

# ***Estudo computacional de peptídeos ativos da Nitroforina-2 visando o planejamento de fármacos anticoagulantes***

KARINA ALINE OSTJEN<sup>1</sup>  
CIRLENI DOMINGA FELIPE<sup>2</sup>  
JORGE ALMEIDA GUIMARÃES<sup>3</sup>  
HERMES LUÍS NEUBAUER DE AMORIM<sup>4</sup>

## **RESUMO**

*Nitroforina 2 (NP-2), uma proteína anticoagulante presente na saliva inseto hematófago Rhodnius prolixus, foi caracterizada como um inibidor específico do complexo tenase (fXase). Em estudo prévio, foi observado que um peptídeo sintético correspondendo a região entre os resíduos 90 a 110 de NP-2 apresentou atividade anticoagulante. O presente trabalho tem por objetivo o emprego de ferramentas de modelagem molecular no estudo da interação de NP-2 e de seu fragmento ativo com o fator IXa. Os resultados obtidos mostram as diferenças e as semelhanças conformacionais entre as estruturas simuladas. As informações obtidas serão empregadas para o planejamento de moléculas pequenas (peptide-like) com potencial anticoagulante.*

**Palavras-chave:** fator IXa, nitroforina-2, fármacos anticoagulantes, modelagem molecular.

---

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Farmácia/ULBRA - Bolsista PROICT/ULBRA

<sup>2</sup>Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA

<sup>3</sup>Laboratório de Bioquímica Farmacológica - Centro de

Biotecnologia/UFRGS

<sup>4</sup>Professor – Orientador do Curso de Química e Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA - Laboratório de Bioinformática Estrutural/ULBRA (hlnamorim@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

*Nitrophorin 2 (NP-2), an anticoagulant protein produced in salivary glands of blood-sucking bug Rhodnius prolixus, was characterized as a specific inhibitor of the tenase complex (fXase). In previous study, it was observed that a synthetic peptide corresponding to the region between residues 90 and 100 of NP-2 sequence shown anticoagulant activity. In the present work, molecular modeling tools were used in the study of the interaction of NP-2 and its active fragment with factor IXa of blood coagulation. The results show the differences and similarities between the simulated structures. The obtained knowledge will be used for design of small molecules (peptide-like) with anticoagulant potential.*

**Key words:** factor IXa, blood coagulation, nitrophorin-2, molecular modeling, anticoagulant drugs.

## INTRODUÇÃO

O quadro de trombose venosa e arterial está associado a uma série de distúrbios hemostáticos tais como, o infarto agudo do miocárdio (EAM), a angina instável, a isquemia cerebrovascular, o ataque cardíaco e o embolismo pulmonar. Os riscos à saúde e de sobrevivência/morte ou ainda de sofrimento humano relacionados à prevalência de hipercoagulopatias, constituem condições que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Como consequência, os agentes anti-hemostáticos e antitrombóticos utilizados atualmente na prevenção e/ou tratamento de distúrbios trombo-embólicos representam um mercado estimado em muitos bilhões de dólares (COLLINS e HOLLIDGE, 2003). Contudo, ainda são poucas as drogas cuja utilização é bem aceita e aplicada na clínica de forma

mais proeminente e seletiva (a aspirina e a heparina são os exemplos típicos).

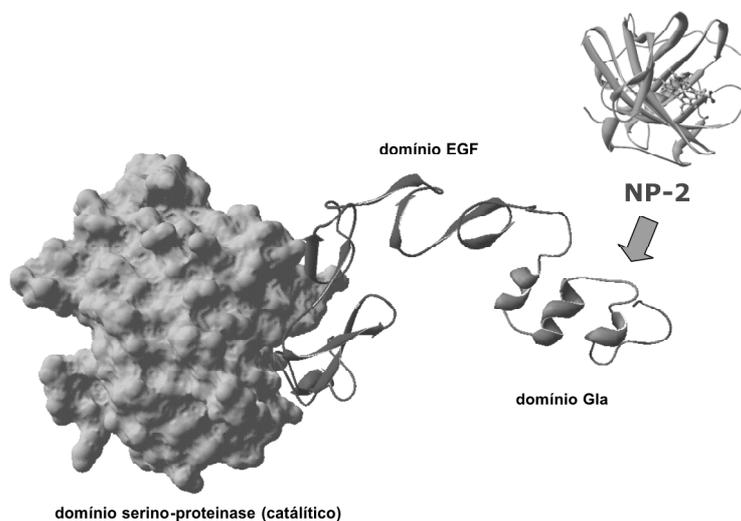
O uso clínico-terapêutico de anticoagulantes tem por objetivo promover a inibição de uma das fases da hemostasia, o processo de coagulação, impedindo assim a progressão do quadro trombótico. Alguns anticoagulantes são também administrados como terapia profilática em pacientes com alto risco de trombose, ou no tratamento da própria trombose após a formação e consolidação do trombo venoso ou arterial (COLLINS e HOLLIDGE, 2003).

A coagulação sanguínea é o resultado final de uma complexa série de reações sequenciais, em cascata, envolvendo várias glicoproteínas (e seus co-fatores) presentes no plasma (Figura 1) (ARNOUT, 2006). O resultado final da ativação da cascata da coagulação é a formação da rede de fibrina polimerizada (malha de fibrina).

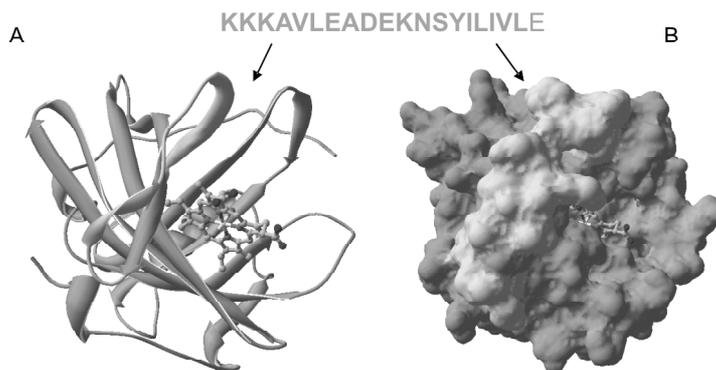


mica molecular de NP-2 e de seu fragmento ativo. Além disso, a simulação da região correspondente da nitroforina 4, a qual apresenta baixa

atividade anticoagulante, foi realizada com o objetivo de se ter um controle para futuros estudos de *docking* molecular.



**Figura 2.** Representação esquemática do fator IXa bovino e da nitroforina 2 (NP-2). No fIXa, o domínio catalítico é mostrado de acordo com a superfície acessível ao solvente. Os domínios EGF e Gla estão representados como fitas. O domínio Gla de fIXa representa o provável sítio de interação com NP-2.



**Figura 3.** Representação esquemática em fitas (A) e da superfície acessível ao solvente (B) da estrutura da nitroforina-2. A região com atividade anticoagulante (resíduos 90-110) está destacada.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todas simulações foram realizadas usando-se o pacote GROMACS e, como campo de forças, o GROMOS96 43A2 (van der SPOEL et al., 2001). As coordenadas iniciais das proteínas utilizadas nas simulações realizadas no presente trabalho foram obtidas no Protein Data Bank (RCSB PROTEIN DATA BANK, 2006). Foram realizadas 3 simulações: a) nitroforina-2; b) fragmento ativo da nitroforina-2 e c) fragmento da nitroforina-4 cuja região corresponde estruturalmente aquela onde está localizado o fragmento ativo de NP-4.

Nas simulações em ambiente aquoso, o modelo SPC de água foi utilizado. Todos os sistemas foram simulados em condições de pressão constante (NPT) e com a utilização de condições periódicas de contorno (PBC). As dimensões da caixa central foram feitas de forma que houve sempre uma distância mínimo de 10 Å entre quaisquer átomo da proteína e a parede mais próxima. O protocolo geral das simulações é descrito a seguir.

As velocidades iniciais das simulações foram assinaladas de acordo com a distribuição de Maxwell, sendo os sistemas termalizados de 100 a 310 K em quatro etapas (100 → 150 K; 150 → 200K; 200 → 250K; 250 → 310K) com duração de 5 ps cada. Após, as simulações foram rodadas a temperatura (310 K) e pressão (*ensemble* NPT) constantes, com emprego de passos de integração de 2 fs. A pressão do sistema foi acoplada por um banho de pressão com escala isotrópica e tempo de relaxação de 0,5 ps.

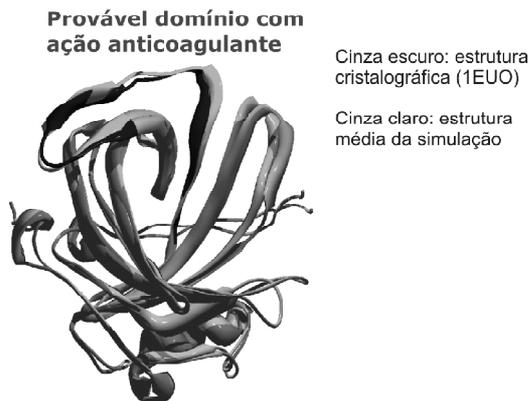
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ligação de um fármaco em seu sítio de interação (sítio ativo ou sítio receptor) depende, essencialmente, da complementaridade estérica (forma espacial) e eletrônica. Dados estruturais de moléculas obtidos por cristalografia de raios-X são representativos da estrutura média de todas as moléculas presentes no cristal. Além disso, as estruturas cristalográficas são estruturas estáticas. Neste aspecto, é importante notar que uma molécula bioativa em solução pode existir em vários estados conformacionais diferentes, isto é, adotando várias “formas” diferentes e intercambiáveis (BERENDSEN e HAYWARD, 2000). Normalmente, só algumas das conformações são ativas. Assim, a análise conformacional representa uma etapa importante no plajeamento de fármacos.

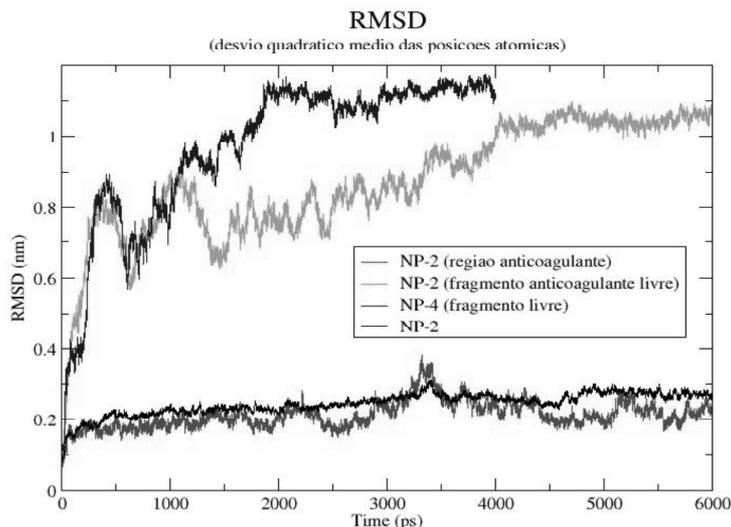
Conforme pode ser observado na Figura 4, onde é mostrada a sobreposição da estrutura cristalográfica de partida de NP-2 com a estrutura média de simulação, há pouca variação conformacional na região estabelecida como provável sítio de interação com fXIa. Por outro lado, os fragmentos livres de NP-2 e NP-4 estão sujeitos a maior variação na conformação. De acordo com a Figura 5, onde é apresentado o desvio médio quadrático (RMSD) das posições atômicas tendo como referência as estruturas cristalográficas, pode-se observar que os fragmentos livres de NP-2 e NP-4 desviam-se consideravelmente das estruturas de partida, ou seja, na proteína intacta a região anticoagulante possui uma conformação bastante distinta da conformação do fragmento livre.

A variabilidade conformacional do fragmento ativo de NP-2 é ilustrada na Figura 6, onde são mostrados *snapshots* (instantâneos) da estrutura do fragmento livre em intervalos de 1 ns. Assim, é possível observar as flutuações conformacionais sofridas no período da simulação. Estes resultados estão de acordo com os fa-

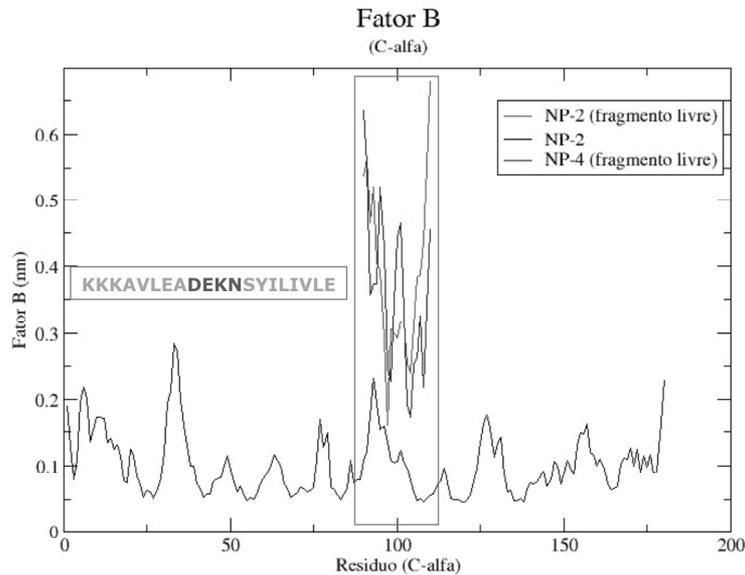
tores de temperatura (ou fator B, um indicativo do grau de flexibilidade e flutuação conformacional experimentado pelas estruturas) gerados nas simulações (Figura 7). Como esperado, os peptídeos livres estão sujeitos a maior liberdade conformacional que a região correspondente na proteína intacta.



**Figura 4.** Sobreposição da estrutura de cristalográfica de partida de NP-2 com a estrutura média gerada na simulação.



**Figura 5.** RMSD atômico posicional das trajetórias (C-alfa) nas simulações.



**Figura 6.** Fatores de temperatura (fator B) obtidos nas simulações de DM.

Para que o fragmento ativo de NP-2 interaja no mesmo sítio que a proteína intacta é necessário que as conformações sejam equivalentes em alguma região. Na Figura 8 é mostrada a sobreposição da estrutura média gerada para o fragmento ativo NP-2 com na região correspondente de NP-2 inteira (estrutura média da simulação). É possível observar que o segmento mais conservado nas duas estruturas é formado pela seqüência Asp99-Glu100-Lys-101-Asn102. Assim, espera-se que esta região represente o sítio de interação de NP-2 com o módulo Gla do fator IXa.

2 possui dinâmica conformacional e estrutura distintas. Mesmo assim, a sobreposição das estruturas mostrou que a seqüência Asp99-Glu100-Lys-101-Asn102 do fragmento ativo apresenta semelhança estrutural com o provável domínio de interação de NP-2 com FIXa, sugerindo que esta região é determinante para a ação anticoagulante de ambas as estruturas. Para que os dados sejam validados, o peptídeo Asp-Glu-Lys-Asn deverá ser sintetizado e sua atividade de inibir a formação do complexo tenase avaliada mediante ensaios bioquímicos.

## CONCLUSÕES

As simulações realizadas indicam que, embora a região proposta com atividade anticoagulante em NP-2 não sofra transições conformacionais significativas em solução, o fragmento ativo livre de NP-

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOUT, J.; Hoylaerts, M.F.; Lijnen H.R. Haemostasis. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.176, p.1-41, 2006.

BERENDSEN, H.J.C.; HAYWARD, S. Collective protein dynamics in relation to function. **Current Opinion on Structural Biology**, v.10, p.165-169, 2000.

COLLINS, B.; HOLLIDGE, C. Antithrombotic drug market. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, p.11-12. 2003.

GUDDERRA, N.P.; Ribeiro, J.M.C.; Andersen, J.A. Structural determinants of factor IX(a) binding in nitrophorin 2, a lipocalin inhibitor of the intrinsic coagulation pathway. **Journal of Biological Chemistry**,

v.280, n.26, p.25022-25028, 2005.

GUIMARÃES, J.A. (comunicação pessoal), 2004.

RCSB Protein Data Bank. Disponível em: <http://www.rcsb.org>.

VAN DER SPOEL, D. et al. **Gromacs user manual version 3.0**. Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands, 2001.

ZHANG, Y. et al. Nitrophorin-2: a novel mixed-type reversible specific inhibitor of the intrinsic factor-X activating complex. **Biochemistry**, v.28, n.10, p.10681- 10690, 1998.