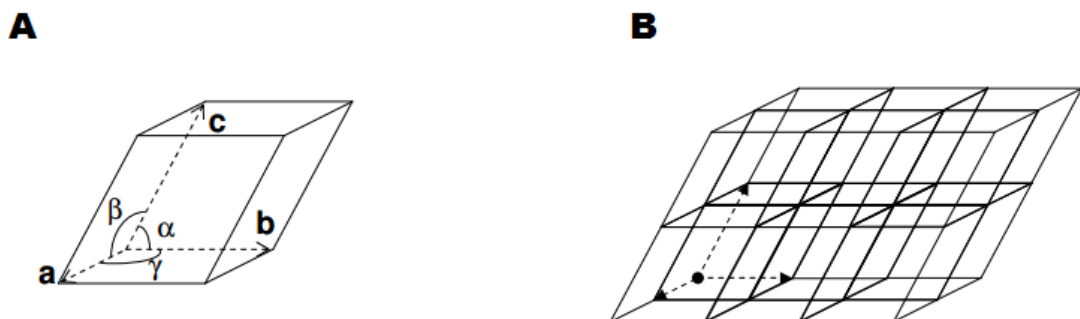


Figura 15 Figura de célula unitária. **A)** Célula unitária demonstrando os parâmetros de célula sendo a, b, e c as dimensões, e α , β e γ os ângulos. **B)** Demonstração de célula unitária dentro da rede cristalina. Adaptado de (DRENTH, 2007).

Após a obtenção do cristal, este é submetido a energia eletromagnética, neste caso uma fonte de raios-X. Essa energia ao incidir no cristal é difratada e chega ao detector onde

é coletada as reflexões. As posições e intensidades dessas reflexões contêm a informação necessária para determinar estruturas moleculares. Esses dados então são analisados pelo cristalógrafo através de diversos programas, específicos para análises cristalográficas, e dão segmento a caracterização do cristal (GLUSKER, 1994).

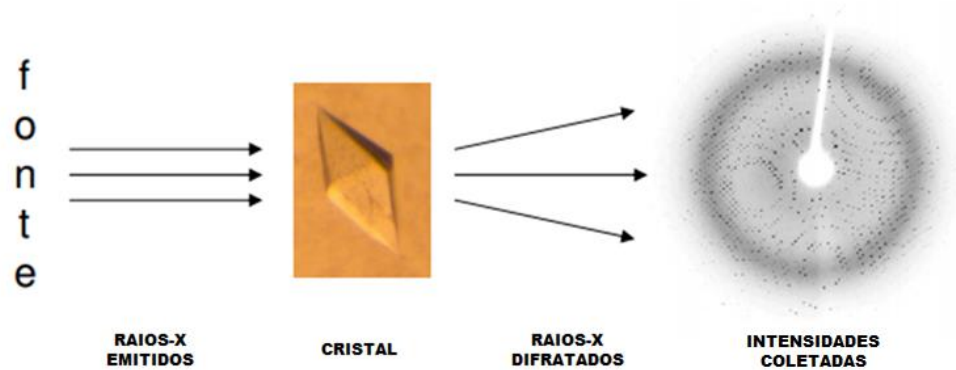


Figura 166 Esquema de coleta de dados Cristalográficos. O cristal difrata o feixe da fonte em vários feixes distintos, cada um dos quais produz uma mancha diferente (reflexão) sobre o detector. As posições e intensidades dessas reflexões contêm a informação necessária para determinar estruturas moleculares. Adaptado de (RHODES, 2006).

Esses dados precisam agora ser analisados quanto aos parâmetros de célula, e para isso são calculadas as dimensões a , b e c ; e os ângulos α , β e γ (chamados de parâmetros de rede), que definem a simetria do cristal (RHODES, 2006).

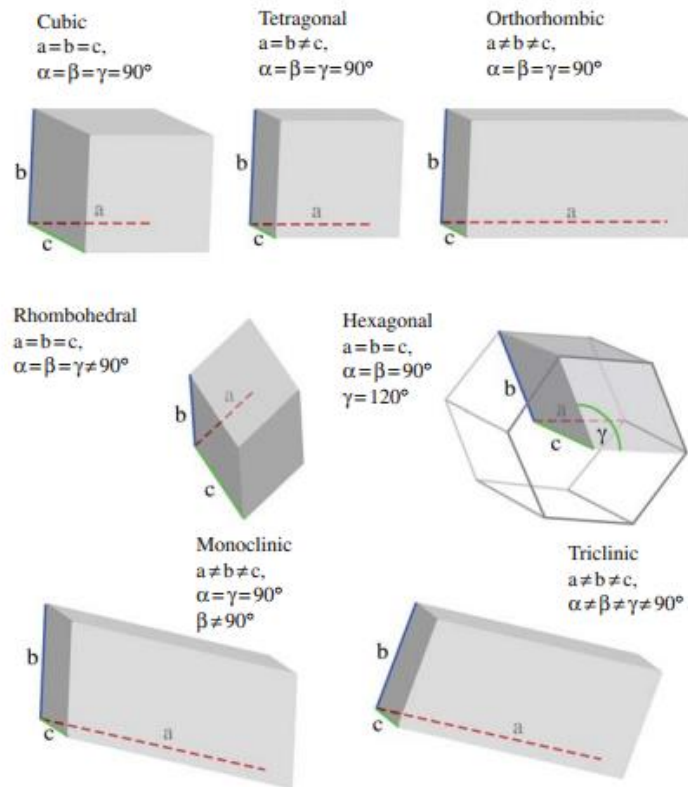


Figura 17 Exemplos de sistemas tridimensionais em cristais. Começando com o mais simétrico (cúbico superior esquerdo) e terminando com o menos simétrico (triclínico inferior direita). Adaptado de (RHODES, 2006)

Com a simetria e os parâmetros de célula definidos faremos a integração dos dados de difração, sendo necessário o cálculo das fases iniciais que não podem ser obtidas do padrão de difração, ocorrendo o “problema das fases”. Para solucioná-lo utilizamos uma molécula que já tem seu cristal resolvido e apresenta estrutura similar com a qual estamos estudando. No caso de não ter ideia de como é a estrutura da molécula em estudo testam-se algumas que sejam semelhantes com o mapa de densidade eletrônica (GLUSKER, 1994).

Todo o processo de integração e cálculo das fases é feito através de programas computacionais como os da plataforma *ccp4* (visualizado em <http://www.ccp4.ac.uk/>) ou *Phenix* (visualizado em <http://www.phenix-online.org/>). Sendo assim podemos construir um modelo estrutural da molécula e ir refinando até o mapa de densidade eletrônica ficar o mais próximo possível do esqueleto da molécula (*Backbone*) (GLUSKER, 1994).

A estrutura tridimensional das macromoléculas com resolução atômica, o que chamamos de estrutura cristalográfica entra como uma informação essencial para o

entendimento detalhado de vários processos biológicos como catálise enzimática e infecção viral, dentre outros.

A cristalografia de macromoléculas é a ciência que se destina a estudar sistemas biológicos através da determinação estrutural em nível atômico de importante classes de moléculas biológicas como as proteínas . Os primeiros trabalhos publicados na área foram na década de 50 por Perutz e Kendrew com as estruturas da hemoglobina e da mioglobina, desde então sua utilização e aplicabilidade tem avançado muito no decorrer dos anos (NONATO, 1997)

A determinação da estrutura cristalográfica de uma proteína tem contribuído substancialmente para o planejamento racional de fármacos e vacinas, onde a resolução de estruturas de complexos proteína:ligante são fundamentais para a descoberta de inibidores ou até mesmo moléculas que possam potencializar determinada ação. Isso se explica pois a estrutura e função de uma proteína estão intimamente relacionadas, onde os segredos dos mecanismos de reconhecimento e respostas das macromoléculas biológicas dependem de suas estruturas químicas, e com mesmo grau de importância de suas estruturas tridimensionais (DRENTH, 2007).

2. OBJETIVOS GERAIS

Realizar avaliação estrutural cristalográfica de trombina humana nativa e sua interação com potencial ligante modulador alostérico.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar *screening* de compostos fragmentos (pequenas moléculas) como potenciais ligantes de trombina visando identificar novos modos de ligação;
- Caracterizar estruturalmente por cristalografia a interação de trombina humana nativa com ANS;
- Caracterizar funcionalmente a interação de ANS com trombina humana nativa através de ensaios de ligação e enzimáticos com substratos cromogênico (S2238) e natural (fibrinogênio).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. MATERIAL

O plasma humano utilizado para purificar α Th foi obtido por meio de doação junto ao banco de sangue do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ.

O fibrinogênio e o PPACK (Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) foram obtidos da Calbiochem (EUA). Os *kits* utilizados para o *screening* cristalográfico inicial foram da Hampton Research (EUA), sendo eles *Cristal Screen 1 e 2* (CSI e CSII) com 50 e 48 condições respectivamente, *Peg/Ion Screen 1 e 2* (PISI e PISII) com 48 condições diferentes cada, e ainda o *Peg/RX 1 e 2* (PRXI e PRXII) que também apresenta 48 condições diferentes cada, totalizando 290 condições de cristalização distintas.

O Ácido 8-anilino-1-naftalenossulfônico (ANS) utilizado foi o *Sigma*[®] Cat # A-3125 e o S-2238 (H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-p-nitroanilina-dihidroclorido) foi o *Chromogenix*[®].

Os demais reagentes foram de padrão analítico.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Purificação de α Trombina humana

A purificação foi realizada baseando-se no método de (NGAI; CHANG, 1991) com algumas adaptações. Este método permite a ativação do zimogênio diretamente em uma fração de plasma rica em protrombina, e necessita de apenas um processo cromatográfico para separação, como é descrito a seguir.

3.2.1.1. Fracionamento do plasma

Para iniciar descongelou-se o plasma a 37°C em banho-maria, transferiu-se o material para um béquer plástico e agitou-se continuamente em câmara refrigerada a 4°C. Em seguida fez-se a adição de benzamidina (C₇H₈N₂) para 5mM de concentração final, e 60mL de Cloreto de Bário 1M (BaCl₂) (com uma proporção sal/plasma de 1:20 v/v) com auxílio de bomba peristáltica e fluxo de aproximadamente 1,5mL/minuto ou 1mL/40 segundos. Os fatores da coagulação tem afinidade por sais de bário e magnésio, esse processo é feito para adsorção da protrombina ao bário. Após isso se realizou a primeira centrifugação, por 30 minutos a 4500 rpm e 4°C. Prosseguiu ressuspensando o *pellet* em 300mL de tampão A (tabela 1) para lavar o *pellet* e novamente centrifugamos por 30min /4500rpm /4°C.

Ressuspendeu-se o pellet em 80mL de EDTA 0,2M pH 7,5 (o pellet poderia se mostrar gelatinoso, caso o pH ficasse fora desta faixa).

Tabela 1 Tampões usados nas etapas de purificação de α Th.

Tampão A	Tris-HCl 20mM	NaCl 150mM	EGTA 1mM	BaCl ₂	Benzamidina 5mM	pH 7,5
Tampão B	Tris-HCl 20mM	NaCl 150mM	EGTA 1mM	EDTA 0,1M	pH 7,5	
Tampão C	Tris-HCl 20mM	NaCl 150mM	EGTA 1mM	pH 7,5		
Tampão D	Tris-HCl 20mM	NaCl 150mM	EGTA 1mM	pH 7,6		
Tampão E	Tris-HCl 20mM	NaCl 150mM	EGTA 15mM	pH 7,7		
Tampão F	Tris-HCl 20mM	NaCl 1M	EGTA 15mM	pH 7,8		

A solução viscosa e opaca foi dialisada por 8h contra 1L de tampão B (tabela 1) em câmara fria e sob agitação. A solução de diálise foi trocada por 2L de tampão C (tabela 1) e ocorreu *over night (o/n)* também em câmara fria sob agitação. Foi realizada a precipitação do material pós-diálise com 24,96g de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ (0-35% de saturação), agitando e mantendo refrigerado a 4°C, o que durou aproximadamente 40 minutos. O material foi centrifugado por 30min /8000rpm /4°C, o precipitado foi desprezado e ao sobrenadante foram adicionados 28,56g de sulfato de amônio (35-70% de saturação) a adição do sal durou aproximadamente 40 minutos. Novamente o material foi centrifugado 30min /8000rpm /4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 30mL de tampão D (tabela 1). Posteriormente foi realizada a diálise *o/n* contra 1L do mesmo tampão. No dia posterior foi trocado o tampão da diálise por 1,6L do mesmo tampão D, etapa que foi repetida no dia seguinte. O material dialisado foi centrifugado por 40min /12000rpm /4°C. esse sobrenadante é guardado para ativação.

3.2.1.2. Ativação da protrombina

Segundo (MEAUME, 1966), a protrombina pode ser clivada e ativada por componentes do veneno de cobra, utilizamos assim esta técnica para formação de α Th.

Incubamos o sobrenadante com o veneno de *Oxyuranus sutellatus* (1/80 p/p ou 1mg de veneno /L de Plasma) (240 μ L de solução estoque a 5mg/mL) por 50min a 36°C. Interrompemos a reação com 0,3g de EGTA preparado em 1mL de NaOH 1N (pH 8, ajustado com NaOH 6M).

Para nos certificarmos que a ativação foi bem sucedida, medimos a atividade frente ao peptídeo cromogênico S-2238, que gera uma cor amarela de intensidade proporcional a atividade enzimática.

3.2.1.3. Eluição em coluna de sepharose heparina

Colocamos o material em coluna de heparina-sepharose previamente equilibrada com tampão E (tabela 1), em condições refrigeradas com auxílio de gelo. Incorporamos a solução proteica com o auxílio de bomba peristáltica, fluxo de 30mL/h. Lavamos a coluna com o mesmo tampão E *o/n* com fluxo de 30mL/h. Eluímos usando um gradiente: 100mL de tampão E e 100mL de tampão F (tabela 1), com intuito de retirar sal da solução. Coletamos frações de 4mL em tubos plásticos com 40uL de MES 1M em cada. Monitoramos todas as frações através da absorvância a 280nm (figura 18).

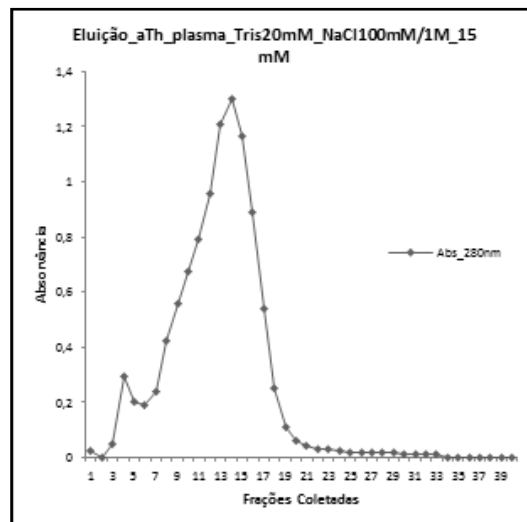


Figura 18 Gráfico da eluição por gradiente realizada. Mostrando a absorvância a 280nm das frações de 1 a 40, onde pode ser observado um pico mais proeminente entre as amostras 7 a 19.

3.2.2. Concentração e Quantificação

Após a eluição por gradiente em coluna de cromatografia de afinidade, reunimos as frações correspondentes ao pico de absorvância (amostras 7 a 19; Figura 18).

Concentramos a proteína por centrifugação em sistema *Amicon* (que consiste em uma membrana de filtração acoplada a um tubo plástico de aproximadamente 60mL ou um microtubo de aproximadamente 1mL para concentração de proteínas) até a obtenção de concentração aproximada de 6,5mg/mL, o que foi observado em espectrofotômetro a 280nm após diluir o concentrado por 20 vezes. Consideramos também a absortividade como 1,82 mg/(mL.cm) e a massa molecular da trombina 33600 Da.

Obtivemos por purificação aproximadamente 22mg de proteína por 1,2L de plasma.

3.2.3. Avaliação de pureza

A pureza da proteína foi avaliada após a purificação por SDS-PAGE 15% (JEFFREY, 1997)(Figura 19). Estocamos a amostra a -70°C , em tubos com alíquotas de 1,0mL cada.

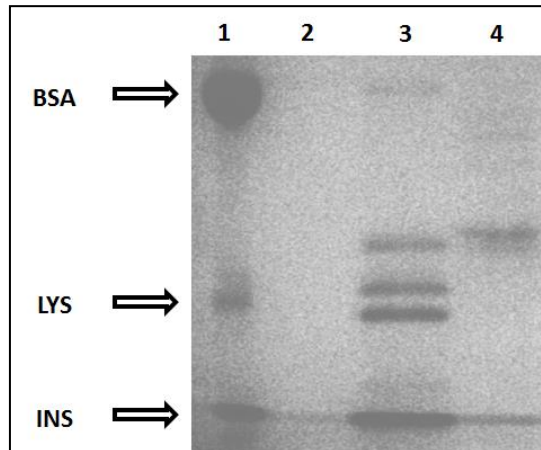


Figura 19 Recorte de gel SDS-PAGE 15% da purificação de αTh . poço 1: Padrão de peso molecular com albumina (BSA - 66 kDa), lisozima (LYS - 14 kDa) e insulina cadeia B (INS - 3,5 kDa); poço 2: vazio; poço 3: antes da ativação de protrombina; poço 4: proteína purificada.

3.2.4. Atividade enzimática de αTh

A atividade enzimática foi medida através da determinação da velocidade inicial de clivagem do substrato cromogênico S-2238 ou coagulação do substrato natural fibrinogênio onde um rápido aumento na absorvância após a fase lag indica clivagem ou coagulação proporcional à intensidade de cor (RIBEIRO, *et. al.* 1995). Essa medida foi realizada em leitor de microplacas VersaMax, utilizando o software Softmax Pro 5.4.

3.2.4.1. Atividade sobre substrato cromogênico (S-2238)

O substrato foi diluído 6 vezes utilizando diluição seriada de 100 até 1,6 no tampão 20mM Tris/150mM NaCl/pH 7.4 (como mostrado na tabela 2) e incubado por 5 minutos, após esse tempo foi adicionada a αTh na concentração de 50nM diluída no mesmo tampão. A atividade foi avaliada durante 30 minutos (Figura 20A). A velocidade de clivagem foi determinada através do coeficiente angular da reta que tangencia a curva de variação na

absorvância a 405nm em intervalos de 9 segundos (Figura 20B). Para cada concentração diferente de substrato, foram feitas medidas em duplicata.

Tabela 2 Esquema de montagem da placa de ensaio para medida de atividade α Th/S-2238. Onde temos uma diluição seriada do substrato S2238 e retiramos metade do volume do poço anterior para completar o próximo na sequência de 1 a 8.

	vol total poço (uL)	vol tampão (uL)	vol. α Th (uL)	vol. S2238 (uL)	α Th nM	[S2238] uM
1	102	50	2	50	1	100
2	102	50	2	50	1	50
3	102	50	2	50	1	25
4	102	50	2	50	1	12,5
5	102	50	2	50	1	6,3
6	102	50	2	50	1	3,1
7	102	50	2	50	1	1,6
8	102	50	2	50	1	0

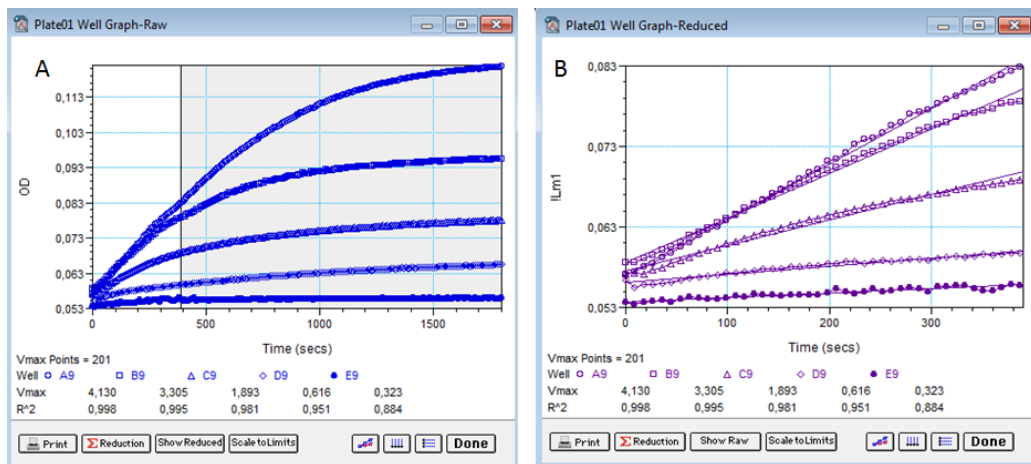


Figura 20 PrintScreen do ensaio de medida de atividade de α Th contra S-2238. A) Poços A9-E9 mostrando as curvas de densidade óptica em aparelho VersaMax. B) Zoom do ápice da curva onde mediu-se os coeficientes angulares.

Vmax		Plate01					
		9	10	11	12		
A		4,130	3,982	0,373	0,396	Kinetic Time: 30:00 Interval: 0:09 Reads: 201 Lm1 405 Automix: Once Calibrate: Once Lag Time: 0:00 End Time: 6:30 OD Min: 0 OD Max: 1 Vmax Pts: 201/201	Start Read: 11:15 05/07/2012
B		3,305	3,119	0,369	0,312		
C		1,893	1,746	0,163	0,239		
D		0,616	0,693	0,213	0,128		
E		0,323	0,270	0,229	0,051		
F		0,092	0,094	0,154	0,046		
G		0,033	0,037	0,010	0,013		
H		0,038	-0,034	-0,014	-0,018		
Wavelength Combination: !Lm1 Temperature Set Point: 37,0 Mean 37,0 Range 36,9 - 37,1 Data Type: Absorbance Reader: SPECTRAmax M5 ROM v2.1.35 20May09							

Figura 21 Parâmetros de medida no programa Softmax[®] Pro 5.4. *PrintScreen* do ensaio realizado mostrando os parâmetros utilizados, em destaque os poços exemplificados na figura 21.

3.2.4.2. Atividade sobre substrato natural (fibrinogênio)

A proteína foi incubada a 37°C por 5 minutos em uma concentração de 4nM diluída em tampão 20mM Tris/150mM NaCl/pH 7.4, o fibrinogênio foi adicionado a 2mg/mL (conforme tabela 3) em duplicata. A atividade foi avaliada durante 30 minutos (Figura 23). A velocidade de coagulação foi determinada através do coeficiente angular da reta que tangencia a curva de variação na absorbância a 405nm em intervalos de 9 segundos.

Tabela 3 Esquema de montagem da placa em duplicata para medida de atividade α Th/Fibrinogênio.

	vol. Total do poço (uL)	Tris20mM NaCl150mM (uL)	α Th 4nM (uL)	Fibrinogen 2mg/mL (uL)
1(A9)	100	25	25	50
2(A10)	100	25	25	50

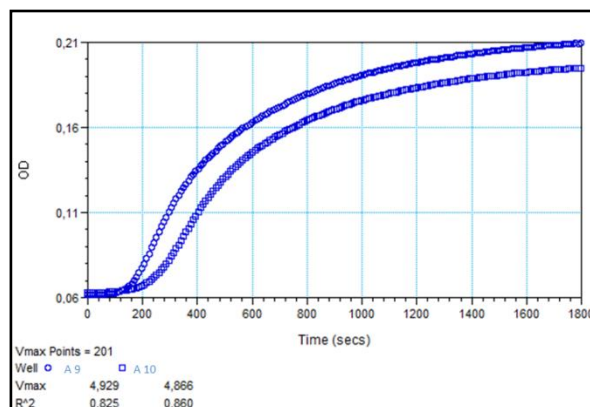


Figura 22 *PrintScreen* de ensaio de atividade de α -Trombina humana contra substrato natural fibrinogênio.

3.2.4.3. Avaliação de atividade de α Th/substrato em presença de ANS

O ANS é uma sonda fluorescente comumente utilizado em estudos de mudanças conformacionais de proteínas (quando passam de formas globulares para não globulares e vice-versa), devido a sua elevada afinidade por proteínas parcialmente enoveladas, e bolsões hidrofóbicos. Além de intermediários de dobramento, a ligação ANS serve como um instrumento sensível para a detecção de conformações deformadas, tais como aquelas a acumular durante a agregação da proteína e na formação de fibras (LATYPOV et al., 2008).

A influência do ANS sobre a atividade de α Th foi medida adicionando aos ensaios de atividade α Th/S2238 e α Th/fibrinogênio, quantidades fixas e variáveis do reagente.

3.2.5. Proporção estequiométrica entre α Th e ANS

Para se avaliar a relação estequiométrica entre α Th e ANS, utilizamos ensaios de fluorescência em aparelho Jasco FP-6300 com parâmetros de excitação 360nm, emissão de 400 a 600nm, fendas 5/5, sensibilidade *light* e resposta *medium*. Foram realizados dois ensaios, um com [ANS] acima da constante de equilíbrio onde fizemos a adição da enzima (dados não mostrados) e no outro com saturação de proteína (bloqueada e não bloqueada) onde se adicionou ANS.

Em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico foi adicionada 50 μ L da solução contendo a proteína a uma concentração final de 50 μ M em 150 μ L tampão Tris-HCl 20mM/ NaCl 150mM/ pH 7,4. O ANS foi adicionado aos poucos (Tabela 4), e coletados os valores da intensidade de fluorescência. A intensidade de fluorescência do ANS sem a proteína também foi medida, na mesma concentração completando com o tampão para 200 μ L.

Tabela 4 Demonstração dos dados da titulação isotérmica entre ANS e trombina monitorados pela intensidade de fluorescência de ANS. Onde a solução de ANS era adicionada a cubeta e após rápida agitação com a micropipeta media-se a intensidade de fluorescência da mistura α Th:ANS.

Vol de ANS add (uL)	[α Th] (μ M)	[ANS] (μ M)	Vol final (μ L)
0	50,0	0,0	200
1	49,8	8,2	201
2	49,5	16,3	202
3	49,3	24,4	203
4	49,0	32,4	204
5	48,8	40,2	205
6	48,5	48,1	206
8	48,1	63,5	208
10	47,6	78,6	210
12	47,2	93,4	212
14	46,7	107,9	214
16	46,3	122,2	216
18	45,9	136,2	218
20	45,5	150,0	220

3.2.6. Análises Cristalográficas

A cristalografia é uma técnica muito 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 próximas ou superiores a 1,0 Å).

A cristalografia foi tema de estudo de pós-doutorado do Prof. Luís Maurício Lima e hoje essa técnica é rotineiramente aplicada em nosso laboratório.

3.2.6.1. Crescimento do Cristal

Em um ambiente sem ruídos ou perturbações e climatizado (aproximadamente 20°C), a solução proteica foi colocada para precipitar primeiramente em sistema *sitting-drop*, para realizar uma *screening* (varredura), que consiste em preencher os poços maiores da placa (placa multipoços-96/3 - 3 Well Crystallization Plate - Swissci Hampton Research[®]) (Figura 24) com 80 μ L de solução precipitante (usamos 6 conjuntos de kits Hampton Research[®]), após isso pipetou-se 2 μ L da solução proteica no menor poço e adicionou 2 μ L da solução do poço maior correspondente, no final fez-se uma tampa com adesivo transparente para vedar os poços e assim ocorrer fenômenos de difusão de vapor entre os poços (menor e maior), fenômenos estes necessários à precipitação da proteína. O adesivo transparente é necessário para visualização do crescimento de cristais na placa em uma lupa apropriada. Sendo que todo esse processo foi registrado para futura rastreabilidade.

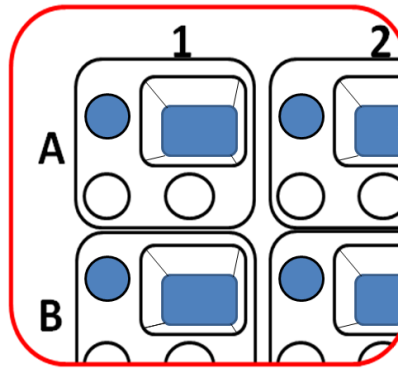


Figura 23 Diagrama de placa 96/3 poços no método *sitting-drop*. Destaque para o poço A1 onde o quadrado simboliza o poço maior (aproximadamente 100 μ L de volume total) e os 3 círculos simbolizam onde fica a “gota sentada”(aproximadamente 5 μ L de volume total).

Após a realização da varredura, aqueles poços em que houve crescimento mais promissor de cristal, foram colocados para crescer novamente, agora no sistema *hanging-drop*. Esse sistema consiste em poços maiores com 400 μ L de solução precipitante e uma lamínula onde pipeta-se 2 μ L da solução proteica com mais 2 μ L da solução precipitante do poço correspondente. Para vedar a placa usa-se pasta de silicone entre o poço e a lamínula que é colocada com a gota “pendurada” para dentro do poço. Esse método também se baseia em difusão de vapor de solvente entre a gota e o poço (figura 25).

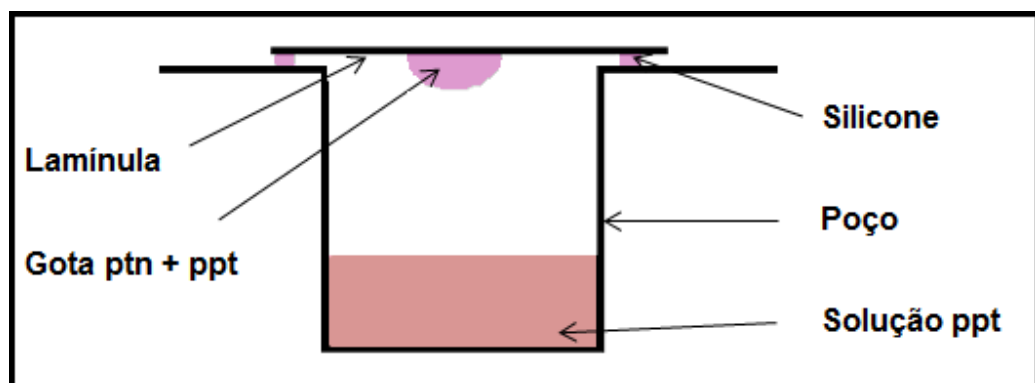


Figura 24 Diagrama de poço no método *Hanging-Drop*. Onde ptn = solução proteica e ppt = solução precipitante. Adaptado de(DANTAS et al., [s.d.]).

3.2.6.2. Análise dos conjuntos de dados.

A determinação de parâmetros de célula do grupo espacial e coleta de dados de difração foram realizados no difratômetro supernova (*agilent*) do INMETRO (Instituto

Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - polo Xerém - Duque de Caxias /RJ), congelados sob jato de nitrogênio gasoso a 100 K, e coletados com fonte de CuKalfa (1,5418 Å) por exposição tipicamente de 5 min, oscilação de 1°C / imagem. Ou também congelados previamente em nitrogênio líquido e levados a difração no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, conforme submissão e aprovação de projeto de pesquisa na linha MX2 com comprimento de onda 1,4610 Å, sob jato de nitrogênio gasoso a 100 K, por exposição tipicamente de 1 min, oscilação de 1°C (GUIMARÃES, et. al. 2009).

Os dados foram processados no CrysAlis^{Pro} (AGILENT TECHNOLOGIES, 2011) ou no Mosflm (LESLIE, 1992). Após indexação e integração, os dados foram escalonados no scala ("The CCP4 suite", 1994) e posteriormente levados a substituição molecular empregando-se o programa MolRep (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997) e a estrutura de trombina bloqueada com PPACK (1PPB.pdb). As melhores soluções foram avaliadas visualmente quanto a erros de no mapa de densidade eletrônica, empacotamento e rede usando Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004) e seguidas para refinamento em espaço recíproco usando refmac (MURSHUDOV; VAGIN; DODSON, 1997), seguidos por refinamento em espaço real novamente com Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004).

Os cristais de complexo trombina:ANS foram obtidos por imersão (*soaking*) de ANS pó na gota contendo cristal de trombina já formado, e incubando-se por 3 a 8 dias a 25°C antes de proceder com a coleta de dados de difração. O ligante foi modelado na estrutura resolvida de trombina em uma gota de densidade eletrônica no mapa de diferença de 3 sigma ou mais e que fosse compatível com as dimensões do ligante e nenhum outro potencial ligante advindo das condições de cristalização (PALMIERI et al., 2013).

4. RESULTADOS

4.1. ENSAIOS CRISTALOGRAFICOS DE TROMBINA LIVRE

Foi realizada ampla varredura cristalográfica onde incubamos a α -Trombina humana com 290 condições diferentes dos kits *Hanptom*. Após esses ensaios as condições mais promissoras para crescimento de cristal foram os descritos na tabela 5, com destaque para a condição CSI-06, a qual demos prosseguimento na resolução da estrutura.

Tabela 5 Ensaio cristalográficos realizados onde houve crescimento de cristal. Destaque na primeira linha para a condição Cristal Screen I 06 (CSI-06), que tem os resultados apresentados a seguir.

Cond	Sal	Precipitante	Solução tampão	pH	Linha de Luz	Dataset	Res.(Å)	Grupo Espacial
CSI-06	0,2 M MgCl (6H ₂ O)	30% p/v PEG 4000	0,1 M Tris-HCl	8,5	MX2	02	1.8	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
CSI-10	0,2 M NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂	30% p/v PEG 4000	0,1 M Na C ₂ H ₃ O ₂ (3H ₂ O)	4,6	Supernova	-	-	-
CSI-13	0,2 M Citrato de Na (2H ₂ O)	30% p/v PEG 400	0,1 M Tris-HCl	8,5	Supernova	-	-	-
CSI-14	0,2 M CaCl ₂ (2H ₂ O)	28% p/v PEG 400	0,1 M HEPES	7,5	Supernova	-	-	-
CSI-16	-	1,5 M LiSO ₄ (2H ₂ O)	0,1 M HEPES	7,5	Supernova	-	-	-
CSI-22	0,2 M Na C ₂ H ₃ O ₂ (3H ₂ O)	30% p/v PEG 4000	0,1 M Tris-HCl	8,5	Supernova	-	-	-
CSI-28	0,2 M Na C ₂ H ₃ O ₂ (3H ₂ O)	30% p/v PEG 8000	0,1 M Cacodilato Na (3H ₂ O)	6,5	Supernova	-	-	-
CSI-41	-	20% p/v PEG 4000 + 10% p/v 2-Propanol	0,1 M HEPES	7,5	Supernova	-	-	-
CSI-45	Zn C ₂ H ₃ O ₂ (H ₂ O)	18% p/v PEG 8000	0,1 M Cacodilato Na (3H ₂ O)	6,5	Supernova	-	-	-

4.2. INFLUÊNCIA DO ANS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Em nosso grupo já mostramos que a trombina é capaz de interagir com a sonda ANS e seu análogo bis-1,8-ANS (LIMA et al., 2004). Desta forma, resolvemos observar de que modo este composto poderia afetar a conformação e função de trombina. Para isso, realizamos ensaio de atividade enzimática de trombina frente aos substratos natural (fibrinogênio) e cromogênico (S-2238).

A medida frente ao substrato natural não foi possível de ser realizada visto que, em experimentos controle, observamos a interação direta de ANS com o fibrinogênio, o que impossibilitaria atribuir a origem do efeito de ANS, se via trombina, fibrinogênio ou ambos. Desta forma, empregamos medida de atividade enzimática frente ao substrato cromogênico S-2238, que há décadas é um composto de referência em ensaios funcionais de trombina (LIMA et al., 2009).

Medimos a velocidade enzimática de trombina em variadas concentrações de ANS (α Th 5nM /S2238 200 μ M em tampão Tris 20mM/NaCl 150mM pH 7,4). Observamos um decréscimo na atividade de trombina (Figura 25) com concentrações a partir de 0,1 μ M, resultando em um IC₅₀ aparente de 42,93 + ou - 8,6 μ M. É importante notar que a despeito da aparente baixa afinidade e eficácia, ANS representa um ligante pequeno e com apenas um grupamento iônico (sulfonato) e um outro capaz de realizar ligações de hidrogênio (amino).

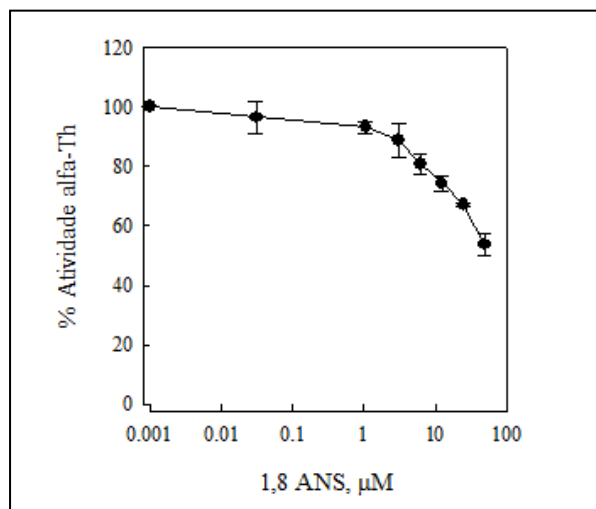


Figura 25 Atividade enzimática Trombina x 1,8-ANS. Parâmetros: α Th 5nM /S2238 200 μ M em tampão Tris 20mM/NaCl 150mM pH 7,4.

A fim de investigar o mecanismo de inibição de trombina por ANS, investigamos a dependência da concentração de ligante na atividade frente ao substrato S-2238.

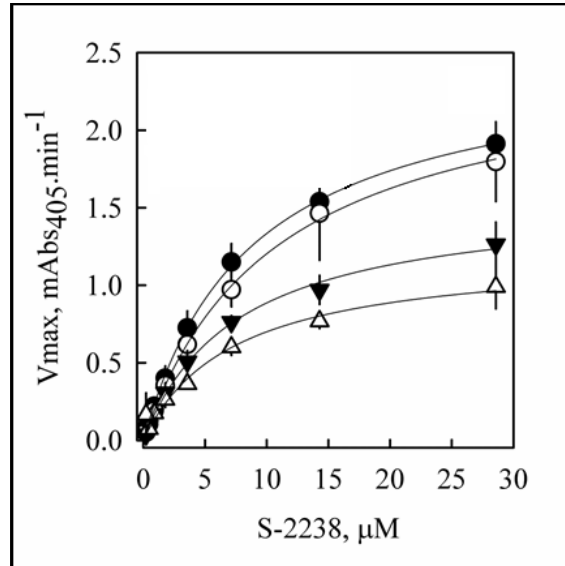


Figura 26 Gráfico Vmax x [S-2238], Abs a 405nm. ● Ausência de ANS; ○ 25μM de ANS; ▲ 50μM de ANS; △ 100μM de ANS.

Como pode ser visualizado na figura 26, à medida que ocorre um aumento na concentração de ANS, a Vmax (velocidade máxima) aumenta com menor intensidade, isso reflete a clivagem do substrato cromogênico. Isso caracteriza uma inibição por parte do ANS que ao se ligar a proteína diminui a taxa de clivagem ao substrato.

A partir dos ensaios de atividade enzimática com S-2238 e fibrinogênio, foram observadas em todas as repetições uma relação inibitória reversível do tipo não-competitiva entre a proteína e o ligante. Essa inibição ocorre quando o inibidor liga-se em um local diferente do sítio ativo ao qual se liga o substrato (NELSON; COX; LEHNINGER, 2005). Utilizando os parâmetros da cinética do estado estacionário na presença de um inibidor não-competitivo segundo Michaelis-Menten, temos.

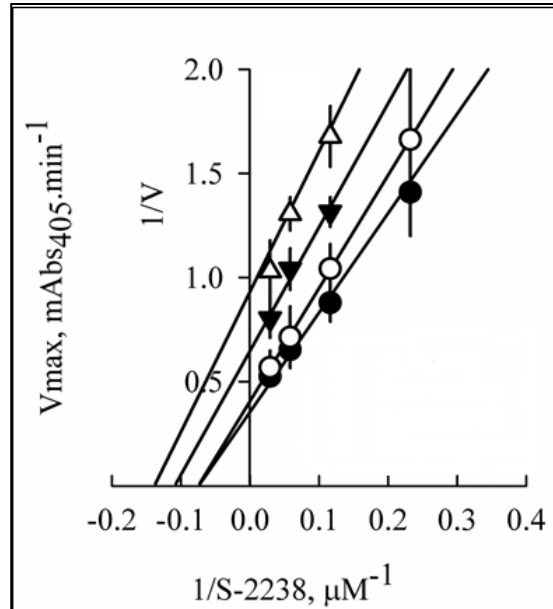


Figura 27 Gráfico $1/V \times [1/S-2238]$, Abs a 405nm. ● Ausência de ANS; ○ 25 μ M de ANS; ▲ 50 μ M de ANS; △ 100 μ M de ANS.

A figura 27 mostra um gráfico duplo recíproco (Michaelis-Menten), onde o aumento na concentração do inibidor (0 /25 μ M /50 μ M /100 μ M-ANS) resulta em um conjunto de retas que indicam uma inibição do tipo não-competitiva (NELSON; COX; LEHNINGER, 2005).

4.3. INTERAÇÃO ENTRE ALFA TROMBINA HUMANA E 1,8-ANS

Como pode ser observada na figura 28, a intensidade máxima de fluorescência de ANS antes de colocar a proteína e após adicioná-la, sofre um deslocamento para o vermelho, indicando que o ANS se ligou a proteína e sofreu influência de uma região mais hidrofóbica do que quando estava livre em solução.

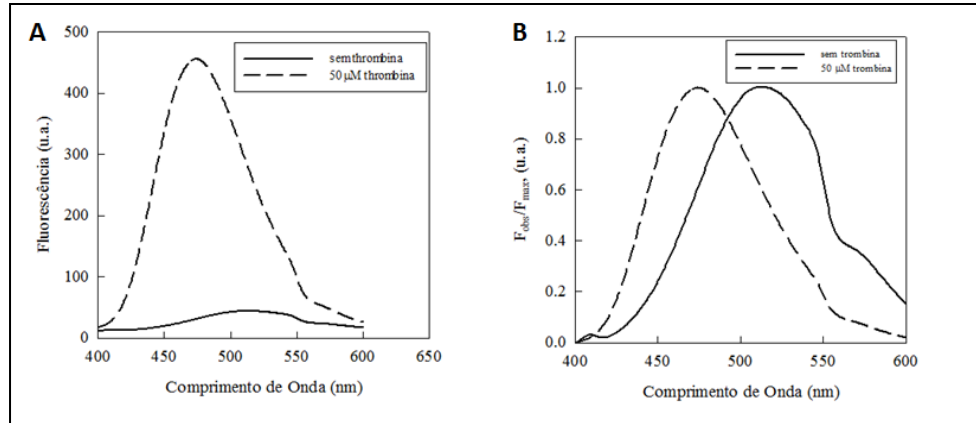


Figura 28 Gráficos $F_{ANS} \times [\alpha Th]$. Comparação entre intensidade de fluorescência do ANS na presença 50 μ M (linha tracejada) e ausência de α Th (linha contínua), antes e após a comparação entre as intensidades máximas. Demonstrando que ocorre um deslocamento de λ da intensidade de fluorescência máxima de ANS.

A fim de investigar a afinidade de interação entre trombina e ANS realizamos ensaio de titulação isotérmica monitorada através da fluorescência do ANS. Trombina foi incubada com concentrações crescentes de ANS, resultando em um progressivo aumento da fluorescência apresentando ainda um desvio dessa curva. Através de ajuste de ligação simples pudemos determinar a constante de dissociação (K_d) como sendo de aproximadamente 5,0 μ M (Figura 29).

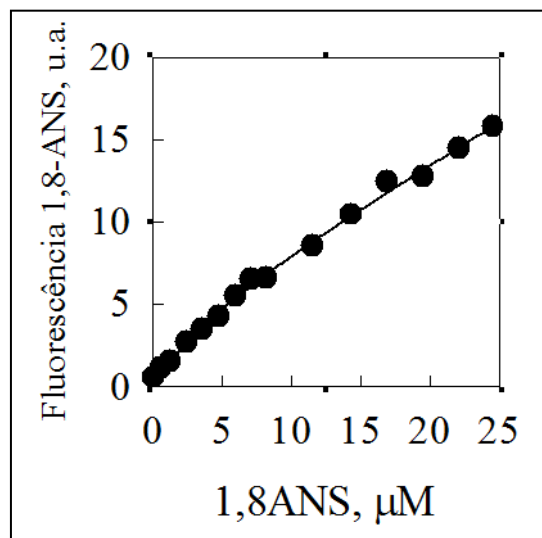


Figura 29 Titulação isotérmica de trombina com ANS. 50 μ M de trombina foi incubada seguido de aumento progressivo da concentração de ANS monitorado por sua fluorescência. Linha representa melhor ajuste para função hiperbólica de 4 parâmetros. Ensaio realizado em tampão 20mM Tris-HCl/ 150mM NaCl/ pH 7,4 a 25 °C.

Para fazer a medida da estequiometria de ligação entre ANS/ α Th monta-se o ensaio com uma solução onde um dos ligantes está em concentração acima da constante de equilíbrio (no caso a proteína), e adiciona o outro ligante lentamente até que o primeiro seja consumido e ocorra uma brusca inflexão na curva. Este ponto de inflexão, em condições perfeitas, seria a estequiometria da equação entre esses ligantes.

Realizamos assim o mesmo ensaio de interação por titulação isotérmica de trombina com ANS, monitorando sua fluorescência. Neste ensaio trombina estava a uma concentração de 50 μ M, 10 vezes acima do Kd previamente calculado, assegurando assim uma condição de ensaio estequiométrico.

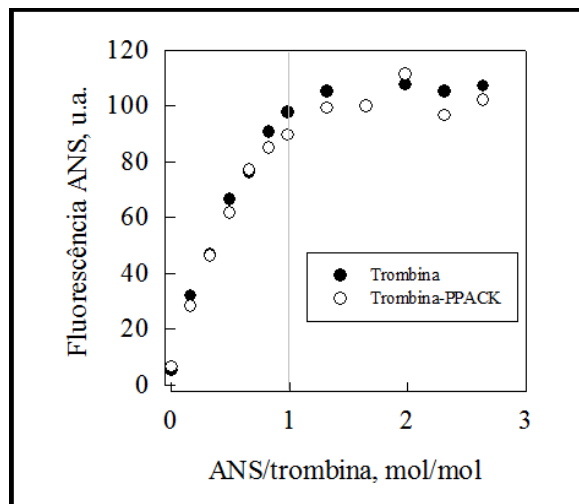


Figura 30 Gráfico de titulação estequiométrica. Que mostra na estequiometria da reação (proporção entre os reagentes) no momento em que a curva tende a ficar constante. ● α Th livre; ○ α Th-PPACK.

Na figura 30 podemos observar que o ponto de inflexão ocorre na relação 1:1, tanto para proteína bloqueada como para não bloqueada. Esse resultado indica que ANS interage com trombina em sítio distinto do catalítico. Em conjunto esses dados indicam que ANS caracteriza-se como um ligante inibidor alostérico de trombina do tipo não-competitivo, com estequiometria de 1:1.

4.4. ESTRUTURA DE ALFA TROMBINA HUMANA E 1,8-ANS

A estrutura de trombina (bloqueada no sítio ativo com PPACK) em complexo com ANS foi obtida por cristalização de trombina na condição original CSI-06, seguido por adição

direta à gota de ANS (sal de amônio) sólido. Após 3 dias os cristais foram congelados e levados à difração no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, na linha de luz MX2. Após ser colocado no difratômetro podemos observar que o cristal apresentou coloração esverdeada característica que indica a presença de ANS (que tem essa coloração), visto que normalmente os cristais não apresentam tal coloração (figura 31).



Figura 31 Imagem do cristal de trombina em complexo com 1,8-ANS (em HCSI06). Montado no loop de nylon sob atmosfera de $N_2(g)$ a 100K no goniômetro da linha de luz MX2 do LNLS durante a coleta de dados de difração de raios-X.

Os cristais foram difratados sob atmosfera de N_2 gás a 100 K. A estrutura de trombina em complexo de ANS revelou pertencer ao grupo espacial $P2_12_12_1$, com parâmetros $a=44.31$, $b=73.32$, $c=86.94$ (ângulos 90° , 90° , 90° como do grupo). A resolução máxima atingida foi de aproximadamente $1,8 \text{ \AA}$ (figura 32), sendo uma resolução ótima para resolvermos estruturas de proteínas.

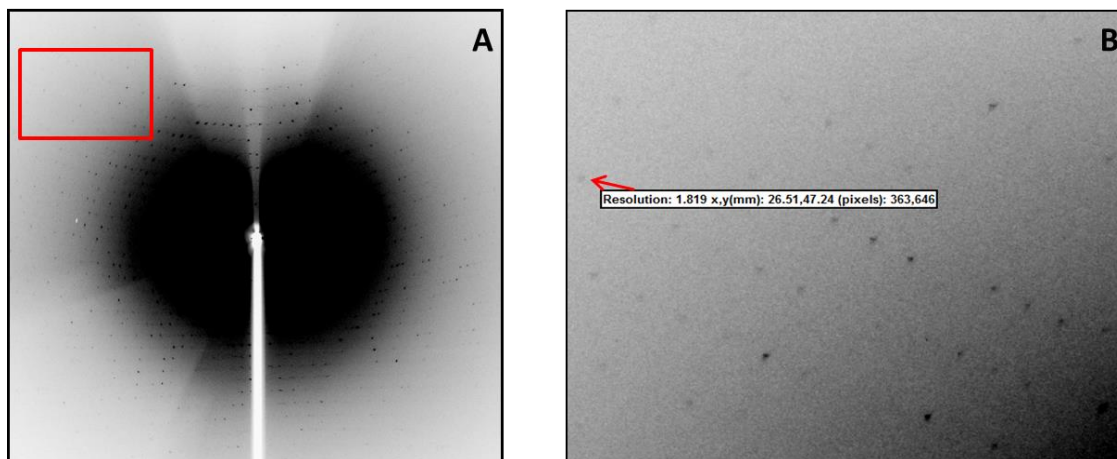


Figura 32 Imagem de difração de Raio X. A) Imagem de difração mostrando o padrão de difração com intensidades decrescentes do centro para extremidades, sendo a marca branca a sombra do *bean stopper*. **B)** Zoom da região demarcada com um quadrado vermelho na figura A, mostrando que houve difração em resoluções perto de 1.8 Å.

A estrutura foi resolvida usando Phaser (MCCOY et al., 2007) e o modelo de trombina humana 1PPB.pdb (BODE; TURK; KARSHIKOV, 1992). A solução obtida foi inspecionada em espaço real usando Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004) e observou-se adequado empacotamento cristalino, sem *gaps* nem *clashes* entre os simétricos. Após refinamento em espaço real, passou-se a um ciclo de refinamento em espaço recíproco com corpo rígido empregando Refmac5 (VAGIN et al., 2004). Novamente a estrutura foi inspecionada e refinada em espaço real empregando-se Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004) seguido por refinamento restrito com Refmac5 (VAGIN et al., 2004). Após 3 ciclos de refinamento pôde-se identificar um *blob* correspondente à glicosilação de trombina junto à Asn154, mas sendo possível observar-se apenas o primeiro açúcar de NAG (dados não mostrados). Pode-se ainda detectar-se outro *blob* de densidade eletrônica incompatível com glicosilação, moléculas de água ou mesmo. Neste sítio foi modelada a molécula de ANS seguido de ciclos de refinamento, demonstrando a estrutura compatível com a densidade eletrônica (Figura 33).

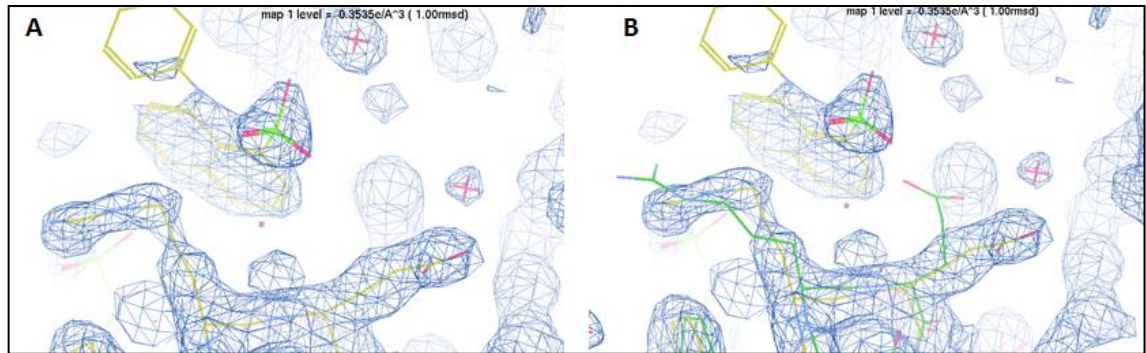


Figura 33 Exemplo da qualidade do mapa de densidade eletrônico de $2F_o-F_c$ contornado a 1 sigma, demonstrando a qualidade do mesmo à resolução de 1.9 Å. Destaque para região de ligação entre 1,8 ANS e a proteína na forma holo (A em amarelo) e apo (B em verde).

A estrutura de trombina ligada a ANS não se demonstrou muito distinta da forma apo de referência (1PPB.pdb), com apenas menores variações na cadeia lateral, como observado nas representações em fita e em *cartoon* (Figura 34).

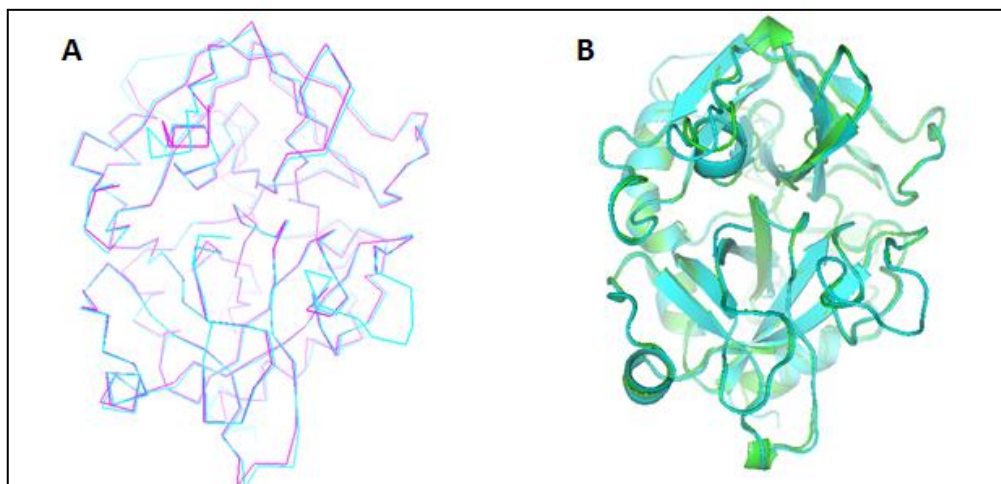


Figura 34 Superposição das estruturas de trombina na forma apo (1PPB.pdb) e ligada a ANS. **A)** representação em fita; **B)** representação em *cartoon*. Emprega-se aqui a orientação padrão de trombina, com o sítio ativo faceando a frente, e no canto superior esq.

Após refinamento da estrutura de ANS, pode-se notar seu ancoramento entre os aminoácidos Glu126 e Arg127, sendo que ocorre reorientação do Glu126 de modo a permitir a inserção do ANS (Figura 35).

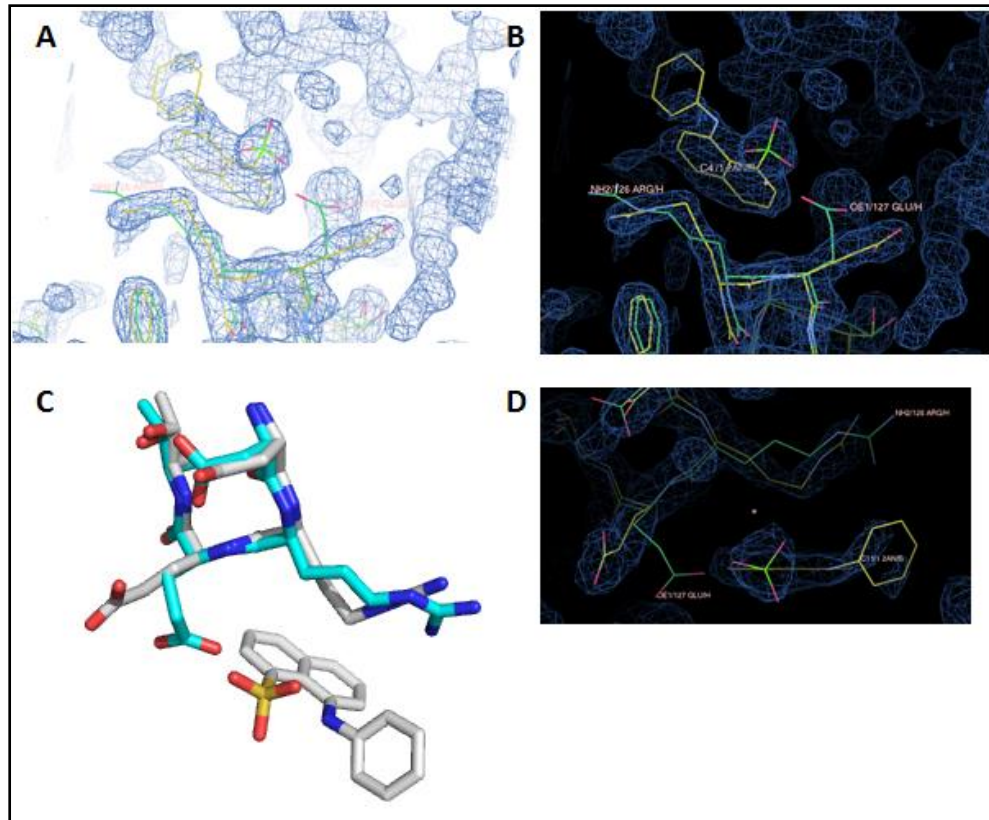


Figura 35 Detalhes da interação entre trombina e ANS. **A e B)** Detalhes do mapa de densidade eletrônica de 2F0-FC contornado a 1 sigma, demonstrando a qualidade do mesmo à resolução de 1.9 Å. **C e D)** Detalhes da interação de ANS com trombina na forma holo (**C**: carbonos em cinza, **D**: carbonos em amarelo) e apo (1PPB.pdb, **C**: carbonos em azul, **D**: carbonos em verde).

Tabela 6 Coleta de dados e estatísticas de refinamento das formas apo e complexo [alfa-trombina humana]:[ANS].

PDB entry	aThPPACK_HCSI06 _18ANS_xt02_MX2	
Status	Phenix Refine 6	
Ligand	apo	
Radiation source	Synchrotron – MX2	CuK α
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Resolution range, Å	28.6 ~ 1.90 (1.99~1.90)	
Unit cell dimension, Å	44.3, 73.3, 86.9	
Monomers / asymmetric unit	1	
Multiplicity	4.8 (4.8)	
Completeness, %	99.8 (99.8)	
I/ σ (I)	9.1 (1.9)	
Rmerge, %	0.143 (1.199)	
Structure Refinement		
No. of reflections used in refinement	22889 (1326)	
No. of reflections used for R _{free}	1,084 (75)	
Rwork / R _{free} , %	19.6 (/ 24.9)	
Bfactor, Å ²		
Wilson	24.6	
Overall		
Ramachandran outliers		
rmsd bond length, Å	0.013	
rmsd bond angles, °	1.212	

Número entre parênteses indicam a mais alta resolução.

R_{free} calculado para $\geq 5\%$ reflexões escolhidas aleatoriamente que foram excluídas do refinamento

5. Conclusão

Por várias décadas a busca por novos fármacos tem sido objetivo de diversos grupos de pesquisa, e os antitrombóticos não ficam de fora, apesar da variedade de medicamentos estes possuem relevantes efeitos colaterais. A busca por moléculas que tenham menor risco se faz necessária. Compreender melhor a enzima principal da coagulação é essencial para o planejamento de novos antitrombóticos.

A triagem realizada para encontrarmos a melhor condição de cristalização de trombina humana, demonstrou que a mesma cristaliza-se com facilidade em diversas condições de tampão e pH, mas demos continuidade ao tratamento dos dados de apenas uma condição. Essa condição forneceu cristais que permitiram uma boa difração, e dados possíveis de reproduzir a estrutura da proteína. Com dados robustos observamos que a nossa proteína representa perfeitamente a estrutura já depositada 1PPB.pdb.

Em nosso grupo já foi demonstrado a interação de trombina com ANS e seu análogo 1,8 bis-ANS (LIMA et al., 2004). Mas agora nossos dados indicam que a interação do complexo ocorre através de um sítio hidrofóbico diferente do sítio ativo, e diferente dos demais conhecidos.

É possível afirmar que essa interação interfere na atividade da proteína, inibindo-a, como foi visto no ensaio de clivagem enzimática do substrato cromogênico S2238 em presença de ANS.

Este novo conhecimento define oportunidades inexploradas para o controle farmacológico da coagulação, podendo aumentar a participação da trombina no controle desse processo, ou ainda gerar uma alternativa para fármacos novos e menos tóxicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGILENT TECHNOLOGIES. **CrysAlisPro Software system**. Agilent Technologies UK Ltd., Oxford, UK, , 2011.
- ANGIOLILLO, D. J.; CAPODANNO, D.; GOTO, S. **Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis**. *European heart journal*, v. 31, n. 1, p. 17–28, jan. 2010.
- BODE, W.; TURK, D.; KARSHIKOV, A. **The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships**. *Protein science: a publication of the Protein Society*, v. 1, n. 4, p. 426–471, abr. 1992.
- CHEW, D. P. et al. **Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials**. *Circulation*, v. 103, n. 2, p. 201–206, 16 jan. 2001.
- CHU, A. J. **Tissue factor mediates inflammation**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 440, n. 2, p. 123–132, ago. 2005.
- CORDEIRO, A. T. **Determinação da Estrutura Cristalográfica por Difração de Raios-X da Enzima Glicose 6-Fosfato Isomerase Humana**. Dissertação Mestrado—São Carlos- SP: Instituto de Física de São Carlos Universidade de São Paulo, 2001.
- DANTAS, C. A. R. et al. **Micro-channel fabrication in an e-tongue system**. [s.d.].
- DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. **The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation**. *Biochemistry*, v. 30, n. 43, p. 10363–10370, 29 out. 1991.
- DE KORT, M.; BUIJSMAN, R. C.; VAN BOECKEL, C. A. A. **Synthetic heparin derivatives as new anticoagulant drugs**. *Drug discovery today*, v. 10, n. 11, p. 769–779, 1 jun. 2005.
- DE MEYER, S. F. et al. **Antiplatelet drugs**. *British Journal of Haematology*, v. 142, n. 4, p. 515–528, ago. 2008.
- DI CERA, E. **Thrombin interactions**. *Chest*, v. 124, n. 3 Suppl, p. 11S–7S, set. 2003.
- DRENTH, J. **Principles of protein x-ray crystallography**. New York :: Springer,, 2007.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. **Coot: model-building tools for molecular graphics**. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126–2132, dez. 2004.
- ERIKSSON, B. I. et al. **Dabigatran etexilate versus enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after total hip replacement: a randomised, double-blind, non-inferiority trial**. *Lancet*, v. 370, n. 9591, p. 949–956, 15 set. 2007.
- ERIKSSON, B. I. et al. **Rivaroxaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip arthroplasty**. *The New England journal of medicine*, v. 358, n. 26, p. 2765–2775, 26 jun. 2008.
- FRANCO, R. F. **Fisiologia da Coagulação, Anticoagulação e Fibrinólise**. *Hemostasia e Trombose*, v. 34, n. jul/dez, p. 229/237, 2001.

GIACOVAZZO. **Fundamentals of crystallography**. [Chester, England]: Oxford; New York: International Union of Crystallography; Oxford University Press, 1992.

GASYMOV, O. K.; GLASGOW, B. J. **ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1774, n. 3, p. 403–411, mar. 2007.

GLUSKER, J. P. **Crystal structure analysis for chemists and biologists**. New York: VCH, 1994.

GLUSKER, J. P.; LEWIS, M.; ROSSI, M. **Crystal structure analysis for chemists and biologists**. New York: VCH, 1994.

GROSSER, T. **Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities**. *Journal of Clinical Investigation*, v. 116, n. 1, p. 4–15, 8 dez. 2005.

GUIMARÃES, B. G. et al. **The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS**. *Journal of synchrotron radiation*, v. 16, n. Pt 1, p. 69–75, jan. 2009.

GUYTON, A. C., HALL, JOHN EDWARD, MARINHO JUNIOR, ALCIDES, CIPOLLA NETO, JOSÉ. **Tratado de Fisiologia Medica - Guyton**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HENNEKENS, C. H. et al. **Dose of aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease: current and future directions**. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, v. 11, n. 3, p. 170–176, set. 2006.

HUNTINGTON, J. A. **Shape-shifting serpins--advantages of a mobile mechanism**. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 31, n. 8, p. 427–435, ago. 2006.

JEFFREY, G. A.; JEFFREY, G. A. **An introduction to hydrogen bonding**. [s.l.] Oxford University Press New York, 1997. v. 12

KRYNETSKIY, E.; MCDONNELL, P. **Building individualized medicine: prevention of adverse reactions to warfarin therapy**. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 322, n. 2, p. 427–434, ago. 2007.

LANE, D. A.; PHILIPPOU, H.; HUNTINGTON, J. A. **Directing thrombin**. *Blood*, v. 106, n. 8, p. 2605–2612, 2005.

LATYPOV, R. F. et al. **Structural and thermodynamic effects of ANS binding to human interleukin-1 receptor antagonist**. *Protein science: a publication of the Protein Society*, v. 17, n. 4, p. 652–663, abr. 2008.

LESLIE, A. G. W. **Joint CCP4 and ESF-EAMCB**. *Newsletter on Protein Crystallography, Mosfilm*. v. 26, 1992.

LI, W. et al. **Structure of the antithrombin–thrombin–heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin**. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 11, n. 9, p. 857–862, 15 ago. 2004.

- LIMA, L. M. T. R. et al. **New insights into conformational and functional stability of human α -thrombin probed by high hydrostatic pressure.** *European Journal of Biochemistry*, v. 271, n. 17, p. 3580–3587, 2004.
- LIMA, L. M. T. R. et al. **Structural and thermodynamic analysis of thrombin: suramin interaction in solution and crystal phases.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, v. 1794, n. 6, p. 873–881, 2009.
- MACKMAN, N. **Triggers, targets and treatments for thrombosis.** *Nature*, v. 451, n. 7181, p. 914–918, 21 fev. 2008.
- MCCOY, A. J. et al. **Phaser crystallographic software.** *Journal of applied crystallography*, v. 40, n. Pt 4, p. 658–674, 1 ago. 2007.
- MEADOWS, T. A.; BHATT, D. L. **Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation.** *Circulation research*, v. 100, n. 9, p. 1261–1275, 11 maio 2007.
- MEAUME, J. **Snake venoms as modifying agents of blood coagulation.** *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, v. 4, n. 1, p. 25–58, jun. 1966.
- MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. **Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method.** *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, RefMac*. v. 53, n. 3, p. 240–255, 1 maio 1997.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger Principles of biochemistry.** New York: W. H. Freeman, 2005.
- NGAI, P. K.; CHANG, J. Y. **A novel one-step purification of human alpha-thrombin after direct activation of crude prothrombin enriched from plasma.** *The Biochemical journal*, v. 280 (Pt 3), p. 805–808, 15 dez. 1991.
- NONATO, M. C. **Estudos Cristalográficos em Macromoléculas Biológicas: Calgranulina C de Granulócitos Porcinos, Tripanotona Redutase de Trypanossoma Cruzi e Fosfolipase A2 Estraída do Veneno de Serpente Bothrops moojeni.** Tese, Doutorado—São Carlos- SP: Instituto de Física de São Carlos, 1997.
- O'BRIEN, P. J.; MUREEBE, L. **Direct Thrombin Inhibitors.** *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, v. 17, n. 1, p. 5–11, 18 fev. 2011.
- PALARETI, G. et al. **Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy.** *Lancet*, v. 348, n. 9025, p. 423–428, 17 ago. 1996.
- PALMIERI, L. C. et al. **A T3R3 hexamer of the human insulin variant B28Asp.** *Biophysical Chemistry*, v. 173–174, p. 1–7, mar. 2013.
- PINEDA, A. O. **Molecular Dissection of Na⁺ Binding to Thrombin.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 30, p. 31842–31853, 8 maio 2004.

QUINLAN, D. J.; MCQUILLAN, A.; EIKELBOOM, J. W. **Low-molecular-weight heparin compared with intravenous unfractionated heparin for treatment of pulmonary embolism: a meta-analysis of randomized, controlled trials.** *Annals of internal medicine*, v. 140, n. 3, p. 175–183, 3 fev. 2004.

REZAIE, A. R. **Regulation of the protein C anticoagulant and antiinflammatory pathways.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 19, p. 2059–2069, 2010.

RHODES, G. **Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models.** [s.l.] Academic press, 2006.

RIBEIRO, J. M.; SCHNEIDER, M.; GUIMARÃES, J. A. **Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*.** *Biochemical Journal*, v. 308, n. Pt 1, p. 243–249, 15 maio 1995.

SABATINE, M. S. et al. **Effect of clopidogrel pretreatment before percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with fibrinolytics: the PCI-CLARITY study.** *JAMA: the journal of the American Medical Association*, v. 294, n. 10, p. 1224–1232, 14 set. 2005.

SAPIÊNCIA, G. S. **Análise por Difração de Raios-X da Gedunina Utilizando os Métodos Diretos.** Dissertação Mestrado—Anápolis, GO: Universidade Estadual de Goiás, 2010.

SOLOMONS, T. W. G. **Organic chemistry.** 10th ed ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2011.

The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, Scala. v. 50, n. Pt 5, p. 760–763, 1 set. 1994.

TURPIE, A. G. G. et al. **Fondaparinux, the first selective factor Xa inhibitor.** *Current opinion in hematology*, v. 10, n. 5, p. 327–332, set. 2003.

VAGIN, A. A. et al. **REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use.** *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2184–2195, dez. 2004.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. **MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement.** *Journal of Applied Crystallography*, v. 30, n. 6, p. 1022–1025, 1 dez. 1997.

WARDROP, D.; KEELING, D. **The story of the discovery of heparin and warfarin.** *British Journal of Haematology*, v. 141, n. 6, p. 757–763, jun. 2008.

WIVIOTT, S. D. et al. **Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes.** *The New England journal of medicine*, v. 357, n. 20, p. 2001–2015, 15 nov. 2007.