

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ENZIMA HEPARINASE II  
DE *FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* ATRAVÉS DE  
SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR**

Gabriela Bernardes Escoto

PORTO ALEGRE  
2009

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ENZIMA HEPARINASE II DE  
*FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* ATRAVÉS DE SIMULAÇÕES DE DINÂMICA  
MOLECULAR**

*Gabriela Bernardes Escoto*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Verli

Porto Alegre  
Abril de 2009

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ENZIMA HEPARINASE II DE  
*FLAVOBACTERIUM HEPARINUM* ATRAVÉS DE SIMULAÇÕES DE DINÂMICA  
MOLECULAR**

*Gabriela Bernardes Escouto*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em nível de Mestrado, em 27 de abril de 2009.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Termignoni (PPGBCM - UFRGS)

Profa. Dra. Grace Gosmann (PPGCF - UFRGS)

Prof. Dr. Paulo Augusto Netz (IQ - UFRGS)

## FICHA CATALOGRÁFICA

E74c ESCOUTO, Gabriela Bernardes  
Caracterização molecular da enzima heparinase II de *Flavobacterium heparinum* através de simulações de dinâmica molecular / Gabriela Bernardes Escouto. – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xviii, 83 p. : il., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Enzima heparinase II. 2. *Flavobacterium heparinum*. 3. Glicoproteínas. 4. Dinâmica molecular. 5. Análise conformacional.  
I. Verli, Hugo. II. Título.

CDU: 577.1

Bibliotecária responsável: Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Esta dissertação foi desenvolvida no Grupo de Bioinformática Estrutural do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob a orientação do Professor Doutor Hugo Verli, com o apoio financeiro da CAPES, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, junto à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Hugo Verli, pela oportunidade concedida ao me receber como sua aluna de mestrado e por toda a atenção e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos colegas do grupo de Bioinformática Estrutural, pela convivência no laboratório e ajuda prestada durante a execução do trabalho. Em especial, à Cláudia Lemelle Fernandes, por suas tão úteis e detalhadas explicações.

Aos membros do Laboratório de Síntese Orgânica Molecular, minha “casa” dentro da Faculdade de Farmácia.

Aos meus amigos desde a graduação, farmacêuticos Juliana, Renato, Eleonora e Rodrigo, que continuam formando o nosso “continente”.

Desde já aos membros da banca, por terem aceitado o convite.

Aos meus pais Daniel e Mary, às minhas irmãs Daniela e Rafaela e à minha avó Alba, por todo o apoio prestado às minhas decisões e na superação das dificuldades.

Ao Luciano, pela compreensão durante as minhas horas de trabalho e pelo incentivo fundamental para que eu atingisse este objetivo.

Dedico esta Dissertação a meus pais, Daniel Rodrigues Escouto e Mary Alba Escouto, pelo seu apoio incansável e constante em todas as etapas de minha formação profissional e pessoal.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AT – antitrombina  
ESP – electrostatic potential derived charges  
FL – fosfolipídios  
FT – fator tecidual  
Fuc – fucose  
Gal – galactose  
GalNAc – N-acetilgalactosamina  
GAGs – glicosaminoglicanos  
GlcA – ácido glicurônico  
GlcN – glicosamina  
GlcNAc – N-acetilglicosamina  
HBPM – heparina(s) de baixo peso molecular  
hepII – heparinase II  
HSGAG – heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans  
IdoA – ácido idurônico  
LMWH – low molecular weight heparins  
Man – manose  
MD – molecular dynamics (dinâmica molecular)  
PDB – Protein Data Bank  
PME – Particle-Mesh Ewald  
Rha – ramnose  
RMN – ressonância magnética nuclear  
RMSD – root mean square deviation  
RMSF – root mean square fluctuation  
Sia – ácido siálico  
TFPI – tissue factor pathway inhibitor  
TIH – trombocitopenia induzida por heparina  
Xyl – xilose



## RESUMO

A hemostasia envolve diversos eventos fisiológicos desencadeados após a ruptura da integridade vascular. Durante estes processos, os glicosaminoglicanos, incluindo a heparina e o heparan sulfato, desempenham funções fisiológicas fundamentais. Particularmente a heparina, isolada no início do século XX, permanece até os dias atuais como um dos mais eficientes agentes terapêuticos de ação antitrombótica. As cadeias polissacarídicas destes glicosaminoglicanos são clivadas por liases, denominadas heparinases, através de um mecanismo de eliminação. As heparinases, identificadas inicialmente na bactéria do solo *Flavobacterium heparinum* (sinonímia: *Pedobacter heparinus*), diferem em tamanho, carga e grau de especificidade pela sequência dissacarídica do substrato. Possuem importantes aplicações na terapêutica, diagnóstico e também na produção de heparinas de baixo peso molecular (HBPM). Dentre as heparinases já descritas para *F. heparinum* a enzima do tipo II é a menos específica, sendo capaz de clivar ligações glicosídicas do tipo 1→4 entre a glicosamina e ácido urônico (idurônico ou glicurônico), presentes na heparina e no heparan sulfato. Entretanto, o processo de reconhecimento enzima-substrato neste sistema é ainda pouco conhecido. Particularmente com relação à dependência por metais, esta enzima tem sua atividade inibida pela presença do íon cálcio que, em contrapartida, é importante para a atividade das heparinases dos tipos I e III. A heparinase II é uma glicoproteína e apresenta um sítio de ligação ao íon zinco, o qual exerce uma importante função de manutenção da integridade da estrutura protéica.

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo a caracterização estrutural e conformacional da enzima heparinase II e, a partir destas informações, subsidiar o entendimento do reconhecimento e especificidade da interação enzima-substrato, fundamentando um planejamento racional de novos ligantes. Empregando-se a Dinâmica Molecular (MD), quatro sistemas envolvendo a enzima foram estudados, considerando-se a presença ou ausência de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  e da estrutura de glicosilação.

Os dados obtidos indicam que a presença do íon  $\text{Zn}^{+2}$  pode estar envolvida no controle da flexibilidade da estrutura protéica em regiões específicas da heparinase II. Em contrapartida, a presença do íon  $\text{Ca}^{+2}$  promove um acréscimo significativo na

flexibilidade em regiões equivalentes àsquelas do  $Zn^{+2}$ , relacionada à influência do íon no sítio catalítico da enzima. Adicionalmente, a presença da O-glicosilação parece ser capaz de promover uma estabilização adicional da estrutura secundária da proteína, sugerindo um papel na estabilidade conformacional da mesma.

Globalmente, os resultados indicam que simulações de MD podem ser utilizadas para representar adequadamente a conformação de glicoproteínas como a heparinase II, permitindo a caracterização de diversas propriedades, como a quantificação de suas interações com cofatores metálicos e o papel de seu sítio de glicosilação. Cria-se, portanto, uma sólida base para o estudo das demais heparinases, de suas respectivas especificidades e, por fim, para o planejamento racional de novos candidatos a agentes moduladores dos processos hemostáticos.

## ABSTRACT

The hemostasis comprises important physiologic events following the rupture of vascular integrity. During these processes, heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans (HSGAG) presents important physiological functions. In particular heparin, isolated in the beginning of the XX century, remains until today as one of the most efficient antithrombotic therapeutic agents. The polysaccharide chains of these HSGAGs are cleaved by lyases, named heparinases, through an elimination mechanism. The heparinases, first identified in the soil bacterium *Flavobacterium heparinum* (also named *Pedobacter heparinus*), differ in size, charge and substrate specificity. They have important applications, such as therapeutic, diagnostic and production of low molecular weight heparins (LMWH). Within the heparinases from *F. heparinum*, the type II enzyme has the broadest substrate specificity, being capable of cleavage upon the (1→4) glycosidic linkages between glucosamine and uronic acid (either glucuronic or iduronic) residues contained by heparin and heparan sulfate. However, the enzyme-substrate recognition process is poorly structurally described. Mainly in relation of the metals dependence, this enzyme has its activity inhibited by the presence of the calcium ion which, in opposite, is important for heparinases I and III activities. The heparinase II is a glycoprotein and shows a zinc ion binding site, which plays an important role in the protein structure maintenance.

Thus, the current work aims to characterize the structure and conformation of heparinase II enzyme and, based on this information, support the understanding of the recognition and specificity of the enzyme-substrate interaction, and further the rational design of new ligands of the enzyme. Using molecular dynamics (MD) calculations, four systems were studied, considering the presence or absence of  $\text{Ca}^{+2}$  and  $\text{Zn}^{+2}$  ions and the glycosylation structure.

The obtained data indicates that the presence of a  $\text{Zn}^{+2}$  ion may be involved in the control of the protein flexibility at some specific regions of the heparinase II. In opposite, the  $\text{Ca}^{+2}$  presence promotes a significant increase of the flexibility on the same regions, related to the influence of this ion in the enzyme active site. Additionally, the O-glycosylation seems to be capable to promote an additional

stabilization of the protein secondary structure, what may indicate its role as an element that contributes to the conformational stability of the protein.

Altogether the results show that MD simulations can be used to correctly represent the glycoprotein conformations, such as heparinase II, allowing characterizing its properties, as well as quantifying its interactions with metallic cofactors and the role of the glycosylation site. Thus, is generated a solid basis to the study of the other heparinases, their respective specificities, and finally to the design of new candidates to hemostatic process modulating agents.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática da cascata de coagulação. Os precursores inativos estão apresentados em letras pretas (protrombina, V, VII, VIII, IX, X e XIII), enquanto as proteínas ativas estão apresentadas em vermelho (trombina, Va, VIIa, VIIIa, IXa, Xa e XIIIa). As setas em vermelho apresentam alças de retro-alimentação positiva da trombina, enquanto as alças pretas, verdes e azuis representam vias de ativação de fatores da coagulação (Verli, 2005)..... 3
- Figura 2: Estrutura básica de um polissacarídeo de heparina, composto por resíduos de ácidos urônicos (idurônico e glicurônico) e glicosamina (Nader *et al.*, 2001). ..... 5
- Figura 3: Representação da estrutura cristalográfica do complexo entre a antitrombina, a trombina e a heparina, código PDB 1TB6 (Li *et al.*, 2004)..... 8
- Figura 4: Estrutura química da tinzaparina; n=1 a 25 unidades dissacarídicas. R=H/SO<sub>3</sub>Na; R1=H/SO<sub>3</sub>Na/COCH<sub>3</sub>; R2= H e R3=COONa ou R2=COONa e R3=H. 11
- Figura 5: Estrutura de alguns agentes anticoagulantes apresentados na Tabela 3: Fondaparinux (1); Idraparinux (2); Razaxaban (3); Rivaroxaban (4); DX-9065a (5); Argatroban (6); Melagatran (7); Ximelagatran (8); Dabigatran etexilato (9); Heparan Sulfato (10)..... 13
- Figura 6: Estrutura cristalográfica do complexo entre a antitrombina e o pentassacarídeo sintético fondaparinux, código PDB 1AZX (Jin *et al.*, 1997)..... 14
- Figura 7: Mecanismo de clivagem da heparanase. A seta em azul indica a ligação hidrolisada no glicosaminoglicano. O grupamento sulfato reconhecido pela enzima está destacado em vermelho..... 16

- Figura 8: Mecanismo de clivagem da heparinase II, formando uma insaturação entre os átomos C4 e C5 do ácido urônico. A seta pontilhada indica a ligação clivada pela enzima..... 18
- Figura 9: Representação da estrutura cristalográfica da heparinase II (código PDB 2FUQ; Shaya *et al.*, 2006). A – monômero, com os domínios N-terminal (rosa), central (azul claro) e C-terminal (laranja) e o íon  $Zn^{+2}$  (esfera em amarelo). B – sítio de ligação do íon  $Zn^{+2}$ , mostrando os resíduos com distância do íon inferior a 3Å. . 19
- Figura 10: Representação da estrutura de glicosilação da heparinase II (Shaya *et al.*, 2006). Xyl – xilose; GlcA – ácido glicurônico; Rha – ramnose; Man – manose..... 21
- Figura 11: Definição dos ângulos de diedro  $\phi$  e  $\psi$  das ligações glicosídicas observadas na estrutura de glicosilação na heparinase II..... 26
- Figura 12: Esquema das etapas que compõe as simulações de MD a 310K. De 0ps a 30ps, uma série de etapas de 5ps cada, aquecendo lentamente o sistema em incrementos de 50K. Após 30ps, o sistema está a 310K e se mantém nesta temperatura pelo restante da simulação. .... 28
- Figura 13: Representação das ligações glicosídicas da heparinase II através de mapas de contorno. As regiões de energia com seus respectivos contornos estão mostradas de 10 a 50  $\text{kJ.mol}^{-1}$ , em intervalos de 10  $\text{kJ.mol}^{-1}$ . As regiões em cinza indicam as respectivas conformações dos dissacarídeos após o refinamento por MD em solução aquosa (0,1  $\mu\text{s}$ ). .... 59
- Figura 14: Análise comparativa por RMSD entre os sistemas simulados por MD da heparinase II. O RMSD dos sistemas 1 (preto), 3 (azul) e 4 (roxo) está representado em sobreposição ao sistema 2 (vermelho). (A), (B) e (C) – todos os átomos da proteína; (D), (E) e (F) – região dos resíduos 465 a 496..... 62

Figura 15: RMSF por resíduo de aminoácido em função do tempo dos sistemas simulados por MD da heparinase II. A – Sistema 1; B – Sistema 2; C – Sistema 3; D – Sistema 4 (de 0,05 nm – azul a 0,15 nm - vermelho). ..... 64

Figura 16: Sobreposição das conformações do resíduo His202 da heparinase II nos sistemas simulados por MD. Sistema 1 – verde; sistema 2 – salmão; sistema 3 – azul; sistema 4 – roxo..... 65

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais dissacarídeos e seus tipos de ligação glicosídica presentes na estrutura de glicosaminoglicanos (Sampaio <i>et al.</i> , 2006). .....	6
Tabela 2: Heparinas de baixo peso molecular (HBPM) comerciais, processos utilizados na obtenção, pesos moleculares médios, relação de atividades anti-fXa/anti-fIIa e atividades anticoagulantes (Adaptado de Eriksson <i>et al.</i> , 1995; Fareed <i>et al.</i> , 1998; Breddin, 1999; Dietrich <i>et al.</i> , 1999; Jeske e Fareed, 1999; Fareed <i>et al.</i> , 2000; Hedner, 2000; Fareed <i>et al.</i> , 2004; Bouças <i>et al.</i> , 2006). .....	10
Tabela 3: Agentes aprovados ou em desenvolvimento para utilização na terapêutica anticoagulante, mecanismos de ação, propriedades e nomes comerciais (Adaptado de Stone <i>et al.</i> , 1986; Maraganore <i>et al.</i> , 1990; Broze <i>et al.</i> , 1995; Herbert <i>et al.</i> , 1996; Stassens <i>et al.</i> , 1996; Sadler, 1997; Ortel e Chong, 1998; Weitz <i>et al.</i> , 1998; Fareed <i>et al.</i> , 2000; Gustafsson <i>et al.</i> , 2001; Lewis <i>et al.</i> , 2001; Crowther e Weitz, 2004; Walenga <i>et al.</i> , 2002; Hirsh, 2003; Lassen <i>et al.</i> , 2003; Eriksson <i>et al.</i> , 2007).....	12
Tabela 4: Ângulos de diedro das ligações O-glicosídicas da heparinase II incluindo dados de mapas de energia e das simulações de MD. ....	61



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	A cascata de coagulação e o papel da heparina .....	1
1.2	Glicosaminoglicanos (GAGs).....	4
1.3	Uso terapêutico da heparina e derivados .....	7
1.4	Uso terapêutico de novos agentes anticoagulantes .....	11
1.5	Heparanase e heparinases.....	15
1.5.1	Características estruturais da heparinase II .....	18
1.6	Glicosilação de proteínas .....	20
1.7	Simulação por MD de carboidratos e glicoproteínas .....	22
2	OBJETIVOS .....	24
3	METODOLOGIA.....	25
3.1	Programas utilizados .....	25
3.2	Protocolo geral empregado .....	25
3.3	Definição das ligações glicosídicas .....	26
3.4	Simulações de MD.....	27
3.4.1	Protocolo de simulação .....	27
3.4.2	Validação das simulações de MD.....	28
4	RESULTADOS .....	29
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
5.1	Parâmetros gerais para a simulação de glicoproteínas .....	58
5.2	Análise conformacional das ligações glicosídicas .....	59
5.3	Estabilidade dos sistemas simulados por MD .....	62
5.4	Regiões envolvidas no mecanismo catalítico .....	64

6	CONCLUSÕES .....	66
7	PERSPECTIVAS .....	67
8	GLOSSÁRIO .....	68
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71
10	CURRICULUM VITAE .....	83

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A cascata de coagulação e o papel da heparina

O controle do fluxo sanguíneo depende da ativação ou inibição de diversos fatores, relacionados a diferentes cascatas proteolíticas, tais como a coagulação, a fibrinólise e a inflamação. O processo de coagulação sanguínea, seguido da dissolução do *coágulo* e do reparo do tecido danificado, é denominado hemostasia, abrangendo importantes eventos que ocorrem em sequência após a ruptura da integridade vascular, incluindo (Bouças *et al.*, 2006):

- Vasoconstrição: limita o fluxo sanguíneo para a área danificada;
- Formação do tampão plaquetário: adesão de plaquetas aos componentes da matriz subendotelial e agregação plaquetária na local do dano vascular;
- Formação do coágulo: formação da rede de fibrina e do tampão plaquetário;
- Fibrinólise: dissolução da rede de fibrina, de modo a normalizar o fluxo sanguíneo;
- Reparo tecidual: cicatrização e crescimento celular.

A cascata de coagulação foi inicialmente descrita como uma série de reações proteolíticas sequenciais (Davie e Ratnoff, 1964). O fator tecidual (FT), também conhecido como fator III, é o principal iniciador da cascata de coagulação, iniciando a cascata extracelular para a formação de fibrina. O dano às paredes do vaso sanguíneo expõe o FT, expresso em células endoteliais, o qual é capaz de ligar-se ao fator VII na presença de íons cálcio. Além dos fatores protéicos III e VII, superfícies fosfolipídicas (FL) oriundas principalmente das plaquetas do tampão plaquetário constituem um cofator não-protéico requerido nesta e em outras etapas da coagulação (Bouma e Griffin, 1977; Jenny e Mann, 1998).

Após iniciada a coagulação, a propagação deste processo resulta em complexos enzimáticos pró-coagulantes estruturados em elementos da matriz subendotelial e na membrana de plaquetas, incluindo serino-proteinases (fatores IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa e XII), co-fatores protéicos (fatores VIIIa e Va), cátions bivalentes e superfícies de membrana (Figura 1) (Jenny e Mann, 1998).

Alguns complexos enzimáticos são característicos durante a cascata de coagulação, incluindo três complexos pró-coagulantes (Complexo Protrombinase, Complexo Tenase Extrínseco e Complexo Tenase Intrínseco) e um complexo

anticoagulante (Proteína C). Os complexos protrombinase e tenase intrínseco contêm co-fatores homólogos derivados do plasma (fatores Va e VIIIa, respectivamente), enquanto os complexos tenase extrínseco e da proteína C contêm co-fatores protéicos derivados de células ou tecidos (Jenny e Mann, 1998).

O complexo tenase extrínseco, formado pelos co-fatores FT (fator III), fVIIa plasmático e fosfolípídeos, exerce atividade catalítica sobre os fatores IX e X, ativando-os (fIXa e fXa). O complexo tenase intrínseco, formado pelo fIXa, fVIIIa e fosfolípídeos, também é capaz de ativar o fator X, gerando fXa (Figura 1). O fator Xa, juntamente com o fator Va, superfícies fosfolípídicas e íons cálcio, constitui o complexo protrombinase, cujo substrato é a protrombina (fator II) convertida em trombina (fator IIa) (Jenny e Mann, 1998; Bouças *et al.*, 2006).

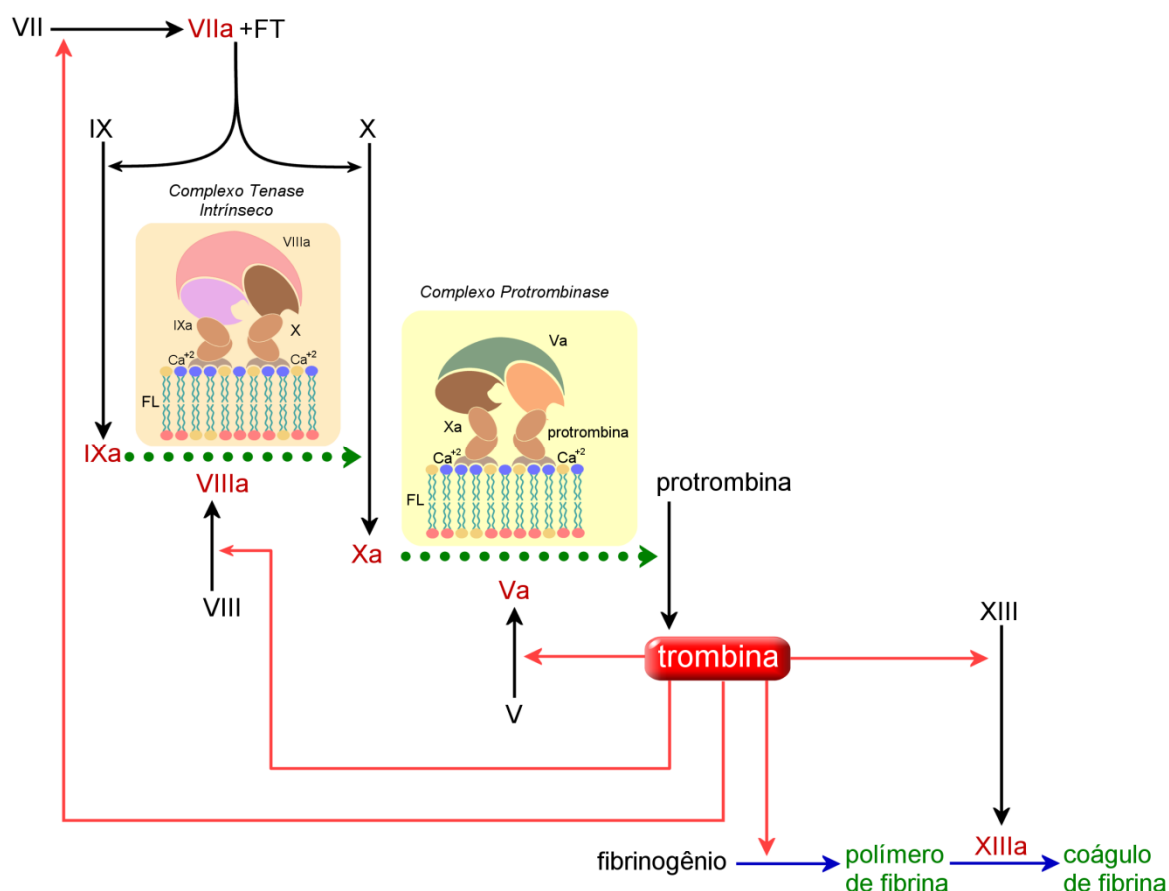


Figura 1: Representação esquemática da cascata de coagulação. Os precursores inativos estão apresentados em letras pretas (protrombina, V, VII, VIII, IX, X e XIII), enquanto as proteínas ativas estão apresentadas em vermelho (trombina, Va, VIIa, VIIIa, IXa, Xa e XIIIa). As setas em vermelho apresentam alças de retro-alimentação positiva da trombina, enquanto as alças pretas, verdes e azuis representam vias de ativação de fatores da coagulação (Verli, 2005).

Os inibidores naturais da coagulação exercem um papel fundamental no controle da hemostasia. Este controle pode ser exercido tanto pela inibição específica das serino-proteinases formadas na cascata, como pela degradação dos fatores (Bouças *et al.*, 2006). Antitrombina (AT), proteína C e TFPI (tissue factor pathway inhibitor, ou inibidor da via do fator tecidual) são os principais moduladores fisiológicos da coagulação em humanos (Hirsh, 2003).

A antitrombina, em particular, é um membro da família das serpinas (*serpin* = *Serine Proteinase Inhibitor*), inibindo todas as serino-proteinases que atuam na

cascata de coagulação. As serpinas inibitórias são substratos suicidas que se ligam irreversivelmente às suas proteinases-alvo e estão envolvidas em vários processos biológicos como a coagulação sanguínea, fibrinólise, morte celular programada, angiogênese, desenvolvimento e inflamação (Gettins, 2000; Gettins, 2002; Huntington *et al.*, 2000; Simonovic *et al.*, 2001). Em decorrência de sua importante função fisiológica, a AT constitui-se em um alvo muito explorado na busca de compostos capazes de inibir a coagulação. Fundamentalmente, a atividade anticoagulante da heparina deve-se à sua capacidade em potencializar a ação inibitória da AT. A estrutura e a atividade da heparina e seus derivados serão descritas nos itens posteriores.

## 1.2 Glicosaminoglicanos (GAGs)

Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos de caráter ácido, compostos de cadeias lineares de unidades dissacarídicas repetitivas, formadas por um amino-açúcar e um ácido urônico (Huang *et al.*, 1999; Nascimento *et al.*, 2006). As cadeias polissacarídicas podem estar ligadas a proteínas, quando encontradas nesta forma são denominadas proteoglicanos (Iozzo, 1998; Sampaio *et al.*, 2006). Dentre os mais importantes GAGs existentes em tecidos animais estão a heparina e o heparan sulfato. A estrutura básica do polissacarídeo de heparina foi proposta por Dietrich e colaboradores em 1973, a partir de produtos de degradação enzimática (Dietrich *et al.*, 1973).

A heparina e o heparan sulfato são constituídos por uma cadeia linear de tamanho variável entre 10 e 200 unidades dissacarídicas de glicosamina e ácido urônico, conectados através de ligações glicosídicas  $\alpha$  ou  $\beta(1\rightarrow4)$  (Silva e Dietrich, 1975; Huang *et al.*, 2001). O ácido urônico pode ser ácido *D*-glicurônico (GlcA) ou *L*-idurônico (IdoA) (Figura 2; Nader *et al.*, 2001).

Durante a sua biosíntese os GAGs estão sujeitos a modificações nas cadeias polissacarídicas através da ação de diversas enzimas, incluindo epimerização do ácido urônico (GlcA a IdoA), N-desacetilação seguida de N-sulfatação da glicosamina e O-sulfatação nos grupos hidroxila (posições 2, 3 e 6). Essas modificações conferem a estes polissacarídeos atributos de grande heterogeneidade molecular (Sampaio *et al.*, 2006; Shaya *et al.*, 2006). A heparina em particular possui principalmente resíduos de ácido urônico (tanto idurônico quanto glicurônico) com alto grau de sulfatação predominantemente na posição 2 (Su *et al.*, 1996; Shaya *et*

*al.*, 2006) e resíduos de glicosamina, geralmente N-sulfatada e/ ou 6-sulfatada. Pode também ocorrer, embora em menor grau, N-acetilação (Sampaio *et al.*, 2006; Shaya *et al.*, 2006). O heparan sulfato, por sua vez, contém alta prevalência de resíduos de ácido glicurônico e proporções menores de sulfatação, tanto no ácido urônico quanto na glicosamina, na qual a N-acetilação é mais frequente (Tabela 1) (Su *et al.*, 1996; Shaya *et al.*, 2006).

Além das características estruturais citadas, as principais diferenças entre heparina e heparan sulfato estão na sua localização celular e na ligação a proteínas. A heparina é encontrada exclusivamente em grânulos secretores no interior de mastócitos, enquanto o heparan sulfato é abundante em superfícies celulares, ligado a receptores de diversos tecidos (Santos *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2006). Estas características são responsáveis pelas interações destes polissacarídeos com ampla variedade de proteínas e receptores, desempenhando um papel fundamental em diversos processos fisiológicos, incluindo angiogênese (Linhardt, 1994; Sasisekharan *et al.*, 1997), patogêneses virais e/ou bacterianas (Shaya *et al.*, 2006), hemostasia (Petitou *et al.*, 1999; Sasisekharan e Venkataraman, 2000), bem como vários aspectos da proliferação celular (Conrad, 1998; Sampaio *et al.*, 2006).

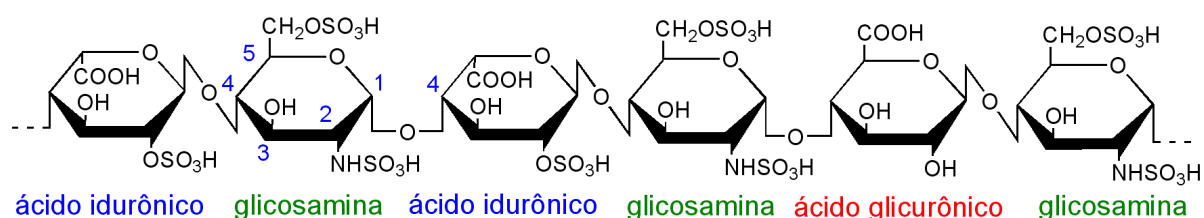


Figura 2: Estrutura básica de um polissacarídeo de heparina, composto por resíduos de ácidos urônicos (idurônico e glicurônico) e glicosamina (Nader *et al.*, 2001).

Tabela 1: Principais dissacarídeos e seus tipos de ligação glicosídica presentes na estrutura de glicosaminoglicanos (Sampaio *et al.*, 2006).

GAG	Dissacarídeos		
	Ácido Urônico	Ligação	Glicosamina
Heparan Sulfato	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN–Ac
	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN–Ac (6S)
	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S)
	D-GlcA	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S,6S)
	L-IdoA	$\alpha 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S)
	L-IdoA (2S)	$\alpha 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S)
Heparina	D-GlcA	$\alpha 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S)
	D-GlcA	$\alpha 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S, 6S)
	L-IdoA (2S)	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S)
	L-IdoA (2S)	$\beta 1 \rightarrow 4$	D-GlcN (S, 6S)

2S: 2-O-sulfatado; 6S: 6-O-sulfatado; S: N-sulfatado.

Estudos demonstraram a importância da existência de certos domínios nas sequências polissacarídicas dos GAGs, para que interações específicas ocorram. Uma das primeiras evidências desta especificidade foi relatada para a sequência mínima de heparina necessária para a ligação à antitrombina, responsável pela sua atividade anticoagulante (Lindahl *et al.*, 1980). Nesta sequência, cada uma das sulfatações observadas demonstrou ser essencial para a alta afinidade de interação da heparina com a antitrombina. Desta forma, foi proposto que alguns padrões de sulfatação no heparan sulfato poderiam arranjar-se de maneira a formar uma sequência específica, capaz de promover ligação seletiva a certas proteínas (Salmivirta *et al.*, 1996). A interação do heparan sulfato (HS) com o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) é influenciada pela quantidade de dissacarídeos 6-O-sulfatados, bem como pela posição desses grupos sulfato na sequência oligossacarídica, o que determinará a ligação do bFGF a receptores que atuam na atividade mitogênica (Lindahl *et al.*, 1998).



### 1.3 Uso terapêutico da heparina e derivados

A heparina foi isolada pela primeira vez em 1916 a partir de uma preparação de fígado de cães (McLean, 1916), como uma substância capaz de retardar o tempo de coagulação do sangue. Seu uso clínico iniciou-se na década de 1940 na prevenção de trombose de pacientes em pós-cirurgia (Bouças *et al.*, 2006). Atualmente, as preparações comerciais de heparina são obtidas, principalmente, de intestino de suínos e bovinos e de pulmão de bovinos, como uma mistura heterogênea de polissacarídeos de diversos tamanhos. O peso molecular de suas cadeias geralmente varia de 5 kDa a 30 kDa, com massa molecular média de 15kDa, o que equivale a aproximadamente 50 unidades monossacarídicas (Hirsh *et al.*, 1998).

A atividade anticoagulante da heparina deve-se à ativação da antitrombina que, por sua vez, inibe as serino-proteinases da cascata de coagulação (Björk *et al.*, 1982), formando um complexo ternário com estas proteínas (Figura 3; Li *et al.*, 2004). Devido ao tamanho da cadeia ser variável, as propriedades anticoagulantes e farmacocinéticas da heparina também podem variar (Boneu, 2000). No caso da inibição da trombina, uma cadeia de 18 unidades monossacarídicas (~5,4 kDa) é a menor estrutura ativa da heparina sobre a antitrombina (Danielsson *et al.*, 1986). A inibição de fator Xa, por sua vez não depende do tamanho da cadeia polissacarídica. Considerando-se que a heparina é composta em sua quase totalidade de cadeias apresentando peso molecular maior que 5,0 kDa, sua atividade inibitória é observada igualmente sobre trombina e fator Xa, de forma que a sua relação de atividades anti-fXa/antitrombina (ou anti-fXa/anti-fIIa) torna-se igual a 1 (Boneu, 2000).

A utilização terapêutica de heparina em pacientes com doenças tromboembólicas requer monitoração frequente, devido à estreita janela terapêutica e à variável relação dose-resposta (Hirsh, 2003). Problemas como a indução de trombocitopenia (TIH) devido ao uso clínico contínuo da heparina também foram observados (Warkentin *et al.*, 1998).

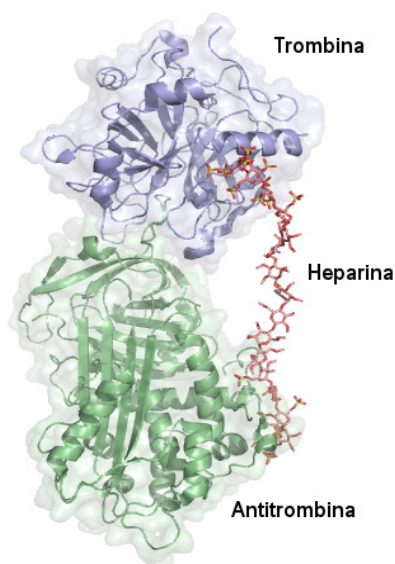


Figura 3: Representação da estrutura cristalográfica do complexo entre a antitrombina, a trombina e a heparina, código PDB 1TB6 (Li *et al.*, 2004).

No intuito de minimizar os riscos decorrentes da administração de heparina, teve início, na década de 1980, a introdução das heparinas de baixo peso molecular (HBPM) na terapêutica. As HBPM são obtidas por fragmentação da heparina, diferindo desta e entre si pelo método de obtenção, massas moleculares e estrutura química. Tais diferenças se refletem na atividade farmacológica e na razão de inibição sobre a trombina e o fator Xa, pois ocorre uma proporção distinta de cadeias polissacarídicas com massa molecular acima de 5,4 kDa. Este aspecto é um dos principais fatores associados às diferentes relações de atividade anti-fXa/anti-fIIa de cada preparação de HBPM, as quais podem variar de 2 até 5 (Tabela 2) (Boneu, 2000; Fareed *et al.*, 2000).

Estas relações de atividade anti-fXa/anti-fIIa individuais podem elucidar a atividade anticoagulante das HBPM, de modo que cada formulação comercial deve ser considerada como um composto específico, apresentando propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas próprias (Fareed *et al.*, 1998; Boneu, 2000). Como já exposto, a trombina, além da conversão do fibrinogênio, promove uma retroalimentação positiva ativando os co-fatores V e VIII (Jenny e Mann, 1998). Uma vez inibida a trombina, a formação dos fatores Va e VIIIa, essenciais para a formação dos complexos tenase intrínseco e protrombinase (Figura 1), não ocorre. Como as HBPM possuem baixa atividade inibitória de trombina devido ao reduzido tamanho de suas cadeias polissacarídicas, não são capazes então de impedir a

retroalimentação, formando os fatores Va e VIIIa mesmo por quantidades-traço de trombina. Há, portanto, diferença entre a potência das HBPM e da heparina não fracionada, cuja atividade anticoagulante permanece maior (Boneu, 2000; Hirsh, 2003).

Contudo, a principal vantagem das HBPM em relação à heparina origina-se do decréscimo na ligação destas às proteínas plasmáticas e às plaquetas, resultando em um efeito anticoagulante mais previsível, o que permite a administração sem um monitoramento continuado do paciente (Hirsh, 2003). São consideradas mais seguras, pois apresentam menor risco de trombocitopenia induzida por heparina. As HBPM apresentam maior tempo de meia-vida e produzem menos sangramento após administração tópica ou intravenosa. Desta forma, foram inicialmente empregadas na prevenção de trombose venosa profunda pós-operatória e, mais tarde, para a profilaxia de pacientes com elevado risco de trombose (Boneu, 2000). Entretanto, as HBPM podem causar hemorragia similar, ou ainda maior que a heparina, após a administração subcutânea (Bouças *et al.*, 2006).

Tabela 2: Heparinas de baixo peso molecular (HBPM) comerciais, processos utilizados na obtenção, pesos moleculares médios, relação de atividades anti-fXa/anti-fIIa e atividades anticoagulantes (Adaptado de Eriksson *et al.*, 1995; Fareed *et al.*, 1998; Breddin, 1999; Dietrich *et al.*, 1999; Jeske e Fareed, 1999; Fareed *et al.*, 2000; Hedner, 2000; Fareed *et al.*, 2004; Bouças *et al.*, 2006).

Processo	HBPM	Peso molecular médio (kDa)	Anti-fXa / anti-fIIa	Atividade anticoagulante (UI/mg) <sup>j</sup>
Despolimerização com ácido nitroso	Dalteparina <sup>b</sup>	6,4	2-4	75
	Nadroparina <sup>c</sup>	5,5	2-4	46
Despolimerização com nitrito de isoamila	Reviparina <sup>d</sup>	3,4	3-5	48
	Certoparina <sup>e</sup>	6,3	2-3	55
Heparinases	Tinzaparina <sup>f</sup>	4,8	2-3	68
Benzilação / hidrólise alcalina	Enoxaparina <sup>g</sup>	4,5	2-4	54
Clivagem peroxidativa	Ardeparina <sup>h</sup>	4,5	2	72
	Parnaparina <sup>i</sup>	7,2	3	84

(Reação de Fenton<sup>a</sup>)

<sup>a</sup> Dietrich *et al.*, 1975

<sup>b</sup> Fragmin®, Pfizer, New London, EUA;

<sup>c</sup> Fraxiparin®, Sanofi-Aventis, Paris, França;

<sup>d</sup> Clivarin®, Abbott, Ludwigshafen, Alemanha;

<sup>e</sup> Sandoparin®, Novartis, Basel, Suíça;

<sup>f</sup> Logiparin/Innohep®, Novo Nordisk and Leo Pharma, Copenhagen, Dinamarca;

<sup>g</sup> Clexane®, Sanofi Aventis, Paris, França;

<sup>h</sup> Normiflo®, Wyeth Ayerst, Filadélfia, EUA;

<sup>i</sup> Fluxum®, Alfa Wassermann, Bologna, Itália;

<sup>j</sup> para a heparina (não-fracionada): 166 UI/mg.

A maioria das HBPM é obtida por despolimerização da heparina a partir de processos químicos, com exceção da tinzaparina (Tabela 2), que se constitui em um sal sódico produzido pela despolimerização enzimática da heparina isolada da

mucosa intestinal de suínos. O processo de obtenção seria a explicação para o maior grau de sulfatação da tinzaparina, em comparação às demais HBPM (Figura 4) (Matzsch *et al.*, 1987; Weitz, 1997). As enzimas que realizam a clivagem, as heparinases de *Flavobacterium heparinum*, serão abordadas posteriormente.

A composição das frações de tinzaparina comercialmente obtidas atende à seguinte especificação de massas moleculares: menos de 10% das cadeias abaixo de 2kDa, 60% a 72% entre 2kDa e 8kDa e 22% a 36% acima de 8kDa (Mousa *et al.*, 2003). A tinzaparina mostrou maior eficácia em relação à heparina na prevenção e tratamento do tromboembolismo venoso profundo e no tratamento da embolia pulmonar, com o emprego de uma única administração diária (Simonneau, 1997; Hull e Pineo, 2000; Cambus *et al.*, 2002).

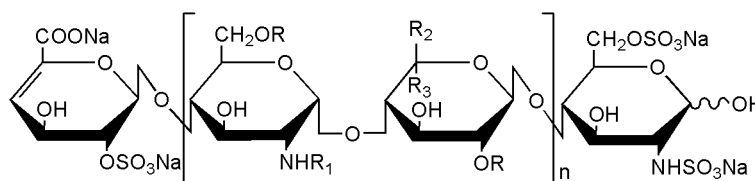


Figura 4: Estrutura química da tinzaparina;  $n=1$  a 25 unidades dissacarídicas.  $R=H/SO_3Na$ ;  $R_1=H/SO_3Na/COCH_3$ ;  $R_2=H$  e  $R_3=COONa$  ou  $R_2=COONa$  e  $R_3=H$ .

#### 1.4 Uso terapêutico de novos agentes anticoagulantes

As limitações dos anticoagulantes disponíveis, principalmente pelo risco elevado de hemorragias e/ ou necessidade de administrações parenterais, bem como a necessidade de serem testados individualmente para cada indicação clínica, induziram à busca de novos agentes anticoagulantes mais seguros, efetivos e que possuam regime padronizado de dose (com, no máximo, duas administrações diárias), seja esta oral ou parenteral (Hirsh, 2003). Neste contexto, foram produzidos protótipos ativos nas várias etapas da cascata de coagulação, já aprovados para uso clínico ou em fase de aprovação (Tabela 3 e Figura 5), incluindo-se inibidores (diretos e indiretos) do fator Xa, inibidores do complexo fator VIIIa/ fator tecidual; inibidores diretos de trombina (IDTs) e inibidores indiretos de trombina, além de moduladores da via da proteína C.

Tabela 3: Agentes aprovados ou em desenvolvimento para utilização na terapêutica anticoagulante, mecanismos de ação, propriedades e nomes comerciais (Adaptado de Stone *et al.*, 1986; Maraganore *et al.*, 1990; Broze *et al.*, 1995; Herbert *et al.*, 1996; Stassens *et al.*, 1996; Sadler, 1997; Ortel e Chong, 1998; Weitz *et al.*, 1998; Fareed *et al.*, 2000; Gustafsson *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2001; Crowther e Weitz, 2004; Walenga *et al.*, 2002; Hirsh, 2003; Lassen *et al.*, 2003; Eriksson *et al.*, 2007).

Mecanismo de ação	Agente	Propriedades	Nome comercial
Inibição indireta do fator Xa	Fondaparinux	Análogo sintético do pentassacarídeo de heparina	Arixtra® <sup>a</sup>
	Idraparinux <sup>b</sup>	Derivado hipermetilado do fondaparinux	
Inibição direta do fator Xa	Razaxaban <sup>c</sup>	Aminobenzisoxazol ativo por via oral	
	Rivaroxaban	Inibidor de baixo peso molecular, ativo por via oral	Xarelto® <sup>d</sup>
Inibição do fVIIa/FT	DX-9065a <sup>e</sup>	Inibidor sintético não-peptídico	
	NAPc2	Peptídeo de nematódeo que se liga ao fator X, inibindo o fator VIIa	
Inibição direta da trombina	TFPI recombinante	Inibidor do complexo FT-fVIIa	
	Argatroban <sup>f</sup>	Inibidor monovalente de baixo peso molecular	
	Melagatran	Forma ativa do ximelagatran	
	Dabigatran	Pró-fármaco (etexilato) ativo por via oral	Pradaxa® <sup>g</sup>
	Ximelagatran	Primeiro inibidor monovalente ativo por via oral	Exanta® <sup>h</sup>
	Hirudina	Polipeptídeo (65 aa) inibidor bivalente da trombina	Iprivasc® (desirudina) <sup>i</sup>
	Lepirudina	Hirudina recombinante	Refludan® <sup>j</sup>
Inibição indireta da trombina	Bivalirudina	Análogo semi-sintético da hirudina	Angiomax® <sup>k</sup>
	Heparina e derivados	Heparina, HBPM, derivados semi-sintéticos, fondaparinux	
	Outros GAGs Galactanas e fucanas	Heparan, dermatan e condroitina sulfatos Compostos sulfatados não derivados da heparina	
Modulação da via da proteína C	APC	Proteína C recombinante	
	Trombomodulina solúvel (sTM)	Análogo recombinante do domínio extracelular da trombomodulina	

<sup>a, f</sup> GlaxoSmithKline, Brentford, Inglaterra;

<sup>b</sup> Sanofi-Aventis, Paris, França;

<sup>c</sup> Bristol-Myers Squibb, Princeton, EUA;

<sup>d, j</sup> Bayer Healthcare AG, Leverkusen, Alemanha;

<sup>e</sup> Daiichi Sankyo, Tóquio, Japão;

<sup>g</sup> Boehringer Ingelheim, Biberach, Alemanha;

<sup>h</sup> AstraZeneca, Mölndal, Suécia;

<sup>i</sup> Canyon Pharmaceuticals, Hunt Valley, EUA;

<sup>k</sup> The Medicines Company, Parsippany, EUA.

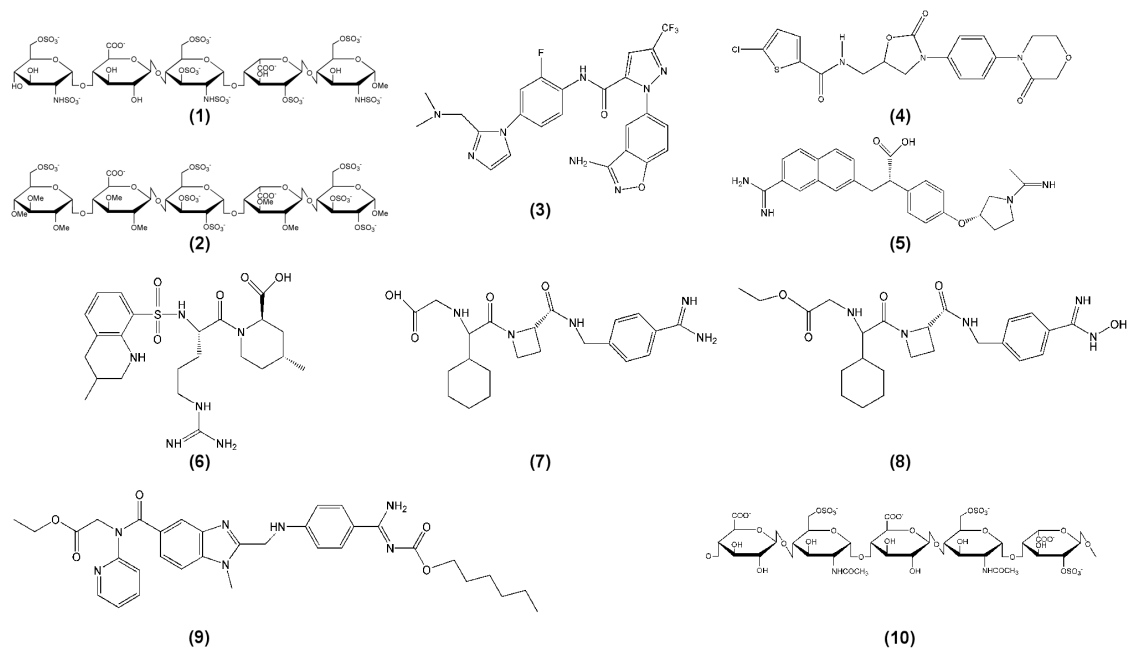


Figura 5: Estrutura de alguns agentes anticoagulantes apresentados na Tabela 3: Fondaparinux (1); Idraparinux (2); Razaxaban (3); Rivaroxaban (4); DX-9065a (5); Argatroban (6); Melagatran (7); Ximelagatran (8); Dabigatran etexilato (9); Heparan Sulfato (10).

A proposta de uma estrutura mínima de heparina capaz de interagir com a antitrombina levou ao desenvolvimento de inibidores específicos do fator Xa, sem atividade sobre a trombina. O fondaparinux, pentassacarídeo sintético análogo da sequência de heparina, foi o primeiro protótipo desta classe de agentes antitrombóticos. Trata-se de um inibidor indireto do fator Xa, com alta afinidade de ligação à antitrombina (Walenga *et al.*, 2002; Hirsh, 2003). A estrutura cristalográfica do complexo envolvendo a antitrombina e o fondaparinux está ilustrada na Figura 6.

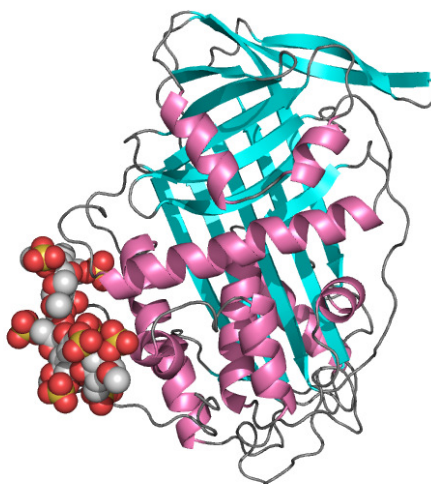


Figura 6: Estrutura cristalográfica do complexo entre a antitrombina e o pentassacarídeo sintético fondaparinux, código PDB 1AZX (Jin *et al.*, 1997).

No grupo dos inibidores diretos da trombina, o argatroban foi o primeiro protótipo aprovado como alternativa à heparina e às HBPM em pacientes com trombocitopenia induzida por heparina (TIH; Lewis *et al.*, 2001). O ximelagatran, administrado como pró-fármaco e ativo por via oral, é rapidamente absorvido e convertido completamente na sua forma ativa, o melagatran (Gustafsson *et al.*, 2001).

Os inibidores indiretos de trombina incluem, além da heparina, HBPM e derivados semi-sintéticos da heparina, outros glicosaminoglicanos, como o heparan sulfato, dermatan sulfato e condroitina sulfato (Nader *et al.* 2001; Bouças *et al.*, 2006). Polissacarídeos sulfatados encontrados em algas e invertebrados marinhos, as galactanas e fucanas (Pereira *et al.*, 2002), também apresentaram ação anticoagulante por inibição indireta da trombina.

Embora o desenvolvimento de novos agentes para o tratamento de hipercoagulopatias tenha gerado alternativas promissoras, ainda não há uma única substância capaz de reunir vantagens suficientes para substituir a heparina e seus derivados como fármacos anticoagulantes e antitrombóticos (Fareed *et al.*, 2000; Hirsh, 2003). Neste contexto, a busca de uma molécula ideal em termos de eficácia, segurança e facilidade de uso, permanece como um objetivo a ser alcançado.



## 1.5 Heparanase e heparinases

Os glicosaminoglicanos podem ser clivados enzimaticamente segundo dois mecanismos distintos: hidrólise e  $\beta$ -eliminação. Em mamíferos, enzimas hidrolíticas como a heparanase clivam a ligação glicosídica nos GAGs através de hidrólise, diferentemente das heparinases bacterianas, que despolimerizam heparina e heparan sulfato segundo um mecanismo de eliminação (Linhardt *et al.*, 1986; Vlodavsky e Friedmann, 2001).

A clivagem dos GAGs pela heparanase resulta em fragmentos de 10 a 20 unidades monossacarídicas, sugerindo que esta enzima reconhece uma estrutura pouco comum e específica nas cadeias de heparina e heparan sulfato (Pikas *et al.*, 1998; Vlodavsky e Friedmann, 2001). A hidrólise ocorre na ligação entre o carbono C1 do ácido urônico e o oxigênio da glicosamina (C1-Ox), reconhecendo a sulfatação no O2 do ácido urônico na unidade dissacarídica adjacente ao sítio de clivagem (Figura 7) (Pikas *et al.*, 1998). Em contrapartida, alguns estudos não consideram esta O-sulfatação essencial para o reconhecimento do substrato (Parish *et al.*, 2001; Vlodavsky e Friedmann, 2001).

A atividade da heparanase foi primeiramente descrita em placentas humanas e em hepatócitos de ratos. Desde então, esta enzima foi identificada em uma variedade de células e tecidos tanto normais (células endoteliais, plaquetas, mastócitos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e B) quanto neoplásicos (linfoma, carcinoma e melanoma) (Vlodavsky *et al.*, 1994; Parish *et al.*, 2001). Adicionalmente, níveis elevados de heparanase foram detectados no soro de animais e pacientes com tumores apresentando metástases (Nakajima *et al.*, 1988).

Tais resultados identificaram a heparanase como a principal enzima capaz de degradar heparan sulfato em tecidos humanos, evidenciando um alvo promissor para o desenvolvimento de agentes antitumorais. Assim, produtos naturais quimicamente modificados, pequenas moléculas e anticorpos monoclonais vêm sendo testados como inibidores de heparinases, tornando-se potenciais agentes para aplicação terapêutica (Miao *et al.*, 2006; Gingis-Velitzki *et al.*, 2007).

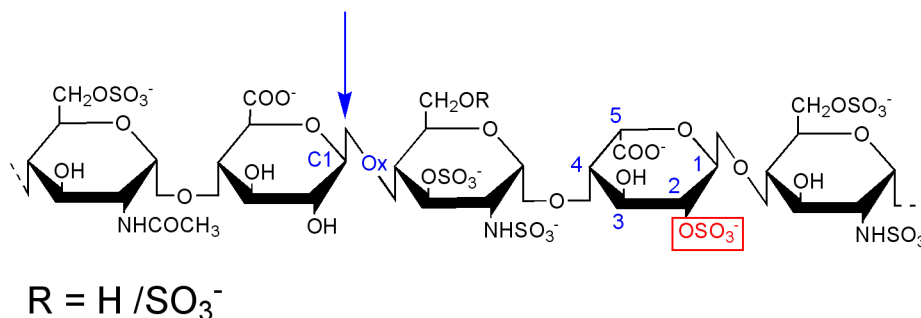


Figura 7: Mecanismo de clivagem da heparanase. A seta em azul indica a ligação hidrolisada no glicosaminoglicano. O grupamento sulfato reconhecido pela enzima está destacado em vermelho.

Em bactérias, as cadeias polissacarídicas são suscetíveis à ação de liases clivando a ligação entre a glicosamina e o carbono C4 do ácido urônico (Ox–C4), resultando em um produto insaturado entre os carbonos 4 e 5 (Figura 8; Shaya *et al.*, 2006; Sampaio *et al.*, 2006). O principal exemplo desta classe de enzimas pode ser observado nas heparinases encontradas na bactéria do solo *Flavobacterium heparinum* (Nader *et al.*, 1990; Lohse e Linhardt, 1992), conhecida também como *Pedobacter heparinus* (Steyn *et al.*, 1998) ou *Cytophaga heparina* (Christensen, 1980). Estas enzimas são capazes de converter heparina e/ ou heparan sulfato em dissacarídeos através da quebra da ligação  $\alpha(1\rightarrow4)$  entre suas unidades de glicosamina e ácido urônico (Su *et al.*, 1996).

*F. heparinum* produz três heparinases, que diferem entre si em peso molecular, carga atômica e especificidade (Nader *et al.*, 1990; Lohse e Linhardt, 1992; Desai *et al.*, 1993): heparinases I, II e III. A heparinase I (heparina liase I, heparinase; código EC 4.2.2.7, Yang *et al.*, 1985), com alta especificidade pela heparina, age nas ligações entre a glicosamina, geralmente 6-sulfatada e/ ou N-sulfatada, e o ácido idurônico [2S-IdoA(1 $\rightarrow$ 4)6S-GlcNS] (Desai *et al.*, 1993; Shaya *et al.*, 2006). A heparinase III (heparina liase III, heparitinase; código EC 4.2.2.8) cliva principalmente a ligação entre o ácido glicurônico e a glicosamina GlcNS/GlcNAc(1 $\rightarrow$ 4)GlcA, frequente no heparan sulfato (Lohse e Linhardt, 1992; Desai *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1996). Por fim, a enzima heparinase II (heparina liase II, heparitinase II, sem código EC), devido à menor especificidade, é capaz de clivar ambos os sítios supra-mencionados, agindo portanto sobre heparina e heparan sulfato, independentemente do padrão de sulfatação desses GAGs (Nader *et al.*,

1990; Desai *et al.*, 1993; Shaya *et al.*, 2006). Embora estas enzimas apresentem graus variados de homologia, as razões moleculares para tais diferenças de especificidade ainda permanecem desconhecidas.

As heparinases possuem importantes aplicações terapêuticas e diagnósticas, como no monitoramento dos níveis sanguíneos de heparina (Baug e Zimmermann, 1993; Tejedor *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1999), na neutralização da heparina no sangue (Godavarti e Sasisekharan, 1998), e na inibição da neovascularização (Sasisekharan *et al.*, 1994; Shriver *et al.*, 1998). Também são empregadas na produção da HBPM tinzaparina (Tabela 2 e Figura 4) (Godavarti e Sasisekharan, 1998; Nader *et al.*, 2001). Mais recentemente, como observado para a heparanase, testes com as heparinases bacterianas em mamíferos vêm mostrando resultados como alternativa na terapia antitumoral (Yang *et al.*, 2007). Quando administrada *in vivo*, a enzima heparinase III, que degrada o heparan sulfato, mostrou-se capaz de inibir o crescimento e metástases de melanomas e de carcinomas de pulmão em modelos animais (Liu *et al.*, 2002). Posteriormente, foram testados os efeitos desta enzima em mielomas sólidos, pois o microambiente onde este tumor se desenvolve é abundante em heparan sulfato. Injeções diárias de heparinase III nos animais com mielomas subcutâneos marcados inibiram consideravelmente o crescimento destes tumores (Yang *et al.*, 2007), caracterizando uma potencial ferramenta terapêutica em desenvolvimento.

Diante do exposto, as heparinases tornam-se alvos moleculares a serem explorados sobretudo na preparação de GAGs quimicamente modificados, nos quais atividades biológicas específicas de polímeros de heparina/ heparan sulfato naturais são acentuadas, enquanto outras são removidas. Estudos recentes indicam que a heparinase II pode ser utilizada, particularmente, na avaliação do grau e tipo de modificação química que ocorre durante a preparação de tais polímeros (Tsuda *et al.*, 1999).

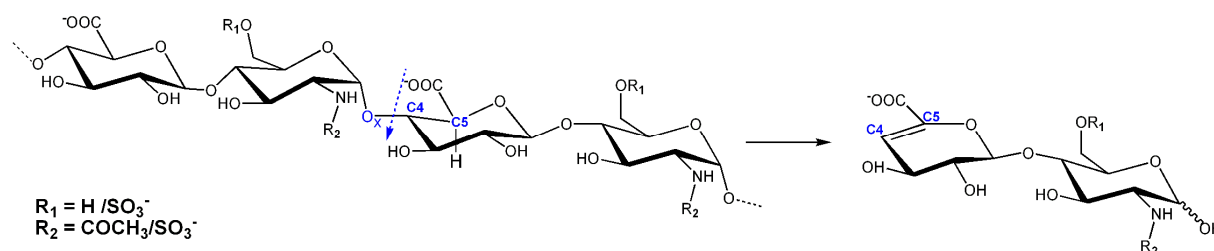


Figura 8: Mecanismo de clivagem da heparinase II, formando uma insaturação entre os átomos C4 e C5 do ácido urônico. A seta pontilhada indica a ligação clivada pela enzima.

### 1.5.1 Características estruturais da heparinase II

A enzima heparinase II possui 772 resíduos de aminoácidos; porém, ao ser exportada para o espaço periplásmico, sofre clivagem em uma sequência sinal de 25 resíduos na sua extremidade N-terminal, produzindo sua forma ativa com 747 resíduos de aminoácidos (Su *et al.*, 1996; Shaya *et al.*, 2006). É a maior das heparinases, com massa molecular final de 84,6 kDa (Godavarti e Sasisekharan, 1996; Su *et al.*, 1996; Shaya *et al.*, 2006). Das heparinases de *F. heparinum*, é a única a apresentar sua estrutura tridimensional elucidada até o momento, por cristalografia de raios-X, realizada na ausência de ligantes (código PDB 2FUQ) e também na presença de um dissacarídeo (código PDB 2FUT), produto de degradação da heparina (Shaya *et al.*, 2004). A estrutura obtida no cristal apresenta-se em forma dimérica, sendo cada monômero composto por três domínios. O domínio N-terminal (resíduos 26-356) é composto por 14  $\alpha$ -hélices:

- Hélice 1, de Glu55 a Met65;
- Hélice 2, de Pro68 a Met80;
- Hélice 3, de Asp94 a Asn100;
- Hélice 4, de Leu104 a Met117;
- Hélice 5, de Pro121 a Thr137;
- Hélice 6, de Ile146 a Trp163;
- Hélice 7, de Pro170 a Ala184;
- Hélice 8, de Glu205 a Ile219;
- Hélice 9, de Glu225 a Pro247;
- Hélice 10, de Gln253 a Met275;

- Hélice 11, de Pro283 a Lys295;
- Hélice 12, de Thr319 a Tyr329;
- Hélice 13 de Glu332 a Lys340;
- Hélice 14, de Cys348 a Arg356.

O sítio catalítico da enzima localiza-se na interface entre os domínios N-terminal e central. O domínio central (resíduos 357-676) é composto essencialmente por  $\beta$ -folhas. Por fim, o domínio C-terminal (resíduos 677-772), apresenta  $\beta$ -folhas agrupadas no formato de “barril” (Figura 9A). Adicionalmente, a heparinase II apresenta um sítio de ligação para o íon  $Zn^{+2}$ , ao qual é atribuída uma importante função de manutenção da integridade estrutural da estrutura protéica (Figura 9B) (Shaya *et al.*, 2006). Em contrapartida, tal papel é exercido pelo íon  $Ca^{+2}$  na regulação da atividade enzimática das enzimas heparinases I e III que, curiosamente, inibe a atividade da heparinase II (Liu *et al.*, 1999; Shriver *et al.*, 1999).

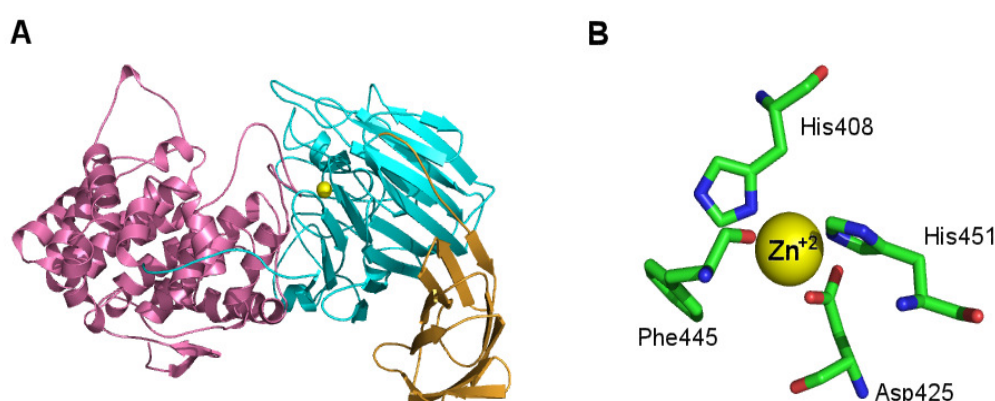


Figura 9: Representação da estrutura cristalográfica da heparinase II (código PDB 2FUQ; Shaya *et al.*, 2006). A – monômero, com os domínios N-terminal (rosa), central (azul claro) e C-terminal (laranja) e o íon  $Zn^{+2}$  (esfera em amarelo). B – sítio de ligação do íon  $Zn^{+2}$ , mostrando os resíduos com distância do íon inferior a 3Å.

Devido à sua baixa seletividade, a heparinase II possui a capacidade de clivar ligações adjacentes, não apenas aos ácidos idurônico e glicurônico, como também aos resíduos de ácido  $\alpha$ -L-galacturônico, raramente existentes nestas estruturas polissacarídicas (Moffat *et al.*, 1991; Shaya *et al.*, 2006). Da mesma forma, foi constatada a atividade da enzima perante substratos quimicamente modificados, seja por acréscimo de grupos sulfato ou adição de grupamentos que não ocorrem

naturalmente como, por exemplo, a heparina N-propionilada (Moffat *et al.*, 1997). Tais características de plasticidade demonstram a importância da heparinase II como modelo para o entendimento dos determinantes moleculares no mecanismo de ação das heparinases e, a partir disto, para o planejamento racional de novas seqüências capazes de inibir ou modular a atividade destas enzimas sobre os glicosaminoglicanos.

## 1.6 Glicosilação de proteínas

A glicosilação é uma das mais comuns e frequentes modificações pós-traducionais em proteínas. As duas principais classes de ligações entre as unidades sacarídicas e o esqueleto peptídico são as ligações N- ou O-glicosídicas. Na N-glicosilação, a porção glicosídica está ligada à amida de uma asparagina, parte da seqüência consenso Asn-X-Thr, onde X pode ser qualquer resíduo de aminoácido, exceto prolina. Em contrapartida, a presença desta seqüência apenas não é o suficiente para determinar se haverá ou não glicosilação (Dwek, 1996). Para a O-glicosilação, a porção glicosídica está ligada ao grupamento hidroxila da cadeia lateral de uma serina, treonina ou hidroxilisina; porém, até o momento não foi identificada uma seqüência consenso para esta modificação (Apweiler *et al.*, 1999). Um terceiro tipo de glicosilação já identificado ocorre em proteínas de superfície celular, as quais estão inseridas na bicamada lipídica por ancoramento a um glicofosfatidilinositol (GPI) (Dwek, 1996).

Diferentemente de proteínas e ácidos nucléicos, que se constituem em polímeros biológicos de cadeias lineares, os carboidratos ligados às proteínas (glicanas) podem ser altamente ramificados. Além disso, suas unidades monossacarídicas podem estar interconectadas por vários tipos de ligações diferentes (Dwek, 1996). Estas características geram uma grande diversidade estrutural nas estruturas de glicosilação.

Os oligossacarídeos N-ligados às glicoproteínas, *i. e.* N-glicanas, contem, na sua maioria, resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) e de manose (Man), unidos através de ligações  $\alpha 1 \rightarrow 2$ ,  $\alpha 1 \rightarrow 3$ ,  $\alpha 1 \rightarrow 4$ ,  $\alpha 1 \rightarrow 6$  e  $\beta 1 \rightarrow 4$  (Qasba *et al.*, 1999; Varki *et al.*, 1999). Em geral, apresentam um pentassacarídeo  $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 - (\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3) - \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 - \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 - \text{GlcNAc}$  (este último ligado à asparagina) como núcleo comum (Dwek, 1996). As glicanas posteriormente ligadas a este núcleo podem formar ramificações ou “antenas” (geralmente entre 1 e 4 antenas), contendo uma



## 1.7 Simulação por MD de carboidratos e glicoproteínas

A elucidação de estrutura tridimensional de biomacromoléculas, como proteínas e carboidratos, constitui-se em requisito essencial para o entendimento de seu papel fisiológico. Neste contexto, o uso de ferramentas de modelagem molecular tem tornado-se cada vez mais amplo na descrição detalhada das propriedades conformacionais e na predição do comportamento destes sistemas moleculares, complementando dados obtidos experimentalmente.

No caso específico de carboidratos, a determinação experimental das estruturas tridimensionais por métodos de cristalografia e RMN é influenciada pela dificuldade de cristalização de oligossacarídeos e glicoconjugados em decorrência de sua elevada flexibilidade. Desta forma, a modelagem molecular permite complementar as informações obtidas por estes métodos experimentais, descrevendo os carboidratos em seus ambientes naturais, solvatados, com contra-íons e/ou interagindo com suas proteínas-alvo.

Em relação à heparina e análogos, no intuito de viabilizar a descrição computacional das propriedades conformacionais de glicosaminoglicanos, o trabalho de Verli e Guimarães utilizou simulações de MD para um decassacarídeo de heparina (Verli e Guimarães, 2004), tomando como referência uma estrutura deste composto previamente determinada por RMN. Neste trabalho, foi necessária a parametrização de um campo de força com cargas atômicas de *ab initio* (HF 6-31G\*\*), utilizando o esquema de cargas de Löwdin (Schmidt *et al.*, 1993), para posterior utilização na MD empregando o pacote de simulação GROMACS (Berendsen *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2005). Este protocolo permitiu a descrição adequada da conformação da heparina em solução aquosa, abrindo a oportunidade para simulação de sistemas moleculares envolvendo GAGs em pacotes de simulação extremamente rápidos, com baixo custo computacional.

Ainda em relação à parametrização de campos de força, o trabalho posterior obteve, por métodos *ab initio*, três esquemas diferentes de cargas atômicas: Mulliken, Löwdin e cargas ESP (ajustadas ao potencial eletrostático), a serem utilizadas na simulação da heparina. Os resultados demonstraram a vantagem das cargas de Löwdin, tais como o reduzido custo computacional e a pequena dependência da conformação molecular (Becker *et al.*, 2005).

Assim, trabalhos seguintes de nosso grupo de pesquisa concentraram-se em grande parte no estudo de complexos envolvendo a heparina e seus derivados,



através de cálculos *ab initio*, *docking* e simulações de dinâmica molecular. Em relação à interação com a antitrombina, simulações de MD foram realizadas para o complexo AT- pentassacarídeo sintético e também para as duas moléculas livres em solução (Verli e Guimarães, 2005). Os resultados permitiram a observação de um mecanismo tipo encaixe induzido na formação do complexo e adicionalmente, o efeito da conformação do IdoA, na interação com a AT.

Posteriormente, novos polissacarídeos, como as galactanas e fucanas, foram também analisados em complexos com a AT (Becker *et al.*, 2007). Inicialmente foi realizada uma análise conformacional dos dissacarídeos de galactana e fucana, através da construção de mapas de contorno. Após observação das conformações mais estáveis, tais dissacarídeos foram submetidos a simulações de MD. Por fim, estas glicanas foram complexadas à AT por ferramentas de *docking* e tais complexos refinados por simulações de MD. Devido às orientações distintas dos dois polissacarídeos na interação com a AT após a simulação dos complexos, foi possível postular uma razão molecular para a diferença entre suas atividades biológicas (Pereira *et al.*, 2002).

O protocolo adotado para a análise conformacional de dissacarídeos (Becker *et al.*, 2007) permitiu, então, o aprofundamento do estudo sobre o equilíbrio entre as conformações do IdoA adotadas em solução aquosa, presente em fragmentos de heparina (Pol-Fachin e Verli, 2008). Os mínimos de energia obtidos foram refinados por simulações de MD com duração de 0,2 $\mu$ s, gerando informações sobre a flexibilidade e as forças envolvidas na conformação dos oligossacarídeos, em consequência da geometria do resíduo de IdoA.

Adicionalmente, uma metodologia para a caracterização conformacional de glicoproteínas em solução aquosa, está em desenvolvimento no grupo (Pol-Fachin *et al.*, 2009), reunindo os protocolos de caracterização de carboidratos e de proteínas por simulações de MD utilizados nos trabalhos anteriores e refinando a aplicação de tais ferramentas. A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que a MD é capaz de reproduzir adequadamente o perfil conformacional de carboidratos e de glicoproteínas, tratando-se de uma ferramenta adicional para a investigação de funções destas e de outras moléculas de interesse biológico.

## 2 OBJETIVOS

Em função do exposto, o presente trabalho tem como objetivo central a caracterização estrutural e conformacional da enzima heparinase II através da aplicação de simulações de dinâmica molecular. Busca-se, portanto, compreender os determinantes estruturais para:

- O papel da glicosilação nas propriedades conformacionais da heparinase II;
- A influência de íons ( $Zn^{+2}$  e  $Ca^{+2}$ ) na atividade da enzima;
- Analisar o envolvimento de regiões participantes do processo catalítico.

A partir destas informações pretende-se prosseguir no estudo desta família de enzimas, de suas propriedades catalíticas e, desta forma, criar subsídios para a modificação racional das propriedades catalíticas da proteína e, assim, construir novas plataformas para a obtenção de análogos sintéticos de heparina.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Programas utilizados

Os protocolos referentes a cada método utilizado no trabalho serão descritos adiante, enquanto que os programas utilizados incluem:

- Manipulação e mutação de sequências polipeptídicas: Swiss-PDB Viewer (Guex e Peitsch, 1997);
- Visualização de moléculas: VMD (Humphrey *et al.*, 1996), Molden (Schaffenaar, 1997) e PyMol (De Lano, 2002);
- Simulações de dinâmica molecular: GROMACS 3.3 (Berendsen *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2005);
- Geração de topologias: PRODRG (van Aalten *et al.*, 1996);
- Análise de estrutura secundária: DSSP (Kabsch e Sander, 1983) e PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

#### 3.2 Protocolo geral empregado

A estrutura tridimensional da heparinase II foi obtida no Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000), banco de dados estruturais de macromoléculas biológicas, sob o código 2FUQ. A estrutura de glicosilação observada (um tetrassacarídeo representado na Figura 11) foi dividida em três dissacarídeos: Xyl- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-GlcA, GlcA- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2)-Man e Rha- $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-Man. Estes foram, separadamente, submetidos ao PRODRG (van Aalten *et al.*, 1996), gerando o arquivo de topologia a ser utilizado nas simulações de MD. Foram construídos, então, mapas de contorno para os dissacarídeos, cujas populações com os mínimos de energia foram utilizadas para as simulações de MD. Após, parâmetros relativos aos dissacarídeos simulados também foram acrescentados na topologia da proteína glicosilada.

O protocolo geral de simulações de dinâmica molecular empregado foi baseado nos procedimentos descritos previamente por de Groot e Grubmüller (2001) e posteriormente empregados pelo grupo (Verli e Guimarães, 2004; Becker *et al.*, 2005; Verli e Guimarães, 2005; Becker *et al.*, 2007; Pol-Fachin e Verli, 2008; Giesel *et al.*, 2008; Pol-Fachin *et al.*, 2009). Os sistemas construídos são compostos por proteína/glicoproteína, solvente e íons, nos quais empregou-se o GROMOS96 43a1 (van Gunsteren *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1999) como campo de força e o pacote

GROMACS 3.3 (Berendsen *et al.*, 1995; van der Spoel *et al.*, 2005) para as simulações de MD.

### 3.3 Definição das ligações glicosídicas

Os símbolos e nomenclatura utilizados seguem as recomendações da IUPAC (IUPAC-IUB, 1983). A orientação relativa de um par de resíduos monossacarídicos adjacentes é descrita por dois ângulos de torção presentes na ligação glicosídica, representados pelas letras gregas  $\phi$  e  $\psi$ . Para uma ligação (1→X), onde “X” é “2” ou “4” para as ligações (1→2) ou (1→4), respectivamente, as definições são mostradas a seguir, nas ligações glicosídicas da heparinase II (Figura 11):

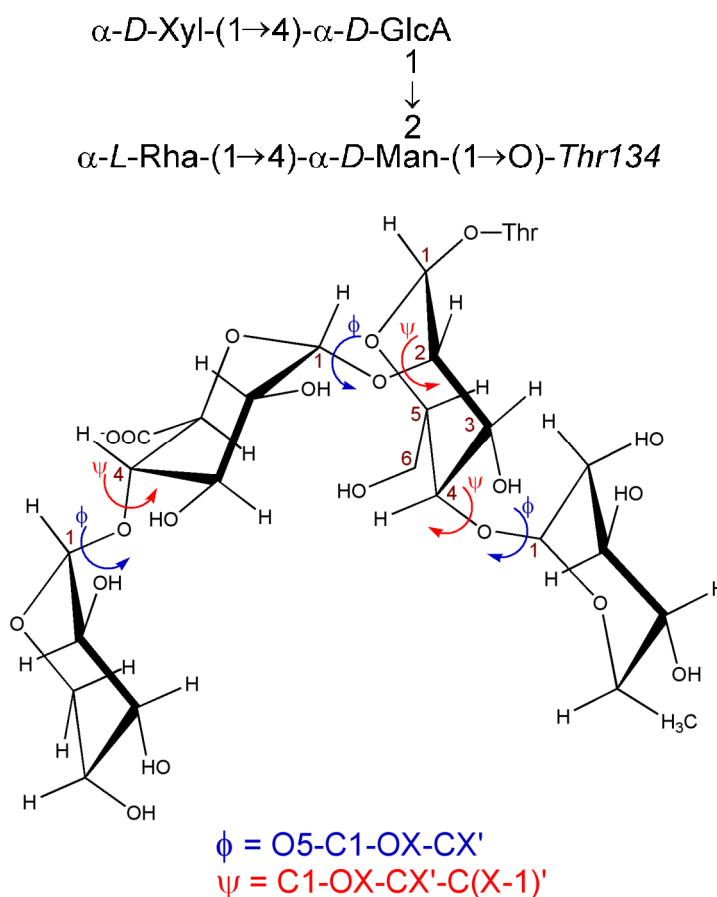


Figura 11: Definição dos ângulos de diedro  $\phi$  e  $\psi$  das ligações glicosídicas observadas na estrutura de glicosilação na heparinase II.

### 3.4 Simulações de MD

#### 3.4.1 Protocolo de simulação

Todas as simulações foram realizadas à temperatura de 310K e tiveram duração de 20ns. Cada molécula (proteína ou glicoproteína) foi inicialmente solvatada em uma caixa retangular utilizando condições periódicas de contorno e o modelo de água SPC (Berendsen *et al.*, 1987). Contra-íons (cloreto ou sódio) foram adicionados de forma a neutralizar as cargas residuais. Cada sistema, composto por proteína/glicoproteína, solvente e íons (compreendendo cerca de 77000 átomos) foi então submetidos à minimização de energia por aproximadamente 10.000 passos utilizando o algoritmo *Steepest Descents*. A estrutura minimizada foi então utilizada como ponto de partida para simulações de MD. Os métodos Lincs e Settle (Miyamoto *et al.*, 1992; Hess *et al.*, 1997) foram aplicados na restrição de ligações covalentes de forma a permitir um passo de integração de 2fs, enquanto as interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método Particle-Mesh Ewald (PME; Darden *et al.*, 1993). A temperatura e a pressão do sistema foram mantidas constantes através do acoplamento da proteína, carboidrato, íons e solvente a banhos externos de temperatura e pressão, utilizando constantes de acoplamento de, respectivamente,  $\tau = 0,1$  ps e  $\tau = 0,5$  ps (Berendsen *et al.*, 1984). A constante dielétrica do meio foi tratada como  $\epsilon = 1$ .

As simulações de dinâmica molecular foram iniciadas através de um aquecimento gradativo do sistema, denominado *termalização*. Esta etapa tem por objetivo uniformizar as forças contidas na estrutura cristalográfica e, desta forma, evitar deformação na proteína (Figura 12; Verli, 2005). Cada sistema foi, então, aquecido lentamente de 50K a 310K, em passos com duração de 5ps. Em cada passo, a temperatura é aumentada em 50K até atingir a temperatura de equilíbrio de 310K, na qual o sistema prossegue pelo tempo de simulação estipulado.

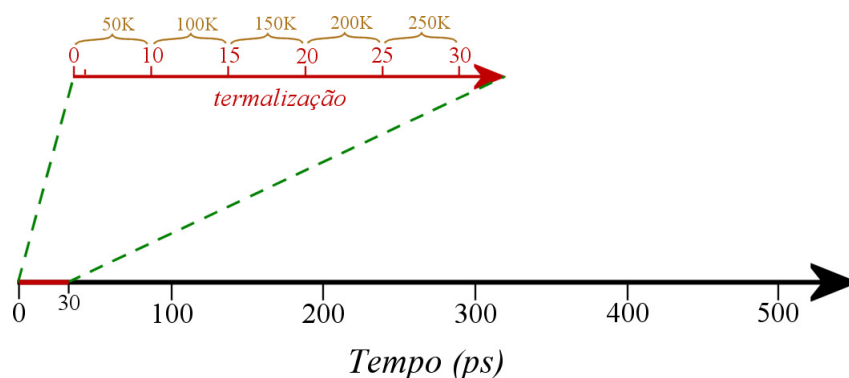


Figura 12: Esquema das etapas que compõe as simulações de MD a 310K. De 0ps a 30ps, uma série de etapas de 5ps cada, aquecendo lentamente o sistema em incrementos de 50K. Após 30ps, o sistema está a 310K e se mantém nesta temperatura pelo restante da simulação.

Baseados na estrutura cristalográfica da heparinase II, quatro sistemas foram simulados:

- (1) Heparinase II não-glicosilada sem a presença de íons estruturais (apenas a estrutura polipeptídica);
- (2) Heparinase II não-glicosilada e com a presença do íon  $Zn^{+2}$ ;
- (3) Heparinase II não-glicosilada e com a presença do íon  $Ca^{+2}$ ;
- (4) Heparinase II glicosilada e com a presença do íon  $Zn^{+2}$ .

### 3.4.2 Validação das simulações de MD

A validação dos resultados obtidos das simulações de MD foi realizada através da comparação com resultados experimentais prévios, como a estrutura cristalográfica e dados de RMN, bem como pela observação da estabilidade dos sistemas estudados, por meio da manutenção da estrutura secundária, energia, densidade e volume.

#### 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos serão apresentados na forma do trabalho elaborado durante a realização da dissertação, citado abaixo:

- Gabriela Bernardes Escouto, Hugo Verli. Conformational aspects of heparinase II from *Flavobacterium heparinum*. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **2009**, em preparação.

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu através de simulações de MD a descrição do comportamento conformacional da heparinase II em solução aquosa, que pode ser sintetizada em duas abordagens principais:

- Caracterização conformacional da estrutura de glicosilação da heparinase II por MD, tanto das ligações glicosídicas isoladas quanto ligadas à enzima. Os resultados demonstraram que a estrutura de glicosilação promove estabilização na conformação protéica, reforçando ainda o potencial do protocolo utilizado na predição de conformações de glicoproteínas em solução aquosa.
- Análise da influência dos íons metálicos  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  na estrutura protéica da heparinase II. Foi constatada forte modulação da flexibilidade da proteína por tais íons, especificamente em regiões formadas por alças. O grande aumento de flexibilidade observado na presença do íon  $\text{Ca}^{+2}$ , sobretudo em regiões próximas ao sítio de ligação ao substrato, resultou em uma menor estabilidade observada de forma global no sistema.

Os resultados obtidos reforçam o potencial de ferramentas de modelagem molecular no estudo de sistemas biológicos, particularmente na caracterização molecular de glicoproteínas. Devido ao pequeno número de dados estruturais disponíveis, tais ferramentas tornam-se uma alternativa promissora ao detalhar informações previamente obtidas por métodos experimentais e também sugerindo novas propriedades a serem analisadas e modificadas. Em relação à heparinase II, espera-se, a partir do entendimento dos determinantes moleculares observados na interação com seus substratos, alguns inicialmente expostos neste trabalho, planejar modificações na especificidade da enzima para a obtenção de novos produtos, análogos de heparina, que apresentem efetiva atividade anticoagulante, com redução de efeitos indesejados e facilidade de administração.



## 7 PERSPECTIVAS

Considerando-se os procedimentos de simulação realizados no presente trabalho, assim como as informações obtidas acerca da heparinase II e algumas de suas propriedades conformacionais em solução aquosa, as seguintes perspectivas podem ser traçadas:

- Com o objetivo de verificar as modificações na conformação protéica com o sítio catalítico ocupado, realizar o estudo estrutural e conformacional de heparinóides sulfatados, propondo complexos destes com a heparinase II através de *docking*. Da mesma forma, através de simulações de MD de sistemas com a proteína ligada ao substrato, avaliar a influência da estrutura de glicosilação da heparinase II na formação de tais complexos.
- Caracterização conformacional das heparinases I e III e de outras polissacarídeo-liases e hidrolases. Devido aos diversos processos fisiológicos envolvendo clivagem de glicosaminoglicanos, estas enzimas evidenciam um alvo múltiplo para planejamento de ligantes, como já observado, atuantes na hemostasia e, mais recentemente, em tumores.

## 8 GLOSSÁRIO<sup>2</sup>

**Análise Populacional de Mulliken**: a análise populacional de Mulliken é um método para distribuir os elétrons em átomos com a finalidade de gerar cargas atômicas parciais. Os resultados são fortemente dependentes do conjunto de bases usado.

Análise populacional de Mulliken: Um esquema de partição, baseado no uso das matrizes de densidade e de recobrimento, para distribuir os elétrons de uma entidade molecular de algum modo fracionário entre suas várias partes (átomos, ligações, orbitais). Como em outros esquemas usados para distribuir a densidade eletrônica em moléculas, a análise populacional de Mulliken é arbitrária e fortemente dependente do conjunto de bases empregado. Contudo, a comparação de análises populacionais para uma série de moléculas é útil para uma descrição quantitativa das interações intramoleculares, de reatividade química e de regularidades estruturais.

**Arquivo PDB**: um arquivo PDB (do inglês *Protein Data Bank*, Banco de Dados de Proteínas) é um arquivo ASCII (do inglês American Symbolic Code for Information Interexchange = text, Código Simbólico Americano para Troca de Informação) usado para armazenar as coordenadas atômicas de uma molécula, geralmente uma proteína ou ácido nucléico (*veja PDB*).

**Cálculos *ab initio***: Cálculos *ab initio* são cálculos mecânico-quânticos que usam equações exatas, sem aproximações, que envolvem a população eletrônica total da molécula.

Métodos mecânico-quânticos *ab initio* (sinônimo com métodos mecânico-quânticos não empíricos): métodos de cálculos mecânico-quânticos independentes de qualquer experimento que não seja a determinação de constantes fundamentais. Os métodos são baseados no uso da equação de Schrödinger completa para tratar todos os elétrons de um sistema químico. Na prática, aproximações são necessárias para restringir a complexidade da função de onda eletrônica e tornar seu cálculo possível.

**Cálculos Mecânico-quânticos**: Cálculos mecânico-quânticos são cálculos de propriedades moleculares baseados na equação de Schrödinger que levam em conta as interações entre os elétrons em uma molécula.

**Campo de Força**: é um conjunto de funções e parametrizações usadas em cálculos de mecânica molecular. Estas funções definem as energias de estiramento de ligação e de distorção de ângulo de ligação (tanto de valência quanto diedro) de uma molécula, quando comparadas com a sua conformação não tensionada (aquela caracterizada pelos valores padrões de comprimentos e de ângulos de ligação).

---

<sup>2</sup> Definições obtidas de de Sant'Anna, 2002 e van der Spoel *et al.*, 2005.

Alguns campos de força podem conter termos de interação entre átomos não ligados, de efeitos eletrostáticos, de ligação de hidrogênio e de outros efeitos estruturais.

**Campo e Potencial Eletrostáticos**: O campo e o potencial eletrostáticos são propriedades de uma molécula que surgem da interação entre uma sonda carregada, tal como uma carga pontual unitária positiva representando um próton, e a molécula alvo. Este campo e o potencial são usados em estudos de relações quantitativas estrutura-atividade tridimensionais (3D-QSAR) e para comparar ou estimar a semelhança de um conjunto de moléculas.

**Dinâmica Molecular**: é um procedimento de simulação que consiste na computação do movimento dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de movimento de Newton. As forças que agem nos átomos, necessárias para simular seus movimentos, são calculadas usando campos de força de mecânica molecular.

**Mecânica Molecular**: é o cálculo das características geométricas e de energia de entidades moleculares baseado em funções de potencial empíricas, cuja forma é tomada da mecânica clássica. O método pressupõe que as funções de potencial possam ser transferidas dentro de um conjunto de moléculas semelhantes. Uma suposição é feita sobre os comprimentos e ângulos “naturais” de ligação, cujos desvios resultam em tensão de ligação e tensão angular, respectivamente. As forças de Van der Waals e eletrostáticas também são levadas em conta.

**Minimização de Energia**: é um procedimento matemático para localizar as conformações estáveis (mínimos de energia) de uma molécula, determinadas por cálculos de mecânica molecular ou mecânico-quânticos.

**Modelagem Molecular**: é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares usando a química computacional e as técnicas de visualização gráfica visando fornecer uma representação tridimensional, sob um conjunto de circunstâncias.

**Protein Data Bank (PDB)**: é um banco de dados de proteínas mantido no Laboratório Nacional Brookhaven, Upton, New York, que contém estruturas de raios-X de dezenas de milhares de proteínas.

**Química Computacional**: é uma disciplina que usa métodos matemáticos para o cálculo de propriedades moleculares e para a simulação do comportamento

molecular. Também inclui, por exemplo, o planejamento de sínteses, a pesquisa de bancos de dados e a manipulação de bibliotecas combinatórias.

**Receptor**: é uma proteína ou um complexo de proteínas localizado no interior ou na superfície de uma célula, que reconhece especificamente e interage com um composto que atua como um mensageiro molecular (neurotransmissor, hormônio, fármaco, etc.). Em um sentido mais amplo, o termo receptor é frequentemente usado como sinônimo para qualquer sítio específico de ligação de fármacos (em oposição a não específico, como a ligação às proteínas do plasma), também incluindo ácidos nucleicos, tais como o DNA.

**Termos de Energia Não-Ligados**: são funções de energia potencial que descrevem interações de Van der Waals, eletrostáticas e de ligação hidrogênio em um campo de força.

**Topologia Molecular**: Topologia molecular é a descrição do modo pelo qual os átomos estão ligados em uma molécula. Em diversos programas de dinâmica molecular constitui-se em um arquivo que descreve em quais átomos ou combinações de átomos as diversas contribuições de um campo de força irão atuar. Apresenta atributos constantes para cada átomo, como quais átomos existem em uma molécula, as características destes átomos (*e.g.* um oxigênio carbonílico é diferente de um oxigênio em um grupamento éter ou hidroxila), como cargas atômicas, termos ligados e não-ligados.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### Referências citadas no texto e no manuscrito

- Andrec, M.; Snyder, D. A.; Zhou, Z.; Young, J.; Montelione, G. T.; Levy, R. M. A large data set comparison of protein structures determined by crystallography and NMR: Statistical test for structural differences and the effect of crystal packing. *Proteins*, **2007**, *69*, 449–465.
- Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1473*, 4-8.
- Baug, R. F.; Zimmermann, J. J. Heparinase in the activated clotting time assay: monitoring heparin-independent alterations in coagulation function. *Perfusion Rev.*, **1993**, *1*, 14–28.
- Becker, C. F.; Guimarães, J. A.; Verli, H. Molecular dynamics and atomic charge calculations in the study of heparin conformation in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, **2005**, *340*, 1499–1507.
- Becker, C. F.; Guimarães, J. A.; Mourão, P. A. S.; Verli, H. Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: implications to their anticoagulant activities. *J. Mol. Graph. Mod.*, **2007**, *26*, 62-68.
- Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular-dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.*, **1984**, *81*, 3684-3690.
- Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.*, **1987**, *91*, 6269-6271.
- Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS – a message-passing parallel molecular-dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.*, **1995**, *91*, 43-56.
- Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 235-242.
- Björk, I.; Lindahl, U. Mechanism of the anticoagulant action of heparin. *Mol. Cell. Biochem.*, **1982**, *48*, 161-182.
- Boneu, B. Low molecular weight heparins: are they superior to unfractionated heparins to prevent and to treat deep vein thrombosis? *Thromb. Res.*, **2000**, *100*, V113-V120.

- Bouças, R. I.; Sampaio, L. O.; Andrade, G. P. V.; Lopes, C. C.; Nascimento, F. D.; Tersariol, I. L. S.; Rocha, H. A. O.; Nader, H. B. Heparin and heparin derivatives and their effect on hemostasis. Em *Insights into Carbohydrate Structure and Biological Function*; Verli, H., Ed; Transworld Research Network: Kerala, **2006**; cap. 2.
- Bouma, B. N.; Griffin, J. H. Human blood coagulation factor XI. Purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XII. *J. Biol. Chem.*, **1977**, *252*, 6432-6437.
- Cambus, J. P.; Saivin, S.; Heilmann, J. J.; Caplain, H.; Boneu, B.; Houin, G. The pharmacodynamics of tinzaparin in healthy volunteers. *Br. J. Haematol.*, **2002**, *116*, 649–652.
- Christensen, P. Description and taxonomic status of *Cytophaga heparina* (Payza and Korn) comb. nov. (basionym: *Flavobacterium heparinum* Payza and Korn 1956). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1980**, *30*, 473-475.
- Conrad, H. *Heparin Binding Proteins*. Academic Press: San Diego, **1998**.
- Danielsson, A.; Raub, E.; Lindahl, U.; Björk, I. Role of ternary complexes, in which heparin binds both antithrombin and proteinase, in the acceleration of the reactions between antithrombin and thrombin of factor Xa. *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261*, 15467-15473.
- Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald – an N.log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys.*, **1993**, *98*, 10089-10092.
- Davie, E. W.; Ratnoff, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, **1964**, *145*, 1310-1312.
- de Groot, B. L.; Grubmüller, H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science*, **2001**, *294*, 2353-2357.
- De Lano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. De Lano Scientific: San Carlos, USA, 2002. <http://www.pymol.org>.
- de Sant’Anna, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações IUPAC 1997). *Quim. Nova*, **2002**, *25*, 505-512.
- Desai, U. R.; Wang, H.; Linhardt, R. J. Substrate specificity of the heparin lyases from *Flavobacterium heparinum*. *Arch. Biochem. Bioph.*, **1993**, *306*, 461-468.

- Dietrich, C. P.; Silva, M. E.; Michelacci, Y. M. Sequential degradation of heparin in *Flavobacterium heparinum*. Purification and properties of five enzymes involved in heparin degradation. *J. Biol. Chem.*, **1973**, *248*, 6408-6846.
- Dietrich, C. P.; Nader, H. B.; McDuffie, N. M. Electrofocusing of heparin. Presence of 21 monomeric and dimeric molecular species in heparin preparations. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **1975**, *47*, 301-309.
- Dwek, R. A. Glicobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 683-720.
- Fareed, J.; Jeske, W.; Hoppensteadt, D.; Clarizio, R.; Walenga, J. M.: Low-molecular-weight heparins: pharmacologic profile and product differentiation. *Am. J. Cardiol.*, **1998**, *82*, 3L-10L.
- Fareed, J. W.; Hoppensteadt, D. A.; Bick; R. L. An update of heparins at the beginning of the new millennium. *Sem. Thromb. Hemost.*, **2000**, *26*, 5-21.
- Gacesa, P. Alginate-modifying enzymes - A proposed unified mechanism of action for the lyases and epimerases. *FEBS Lett.*, **1987**, *212*, 199-202.
- Gettins, P. G. W. Keeping the serpin machine running smoothly. *Genome Research*, **2000**, *10*, 1833-1835.
- Gettins, P. G. W. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.*, **2002**, *102*, 4751-4803.
- Giesel, G. M.; Lima, L. M. T. R.; Faber-Barata, J.; Guimarães, J. A.; Verli, H. Characterization of the papillomavirus  $\alpha 1E2$  peptide unfolded to folded transition upon DNA binding. *FEBS Lett.*, **2008**, *582*, 3619-3624.
- Gingis-Velitski, S.; Ishai-Michaeli, R.; Vlodavsky, I.; Ilan, N. Anti-heparanase monoclonal antibody enhances heparanase enzymatic activity and facilitates wound healing. *FASEB J.*, **2007**, *21*, 3986-3993.
- Godavarti, R.; Sasisekharan, R. A comparative analysis of the primary sequences and characteristics of heparinases I, II e III from *Flavobacterium heparinum*. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, **1996**, *229*, 770-777.
- Godavarti, R.; Sasisekharan, R. Heparinase I from *Flavobacterium heparinum*; role of positive charge in enzymatic activity. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 248-255.
- Guex, N.; Peitsch. M. C. Swiss-Model and the Swiss-PDB Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **1997**, *18*, 2714-2723. <http://www.expasy.org/spdbv>.

- Gustafsson, D.; Nyström, J.-E.; Carlsson, S.; Bredberg, U.; Eriksson, U.; Gyzander, E.; Elg, M.; Antonsson, T.; Hoffmann, K.-J.; Ungell, A.-L.; Sørensen, H.; Någård, S.; Abrahamsson, A.; Bylund, R. The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb. Res.*, **2001**, *101*, 171–181.
- Herrmann, J. L.; O’Gaora, P.; Gallagher, A.; Thole, J. E. R.; Young, D. B. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J.*, **1996**, *15*, 3547–3554.
- Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C.; Fraaije, J. G. E. M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*, **1997**, *18*, 1463–1472.
- Hirsh, J.; Warkentin, T. E.; Raschke, R.; Granger, C.; Ohman, E. M.; Dalen, J. E. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest*, **1998**, *114*, 489S-510S.
- Hirsh J. Current anticoagulant therapy-unmet clinical needs. *Thromb. Res.*, **2003**, *109*, S1-S8.
- Huang, W.; Matte, A.; Li, Y.; Kim, Y. S.; Linhardt, R. J.; Su, H.; Cygler, M. J. Crystal structure of chondroitinase B from *Flavobacterium heparinum* and its complex with a disaccharide product at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **1999**, *294*, 1257–1269.
- Huang, W.; Boju, L.; Tkalec, L.; Su, H.; Yang, H.; Gunay, N. S.; Linhardt, R. J.; Kim, Y. S.; Matte, A.; Cygler, H. Active site of chondroitin AC lyase revealed by the structure of enzyme-oligosaccharide complexes and mutagenesis. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 2359-2372.
- Hull, R. D.; Pineo, G. F. Low-molecular-weight heparin in the treatment of venous thromboembolism. *Semin. Thromb. Hemost.*, **2000**, *26* (Suppl. 1), 61-67.
- Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*, **1996**, *14*, 33-38. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>.
- Huntington, J. A.; Read, R. J.; Carrell, R. W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, **2000**, *407*, 923–926.



- Imberty, A.; Pérez, S. Structure, conformation, and dynamics of bioactive oligosaccharides: theoretical approaches and experimental validations. *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 4567–4588.
- Iozzo, R. V. Matrix Proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, 67, 609–652.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *Pure Appl. Chem.*, **1983**, 55, 1269–1272.
- Jain, S.; Sundaralingam, M. Effect of crystal packing environment on conformation of the DNA duplex- molecular – structure of a DNA octamer D (G-T-G-T-A-C-A-C) in two crystal forms. *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 12780-12784.
- Jenny, N. S.; Mann, K. G. Coagulation Cascade: An Overview. Em *Thrombosis and Hemorrhage*, 2<sup>a</sup> Ed.; Loscalzo, J.; Schafer, A. I., Eds.; Williams & Wilkins: Baltimore, **1998**; cap. 1.
- Jin, L.; Abrahams, J. P.; Skinner, R.; Petitou, M.; Pike, R. N.; Carrel, R. W. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 14683-14688.
- Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern-recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **1983**, 22, 2577-2637.
- Karplus, M.; Petsko, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature*, **1990**, 347, 631-639.
- Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **1993**, 26, 283-291.
- Lewis, B. E.; Wallis, D. E.; Berkowitz, S. D.; Matthai, W. H.; Fareed, J.; Walenga, J. M.; Bartholomew, J.; Sham, R.; Lerner, R. G.; Zeigler, Z. R.; Rustagi, P. K.; Jang, I. K.; Rifkin, S. D.; Moran, J.; Hursting, M. J.; Kelton, J. G. Argatroban anticoagulant therapy in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation*, **2001**, 103, 1838–1843.
- Li, W.; Johnson, D. J. D.; Esmon, C. T.; Huntington, J. A. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat. Struct. Biol.*, **2004**, 11, 857-862.

- Lindahl, U.; Backstrom, G.; Thunberg, L.; Leder, I. G. Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*, 6551–6555.
- Lindahl, U.; Kusche-Gullberg, M.; Kjellen, L. Regulated diversity of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 24979-24982.
- Linhardt, R. J., Galliher, P. M.; Cooney, C. L. Polysaccharide Lyases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1986**, *12*, 135–176.
- Linhardt, R. J. Analysis of Glycoconjugates. In *Current Protocols in Molecular Biology*; Varki, A., Ed.; Wiley-Interscience: Boston, USA, **1994**; pp 17.13.17-17.13.32.
- Linhardt, R. J. Heparin: Structure and activity. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 2551-2564.
- Liu, D.; Shriver, Z.; Godavarti, R.; Venkataraman, G.; Sasisekharan, R. The calcium-binding sites of heparinase I from *Flavobacterium heparinum* are essential for enzymatic activity. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 4089-4095.
- Liu, D.; Shriver, Z.; Venkataraman, G.; El Shabrawi, Y.; Sasisekharan, R. Tumor cell surface heparan sulfate as cryptic promoters or inhibitors of tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2002**, *99*, 568-573.
- Lohse, D. L.; Linhardt, R. J. Purification and characterization of heparin lyases from *Flavobacterium heparinum*. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 24347-24355.
- Lütteke, T.; Frank, M.; von der Lieth, C. -W. Data mining the Protein Data Bank: automatic detection and assignment of carbohydrate structures. *Carbohydr. Res.*, **2004**, *339*, 1010-1020.
- Matzsch, T., Bergqvist, D., Hedner, U., Ostergaard, P. Effects of an enzymatically depolymerized heparin as compared with conventional heparin in healthy volunteers. *Thromb. Haemost.*, **1987**, *57*, 97-101.
- McLean, J. The thromboplastic action of cephalin. *Am. J. Physiol.*, **1916**, *41*, 250-257.
- Miao, H. Q.; Liu, H.; Navarro, E.; Kussie, P.; Zhu, Z. Development of heparanase inhibitors for anti-cancer therapy. *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 2101–2111.
- Miyamoto, S.; Kollman, P. A. SETTLE: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.*, **1992**, *13*, 952-962.

- Moffat, C. F.; Mclean, M. W.; Long W. F.; Williamson, F. B. Heparinase II from *Flavobacterium heparinum* - Action on chemically modified heparins *Eur. J. Biochem.*, **1991**, *197*, 449–459.
- Moffat, C. F.; Long, W. F.; McLean, M. W.; Williamson, F. B. Heparinase-II-catalyzed degradation of N-propionylated heparin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1997**, *338*, 201-206.
- Mousa, S. A.; Bozarth, J. B.; Barrett, J. S. Pharmacodynamic properties of the Low Molecular Weight Heparin, tinzaparin: effect of molecular weight distribution on plasma tissue factor pathway inhibitor in healthy human subjects. *J. Clin. Pharmacol.*, **2003**, *43*, 727-734.
- Nader, H. B.; Porcionatto, M. A.; Tersariol, I. L. S.; Pinhal, M. S.; Oliveira, F. W.; Moraes, C. T.; Dietrich, C. P. Purification and substrate specificity of Heparitinase I and Heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*. *J Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 16807-16813.
- Nader, H. B.; Pinhal, M. A. S.; Baú, E. C.; Castro, R. A. B.; Medeiros, G. F.; Chavante, S. F.; Leite, E. L.; Trindade, E. S.; Shinjo, S. K.; Rocha, H. A. O.; Tersariol, I. L. S.; Mendes, A; Dietrich, C. P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2001**, *34*, 699-709.
- Nakajima, M.; Irimura, T.; Nicolson, G. L. Heparanases and tumor metastasis. *J. Cell. Biochem.*, **1988**, *36*, 157–167.
- Nascimento, F.; Lopes, C. L.; Rocha, H. A. O.; Sampaio, L. O.; Nader, H. B.; Tersariol, I. L. S. Heparan sulfate proteoglycan as regulator of protein interactions. Em *Insights into Carbohydrate Structure and Biological Function*; Verli, H., Ed; Transworld Research Network: Kerala, **2006**; cap. 9.
- Parish, C. R.; Freeman, C.; Hulett, M. D. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, *1471*, M99–M108.
- Payza, A. N.; Korn, E. D. Bacterial degradation of heparin. *Nature (London)*, **1956**, *177*, 88–89.
- Pereira, M. S.; Vilela-Silva, A. C. E. S.; Valente, A. P.; Mourão, P. A. S. A 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. *Carbohydr. Res.*, **2002**, *337*, 2231-2238.

- Petitou, M.; Herault, J. P.; Bernat, A.; Driguez, P. A.; Duchassoy, P.; Lormeau, J. C.; Herbert, J. M. Synthesis of thrombin-inhibiting heparin mimetics without side effects. *Nature*, **1999**, *398*, 417-422.
- Pikas, D. S.; Li, J. P.; Vlodaysky, I.; Lindahl, U. Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 18770–18777.
- Pol-Fachin, L.; Verli, H. Depiction of the forces participating in the 2-*O*-sulfo- $\alpha$ -L-iduronic acid conformational preference in heparin sequences in aqueous solutions. *Carbohydr. Res.*, **2008**, *343*, 1435-1445.
- Pol-Fachin, L.; Fernandes, C. L.; Verli, H. GROMOS96 43a1 performance on the characterization of glycoprotein conformational ensembles through molecular dynamics simulations. *Carbohydr. Res.*, **2009**, *344*, 491-500.
- Qasba, P. K.; Balaji, P. V.; Rao, V. S. R. Conformational analysis of Asn-linked oligosaccharides: Implications in biological processes. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **1997**, *395-396*, 333-360.
- Reinhold, B. B.; Hauer, C. R.; Plummer, T. H.; Reinhold, V. N. Detailed structural analysis of a novel, specific O-linked glycan from the prokaryote *Flavobacterium meningosepticum*. *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 13197–13203.
- Rhomberg, A. J., Shriver, Z., Biemann, K.; Sasisekharan, R. Mass spectrometric evidence for the enzymatic mechanism of the depolymerization of heparin-like glycosaminoglycans by heparinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1998**, *95*, 12232–12237.
- Salmivirta, M.; Lidholt, K.; Lindahl, U. Heparan sulfate - a piece of information. *FASEB J.*, **1996**, *10*, 1270-1279.
- Sampaio, L. O.; Tersariol, I. L. S.; Lopes, C. C.; Bouças, R. I.; Nascimento, F. D.; Rocha, H. A. O.; Nader, H. B. Heparins and heparan sulfates. Structure, distribution and protein interactions. Em *Insights into Carbohydrate Structure and Biological Function*; Verli, H., Ed; Transworld Research Network: Kerala, **2006**; cap. 1.
- Santos, E. A.; Menezes, L. R.; Pereira, N. M. L.; Andrade, G. P. V.; Nader, H. B.; Dietrich, C. P. Mast cells are present in epithelial layers of different tissues of the mollusk *Anomalocardia brasiliensis*. *In situ* characterization of heparin and a correlation of heparin and histamine concentration. *Histochem. J.*, **2003**, *34*, 553-558.

- Sasisekharan, R.; Moses, M. A.; Nugent, M. A.; Cooney, C. L.; Langer, R. Heparinase inhibits neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 1524-1528.
- Sasisekharan, R.; Ernst, S; Venkataraman, G. On the regulation of fibroblast growth factor activity by heparin-like glycosaminoglycans. *Angiogenesis*, **1997**, *1*, 45-54.
- Sasisekharan, R.; Venkataraman, G. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, *4*, 626-631.
- Schaftenaar, G. MOLDEN. CAOS/CAMM Center, University of Nijmegen, Toernooiveld 1, 6525 ED NIJMEGEN, The Netherlands, **1997**.
- Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. J.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comp. Chem.*, **1993**, *14*, 1347-1363.
- Scott, W. R. P.; Hünenberger, P. H.; Tironi, I. G.; Mark, A. E.; Billeter, S. R.; Fennenn, J.; Torda, A. E.; Huber, T.; Krüger, P.; van Gunsteren, W. F. The GROMOS biomolecular simulation program package. *J. Phys. Chem. A*, **1999**, *103*, 3596-3607.
- Shaya, D.; Li, Y.; Cygler, M. Crystallization and preliminary X-ray analysis of heparinase II from *Pedobacter heparinus*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **2004**, *60*, 1644–1646.
- Shaya, D.; Tocilj, A.; Li, Y.; Myette, J., Venkataraman, G., Sasisekharan, R.; Cygler, M. Crystal structure of heparinase II from *Pedobacter heparinus* and its complex with a disaccharide product. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 15525-15535.
- Shriver, Z.; Hu, Y.; Pojasek, K.; Sasisekharan, R. Heparinase II from *Flavobacterium heparinum* – Role of cysteine in enzymatic activity as probed by chemical modification and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 22904-22912.
- Shriver, Z.; Liu, D.; Hu, Y.; Sasisekharan, R. Biochemical investigations and mapping of the calcium-binding sites of heparinase I from *Flavobacterium heparinum*. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 4082-4088.
- Silva, M. E.; Dietrich, C. P. Structure of heparin. Characterization of the products formed from heparin by the action of a heparinase and a heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. *J. Biol. Chem.*, **1975**, *250*, 6841-6846.

- Simonneau, G.; Sors, H.; Charbonnier, B.; Page, Y.; Laaban, J. P.; Azarian, R.; Laurent, M.; Hirsh, J. L.; Ferrari, E.; Bosson, J. C.; Mottier, D.; Beau, B. A comparison of low molecular-weight heparin with unfractionated heparin for acute pulmonary embolism. *N. Engl. J. Med.*, **1997**, *337*, 663-669.
- Simonovic, M.; Gettins, P. G. W.; Volz, K. Crystal structure of human PEDF, a potent anti-angiogenic and neurite growth-promoting factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2001**, *98*, 11131-11135.
- Steyn, P. L.; Segers, P.; Vancanneyt, M.; Sandra, P.; Kersters, K.; Joubert, J. J. Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. Proposal of the family Sphingobacteriaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1998**, *48*, 165–177.
- Su, H.; Blain, F.; Musil, R. A.; Zimmermann, J. J. F.; Gu, K.; Bennett, D. C. Isolation and expression in *Escherichia coli* of hepB and hep C, genes coding for the glycosaminoglycan-degrading enzymes heparinase II and heparinase III, respectively, from *Flavobacterium heparinum*. *Appl. Envir. Microbiol.* **1996**, *62*, 2723-2734.
- Tejedor, L.; Oman, D.; Zimmermann, J.; Russo, A.; Rose, M.; Borzhemskaya, L.; Pelzer, H. Use of Dade(R) Hepzyme (TM) to eliminate heparin interference in coagulation-testing. *Thromb. Haemostasis*, **1993**, *69*, 866.
- Tkalec, A. L.; Fink, D.; Blain, F.; Sun, G. Z.; Laliberté, M.; Bennet, D. C.; Gu, K.; Zimmermann, J. J. F.; Su, H. Isolation and expression in *Escherichia coli* of *csla* and *cslb*, genes coding for the chondroitin sulfate-degrading enzymes chondroitinase AC and chondroitinase B, respectively, from *Flavobacterium heparinum*. *Appl. Environ. Micobiol.*, **2000**, *66*, 29-35.
- Tsuda, H.; Yamada, S.; Miyazono, H.; Morikawa, K.; Yoshida, K.; Goto, F.; Tamura, J.; Neumann, K. W.; Ogawa, T.; Sugahara, K. Substrate specificity studies of *Flavobacterium* chondroitinase C and heparitinases towards the glycosaminoglycan-protein linkage region. *Eur. J. Biochem.*, **1999**, *262*, 127-133.
- van Aalten, D. M. F.; Bywater, B.; Findlay, J. B. C.; Hendlich, M.; Hooft, R. W. W.; Vriend, G. PRODRG, a program for generating molecular topologies and

- unique molecular descriptors from coordinates of small molecules. *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, **1996**, *10*, 255-262.  
<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>.
- van der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; van Buuren, A. R.; Apol, E.; Meulenhoff, P. J.; Tieleman, D. P.; Sijbers, A. L. T. M.; Freenstra, K. A.; van Drunen, R.; Berendsen, H. J. C. **2005**, GROMACS user manual 3.3. Nijenborgh 4, 9747 Groningen, The Netherlands. <http://www.gromacs.org>.
- van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. Computer simulations of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1990**, *29*, 992-1023.
- van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Huenenberger, P. H.; Krueger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G. Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide, **1996**, Vdf Hochschulverlag, AG Zurich, Switzerland.
- Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J.; Chrispeels, M.; Hindsgaul, O.; Paulson, J. C.; Manzi, A.; Powell, L.; van Halbeek, H.; Janssen, K.; CozzaSialiano, M.; Brown, D.; deBruin, D.; Weiss, D.; Urgo, T. Essentials of Glicobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**. The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California.
- Verli, H.; Guimarães, J. A. Molecular dynamics simulation of a decasaccharide fragment of heparin in aqueous solution. *Carbohydr. Res.*, **2004**, *24*, 339, 281-290.
- Verli, H.; Guimarães, J. A. Insights into the induced fit mechanism in antithrombin–heparin interaction using molecular dynamics simulations. *J. Mol. Graph. Mod.*, **2005**, *24*, 203–212.
- Verli, H. Interação heparina-antitrombina: reconhecimento molecular caracterizado por ferramentas de modelagem molecular. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2005**.
- Vlodavsky, I.; Mohsen, M.; Lider, O.; Svahn, C. M.; Ekre, H. P.; Vigoda, M.; Ishaimichaeli, R.; Peretz, T. Inhibition of tumour metastasis by heparanase inhibiting species of heparin. *Inv. Metast.*, **1994**, *14*, 290–302.
- Vlodavsky, I.; Friedmann, Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J. Clin. Invest*, **2001**, *108*, 341–347.

- Walenga, J. M.; Jeske, W. P.; Samama, M. M.; Frapaise, F. X.; Bick, R. L.; Fareed, J. Fondaparinux: a synthetic heparin pentasaccharide as a new antithrombotic agent. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2002**, *11*, 397-404.
- Warkentin, T. E.; Chong, B. H.; Greinacher, A. Heparin-induced thrombocytopenia: Towards consensus. *Thromb. Hemost.*, **1998**, *79*, 1-7.
- Weitz, J. I. Low-molecular-weight heparins. *N. Engl. J. Med.*, **1997**, *337*, 688-698.
- Yang, V. C.; Linhardt, R. J.; Berstein, H.; Cooney, C. L.; Langer, R. Purification and characterization of heparinase from *Flavobacterium heparinum*. *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 1849-1857.
- Yang, Y.; MacLeod, V.; Dai, Y.; Khotskaya-Sample, Y.; Shriver, Z.; Venkataraman, G.; Sasisekharan, R.; Naggi, A.; Torri, G.; Casu, B.; Vlodaysky, I.; Suva, L. J.; Epstein, J.; Yaccoby, S.; Shaughnessy, J. D.; Barlogie, B.; Sanderson, R. D. S. The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. *Blood*, **2007**, *110*, 2041-2048.
- Zimmermann, J. J.; Oddie, K.; Langer, R.; Cooney, C. L. The release of heparinase from the periplasm space of *Flavobacterium heparinum* by three-step osmotic shock. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1991**, *30*, 137-148.



## 10 CURRICULUM VITAE

### I. Trabalhos científicos apresentados em congressos e outros eventos:

Escouto, G. B. & Verli, H. 2008. Structural and conformational characterization of heparinase II from *Flavobacterium heparinum*. *XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB Program and Index*, N-53. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 17 a 20 de maio de 2008, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

Escouto, G. B. & Verli, H. 2008. Caracterização molecular da enzima heparinase II de *Flavobacterium heparinum*. IX Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular - Livro de Resumos, resumo 08, página 14. IX Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 19 e 20 de novembro de 2007, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Escouto, G. B. & Verli, H. 2008. Caracterização molecular da enzima heparinase II de *Flavobacterium heparinum*. X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular - Livro de Resumos, página 91. X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 26 a 28 de novembro de 2008, UFRGS, Porto Alegre, RS.

### II. Publicações em periódicos especializados:

Escouto, G. B.; Verli, H. 2009. Conformational aspects of heparinase II from *Flavobacterium heparinum*. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, em preparação.

### III. Bolsa recebida:

Bolsista CAPES do programa de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS de outubro de 2007 a março de 2009.