

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

FACULDADE DE FARMÁCIA

**DOCKING DE INIBIDORES PLANEJADOS DA TROMBINA  
DERIVADOS DO ÁCIDO GLICIRRÉTICO**

Pedro Magno Mentges

**DOCKING DE INIBIDORES PLANEJADOS DA TROMBINA**  
**DERIVADOS DO ÁCIDO GLICIRRÉTICO**

Pedro Magno Mentges

Monografia elaborada no Grupo de Bioinformática Estrutural do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para a obtenção do título de Farmacêutico Bioquímico, sob orientação do professor doutor:

Hugo Verli

Faculdade de Farmácia

Novembro de 2011

## SUMÁRIO

<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u> .....	<u>4</u>
<u>Resumo</u> .....	<u>5</u>
<u>1)Introdução</u> .....	<u>6</u>
<u>1.1)Hemostasia e a cascata de coagulação</u> .....	<u>6</u>
<u>1.1.1)Iniciação</u> .....	<u>7</u>
<u>1.1.2)Amplificação</u> .....	<u>8</u>
<u>1.1.3)Propagação</u> .....	<u>8</u>
<u>1.2)A trombina</u> .....	<u>9</u>
<u>1.3)Inibidores de trombina e seu uso na terapêutica</u> .....	<u>11</u>
<u>1.4)Pesquisa de novos fármacos</u> .....	<u>11</u>
<u>1.5)Glycyrriza Glabra</u> .....	<u>11</u>
<u>1.6)Docking</u> .....	<u>12</u>
<u>2)Objetivos</u> .....	<u>14</u>
<u>3)Metodologia</u> .....	<u>18</u>
<u>4)Resultados e discussão</u> .....	<u>19</u>
<u>5)Conclusões</u> .....	<u>34</u>
<u>Referências</u> .....	<u>35</u>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFL – análise focada no ligante

AFR- análise focada no receptor

GAG - glicosaminoglicano

GL - glicirrizina

GLA - ácido glicirretinico

FT – Fator Tecidual

PAR-receptor proteoliticamente ativo(proteolytically active receptor)

PDB - protein data bank

## Resumo

Usando como base o arcabouço estrutural da glicirrizina, um conhecido inibidor da trombina, uma série de compostos derivados do ácido glicirrético foi planejada e testada em screening virtual com a trombina. Esses compostos foram avaliados através de técnica de docking (ancoramento) molecular com objetivo de avaliar as interações com o exosítio I da trombina e confrontar essas interações com o perfil de interação de substratos fisiológicos da trombina.

Muitos compostos que atuam no exosítio I possuem potencial característica de modulação da atividade da trombina, conseqüentemente diversas estratégias modernas buscam agregar essa atividade de modulação aos anticoagulantes, o que configura o exosítio I como um potencial alvo para o desenvolvimento de novos agentes anticoagulantes.

Os resultados obtidos nesse estudo possibilitaram a caracterização da interação dos referidos derivados com a trombina, com diversos compostos obtendo resultados indo ao encontro com os dados experimentais que foram confrontados, com perspectivas futuras de estudos complementando o entendimento dessa classe de compostos.

A partir da validação dos protocolos e resultados obtidos espera-se, portanto, que esses dados venham a contribuir no desenvolvimento de uma linha de pesquisas visando o planejamento, a síntese e a obtenção de novos candidatos a protótipos de agentes antitrombóticos com ação sobre o exosítio I.

# 1) Introdução

## 1.1) Hemostasia e a cascata de coagulação

Embora a hemostasia seja frequentemente mencionada de forma simples como o mecanismo pelo qual a hemorragia cessa após rompimento vascular, o processo pelo qual o sangue rapidamente se transforma de seu estado fluido para o de um coágulo localizado no local da lesão dos vasos está longe de ser simples, envolvendo uma complexa interação entre componentes celulares e moleculares (Eyre & Gamin, 2010). Ao final deste processo, a ativação em massa de plaquetas, associada a uma rede de fibrina e à redução do calibre vascular na região lesada permitem o controle do sangramento. (Vine, 2009) Adicionalmente, este tampão hemostático não atua apenas no selamento do tecido após o ferimento, mas também como proteção contra as células invasoras durante o processo de cicatrização posterior. (Hinsbergh, 2001)

A formação da rede de fibrina é devida aos eventos desencadeados durante a chamada cascata da coagulação, proposta em 1964 (Davie *et al.*, 1964; Macfarlane, 1964) e representando um grande avanço no entendimento da hemostasia. (Ferreira *et al.*, 2010; Pérez-Gómez & Bover, 2003)

Contudo, observações experimentais e clínicas mais recentes demonstraram que a hipótese da cascata não reflete com total fidelidade os eventos da hemostasia *in vivo*, sendo, portanto substituído recentemente pelo modelo da coagulação baseado em células. (Gresele & Agnelli, 2002; Zago *et al.*, 2005)

Com uma abordagem inovadora, esse novo modelo fornece subsídios para a compreensão de como a hemostasia funciona *in vivo*, esclarecendo o mecanismo de certos distúrbios da coagulação. Este modelo é dividido em três fases: iniciação, amplificação e propagação, conforme esquema da figura 1, que aparece abaixo. (Pérez-Gómez & Bover, 2003)

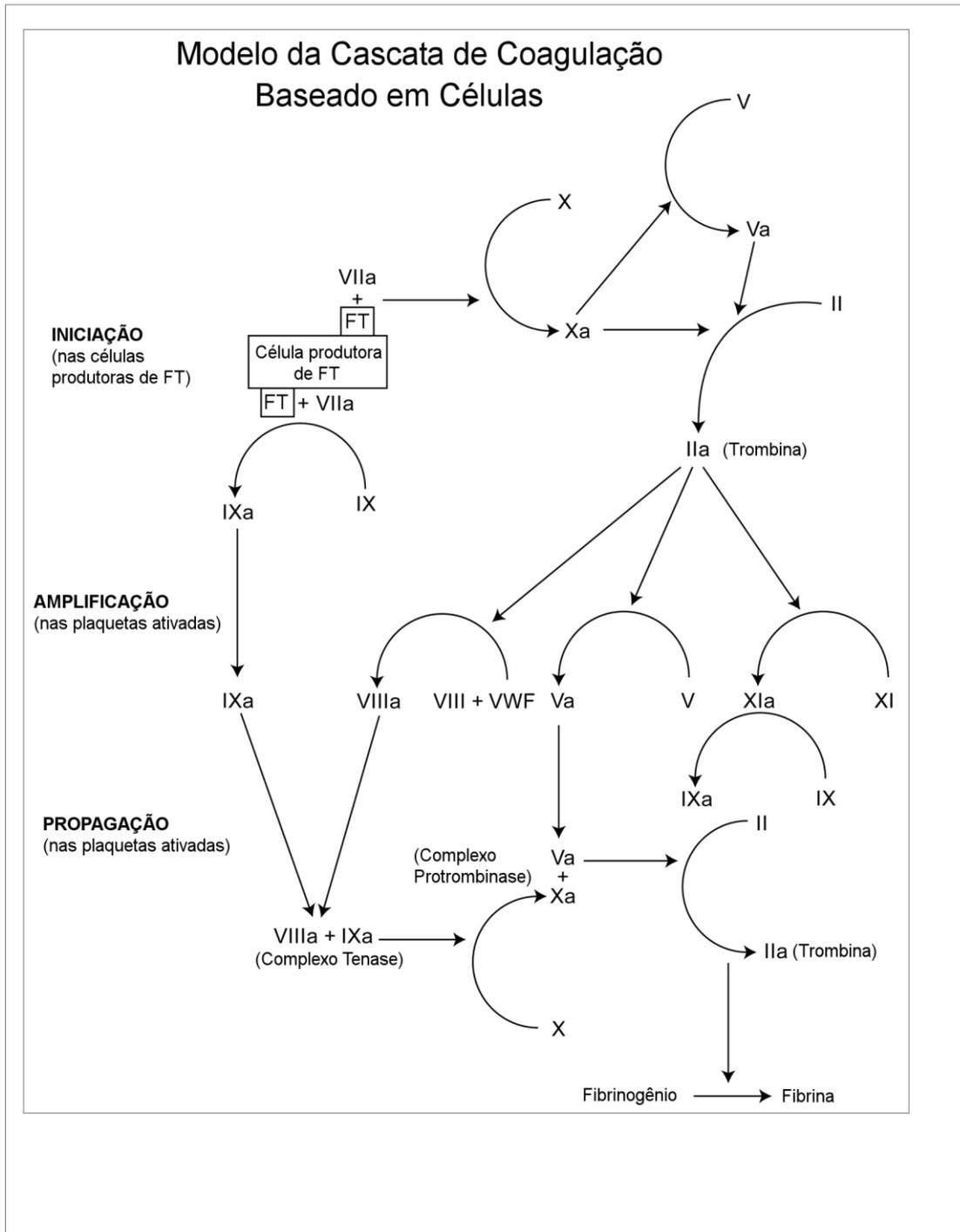


Figura 1: Modelo da coagulação baseado em células (adaptado de Vine, 2009).

### 1.1.1) Iniciação

A coagulação sanguínea se inicia com a exposição do sangue à células expressando fator tecidual (FT), tais como fibroblastos e células da musculatura lisa (Vine, 2009). Uma vez combinado ao FT, o fator VII é ativado a fVIIa que, ao se complexar a FT,

promove a ativação dos fatores X e IX. O fator Xa formado, juntamente com o fator V converte, em superfícies celulares, uma pequena quantidade de protrombina (fator II) a trombina (fator IIa), a qual possui um importante papel na próxima fase, a fase de amplificação (Vine, 2009).

### 1.1.2) Amplificação

Esta fase é caracterizada pela ação da pequena quantidade de trombina já existente que atua ativando parcialmente cofatores e acelera a ativação de plaquetas. A ativação de plaquetas, que é essencial para essa fase, resulta da formação de interações com fibras de colágeno. Essa adesão, que é mediada por receptores específicos (complexo formado pelas glicoproteínas Ia/IIa) e pelo fator de Von Willebrand, expõe receptores e sítios de ligação que interagem com os fatores de coagulação ativados, Va, VIIIa e XIa (Vine, 2009; Hoffman et al., 2001; Pérez-Gomez & Bover, 2007).

O fator de Von Willebrand é clivado pela trombina para que ocorra a liberação do fator VIIIa, concluindo a fase de amplificação com as plaquetas tendo em suas superfícies os fatores Va, VIIIa e XIa.

### 1.1.3) Propagação

Essa fase é caracterizada pela produção dos complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas. O complexo tenase é formado quando o fator IXa migra das células expressando FT para a superfície das plaquetas ativadas, complexando-se ao fator VIIIa plaquetário. O complexo resultante da ligação dos fatores VIIIa e IXa ativa o fator X, que então se complexa ao fator Va, formando o complexo protrombinase. Este complexo, por sua vez, produz rapidamente uma grande quantidade de trombina. Esta enzima é responsável pela conversão de fibrinogênio em fibrina e pela ativação de fator XIII, que estabiliza a fibrina, permitindo a formação de um coágulo de fibrina (Vine et al., 2009).

A trombina possui papel essencial na coagulação, a ponto dos seus níveis séricos espelharem o estágio da coagulação no momento, com os níveis de trombina indo de 1 nM (fase de iniciação) para 500nM (fase de propagação). Adicionalmente, a própria trombina pode ativar os fatores V, VIII e XI gerando vias de retroalimentação positiva em todo o sistema que reforçam a coagulação (Jenny et al., 1998; Wolberg et al., 2008; Gresele & Agnelli, 2002).

## 1.2)A trombina

A trombina (EC 3.4.21.5) é uma serino-protease glicosilada da família da quimotripsina, gerada majoritariamente no penúltimo passo da via de coagulação sanguínea a partir da ativação da protrombina. Além de possuir papel essencial na hemostasia, possui ainda relação com diversas patologias, incluindo crescimento tumoral, doenças relacionadas ao remodelamento de tecidos e inflamação severa, como hepatite e carcinoma hepático (Bode et al., 1989; Di Cera et al., 2008; Ma & Dorling, 2011; Gianelli et al., 2003).

Serino proteases constituem um grupo variado de enzimas que usa um resíduo de serina como nucleófilo. O alvo de clivagem geral consiste em sítios contendo resíduos básicos de aminoácidos. Tanto enzimas altamente específicas (como a trombina) e inespecíficas como a tripsina atuam dessa maneira. Com diferença no número de alvos das enzimas. Enquanto a tripsina realmente cliva grande parte das ligações contendo resíduos básicos, a trombina cliva apenas algumas combinações da arginina, como ligações Arg-Gly e Arg-Pro, por exemplo. (Bode et al., 1989)

No caso da espécie humana, a trombina (denominada  $\alpha$ -trombina) é formada por duas cadeias, uma leve contendo 36 resíduos, e uma pesada contendo 259 resíduos de aminoácidos. As duas cadeias são conectadas covalentemente através de uma ponte dissulfeto entre os resíduos Cys1 da cadeia leve e Cys122 da cadeia pesada. (Bode et al., 1989, Bode et al., 1992)

Existe um equilíbrio entre as serino-proteases e inibidores específicos nos diversos tecidos do corpo onde essas enzimas estão envolvidas em processos fisiológicos como inflamação, *turnover* do tecido conjuntivo, reparo e ativação do complemento. Desde o momento em que são ativadas, estas proteases podem se enquadrar como uma ameaça a tecidos e outras proteínas circulantes se não forem imediatamente incapacitadas pelos seus inibidores. (Turgeon & Houenou, 1997)

A manifestação patológica causada por produção de trombina em excesso ou em local inadequado é conhecida como trombose. As manifestações clínicas incluem infarto do miocárdio, trombose venosa profunda, derrame e doença vascular periférica, que são as principais causas de morbidade e mortalidade atualmente no ocidente. (Nimjee et al., 2009).

Assim, tendo em vista seu papel central na trombose e em diversas patologias, a trombina é foco de diversos estudos buscando novas abordagens terapêuticas para o tratamento de trombose (Weitz & Crowther, 2002). Usualmente, estes esforços buscam a

modulação dos sítios de ligação de ânions da trombina, denominados exosítio 1 e exosítio 2 (Figura 2).

### Complexação trombina/hirudina

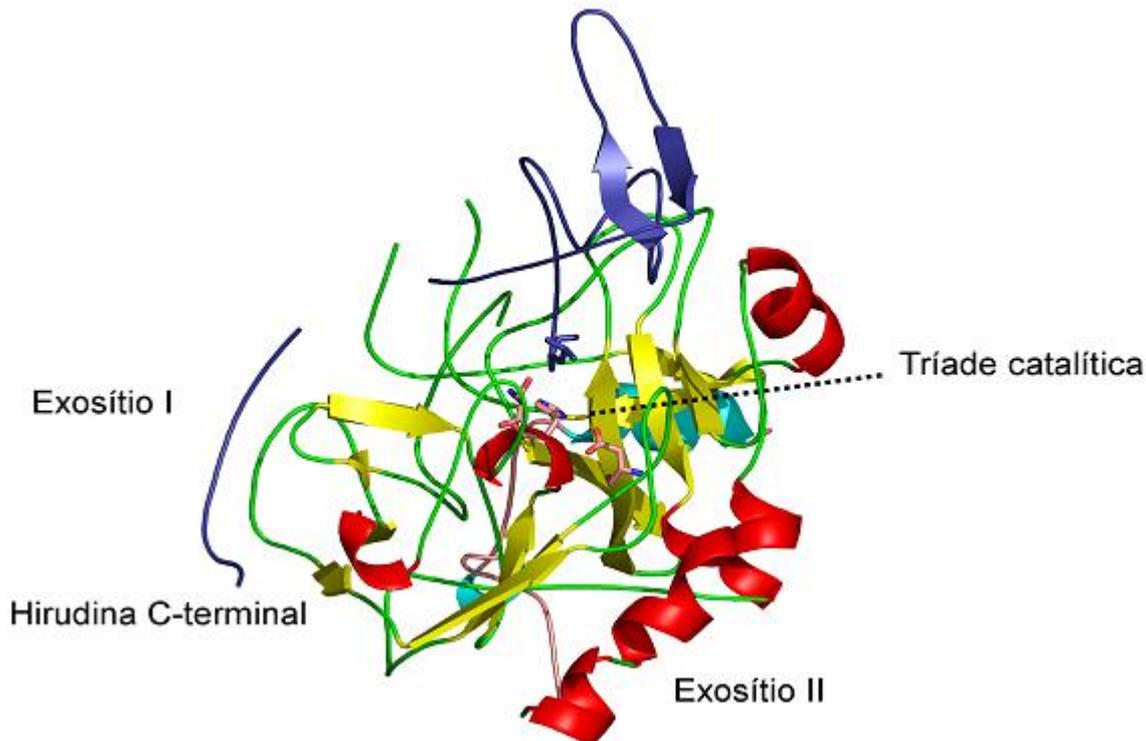


Figura 2: Trombina e seus três principais sítios de ligação a compostos: o sítio ativo e os sítios de ligação aniônica denominados exosítio 1 e exosítio 2 (Giesel, 2009; adaptado de Liu et. al, 2007) .

Exosítio 1 está envolvido na ligação ao fibrinogênio, a receptores proteoliticamente ativados (tais como PAR1 e PAR3), e a alguns fatores de coagulação (tais como fator V e fator VIII), enquanto o exosítio 2 liga-se à heparina e ao receptor plaquetário GPIb (Nimjee *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 1999; Di Cera, 2008; Hutington, 2008). As regiões da trombina que definem estes exosítios são:

- Exosítio I: centralizada no resíduo Lys70, contém a seqüência de Arg67 até Glu80 da cadeia pesada, incluindo diversos resíduos positivamente carregados em meio plasmático (Di Cera, 2008). Adicionalmente, essa região é cercada pelos resíduos positivos Arg35, Lys149E, Lys81, Lys110, Lys109 e Lys36 (Bode *et al.*, 1992; Bode, 2006);
- Exosítio II: localizado em região da enzima oposta à localização do exosítio I,

também na cadeia pesada, abriga os resíduos carregados positivamente Arg126, Lys236, Lys240, Arg93, Arg101, Arg233, Arg165, Lys169, Lys235, Arg175, Arg173, Arg97 (Bode *et al.*, 1992).

### 1.3) Inibidores de trombina e seu uso na terapêutica

A terapia com anticoagulantes teve seu início com o uso clínico da heparina no tratamento do tromboembolismo em 1939 (Murray, 1939). A heparina constitui-se em um glicosaminoglicano (GAG) sulfatado originalmente obtido a partir de fígado de cães em 1923 (Howell, 1923). Com o aumento da ocorrência clínica das doenças tromboembólicas, houve um incremento significativo da necessidade de desenvolvimento de novos agentes com potencial de interferir efetivamente na trombogênese. (Frenkel *et al.*, 2005) Neste contexto, o papel-chave da trombina na regulação da hemostasia tornou-a um dos principais alvos moleculares para o planejamento de novos candidatos a fármacos anticoagulantes. (Weitz & Crowther, 2002; Ho *et al.*, 2001; May-Yoke *et al.*, 2004; Fredenburgh *et al.*, 2004)

Os inibidores de trombina são usualmente classificados como diretos ou indiretos. Os inibidores diretos exercem seu efeito anticoagulante através de ligação com o sítio catalítico da trombina, impedindo-a de promover a hidrólise de seus substratos. (Weitz, 2003; Nimjee *et al.*, 2009) Por sua vez, os inibidores indiretos não bloqueiam a ação do sítio catalítico da trombina, mas agem através de outros sítios, destacadamente seus exossítios, modulando assim a catálise da enzima alostericamente ou ainda interferindo na formação de complexos entre a trombina e outras proteínas. Um dos principais exemplos desta última classe envolve a heparina.

Os inibidores de ação indireta possuem considerável tempo de uso clínico para o tratamento de patologias relacionadas à hemostasia, com eficácia e limitações bem conhecidas. Como por exemplo, dentre as limitações no uso da heparina destacam-se na promoção de respostas anticoagulantes imprevisíveis, que exigem uma rotina constante de ajuste de dosagem e monitoramento de sua ação farmacológica, e o fato de que seus efeitos biológicos envolvem a ligação inespecífica a várias outras proteínas e outros tipos celulares, aumentando sua susceptibilidade a variações genéticas individuais. (Bates *et al.*, 2000)

Assim, o desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos busca melhorar problemas como os já citados da heparina, assim como os característicos de outros inibidores de ação indireta. Suportando, desse modo, a obtenção de compostos com



### 1.5) *Glycyrrhiza Glabra*

A *Glycyrrhiza Glabra*, que é muito usada como adoçante e flavorizante, além de possuir uso tradicional na medicina chinesa, indiana e tibetana, possui como principais compostos a glicirrizina (GL) e o ácido glicirrético ou ácido glicirretínico (GLA). (Graebin et al., 2010; Ivo Mauricio et al., 1997)

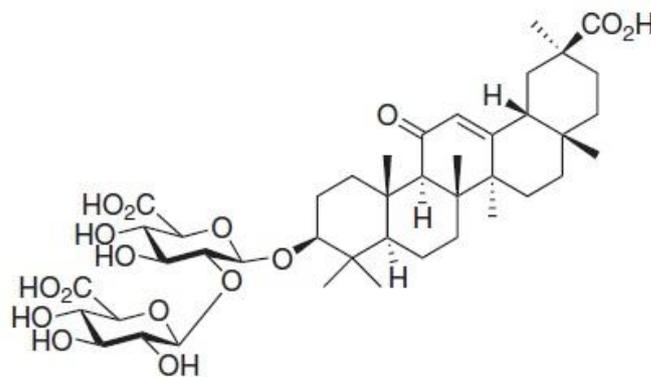


Figura 4 Glicirrizina

GL e GLA possuem ampla gama de atividades, com GL tendo atividade imunomodulatória e anti-viral (além de outras atividades), com um claro destaque para a sua atividade antitrombótica e o GLA possui atividades farmacológicas como anti-inflamatória e anti-viral, por exemplo, mas não possui atividade anti-trombótica descrita na literatura embora possua grande similaridade de arcabouço com a glicirrizina. (Graebin et al., 2010; Ivo Mauricio et al., 1997)

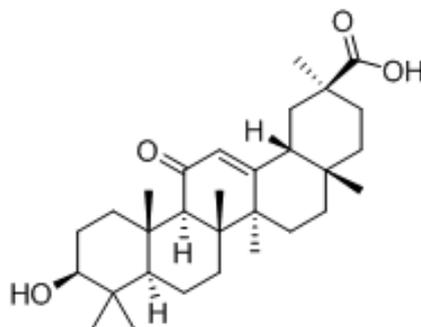


Figura 5 Ácido Glicirretínico

Sabendo-se dessas características não é surpreendente que tanto GLA como GL venham sendo utilizados como composto base para a síntese de derivados químicos nas últimas décadas, com muitos desses derivados possuindo interessante atividade farmacológica. (Graebin et al., 2010)

### 1.6) *Docking*

O *docking* ou ancoramento é uma técnica computacional na qual se busca identificar a forma pela qual duas moléculas interagem entre si, geralmente um receptor e um ligante (que pode ser um composto sintético, natural ou peptídico). O *docking* geralmente considera o receptor-alvo como uma entidade rígida, isto é, sem liberdade de torção em suas ligações, de forma a reduzir o custo computacional do cálculo. O ligante, em contrapartida, pode ser tratado tanto de forma flexível quanto rígida, dependendo de sua complexidade. (Yurev et al., 2009)

Durante o cálculo de *docking* são geradas diversas orientações do ligante na região que define o sítio de ligação junto ao receptor-alvo. Estas orientações são ordenadas, de forma que a primeira orientação corresponda aquela com menor energia e, portanto, maior probabilidade de ocorrência. (Yurev et al., 2009)

Como um método computacional, os cálculos de *docking* permitem a realização de análises de custo reduzido, suportando avaliações sistemáticas das interações ligante-receptor e, assim, a identificação de candidatos a protótipos de ligantes de acordo com os ordenamentos obtidos. Espera-se, assim, reduzir tempo e recursos na busca por novos agentes terapêuticos. Adicionalmente, este tipo de abordagem permite o teste com um número extremamente elevado de compostos, não acessível em testes farmacológicos usuais, aumentando com isso as chances de obtenção de um candidato a ligante. (Nargotra et al., 2011)

As metodologias de avaliação podem ser divididas em duas categorias: análise focada no receptor (AFR) e análise focada no ligante (AFL). A AFL se baseia essencialmente na análise comparativa da forma estrutural e complementaridade entre os compostos químicos e ligantes conhecidos, com o conhecimento experimental sobre compostos ativos sendo um pré-requisito para a aplicação da AFL. Em contraste o método AFR estima a interação de compostos dada com um receptor-alvo, o que não requer necessariamente dados experimentais sobre os compostos ativos. Como AFR e

AFL são complementares entre si, uma combinação bem elaborada dos dois métodos pode ser uma possível forma de maximizar a eficiência *in silico* em futuros estudos relacionados. (Choi et al., 2011)

Nesse experimento, a metodologia de análise usada será focada no receptor, com as interações que ele apresentará com os compostos testados.

## 2) Objetivos

A partir do exposto, o presente trabalho tem como objetivo realizar o *screening* virtual de uma série de compostos, derivados sintéticos da glicirrizina (GL), previamente identificado como modulador do exosítio 1 da trombina.

Os compostos estudados, 1-15, foram planejados e sintetizados pelo Professor Cedric Graebin (UFRRJ) a partir do arcabouço estrutural do ácido glicirretínico (GLA), conforme ilustrado na Tabela 1. Espera-se que os resultados obtidos possam subsidiar a seleção de compostos desta série de moléculas para ensaios farmacológicos posteriores que, por fim, poderão ser empregados na validação dos cálculos realizados.

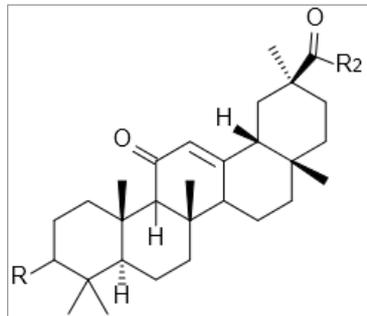
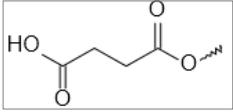
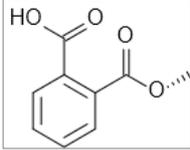
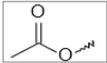
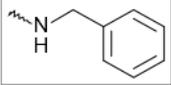
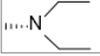
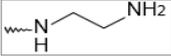
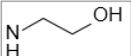
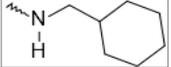
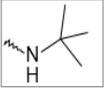
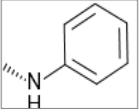
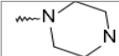
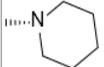
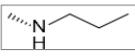


Figura 6 Esquematização das substituições

Tabela 1: Lista dos compostos testados frente à trombina.

Compostos	R	R2
1		OH
2		OH
3		OH
4	O	OH
5	OH	
6	OH	
7	OH	
8	OH	
9	OH	
10	OH	
11	OH	
12	OH	
13	OH	
14	OH	
15 (GLA)	OH	OH

### 3) Metodologia

#### 3.1) Programas utilizados

Os programas utilizados no presente trabalho incluem:

- Winmostar – construção de estruturas 3D dos compostos;
- Open Babel - conversão de formatos de arquivos (O'Boyle.,2001);
- Autodock 4.2 – cálculo de docking (Morris et al.,1998);
- LigPlot<sup>+</sup> 1.3 – avaliação das interações ligante-receptor (Wallace et al.,1995);

#### 3.2) Configuração do receptor

A molécula de trombina selecionada para o docking dos ligantes foi obtida no *Protein Data Bank* (PDB) sob código 2BVR (Neumann et al. 2005). Após remoção da hirudina e demais ligante, procedeu-se com a adição de hidrogênios polares e adição de cargas atômicas.

#### 3.3) Configuração dos ligantes

Os ligantes foram construídos e minimizados pelo método RM1 no programa Winmostar. Obtiveram-se, assim, cargas atômicas para o cálculo de *docking* posterior.

Os ligantes foram ancorados em área de dimensões 72x88x72 pontos de grid (com cada ponto equivalente a 0,375 Å). Esta dimensão foi definida visualmente visando cobrir os principais resíduos do exsítio 1, que segundo Bode incluem: Lys36, Arg67, Lys70, Arg73, Arg75, Glu77, Arg77A, Glu80, Lys81, Trp141, Lys149E e Gln151. (Bode *et. al.*, 1992; Bode, 2006)

Os ancoramentos de cada ligante foram realizados partindo-se de orientações aleatórias dos ligantes, dentro da caixa delimitada acima, empregando 10 runs para cada grau de liberdade dos compostos. As estruturas de menor energia foram então selecionadas para avaliação das interações com a proteína através do programa ligplot.

#### 4) Resultados e Discussão

Os ligantes foram planejados e construídos a partir de estruturas com modificações simples em relação ao GLA, com modificações sendo efetuadas apenas nesse ponto distinto das moléculas (R e R2), simplificando a análise da causa dos efeitos gerados pelos substituintes e, especialmente, facilitando a síntese desses compostos para eventuais teste *in vitro/in vivo*.

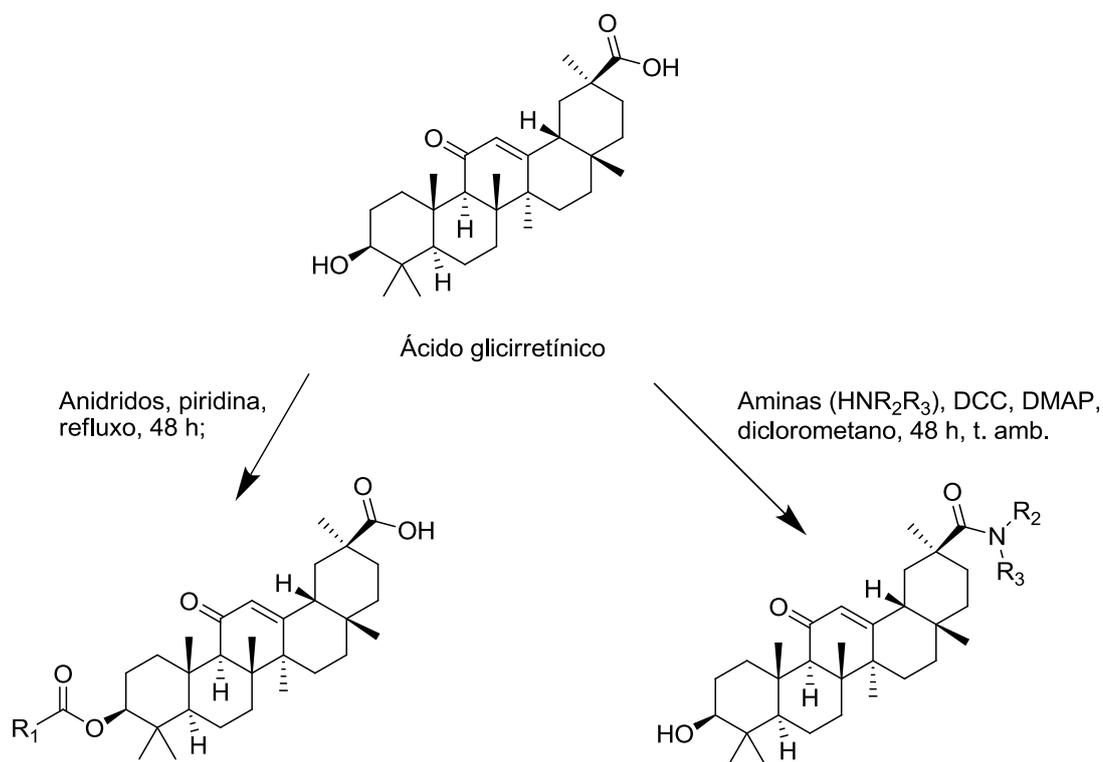


Figura 7 Esquema de síntese dos derivados do GLA

Na construção desses derivados foram utilizados substituintes de características variadas (polaridade, tendência a formar ligações de hidrogênio, tamanho do substituinte, etc.) a fim de explorar as interações, delineando quais fatores são favoráveis e quais são desfavoráveis para que as interações desejadas ocorram.

Para averiguar quais resultados são ocasionados por essas mudanças na estrutura e quais são características já presentes no GLA, o mesmo também foi testado.

Em um primeiro momento foi conferido visualmente se o posicionamento espacial dos ligantes resultante do *docking* era o desejado. Com auxílio de imagens, logo abaixo, da sobreposição desses ligantes com os resíduos do exosítio 1 (figuras 6 e 7 ) e com o GLA (figura 7), se confirmou que todos compostos testados ficaram enquadrados nas proximidades do exosítio I, já sendo um dado inicial favorável em relação a efetiva interação com o exosítio I.

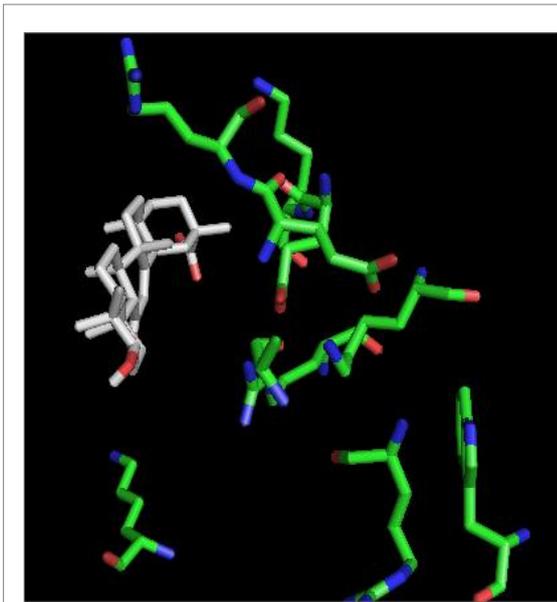


Figura 8 Posicionamento do GLA em relação aos resíduos do exosítio 1.

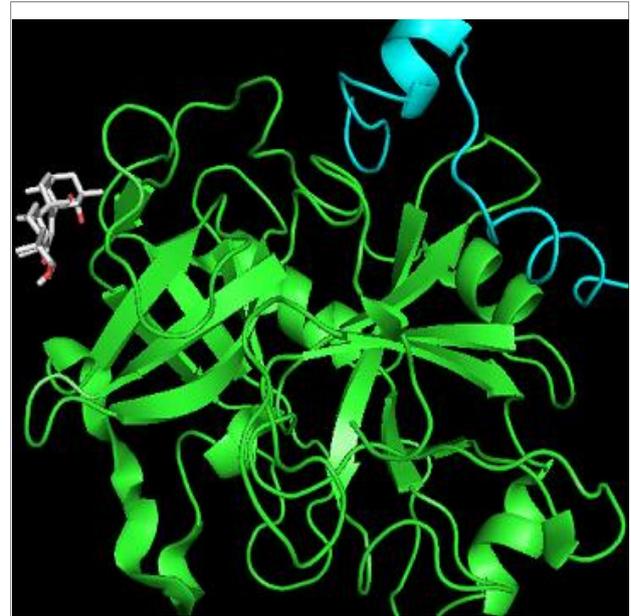


Figura 9 Posicionamento do GLA em relação à estrutura da trombina.

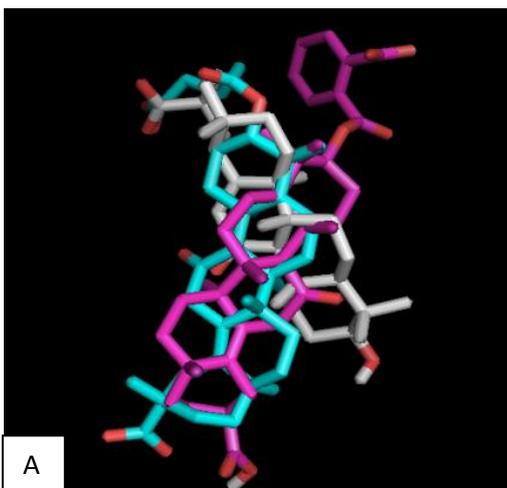


Figura 10 GLA (em branco) com:  
A) ligantes 1 (em azul) e 2 (em rosa)

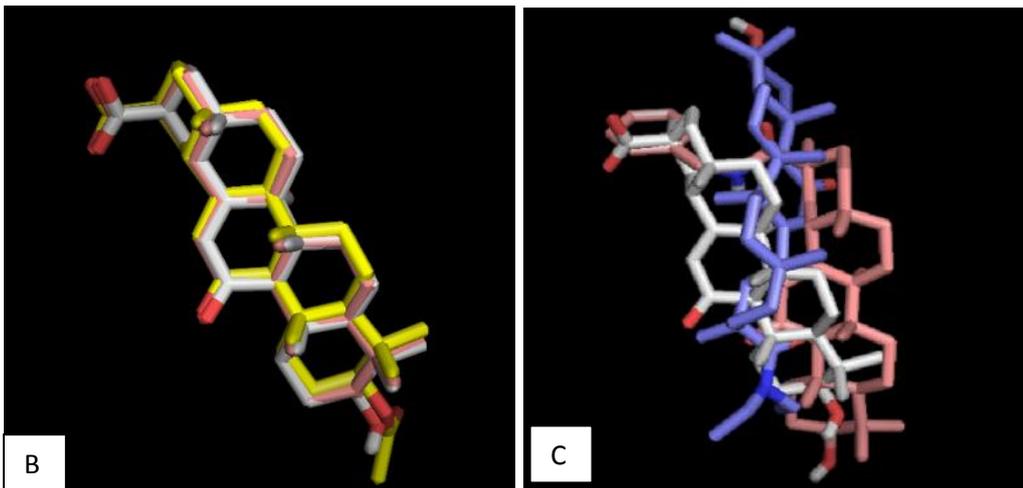


Figura 11 GLA (em branco) com:

B) ligantes 3 (em amarelo) e 4 (em rosa)

C) ligantes 5 (em azul) e 6 (em rosa)

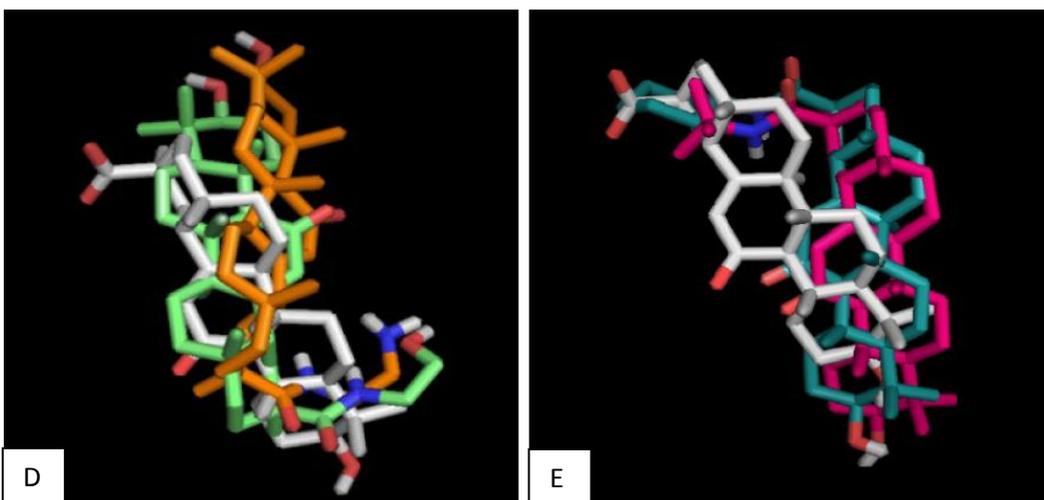


Figura 12 GLA (em branco) com:

D) ligantes 7 (em verde) e 8 (em laranja)

E) ligantes 9 (em azul) e 10 (em rosa)

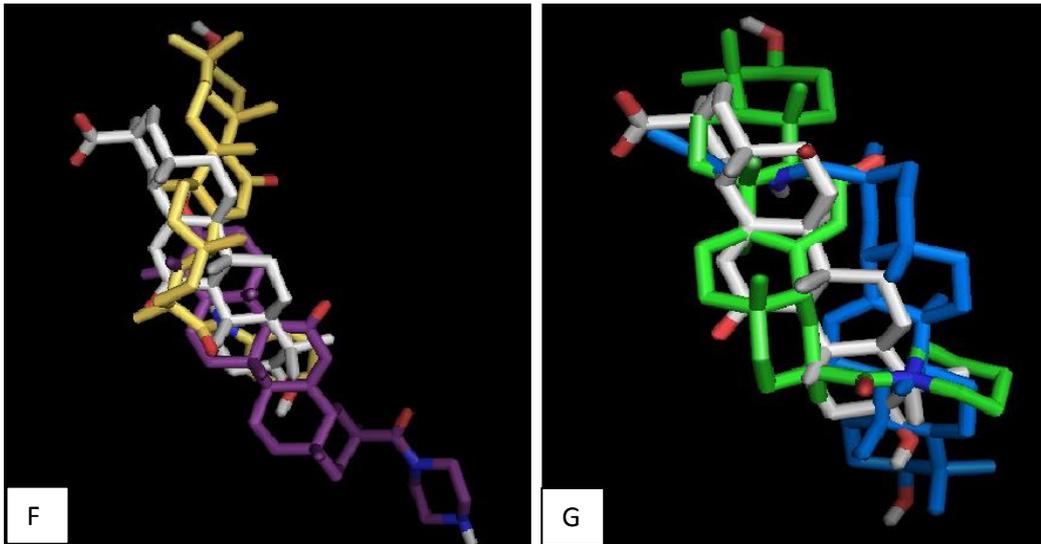


Figura 13 GLA (em branco) com:

F) ligantes 11 (em azul) e 12 (em rosa)

G) ligantes 13 (em azul) e 14 (em rosa)

Tabela 2 Melhor Energia do ancoramento de cada composto

Composto	Menor Binding Energy
1	- 6,47
2	-6,95
3	-6,45
4	-6,95
5	-6,23
6	-5,03
7	-5,63
8	-5,57
9	-6,15
10	-5,16
11	-5,74
12	-4,58
13	-5,63
14	-5,38
15 (GLA)	- 5,86

Após isso se procedeu com a demarcação das interações existentes entre os componentes ancorados com os resíduos da estrutura da trombina. As interações detectadas nas imagens foram transcritas para o formato de tabela com diferenciação entre as ligações entre hidrofílicas e lipofílicas e com qual resíduo da enzima que essa interação ocorre. Quantificando o total de interações para fim de mapeamento dos resultados e confronto entre o resultado do *docking* das estruturas. Os resultados demonstraram os compostos testados interagindo com resíduos que sabidamente fazem parte do exossítio I (já citados anteriormente no texto), realçando o que já havia sido estimado visualmente: que os derivados estão atuando realmente na região de interesse do estudo.

Tabela 3 Interações dos ligantes com a trombina; itens "X" (grifados em vermelho) representam ligações hidrofílicas (H) demais "X" representam interações lipofílicas(L) com os resíduos.

	Phe 34	Lys 36	Gln 38	Leu 65	Arg 67	Tyr 76	Lys 81	Ile 82	Ser 83	Met 84	Lys 109	Lys 110	Pro 111	Val 112	Ala 113	Total (H/L)
1		x		x				x	x	x	x	x				2/5 (7)
2		x	x	x			x	x	x							0/6 (6)
3			x	x	x	x		x	x	x	x	x				1/8 (9)
C 4				x		x		x	x	x	x	x				1/6 (7)
o 5	x		x	x		x	x	x	x	x		x				2/7 (9)
m 6				x			x	x				x	x	x	x	3/4 (7)
p 7				x		x	x	x				x	x	x	x	4/4 (8)
o 8				x			x	x				x	x	x	x	3/4 (7)
s 9	x		x	x		x	x	x	x	x		x				2/7 (9)
t 10	x		x	x	x	x		x	x	x						2/6 (8)
o 11				x			x	x				x	x	x	x	3/4 (7)
s 12			x	x	x	x		x		x						1/5 (6)
13				x		x		x	x	x		x	x	x		1/7 (8)
14	x		x	x	x	x		x	x	x						2/6 (8)
15				x		x		x	x	x	x	x				1/6 (7)

A maioria dos ligantes testados apresentou grande percentual de interações hidrofóbicas, com uma menor, mas presente, fração de interações hidrofílicas. Embora em menor número, essas interações hidrofílicas são essenciais para a formação de complexos com a trombina, sendo inclusive, um passo limitante para a que formação desses complexos se inicie. (Huntington, 2005; Karshikov, 1992)

No caso as estruturas 3, 5, 9 e 2 apresentaram os resultados que mais chamaram atenção em relação às demais estruturas testadas, com 3, 5 e 9 apresentando o maior número de interações com quase totalidade delas lipofílicas, sendo os exemplos com aparentemente maior potencial de interação efetiva com o exossítio I segundo os resultados.

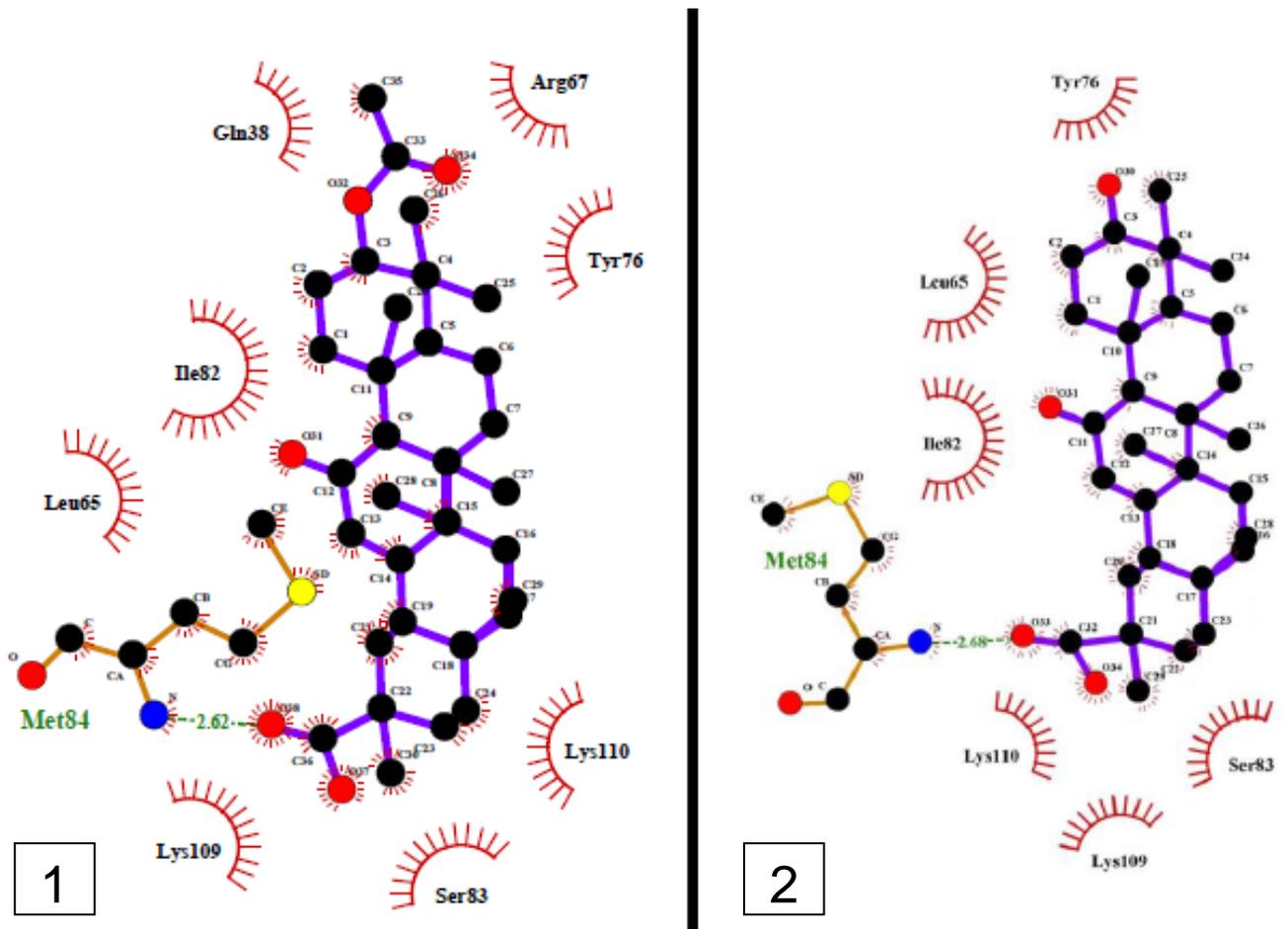


Figura 13: Interações da estrutura 1 com trombina, na esquerda, e da estrutura 2 com a trombina, na direita

Enquanto que 2 foi a exceção dos testes, sendo a única estrutura com ausência de interações hidrofílicas, e 9 apresentou número equivalente de interações hidrofílicas e lipofílicas. Com ambas fugindo totalmente do padrão de interação com o exossítio I.

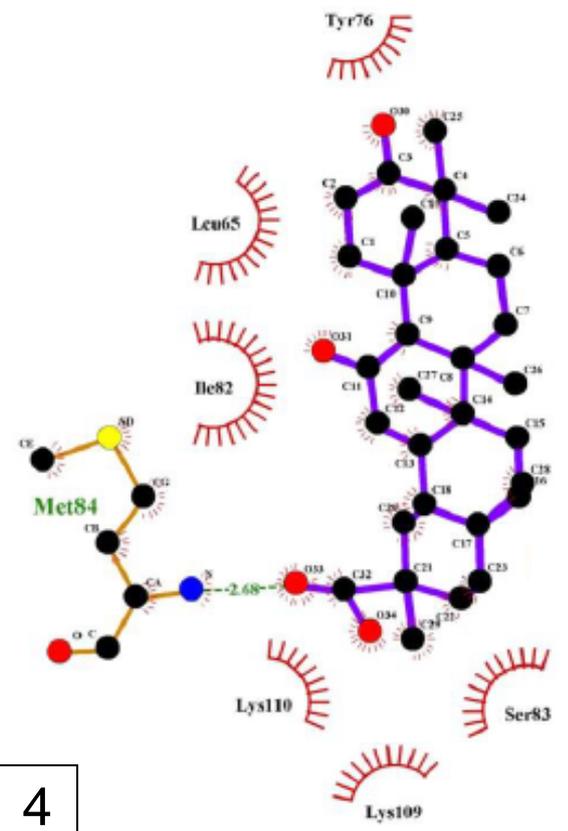
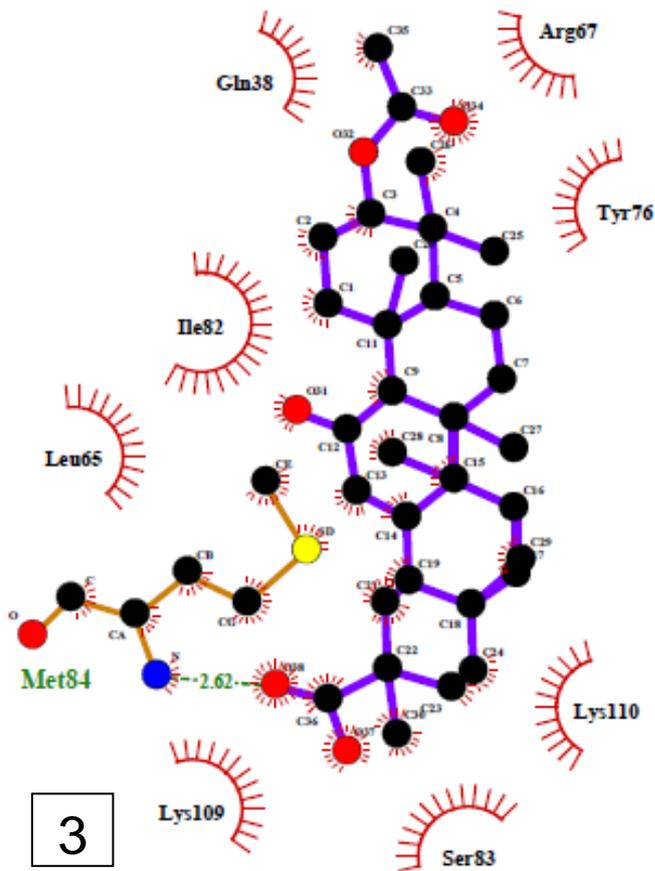


Figura 14: Interações da estrutura 3 com trombina, na esquerda, e da estrutura 4 com a trombina, na direita

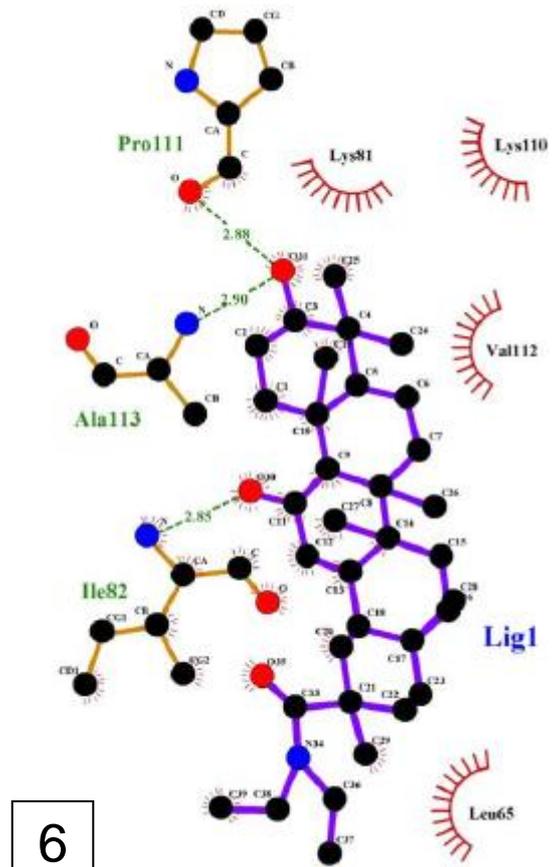
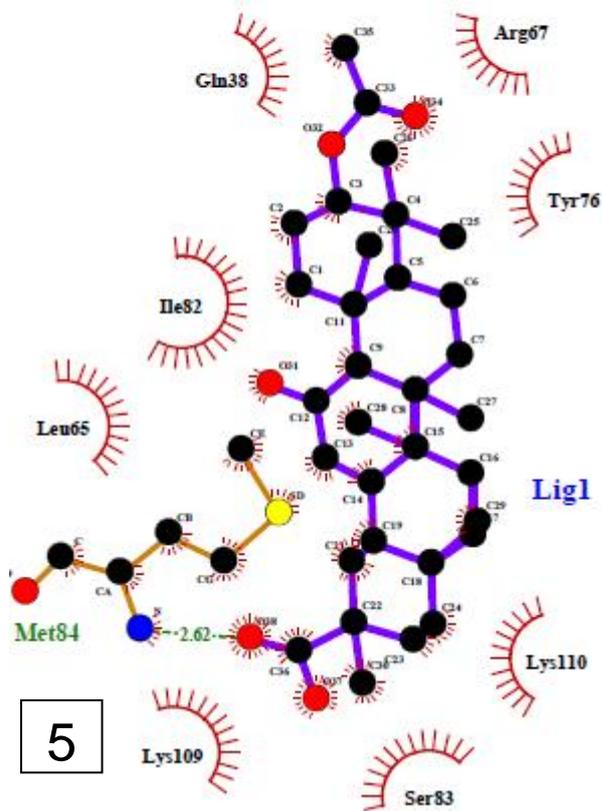


Figura 15: Interações da estrutura 5 com trombina, na esquerda, e da estrutura 6 com a trombina, na direita

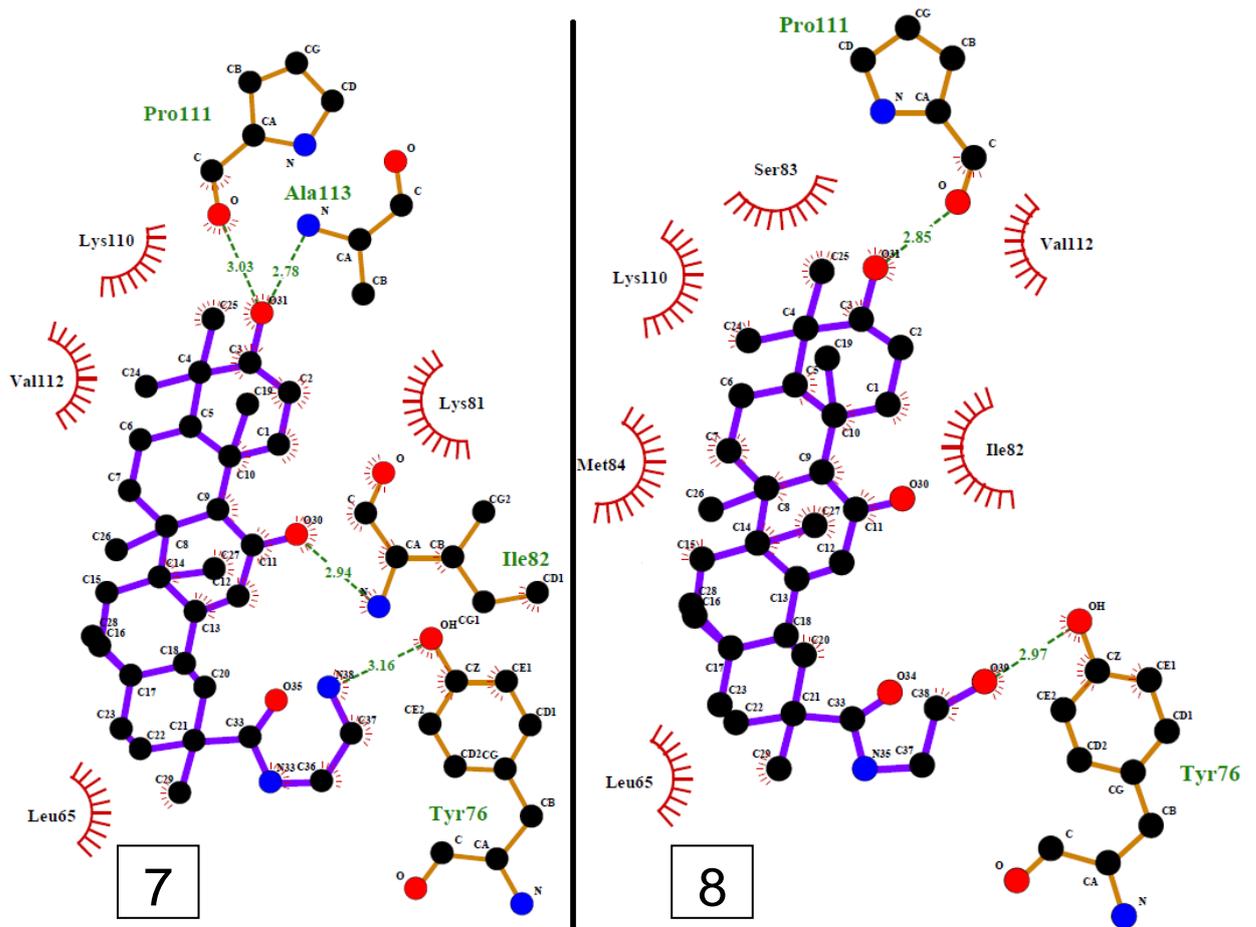


Figura 16: Interações da estrutura 7 com trombina, na esquerda, e da estrutura 8 com a trombina, na direita

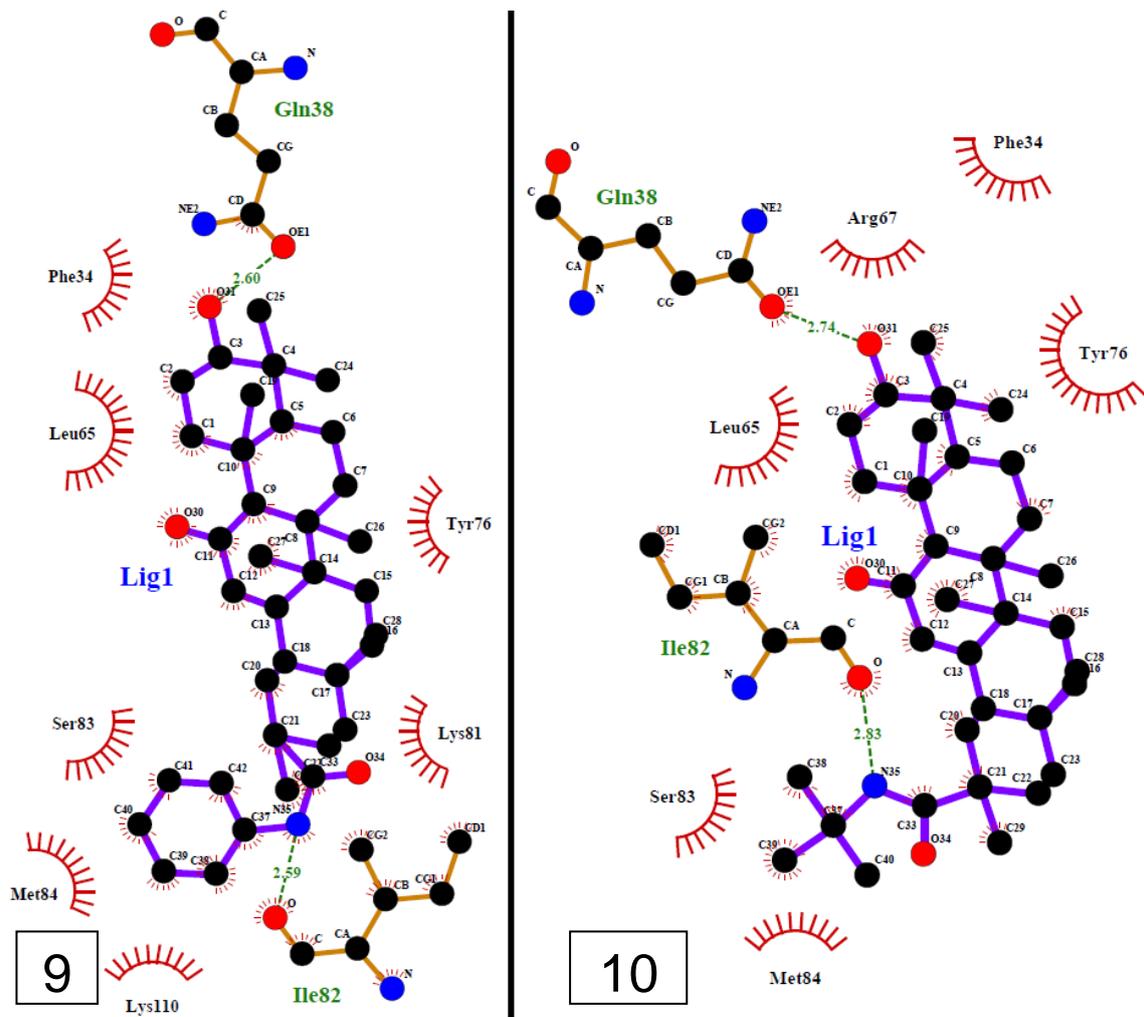


Figura 17: Interações da estrutura 9 com trombina, na esquerda, e da estrutura 10 com a trombina, na direita

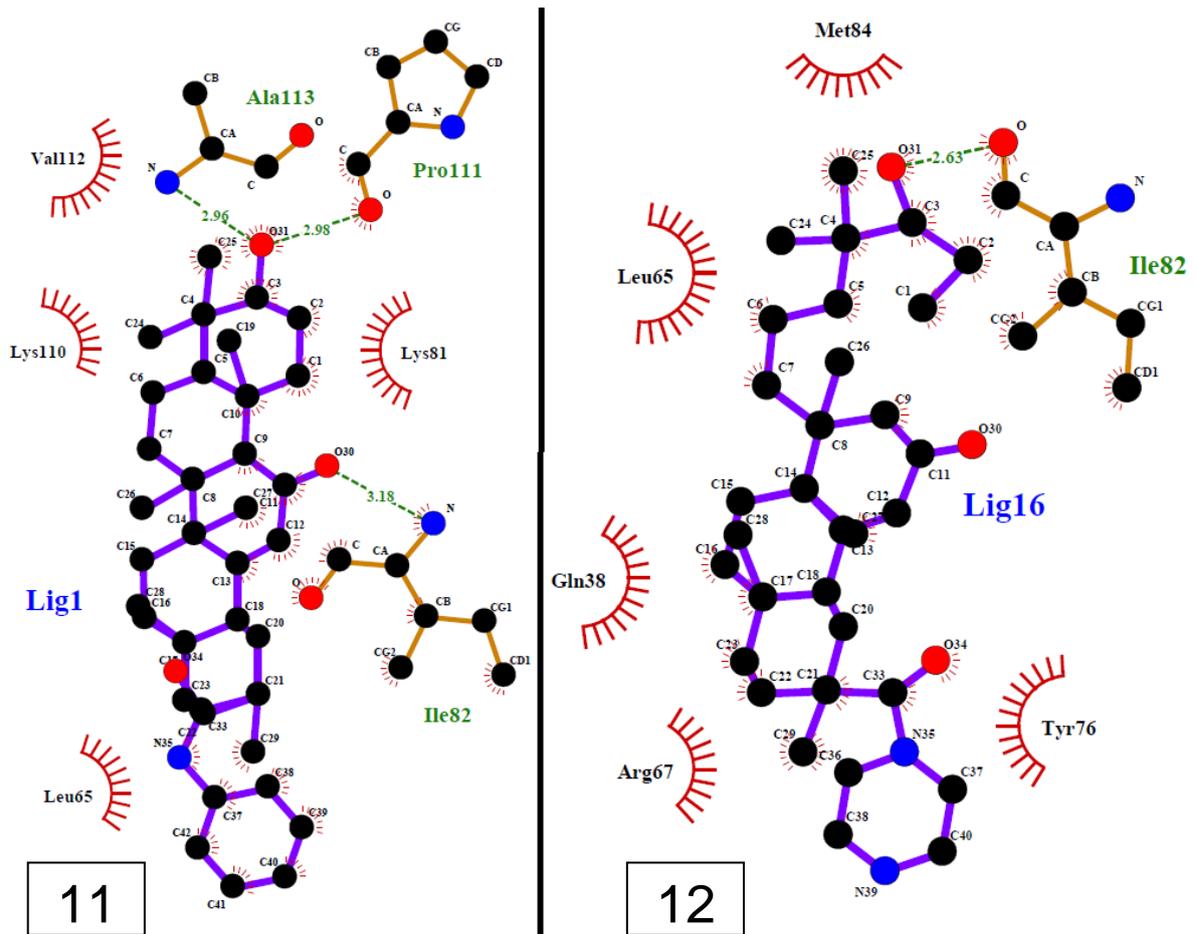


Figura 18: Interações da estrutura 11 com trombina, na esquerda, e da estrutura 12 com a trombina, na direita

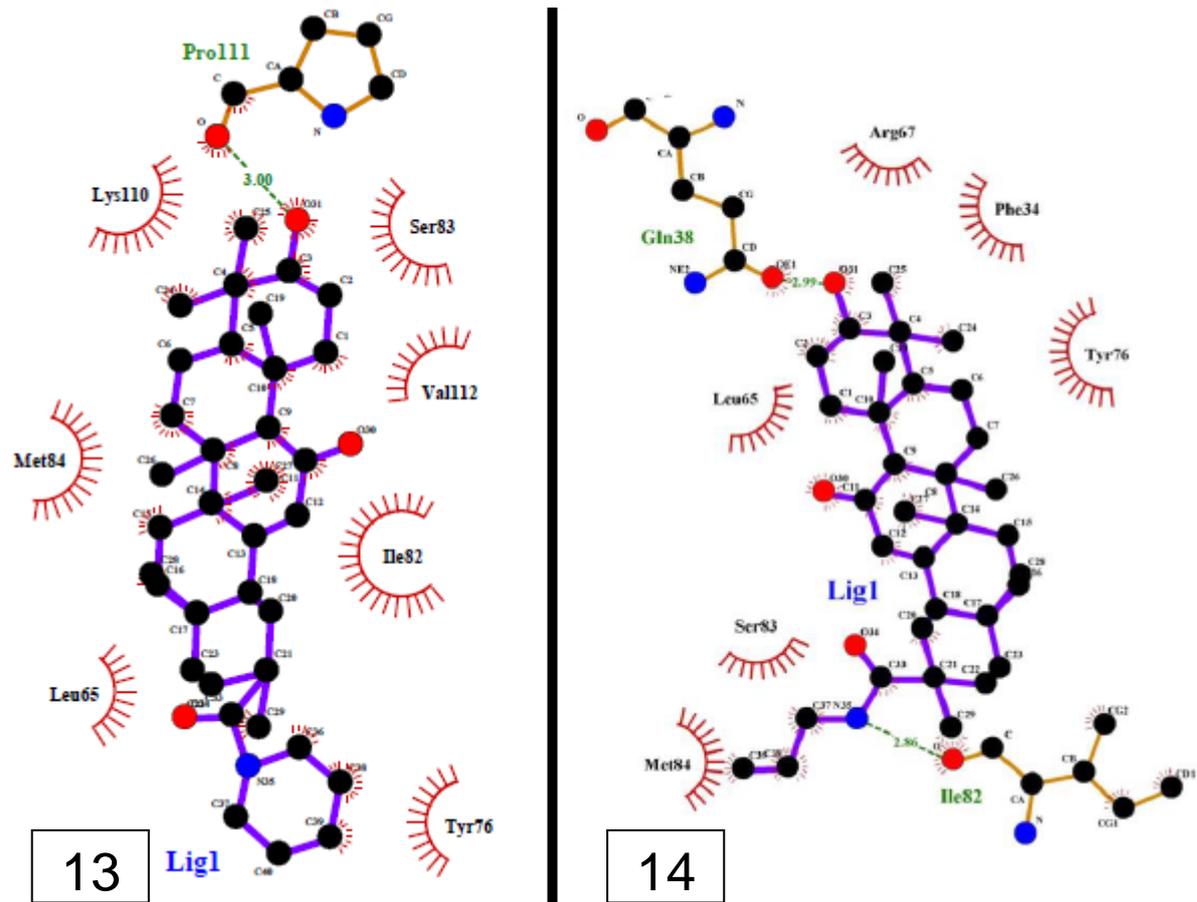


Figura 19: Interações da estrutura 13 com trombina, na esquerda, e da estrutura 14 com a trombina, na direita

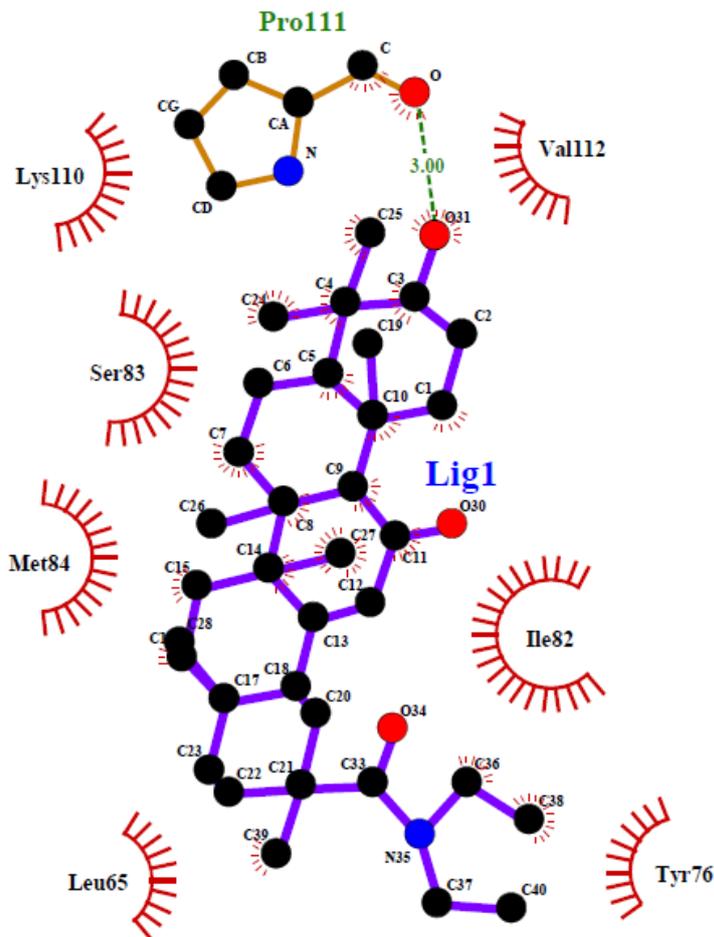


Figura 20 Interações do ligante 15 (GLA)

Com o intuito de determinar o grau de relevância das interações com os resíduos da proteína, já mostradas nas figuras anteriores, as interações dos compostos com o exossítio I foram confrontadas com as interações do exossítio I com o fibrinogênio e a fibrina, dois componentes da via de coagulação do organismo que possuem conhecida relação com o exossítio.

Já que eventual similaridade de interações pode indicar competição por um mesmo sítio, conseqüentemente, um alvo para a ação de estruturas planejadas na via de coagulação. Nesse caso, com o critério de comparação consistindo na contagem do número de resíduos com mesma interação mencionada para o fibrinogênio e a fibrina.

As interações já lançadas na tabela anterior foram reorganizadas sob o critério de similaridade com interações da fibrina e do fibrinogênio. Conforme tabela abaixo:

Tabela 4 Interações em comum com fibrina e fibrinogênio grifadas em azul; resíduos em comum com fibrinogênio grifados em verde, com fibrina em laranja, e com fibrinogênio e fibrina em azul;

	Phe 34	Lys 36	Gln 38	Leu 65	Arg 67	Tyr 76	Lys 81	Ile 82	Ser 83	Met 84	Lys 109	Lys 110	Pro 111	Val 112	Ala 113	IC/total
1		x		x				x	x	x	x	x				4 (7)
2		x	x	x			x	x	x							3 (6)
3			x	x	x	x		x	x	x	x	x				6 (9)
4				x		x		x	x	x	x	x				5 (7)
5	x		x	x		x	x	x	x	x		x				6 (9)
6				x			x	x				x	x	x	x	4 (7)
7				x		x	x	x				x	x	x	x	5 (8)
8				x			x	x				x	x	x	x	4 (7)
9	x		x	x		x	x	x	x	x		x				6 (9)
10	x		x	x	x	x		x	x	x						5 (8)
11				x			x	x				x	x	x	x	4 (7)
12			x	x	x	x		x		x						4 (6)
13				x		x		x	x	x		x	x	x		4 (8)
14	x		x	x	x	x		x	x	x						5 (8)
15				x		x		x	x	x	x	x				5 (7)

Os resultados apresentaram considerável similaridade com os dados de artigos científicos, com estruturas tendo até 75% das interações coincidindo com as descritas em estudos experimentais da fibrina e do fibrinogênio, não o que demonstra uma possível capacidade de intervenção desses ligantes em pontos da via de coagulação onde esses compostos atuam no organismo. Mas também quanto aos tipos de interação, com as hidrofóbicas sendo predominantes e em menor quantidade as hidrofílicas, o que são características do exossítio 1, o que indica que esses compostos podem possuir efetiva similaridade não apenas de interações, mas também de ação, com grande potencial então para servirem como base para a produção de inibidores. (Huntington,2005)

Fazendo um balanço geral, como na tabela abaixo, pode se apontar, sem dúvidas, um perfil fidedigno das estruturas às características de candidatos a inibidores, com especial destaque para os compostos 3, 5 e 9 (grifados em vermelho na tabela 5) que ficaram sempre entre os melhores resultados do teste, e se enquadraram inclusive em faixa de energia de ligação próxima, podendo eles virem a constituir o elo para um melhor entendimento da relação estrutura atividade dessa classe de compostos com espectro de ação tão amplo.

Tabela 5 Balanço geral das interações; compostos ordenados pela energia de ligação;

Composto	Relação H/L	Interações em comum	En. Lig.
2	0/6	4	-6,95
4	1/6	5	-6,95
1	2/5	5	-6,47
3	1/8	6	-6,45
5	2/7	6	-6,23
9	2/7	6	-6,15
15	1/6	5	-5,86
11	3/4	4	-5,74
13	1/7	4	-5,63
7	4/4	5	-5,63
8	3/4	4	-5,57
14	2/6	5	-5,38
10	2/6	5	-5,16
6	3/4	4	-5,03
12	1/5	4	-4,58

**Conclusões:**

Os resultados obtidos indicam forte possibilidade de esses componentes possuírem de fato características de inibidores competitivos / moduladores do exosítio I da trombina. Tanto pela comparação com o perfil geral de interação e "*steering*" de compostos que tem afinidade pelo exosítio I como pelos resíduos do exosítio I que interagem com componentes alvo do organismo (como a fibrina e o fibrinogênio) obtiveram-se dados que vão ao encontro com os resultados gerados nas simulações.

Embora já exista bibliografia que confirme o papel da GL na inibição do exosítio I da trombina, esse não era o caso do GLA, que embora usado para diversas finalidades afins com as da GL, não possuía documentação comprovando sua utilidade para o desempenho dessa atividade farmacológica.

Embora esses resultados tenham coincidido com dados experimentais consultados, fornecendo considerável evidencia para novos testes, uma inspeção mais detalhada dessa classe de compostos é essencial para esclarecer a relevância desses resultados.

Os resultados indicam possibilidade de o GLA poder vir a ser usado como uma base para possíveis inibidores do exosítio I da trombina.

Para confirmação dos resultados obtidos *in silico*, avaliações *in vivo*/ *in vitro* são necessárias.

## Bibliografia

- Bates, S.M., Weitz, J.L.: The mechanism of action of thrombin inhibitors (2000). *Journal of Invasive Cardiology*, 12, Supplement F, 27–32.
- Becker L., Fredenburgh C., Stafford R., Weitz I.: Exosites 1 and 2 are essential for protection of fibrin-bound thrombin from heparin-catalyzed inhibition by antithrombin and heparin cofactor II (1999). *Journal of Biological Chemistry* 274, 6226–6233.
- Becker R., Spencer F.: Thrombin: Structure, Biochemistry, Measurement, and Status in Clinical Medicine (1998). *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 215-229.
- Bode W., Turk D., Karshikov A.: The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe–Pro–Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure–function relationships (1992). *Protein Science*, 1, 426–471.
- Bode W., Mayr I., Baumann U., Huber R., Stone R., Hofsteenge J.: The refined 1.9 Å crystal structure of human  $\alpha$ -thrombin: Interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment (1989). *EMBO J.*, 8, 3467-3475.
- Bode W.: Structure and interaction modes of thrombin (2006). *Blood Cells Mol. Dis.*, 36, 122–130.
- Choi J., He N., Kim N., Yoon S.: Enrichment of virtual hits by progressive shape-matching and docking (2011). *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 32, 82-88.
- Di Cera E.: Thrombin Review (2008). *Molecular Aspects of Medicine* 29, 203–254.
- Eyre L., Gamlin F: Haemostasis, blood platelets and coagulation (2010). *Anaesthesia and intensive care medicine*, 11, 6.
- Fabricant D.S., Farnsworth N.R.: The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery (2001). *Environmental Health Perspectives*, Vol. 109, Supplement 1.
- Ferreira C. Sousa, Dusse L. Carvalho M. A cell-based model of coagulation and its implications (2010). *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 32, 5.
- Giannelli G., Quaranta V., Antonaci S.: Tissue remodelling in liver diseases (2003). *Histol Histopathol.* 18, 1267-1274.
- Giesel G.M. Caracterização da dinâmica de modulação da Trombina por inibidores

covalentes e alostéricos (2009). Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - UFRGS.

Graebin C.S., Verli H., Guimarães A.J.: Glycyrrhizin and Glycyrrhetic Acid: Scaffolds to Promising New Pharmacologically Active Compounds (2010). *Journal of Brazilian Chemical Society*, Vol. 21, No. 9, 1595-1615.

Gresele P., Agnelli G.: Novel approaches to the treatment of Thrombosis (2002). *Trends in Pharmacological Sciences*, 23, 1.

Huntington J.: Molecular recognition mechanisms of thrombin (2005). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3, 8, 1861–1872.

Hinsberg V.: The endothelium: vascular control of haemostasis (2001). *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 95, 198-201.

Hoffman M., Monroe M.: A cell-based model of hemostasis (2001). *Thrombosis and Haemostasis*, 85, 958–965.

Ivo Mauricio , Francischetti B., Monteiro R.Q. , Guimarães J.A.: Identification of Glycyrrhizin as a Thrombin Inhibitor (1997). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 235, 259–263 (1997).

Jenny S., Mann G.: Coagulation Cascade: An Overview (1998). *Thrombosis and Hemorrhage*, 2<sup>a</sup> Ed., Loscalzo J., Schafer A. I. Eds.; Williams & Wilkins, Baltimore, 3-8.

Karshikov A., Bode W., Tulinsky A., Stone S.: Electrostatic interactions in the association of proteins: An analysis of the thrombin-hirudin complex (1992). *Protein Science*, 1, 727-735.

Liu C.C., Brustad E., Liu W., Schultz P.G.: Crystal structure of a biosynthetic sulfo-hirudin complexed to thrombin (2007) *Journal of American Chemical Society*, 129, 10648-10649.

Ma L., Dorling A.: The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation (2011). *Semin Immunopathol*, DOI 10.1007/s00281-011-0281-9.

May-Yoke Ng N., Quinsey N., Matthews A., Kaiserman D., Wijeyewickrema a, Bird P., Thompson E., Pike R.: The effects of exosite occupancy on the substrate specificity of thrombin (2004). *Biophysical Chemistry* 112, 277– 284.

Murray D.W.G.: Heparin in thrombosis and embolism (1939). *British Journal of Surgery*, 27, 567.

Myles T., Le Bonniec F., Betz A., Stone R. Electrostatic steering and ionic tethering in the

formation of thrombin-hirudin complexes: the role of the thrombin anion-binding exosite-I (2001). *Biochemistry*, 40, 4972–9.

Nargotra A., Sharma S., Alam I., Ahmed Z., Bhagat A., Taneja C., Qazi N., Koul S.: In silico identification of viper phospholipaseA2 inhibitors: validation by in vitro, in vivo studies. *Journal of Molecular Modeling*, DOI 10.1007/ s00894-011-0994-7.

Neumann T., Junker D., Keil O., Burkert K., Oettleben H., Gamer J., Sekul R., Deppe H., Feurer A., Tomandl D., Metz G.: Discovery of Thrombin Inhibitor Fragments from Chemical Microarray Screening. *Letters in Drug Design and Discovery*, 2, 590.

Nimjee S. M., Oney S., Volovyk Z., et al.: Synergistic effect of aptamers that inhibit exosites 1 and 2 on thrombin. *RNA* 2009 , 15, 2105-2111.

Nutescu E.A., Shapiro N.L., Chevalier A.: New Anticoagulant Agents: Direct Thrombin Inhibitors (2008). *Cardiology Clinics* ,26, 169-187.

O'Boyle N., Banck M., James C., Morley C., Vandermeersch T., Hutchison G.: Open Babel: An open chemical toolbox (2011). *Journal of Cheminformatics*, Vol. 3, article 33.

Pérez-Gómez F., Bover R.: The New Coagulation Cascade and Its Possible Influence on the Delicate Balance Between Thrombosis and Hemorrhage (2003). *Rev Esp Cardiol*. 2007; 60, 1217-9.

Segers K., Bock B, Tans G., Rosing J., Nicolaes G.: The Role of Thrombin Exosites I and II in the Activation of Human Coagulation Factor V (2007). *Journal of Biological Chemistry* 282, 47, 33915–33924.

Skordalakes E., Elgendy S., Goodwin C., Green D., Scully M., Kakkar V., Freyssinet J., Dodson G., Deadman J.: Bifunctional Peptide Boronate Inhibitors of Thrombin: Crystallographic Analysis of Inhibition Enhanced by Linkage to an Exosite 1 Binding Peptide (1998). *Biochemistry*, 37, 14420-14427.

Turgeon V., Houenou L., The role of thrombin-like serine/proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system (1997). *Brain Research Reviews* 25, 85-95.

Vine K.: Recent advances in haemostasis and thrombosis (2009). *Retina*, 29, 1–7.

Wallace C., Laskowski A., Thornton M.: LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions (1995). *Prot. Eng.*, 8, 127-134.

Weitz J.: A novel approach to thrombin inhibition (2003). *Thrombosis Research* 109, S17–S22.

Weitz J., Crowther M.: Direct thrombin inhibitors (2002). *Thromb Res.* 2002, 106(3), V275-

84.

Yuriev E., Agostino M., Ramsland P.: Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *Journal of Molecular Recognition* 24, 2, 149–164.