



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

**ARTUR RODRIGUES MAIO**

**MODELAGEM MOLECULAR E SIMULAÇÃO DE  
DINÂMICA MOLECULAR DE POLISSACARÍDEOS  
ANTICOAGULANTES INIBIDORES DE TROMBINA**

Dissertação de Mestrado submetida a  
Universidade Federal Fluminense visando à obtenção do grau de  
Mestre em Ciências e Biotecnologia

**Orientador(es): Dr. Murilo Lamim Bello  
Dra. Helena Carla Castro**



Niterói  
2025

**ARTUR RODRIGUES MAIO**

**MODELAGEM MOLECULAR E SIMULAÇÃO DE  
DINÂMICA MOLECULAR DE POLISSACARÍDEOS  
ANTICOAGULANTES INIBIDORES DE TROMBINA**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Planejamento Farmacêutico e Simulação Computacional - UFRJ / Laboratório de Antibióticos, Bioquímica e Modelagem Molecular – UFF / Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq, FAPERJ, UFF-FOPESQ.

Dissertação de Mestrado submetida a Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia

**Orientador(es): Dr. Murilo Lamim Bello  
Dra. Helena Carla Castro**

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV  
Gerada com informações fornecidas pelo autor

M217m Maio, Artur Rodrigues  
MODELAGEM MOLECULAR E SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR DE  
POLISSACARÍDEOS ANTICOAGULANTES INIBIDORES DE TROMBINA / Artur  
Rodrigues Maio. - 2025.  
85 f.: il.

Orientador: Murilo Lamim Bello.  
Coorientador: Helena Carla Castro.  
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,  
Instituto de Biologia, Niterói, 2025.

1. Anticoagulantes. 2. Modelagem Molecular. 3. Galactana  
Sulfatada. 4. Trombina. 5. Produção intelectual. I. Bello,  
Murilo Lamim, orientador. II. Castro, Helena Carla,  
coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto  
de Biologia. IV. Título.

CDD - XXX

## **ARTUR RODRIGUES MAIO**

# **MODELAGEM MOLECULAR E SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR DE POLISSACARÍDEOS ANTICOAGULANTES INIBIDORES DE TROMBINA**

Dissertação de Mestrado  
submetida a Universidade Federal  
Fluminense como requisito parcial  
visando à obtenção do grau de  
Mestre em Ciências e  
Biotecnologia

### **Banca Examinadora:**

---

**Dr. Murilo Lamim Bello, Faculdade De Farmácia - Universidade Federal Do Rio  
De Janeiro, Brasil (Orientador/Presidente)**

---

**Dr<sup>a</sup>. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão - Departamento de Biologia  
Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense, Brasil**

---

**Dr<sup>a</sup>. Natalia Lidmar von Ranke - Neo7Bioscience Inc, Dallas, Estados Unidos**

---

**Dr. Ricardo Augusto Massarico Serafim - Insitut Químic de Sarrià (IQS),  
Universitat Ramon Llull, Barcelona, Espanha**

---

**Dr. Saulo Cabral Bourguignon - Departamento de Biologia Celular e Molecular,  
Universidade Federal Fluminense, Brasil (Suplente)**

---

**Dr. Reinaldo Barros Geraldo - Faculdade de Medicina, UNILAGOS  
(Revisor/Suplente)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por todas as graças recebidas ao longo desta jornada.

Aos meus pais, Isabel e Duarte pelo tempo, amor e dedicação em minha educação, que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À minha noiva Jéssica pelo amor, carinho e apoio incondicional em todos os momentos.

Aos meus orientadores, Murilo Lamim Bello e Helena Castro, pela paciência, pelos conhecimentos transmitidos e pelo constante auxílio no desenvolvimento deste projeto.

A todos os professores com os quais tive o privilégio de conviver durante este curso, que contribuíram significativamente para minha formação acadêmica e pessoal.

Às agências de fomento CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro e incentivo à pesquisa, que viabilizaram este trabalho.

Aos colegas de laboratório em especial do LaPFarSC e LABIEMOL, aos amigos desta turma, pelos momentos de aprendizado, convivência e amizade compartilhados, que tornaram este percurso mais leve e enriquecedor.

A todos, meu mais sincero obrigado!

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1. COAGULAÇÃO SANGUÍNEA E HEMOSTASIA.....	12
1.2. PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE COAGULAÇÃO.....	13
1.3. TROMBINA: ENZIMA CHAVE DA COAGULAÇÃO.....	15
1.4. ANTITROMBINA: INIBIDOR FISIOLÓGICO DA TROMBINA .....	17
1.5. FÁRMACOS ANTICOAGULANTES .....	19
1.5.1. ANTICOAGULANTES INIBIDORES INDIRETOS DA TROMBINA .....	21
1.5.2. ANTICOAGULANTES INIBIDORES DIRETOS DA TROMBINA .....	23
1.6. ESTRUTURA QUÍMICA E FLEXIBILIDADE DOS CARBOIDRATOS.....	25
1.7. PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS E ESTUDOS <i>IN SILICO</i> .....	27
1.7.1. MODELAGEM MOLECULAR.....	31
1.7.2. MODELAGEM COMPARATIVA.....	31
1.7.3. <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	32
1.7.4. <i>REDOCKING</i> MOLECULAR.....	34
1.7.4. TRIAGEM VIRTUAL.....	35
1.7.5. SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR.....	36
2.1. OBJETIVO GERAL .....	38
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.2. MODELAGEM COMPARATIVA DAS PROTEINAS.....	41
3.3. MODELAGEM MOLECULAR DOS POLISSACARÍDEOS .....	44
3.4. SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR: FORMAS APO .....	45
3.5. ANÁLISE CONFORMACIONAL POR <i>CLUSTERING</i> .....	45
3.7. <i>REDOCKING</i> MOLECULAR .....	47
3.8. <i>DOCKING</i> MOLECULAR .....	47
3.9. SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR: FORMA HOLO .....	47
4. RESULTADOS .....	49
4.1. MODELAGEM MOLECULAR DOS POLISSACARÍDEOS .....	49
4.2. MODELAGEM COMPARATIVA DAS ESTRUTURAS PROTEICAS.....	50
4.3. ANÁLISE DAS CAVIDADES TRANSITÓRIAS .....	52
4.4. <i>REDOCKING</i> MOLECULAR .....	54
4.5. <i>DOCKING</i> MOLECULAR .....	55
4.6. SELEÇÃO DOS COMPLEXOS MOLECULAR TERNÁRIOS.....	57
5. DISCUSSÃO .....	63

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
6.1. CONCLUSÕES .....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
7.1 OBRAS CITADAS .....	70
7.2 OBRAS CONSULTADAS.....	82
8. APÊNDICE .....	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática das etapas da Cascata da Coagulação.	12
<b>Figura 2.</b> Estrutura molecular obtida por cristalografia de raios-x da Trombina.	16
<b>Figura 3.</b> Representação da estrutura cristalográfica da THR destacando-se seus diferentes sítios de ligação.	17
<b>Figura 4.</b> Modelo tridimensional da estrutura proteica da AT.	18
<b>Figura 5.</b> Representação dos resíduos passíveis de glicosilação na antitrombina.	19
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática das etapas onde os fármacos anticoagulantes exercem as atividades farmacológicas.	20
<b>Figura 7.</b> Mecanismos de modulação farmacológica da trombina.	21
<b>Figura 8.</b> Representação da estrutura química 2D da molécula de heparina.	21
<b>Figura 9.</b> Representação da molécula polissacarídica anticoagulante extraída da espécie de ouriço-do-mar <i>Echinometra Lucunter</i> .	23
<b>Figura 10.</b> Esquema bidimensional da molécula do fármaco bivalirudin.	24
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática dos diferentes mecanismos anticoagulantes sobre a THR.	25
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática de estruturas químicas de carboidratos e ligações glicosídicas.	26
<b>Figura 13.</b> Representação dos ângulos de torção entre dois monossacarídeos em ligação glicosídica.	27
<b>Figura 14.</b> Diferentes abordagens de planejamento de fármacos auxiliados por ferramentas computacionais.	29
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática da metodologia seguida no projeto.	40
<b>Figura 16.</b> Representação da interface gráfica da base online de dados PDB.	41
<b>Figura 17.</b> Representação da interface gráfica do software PyMol.	41
<b>Figura 18.</b> Representação da interface gráfica da base online de dados de proteínas PyMol.	42
<b>Figura 19.</b> Robetta. Representação da interface gráfica online do módulo <i>Structure Prediction</i> do servidor.	43
<b>Figura 20.</b> SWISS-MODEL. Representação da interface gráfica do servidor.	43
<b>Figura 21.</b> Polys Glycan Builder. Representação da interface gráfica online do construtor online.	44

<b>Figura 22.</b> Modelagem molecular dos polissacarídeos.	49
<b>Figura 23.</b> Análises das estruturas moleculares das proteínas Protrombina e Antitrombina-III geradas por modelagem comparativa.	50
<b>Figura 24.</b> Representação das estruturas proteicas após as simulações de DM e análise das conformações mais representativas.	51
<b>Figura 25.</b> Representação das cavidades transitórias na trajetória da DM das estruturas, MD-PRO-AT, MD-THR-AT e MD-THR.	53
<b>Figura 26.</b> Sítios de ligação da estrutura MD-THR-AT nos <i>clusters</i> C1, C2 e C3.	54
<b>Figura 27.</b> Redocking do ligante HEP-16 no complexo trombina/AT-III.	55
<b>Figura 28.</b> Análise dos locais de ligação dos diferentes polissacarídeos ao complexo MD-THR-AT.	56
<b>Figura 29.</b> SGAL-16 em interação em ponte com o complexo MD-THR-AT.	57
<b>Figura 30.</b> Representação tridimensional das poses escolhidas referentes as moléculas de 5 resíduos.	58
<b>Figura 31.</b> Representação tridimensional das poses escolhidas referentes as moléculas de 16 resíduos.	58
<b>Figura 32.</b> Representação 3D da caixa de simulação com íons.	59
<b>Figura 33.</b> Representação dos resultados da DM dos diferentes ligantes com a estrutura MD-THR-AT.	60
<b>Figura 34.</b> Caracterização das interações de HEP-16 ligada pelo mecanismo de ponte com os resíduos da estrutura proteica MD-THR-AT.	61
<b>Figura 35.</b> Caracterização das interações de SGAL-16 ligada pelo mecanismo de ponte com os resíduos da estrutura proteica MD-THR-AT.	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Numeração dos principais resíduos do complexo Trombina-Antitrombina após a modelagem.	52
<b>Tabela 2.</b> Resultado da análise da energia de ligação dos diferentes polissacarídeos ao complexo trombina-antitrombina.	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>Thr</b>	Trombina alfa
<b>AT</b>	Antitrombina
<b>CADD</b>	<i>Computer Aided Drug Design</i>
<b>DM</b>	Dinâmica Molecular
<b>DTI</b>	Inibidor Direto da Trombina
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicanos
<b>GTV</b>	GlycoTorch Vina
<b>HEP-5</b>	Heparina de Cinco Resíduos
<b>HEP-16</b>	Heparina de Dezesesseis Resíduos
<b>LBDD</b>	<i>Ligand Based Drug Design</i>
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>PME</b>	<i>Particle Mesh Ewald</i>
<b>PRO</b>	Protrombina
<b>RCL</b>	<i>Reactive Loop Center</i>
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMSD</b>	Desvio Quadrático Médio
<b>RMSF</b>	Flutuação Quadrática Média
<b>SGAL-5</b>	Galactana Sulfatada de Cinco Resíduos
<b>SGAL-16</b>	Galactana Sulfatada de Dezesesseis Resíduos
<b>SBDD</b>	<i>Structure Based Drug Design</i>
<b>THR</b>	Trombina
<b>UniProt</b>	<i>Universal Protein Resource</i>
<b>VS</b>	<i>Virtual Screening</i>

## RESUMO

As doenças relacionadas às desordens do sistema cardiovascular são uma das maiores causas de morte e de custos em saúde a nível mundial. Devido a isto, o uso de fármacos anticoagulantes no tratamento dessas doenças é amplamente adotado. Entre os anticoagulantes mais utilizados na farmacologia está a heparina. Entretanto, as limitações ao seu uso em determinadas condições clínicas, em grande parte relacionadas aos efeitos colaterais hemorrágicos e alérgicos, além das limitações conhecidas de outros fármacos anticoagulantes. Estes fatos pressionam a pesquisa por fontes alternativas anticoagulantes com melhor perfil terapêutico. Atualmente, novos anticoagulantes macromoleculares estão sendo estudados, com destaque para o composto galactana sulfatada, um inibidor indireto de trombina extraído da fauna marinha, com perfil de segurança adequado para o tratamento da trombose. O presente trabalho teve como objetivo estudar, com detalhes os aspectos moleculares das interações intermoleculares da galactana sulfatada e da heparina com o complexo molecular antitrombina/trombina. A formação dos complexos moleculares entre os polissacarídeos e a antitrombina/trombina foi estudada empregando-se *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular. Os resultados indicaram a preferência das moléculas de galactana sulfatada em se ligar na forma de ponte entre o sítio de ligação da antitrombina e o exossítio II da trombina. Os resultados da simulação de dinâmica molecular mostraram a alta estabilidade da pose de ligação na forma de ponte da molécula de heparina entre as macromoléculas antitrombina e trombina. As variações conformacionais do complexo antitrombina/trombina permitiram identificar os principais sítios de ligação desses dois polissacarídeos e os resíduos essenciais para interações intermoleculares. Os novos resultados obtidos nesta análise podem ajudar a explicar o efeito anticoagulante mais potente da heparina quando comparada com a  $\alpha$ -L-galactana 2-sulfatada.

**Palavras-chave:** Anticoagulantes; Modelagem Molecular; Galactana Sulfatada; Trombina; Antitrombina.

## ABSTRACT

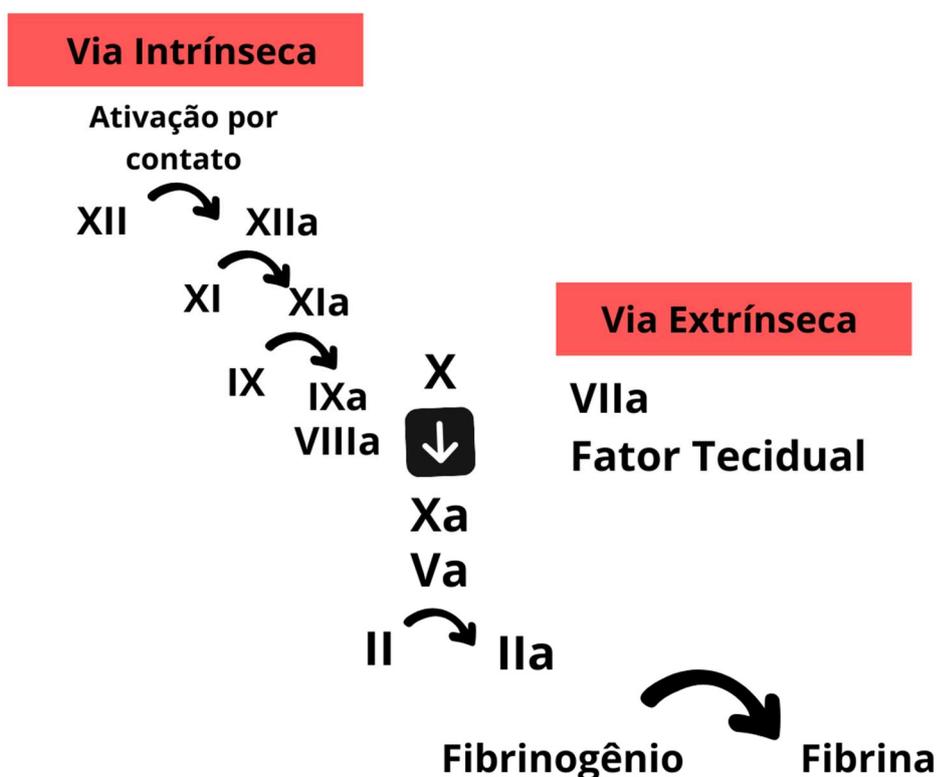
Cardiovascular disorders are among the leading causes of death and healthcare costs worldwide. As a result, the use of anticoagulant drugs in the treatment of these conditions is widely adopted. Heparin is one of the most commonly used anticoagulants in pharmacology. However, its use is limited in certain clinical conditions, primarily due to hemorrhagic and allergic side effects, as well as the known limitations of other anticoagulant drugs. This has driven the search for alternative anticoagulant sources with a better therapeutic profile. Currently, new macromolecular anticoagulants are being investigated, with a focus on sulfated galactan, an indirect thrombin inhibitor extracted from marine fauna, which exhibits a suitable safety profile for the treatment of thrombosis. The present study aimed to investigate in detail the molecular aspects of the intermolecular interactions of sulfated galactan and heparin with the antithrombin/thrombin molecular complex. The formation of molecular complexes between the polysaccharides and antithrombin/thrombin was studied using molecular docking and molecular dynamics simulations. The results indicated a preference of sulfated galactan molecules to bind in a bridging form between the antithrombin binding site and the exosite II of thrombin. Molecular dynamics simulations revealed the high stability of heparin's bridging pose between the antithrombin and thrombin macromolecules. Conformational variations in the antithrombin/thrombin complex allowed the identification of the main binding sites for these two polysaccharides and the essential residues for intermolecular interactions. The new findings from this analysis may help explain the more potent anticoagulant effect of heparin compared to  $\alpha$ -L-galactan 2-sulfate.

**Keywords:** Anticoagulants; Molecular Modeling; Sulfated Galactan; Thrombin; Antithrombin.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. COAGULAÇÃO SANGUÍNEA E HEMOSTASIA

A hemostasia consiste no intrincado equilíbrio entre os mecanismos pró coagulantes e anticoagulantes endógenos, permitindo o correto fluxo sanguíneo em condições normais e impedindo o sangramento excessivo em ocorrências de lesão. Quando há injúria ao tecido do vaso, para cessar o sangramento e evitar a excessiva perda de tecido sanguíneo, são ativadas substâncias pró-coagulantes, que ao predominarem sobre os mecanismos anticoagulantes, promovem a ativação do coágulo sanguíneo retendo o sangramento (CHAPIN e HAJJAR, 2015; AL-KOUSSA, ALZAIM e EL-SABBAN, 2022) A Figura 1 mostra a representação esquemática da cascata de coagulação clássica.



**Figura 1.** Representação esquemática do modelo clássico da cascata de coagulação. Vias Intrínseca e Extrínseca.

A coagulação envolve diversas interações entre proteases plasmáticas e cofatores culminando na gênese da trombina (THR), também chamada de Fator IIa, a partir da protrombina (PRO), também chamada de Fator II. A THR então converte o fibrinogênio solúvel em polímeros de fibrina insolúveis. O modelo conhecido como cascata de coagulação, inicialmente proposto em 1964, promoveu o entendimento da fisiologia da coagulação sanguínea e sua regulação através de uma série de ativações, devido a isso foi utilizado o termo cascata (CHEE, 2014). Essas ativações proteolíticas de precursores por proteases presentes no plasma, resultam então na formação e no aumento da geração de THR para formar o coágulo. Apesar de a cascata da coagulação ter sido um modelo inovador e ter contribuído de maneira significativa para o entendimento do processo de coagulação, estudos experimentais e clínicos mais recentes indicam que essa hipótese não representa na totalidade os eventos que ocorrem na hemostasia *in vivo*. No entanto, o modelo continua sendo uma ferramenta útil para o estudo da coagulação em ambientes experimentais *in vitro* (FERREIRA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Conforme apresentado na Figura 1, a cascata de coagulação pode ser dividida em duas vias: 1) a intrínseca, quando iniciada por componentes advindos do espaço intravascular; 2) a extrínseca, podendo envolver fatores presentes no espaço extravascular ou no tecido sanguíneo (AL-KOUSSA, ALZAIM e EL-SABBAN, 2022). Durante o evento da cascata de coagulação, há atuação de diversas proteínas nas diferentes etapas bioquímicas (CAMIRE, 2018).

## 1.2 PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE COAGULAÇÃO

A coagulação sanguínea é um processo complexo que envolve uma série de proteínas desempenhando papéis cruciais para a formação, regulação e remoção do coágulo. Esse processo é essencial para manter a hemostasia, garantindo que o sangramento seja controlado após uma lesão vascular, enquanto evita a formação inadequada de coágulos que poderia levar a trombozes. Dentre as principais proteínas envolvidas, destacam-se:

**Fibrinogênio:** É convertido em fibrina pela ação da THR, formando a rede estrutural do coágulo. A fibrina atua como uma malha que retém plaquetas e células sanguíneas,

estabilizando o coágulo.

Protrombina (Fator II): Precursor inativo da THR, é convertido em THR pelo complexo protrombinase (composto pelo Fator Xa, Fator Va, cálcio e fosfolipídeos). A THR, por sua vez, é uma enzima central na coagulação, ativando múltiplos fatores e convertendo fibrinogênio em fibrina.

Fator VIII: Atua como cofator no complexo tenase, que é formado pelo Fator IXa, Fator VIIIa, cálcio e fosfolipídeos. Esse complexo ativa o Fator X, amplificando a cascata de coagulação.

Fator IX: É ativado pelo Fator XIa e, em conjunto com o Fator VIIIa, forma o complexo tenase, que ativa o Fator X. Sua deficiência está associada à hemofilia B.

Fator X: Uma vez ativado, o Fator Xa integra o complexo protrombinase, que converte a PRO em THR. É um ponto de convergência das vias intrínseca e extrínseca da coagulação.

Fator XI: Ativado pelo Fator XIIa, o Fator XIa é responsável por ativar o Fator IX, amplificando a via intrínseca da coagulação. Estudos recentes destacam seu papel na trombose arterial.

Fator XII: Inicia a cascata de coagulação através da via intrínseca, sendo ativado por superfícies carregadas negativamente. Embora sua deficiência não cause sangramento, está implicado em processos trombóticos e inflamatórios.

Fator XIII: Estabiliza o coágulo de fibrina ao catalisar a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de fibrina, aumentando a resistência do coágulo à degradação.

Plasminogênio: É convertido em plasmina pela ação do ativador do plasminogênio tecidual (tPA). A plasmina degrada a fibrina, dissolvendo o coágulo em um processo conhecido como fibrinólise, que restaura a permeabilidade vascular após a reparação do tecido.

A THR e a antitrombina (AT) desempenham papéis centrais na regulação da coagulação. A THR, além de converter fibrinogênio em fibrina, ativa Fatores como V, VIII, XI e XIII, amplificando a formação do coágulo. Já a AT é um potente inibidor fisiológico da THR e de outros Fatores de coagulação, como Xa e IXa. O equilíbrio entre a atividade da THR e a inibição pela AT é crucial para prevenir tanto a coagulação excessiva, que pode levar a trombozes, quanto a coagulação insuficiente, que pode resultar em sangramentos (LICHOTA, SZEWCZYK e GWOZDZINSKI, 2020).

A desregulação desse equilíbrio pode resultar em complicações clínicas significativas, como trombose venosa profunda, embolia pulmonar ou hemorragias espontâneas. Portanto, a compreensão detalhada desses mecanismos é essencial para o desenvolvimento de terapias anticoagulantes e pró-hemostáticas mais eficazes e seguras (CONNOLLY *et al.*, 2024)

### **1.3 TROMBINA: ENZIMA CHAVE DA COAGULAÇÃO**

A THR é uma serino-protease sintetizada no fígado e secretada para a circulação na forma inativa, em PRO. Esta forma inativa conforme descrito no modelo da cascata da coagulação, é uma glicoproteína multidomínio que na ocorrência de lesão tecidual, têm sua ativação por proteólise limitada para a formação da THR. Esta molécula hidrolisa seletivamente ligações peptídicas entre arginina e glicina, exercendo papel central na hemostasia e na principal reação da cascata de coagulação sanguínea humana (ROUDSARI *et al.*, 2025; DAVIE e KULMAN, 2006).

A THR atua controlando o equilíbrio entre a hemostasia e a fibrinólise. Dentre a série de ações que esta enzima promove, estão: a agregação plaquetária e a catálise da conversão de fibrina solúvel em fibrinogênio insolúvel, constituindo e estabilizando o coágulo (FERREIRA, 2010; YONG, 2024).

A  $\alpha$ -trombina humana ( $\alpha$ -THR), forma ativa da proteína (Figura 2), é uma serino-protease de 36 kDa composta por duas cadeias, uma leve de 36 resíduos (cadeia **L**) e outra pesada de 259 resíduos (cadeia **H**), estando ligadas covalentemente por meio de pontes dissulfeto (DI CERA, 2008).

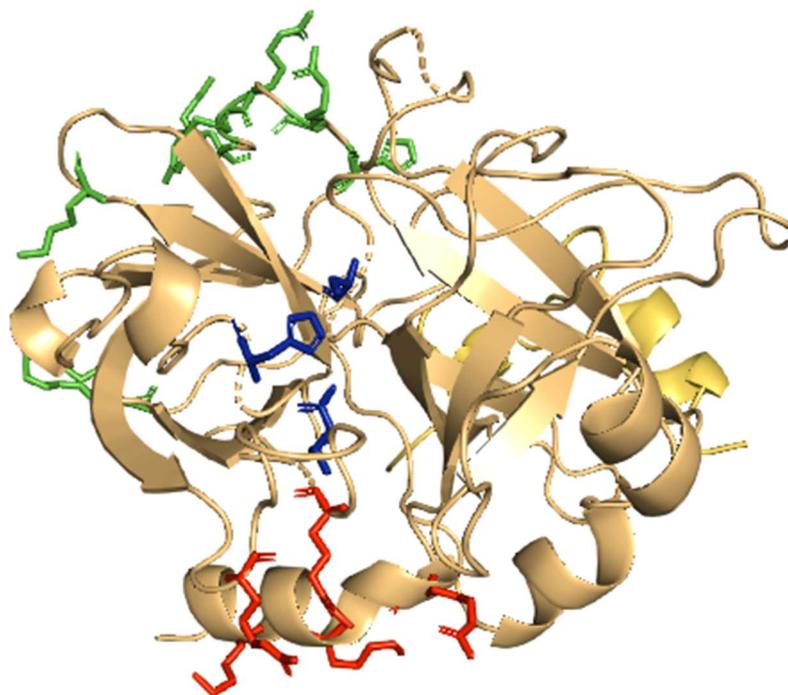


**Figura 2.** Estrutura molecular obtida por cristalografia de raios-x da Trombina. A cadeia leve está representada em amarelo e lilás, e a cadeia pesada em verde. O ligante destacado em amarelo é o inibidor direto bivalirudin (Código PDB: 3VXE).

O sítio ativo da THR hidrolisa seletivamente ligações peptídicas entre os resíduos Arginina-Glicina. Está localizado na cadeia H, na fenda entre dois domínios Beta-barril antiparalelos, nas proximidades da superfície da molécula. O sítio catalítico contém a tríade catalítica, composta pelos resíduos Ser195, resíduo responsável por definir a macromolécula como uma serino-protease, e pelos resíduos His57 e Asp102. Além do sítio catalítico, a  $\alpha$ -THR contém outros dois sítios de ligação importantes, os exossítios 1 e 2, destacados na Figura 3 (SOLOMONS e FRUHLE, 2007; KOMIVES, 2023).

O exossítio 1 é caracterizado pelos resíduos Arg73, Arg75, Arg77, His71, Lys36, Lys109, Lys110 e Tyr76. Esta é uma região de ligação a ânions, a qual interage com o fibrinogênio, podendo ser sítio de ligação de inibidores como a hirudina (YAMADA *et al.*, 2013).

O exossítio 2, localizado em região oposta ao exossítio 1 e formado pelos resíduos Arg93, Arg101, Arg233, Lys236, Lys240, representa uma importante área de interação à inibidores polianiônicos, permitindo o mecanismo de ação anticoagulante de moléculas como a heparina entre outras, como alguns glicosaminoglicanos (DI CERA, 2008; TROISI *et al.*, 2021).



**Figura 3.** Representação da estrutura cristalográfica da THR destacando-se na forma bastão os resíduos aminoácidos de seus diferentes sítios de ligação. Sítio ativo com aminoácidos destacados em azul ao centro; Exosítio 1 com aminoácidos destacados em verde na região superior; Exosítio 2 com aminoácidos destacados em vermelho na região posterior (Código PDB: 1HXF).

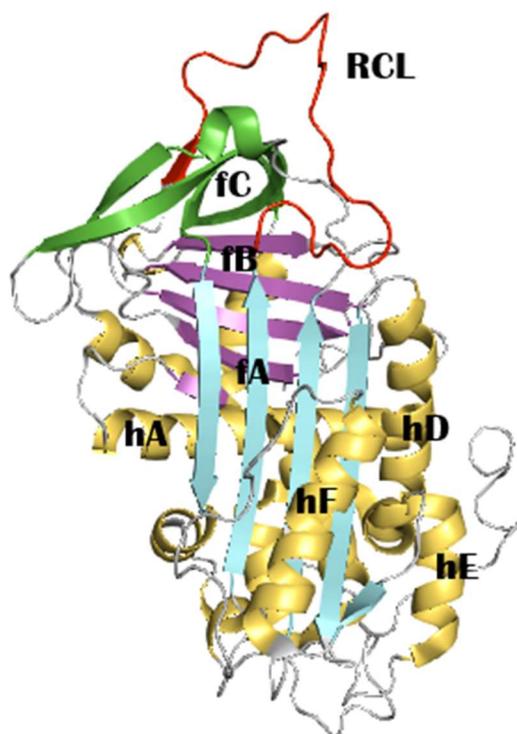
Farmacologicamente a THR pode ser inibida de formas indiretas e diretas, através das diferentes formas de ligação a seus 3 diferentes domínios. Deste modo, é possível classificar a maioria dos inibidores da THR com base nos diferentes sítios de ligação que exploram: a) Aqueles que se ligam unicamente ao sítio ativo, como o Argatroban; b) os que se ligam tanto ao sítio ativo quanto ao exosítio 1, como a hirudina e derivados; c) os que interagem com o sítio ativo e o exosítio 2, como a heparina; d) os que se conectam exclusivamente ao exosítio 1, como algumas moléculas em fase de estudo (MONTINARI e MINELLI, 2022; SMYTHE, TRUJILLO e FANIKOS, 2016; WALKER e ROYSTON, 2002). O mecanismo de ação dos inibidores diretos de THR será apresentado no tópico 1.5.2.

## 1.4 ANTITROMBINA: INIBIDOR FISIOLÓGICO DA TROMBINA

A AT é um dos principais anticoagulantes endógenos presentes no organismo, inibindo a atividade da THR e outras serino-proteases da cascata de coagulação, principalmente os fatores FIXa, FXa, FXIa e FXIIa. O endotélio produz uma variedade

de glicosaminoglicanos (GAG), que atuam como ligantes de alta afinidade para a AT, cruciais para a rápida ativação e incremento da ação anticoagulante desta enzima no organismo (FERREIRA *et al.*, 2010; HSU e MOOSAVI, 2021). A Figura 4 apresenta um modelo da estrutura tridimensional da proteína AT.

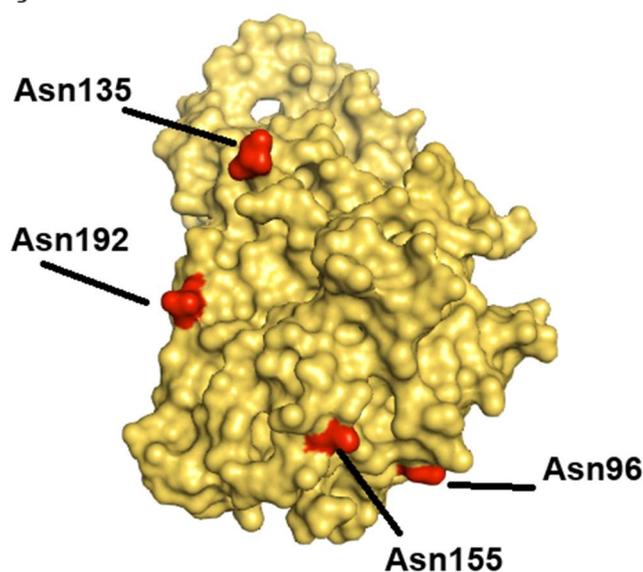
A AT é classificada como uma glicoproteína da família das Serpinas, abreviação de *serine protease inhibitors*, ou seja, da família das proteínas inibidoras de serino proteases. As serpinas são proteínas de médio tamanho (cerca de 400 aminoácidos) e em grande maioria controladoras de cascatas proteolíticas, como a cascata de coagulação. É caracterizada por apresentar nove alfa hélices, 3 folhas- $\beta$ , chamadas de A, B e C, além do sítio ativo composto por um loop central reativo (RCL) exposto na superfície do ligante (Figura 4) (REZAIIE e GIRI 2020; GETTINS, 2002; HUNTINGTON, READ e CARRELL, 2000).



**Figura 4.** Modelo tridimensional da estrutura proteica da AT. Folhas- $\beta$  **fA**, **fB** e **fC** representadas em azul, lilás e verde, respectivamente. As oito  $\alpha$ -hélices estão designadas de **hA** a **hH**, em amarelo. O loop central reativo (**RCL**) é destacado em vermelho na parte superior da AT (imagem gerada pelo Pymol através do modelo PDB id: 3VXE).

Constituída por uma única cadeia polipeptídica, a AT apresenta 15% de carboidratos e 4 isoformas conforme as diferentes composições possíveis de sua porção sacarídea, sendo as formas  $\alpha$ - e  $\beta$ -AT as mais abundantes. A forma alfa apresenta-se glicosilada em todas as 4 posições possíveis (Asn96, Asn135, Asn155 e Asn192), enquanto a forma beta-glicosilada, mais ativa, possui uma glicosilação a menos, na Asn135 (Figura 5). A  $\beta$ -AT apresenta maior importância fisiológica, por ser o inibidor majoritário da THR e outras moléculas da cascata de coagulação, além de possuir maior afinidade pela molécula de heparina e compostos derivados, GAGs entre outros polissacarídeos (SCHLÖMMER, BRANDTNER e BACHLER, 2022).

### Sítios de glicosilação na Antitrombina

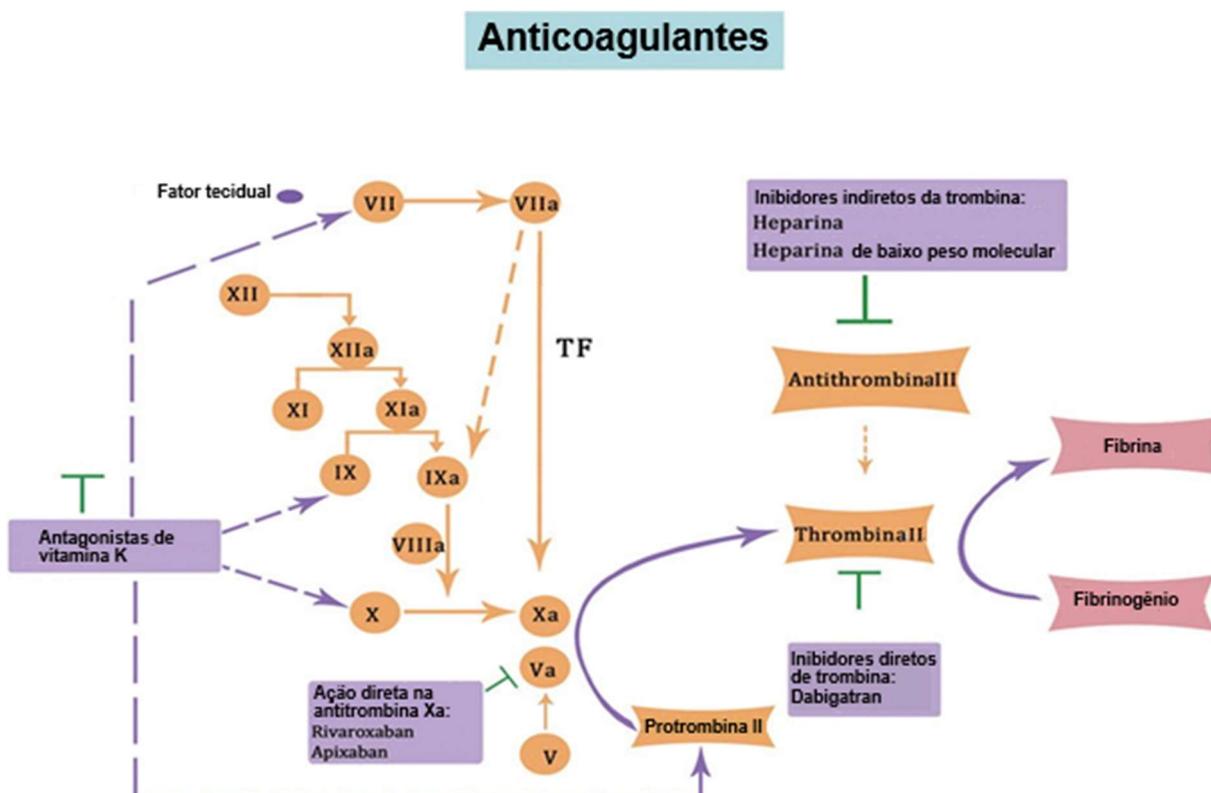


**Figura 5.** Representação dos resíduos passíveis de glicosilação na antitrombina. Resíduos Asn96, Asn155, Asn135, Asn192 representados em vermelho. Imagem gerada pelo Pymol através do modelo PDB id: 3VXE.

## 1.5 FÁRMACOS ANTICOAGULANTES

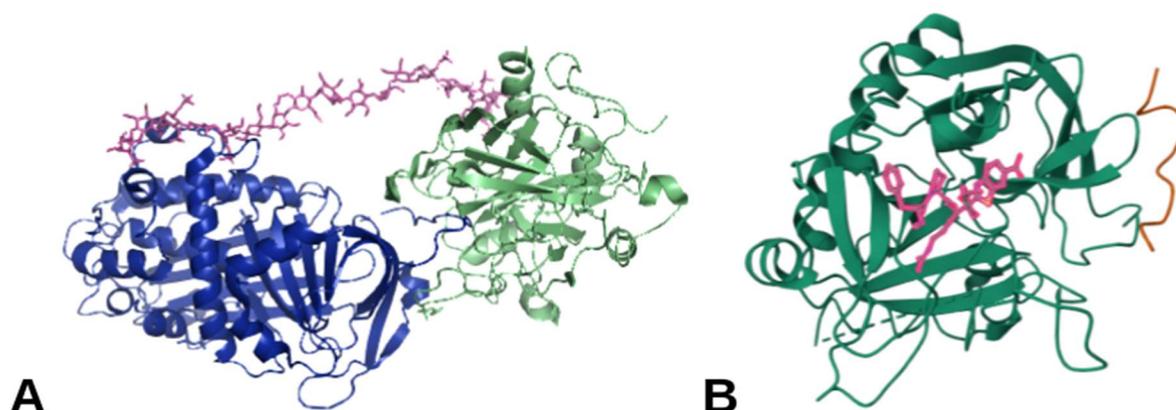
As doenças relacionadas às desordens do sistema cardiovascular são uma das maiores causas de morte e custos de saúde a nível mundial (POMIN, 2014; RASKOB *et al.*, 2014). Devido a isto, para o tratamento das condições agudas e profilaxia destas desordens, há um grande uso na clínica de fármacos anticoagulantes como as heparinas e seus derivados (SOBREIRA *et al.*, 2024).

Além de permitir o tratamento de várias condições fisiológicas e doenças, a classe dos medicamentos anticoagulantes possibilitou avanços significativos na medicina. Diversos procedimentos cirúrgicos, transplantes e tecnologias como a circulação extracorpórea, somente são possíveis com a aplicação segura de anticoagulantes (BORGOMONI *et al.*, 2020). Diversos são os possíveis mecanismos de ação dessa classe farmacológica, conforme demonstrado na Figura 6.



**Figura 6.** Representação esquemática das etapas onde os fármacos anticoagulantes exercem as atividades farmacológicas (Adaptado de LIN *et al.*, 2024).

O mecanismo de ação de grande parte dos fármacos anticoagulantes ocorre por meio da modulação da atividade inibitória sobre a THR, enzima essencial para a coagulação sanguínea humana. Esta ação farmacológica pode ser exercida por meio de mecanismos diretos, com atividade inibitória diretamente sobre a estrutura da THR, ou indiretos, atuando na ampliação da ação de moléculas anticoagulantes endógenas, como a AT (Figura 7) (HIRSH e WARKENTIN, 2023).

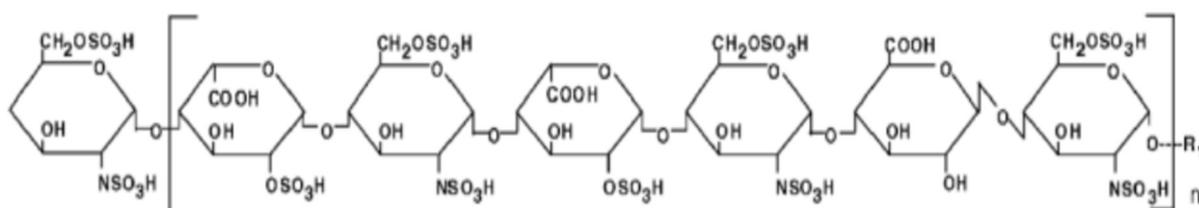


**Figura 7.** Mecanismos de modulação farmacológica da THR, representada em verde, por ligantes anticoagulantes, representados em magenta: **(A)** Mecanismo de inibição indireta da THR pela molécula da heparina, ampliando a ação da AT, representada em azul; **(B)** Mecanismo de inibição direta pela ação da molécula de hirudina sobre a THR. Representação dos modelos moleculares gerada utilizando o programa Pymol.

### 1.5.1 ANTICOAGULANTES INIBIDORES INDIRETOS DA TROMBINA

O mecanismo de ação predominante da classe de fármacos anticoagulantes inibidores de THR é alcançado por meio da potencialização de ação da AT, como exemplificado pelas heparinas, o protótipo dessa classe de fármacos (Figura 7A). O papel central desempenhado pela THR nos processos de coagulação sanguínea a torna um alvo terapêutico significativo para o desenvolvimento de novos anticoagulantes (VASCONCELOS *et al.*, 2018).

A AT é alvo de fármacos anticoagulantes, visto que ampliam sua ação perante a THR. Dentre os fármacos anticoagulantes, destaca-se a heparina, anticoagulante de estrutura polissacarídica utilizada na clínica há mais de 50 anos (Figura 8) (ODUAH, LINHARDT e SHARFSTEIN, 2016)



**Figura 8.** Representação da estrutura química da molécula de heparina.

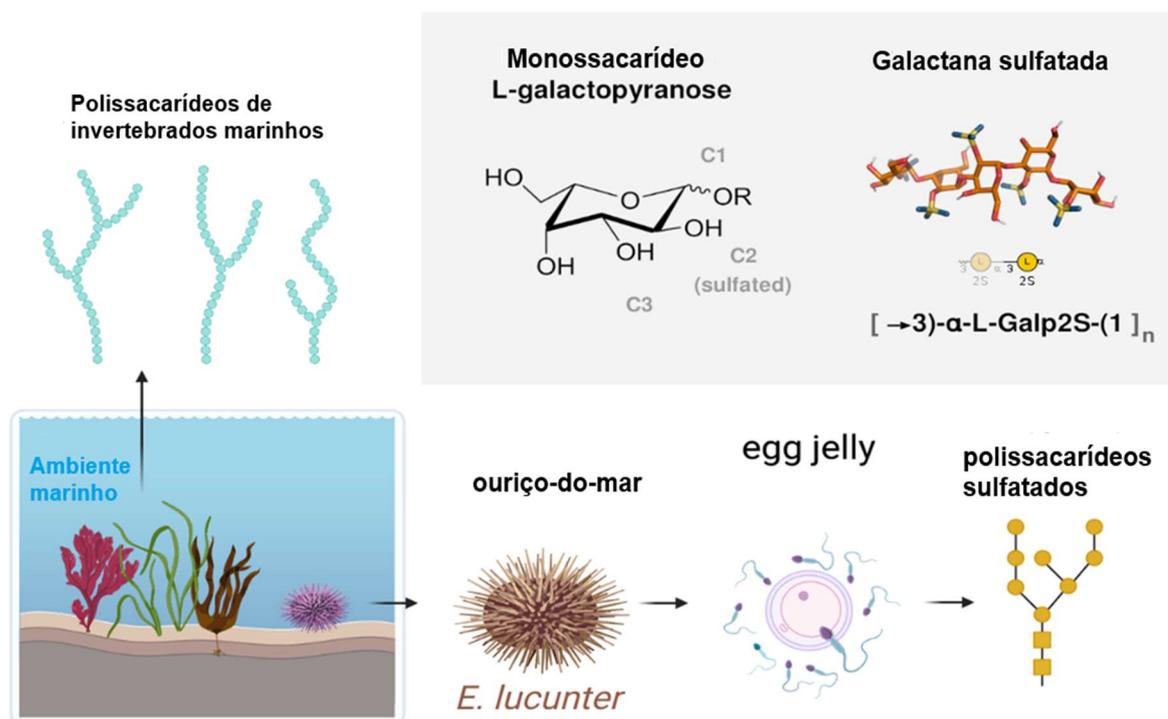
A atividade enzimática anticoagulante da AT pode ser ampliada farmacologicamente de diferentes formas, sendo a principal por meio da formação de um complexo ternário entre o ligante anticoagulante, a AT e a THR, conforme representado na Figura 7A, onde o ligante polissacarídeo se liga através do mecanismo de ponte entre a trombina e a antitrombina (JIN e GOPINATH, 2016). Esta potencialização da atividade anticoagulante pelo ligante ocorre em função da interação intermolecular entre as duas proteínas, acarretada principalmente pelas interações iônicas entre os grupos sulfato da heparina ou polissacarídeo, e resíduos de aminoácidos com carga positiva presentes na AT e na THR, em especial a Arg129 e Lys125 da hélice D da AT (VERLI e GUIMARÃES, 2005; HOFFBRAND, 2013).

Outro mecanismo é o chamado de ajuste induzido, no qual um ligante induz mudanças conformacionais na AT para a interação via Fator Xa. O resultado dessa mudança na conformação é a exposição da alça reativa, aumentando a reatividade perante a protease alvo molecular (HOFFBRAND, 2013). Este mecanismo é dependente do tamanho da cadeia polissacarídica e da afinidade entre a cadeia polissacarídica e a AT. A afinidade intermolecular deriva dos tipos e padrões de sulfatação dos resíduos que compõem a cadeia polissacarídica (LEME e SGUIZZATTO, 2012).

Estudos anteriores com moléculas advindas da fauna e flora marinhas mostraram que o composto galactana 2-sulfatada, derivada de uma espécie de equinodermo da fauna brasileira, possui propriedades anticoagulantes semelhantes à heparina. A molécula, extraída da espécie de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, representada na Figura 9, apresentou a atividade biológica mais adequada com melhor perfil anticoagulante em comparação com a heparina de mesmo peso molecular (VASCONCELOS *et al.*, 2018; QUEIROZ *et al.*, 2016).

As características de sulfatação e sequência repetitiva de unidades monossacarídicas da molécula foram bases para estudos de relação estrutura-atividade entre diferentes compostos anticoagulantes (POMIN e MOURÃO, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2018).

### Galactana sulfatada derivada de ouriço-do-mar

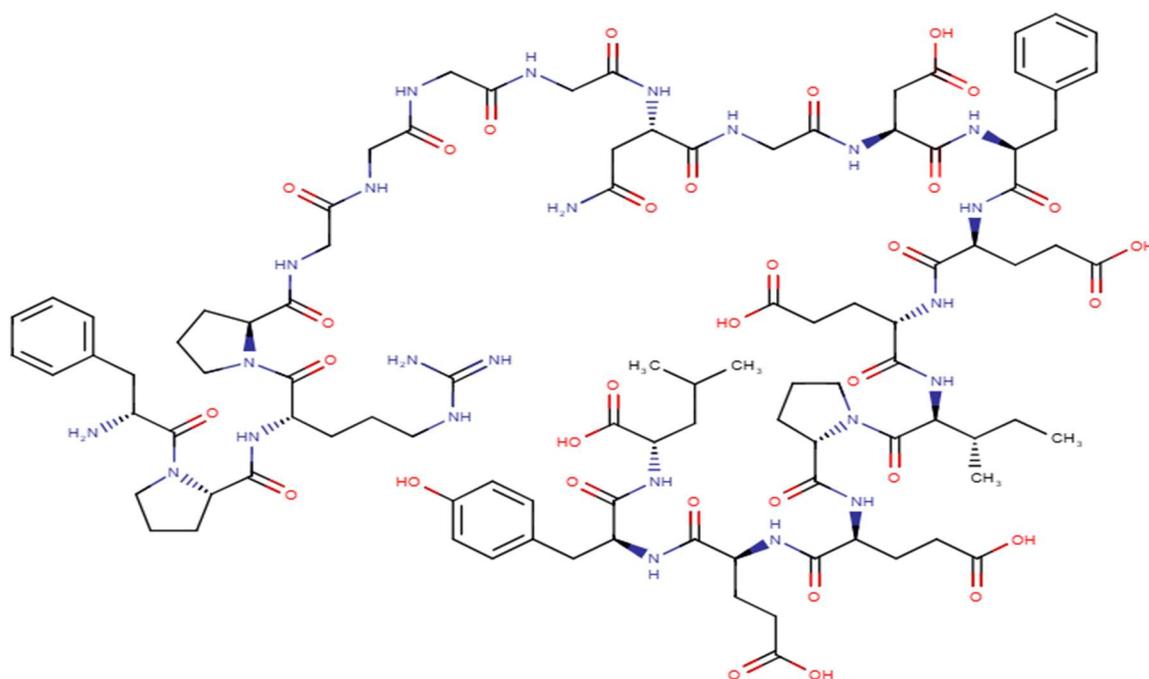


**Figura 9.** Representação da molécula polissacarídica anticoagulante extraída da espécie de ouriço-do-mar *Echinometra Lucunter*.

### 1.5.2 ANTICOAGULANTES INIBIDORES DIRETOS DA TROMBINA

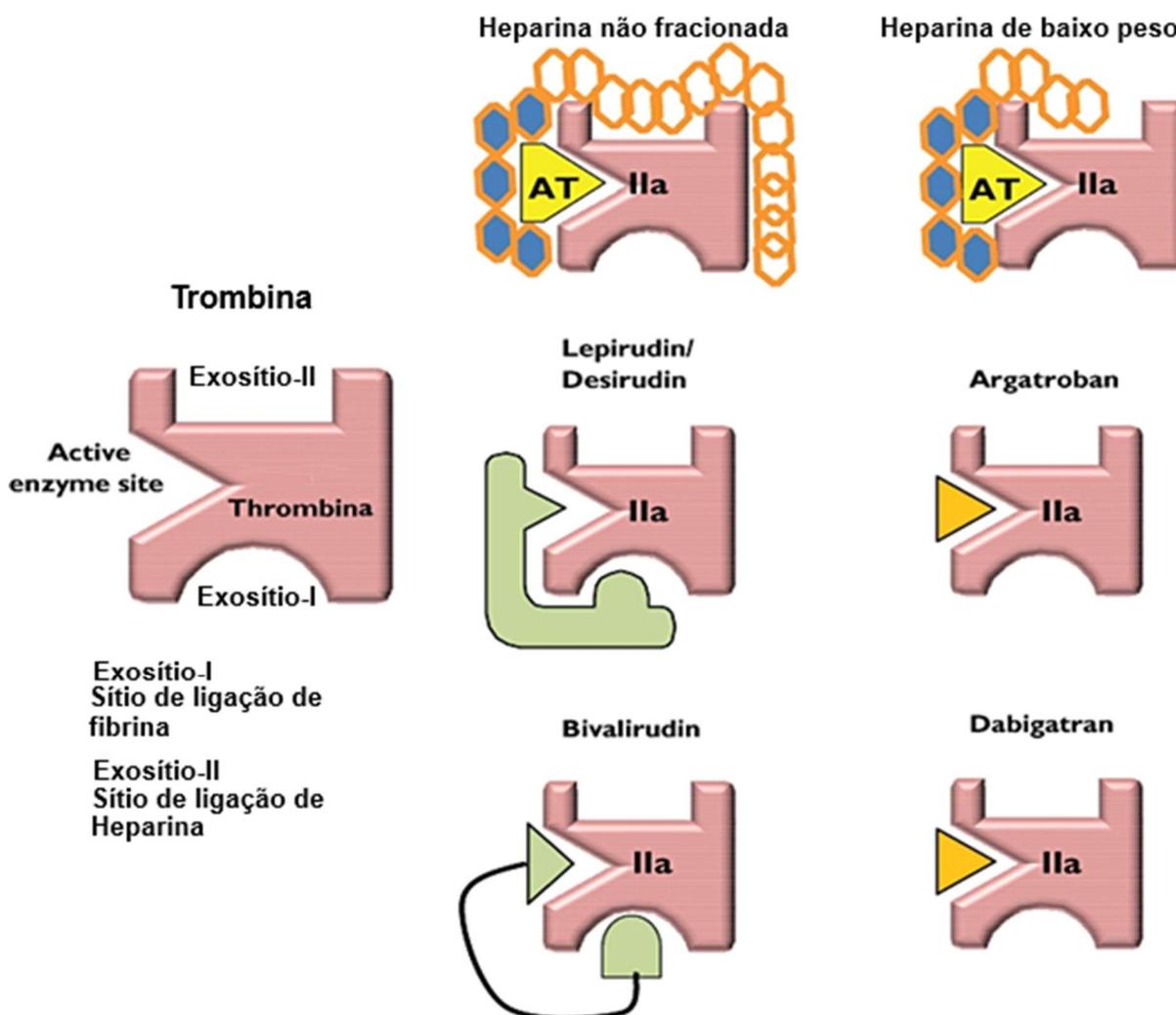
Diferentes anticoagulantes foram desenvolvidos após a completa elucidação estrutural da THR, impulsionando estudos baseados em sua estrutura, como os novos anticoagulantes inibidores diretos da THR (DTI). Esses fármacos atuam inibindo a THR por meio de ligação direta a essa enzima, em contraste com a heparina, cujo efeito anticoagulante é exercido principalmente por meio da AT (DINISIO, MIDDELDORP e BULLER, 2005; FLATO *et al.*, 2018; BRANDÃO, 2018).

Os DTI podem ser subdivididos em duas subclasses distintas conforme o mecanismo de ação sobre as diferentes regiões da THR: 1) compostos que agem por ligação ao sítio ativo e ao exossítio da THR, chamados de moléculas bivalentes; 2) compostos que têm ação ao se ligar somente ao sítio ativo da enzima. Os compostos que se ligam de forma bivalente à THR, ocupando tanto o centro ativo quanto o exossítio são exemplificados pela hirudina e bivalirudina, peptídeo sintético mimético da hirudina com vinte aminoácidos em sua estrutura, representada pela Figura 10.



**Figura 10.** Esquema bidimensional da molécula do fármaco bivalirudin (Adaptado de drugbank.com - DrugBank ID: DB00006).

Como moléculas que se fixam unicamente ao sítio ativo da THR, temos os princípios ativos dos seguintes fármacos: Ximelagatran (retirado do mercado), Argatroban (administrado por via venosa) e Dabigatran (único formulado para administração oral) (VASCONCELOS *et al.*, 2018). A hirudina, bivalirudina e argatroban são indicados para administração parenteral, sendo aprovados para uma variedade de condições clínicas, como a prevenção de AVC em pacientes com fibrilação atrial (LEE e ANSELL, 2011). O mecanismo de ação destas diferentes moléculas está representado, de forma esquemática, pela Figura 11.



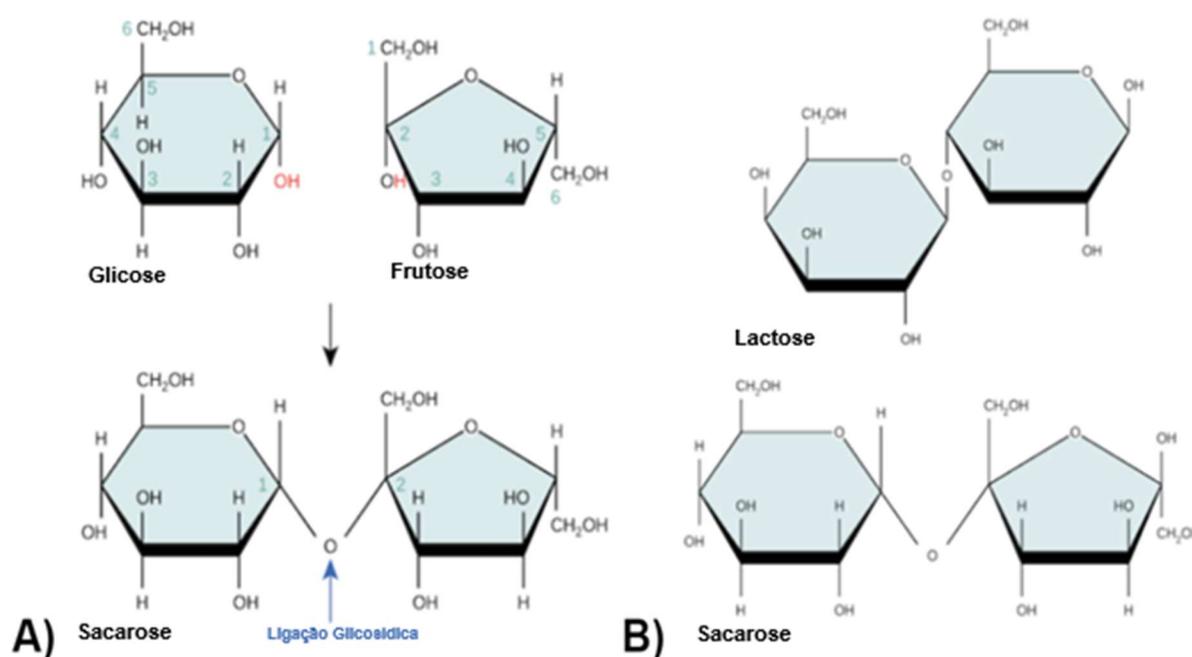
**Figura 11.** Representação esquemática dos diferentes mecanismos anticoagulantes sobre a THR, representada em magenta. Antitrombina representada em amarelo e, heparina representada em azul e laranja. Moléculas que interagem com o sítio ativo e exosítio-1 ao mesmo tempo, representadas em verde, e moléculas que interagem somente com o sítio ativo, em laranja. (Adaptado de LEE e ANSELL, 2011).

## 1.6 ESTRUTURA QUÍMICA E FLEXIBILIDADE DOS CARBOIDRATOS

Formados por unidades de carboidratos conectadas por ligações glicosídicas, os polissacarídeos são as estruturas orgânicas mais abundantes na natureza (POMIN, 2014). A variação estrutural e as possibilidades de conformações tridimensionais dos carboidratos são vastas (VARKI *et al.*, 2018). Também chamados de glicídios ou hidratos de carbono, essa classe de macromoléculas apresenta funções químicas de poliálcool-aldeído ou poliálcool-cetona. Os carboidratos simples, ou

monossacarídeos, são compostos por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo representados pela fórmula geral  $C_nH_{2n}O_n$  (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

A nomenclatura dos monossacarídeos é dada pelo valor de  $n$  na fórmula geral, sendo:  $n=3$ , trioses;  $n=4$ , tetroses;  $5n=5$ , pentoses;  $6n=6$ , hexoses; e  $7n=7$ , heptoses. As hexoses, como glicose, fucose e galactose, são as mais abundantes na natureza, as quais se apresentam em solução na sua forma cíclica, conforme a maioria dos carboidratos de cinco ou mais carbonos (IUPAC, 1996). Os monossacarídeos e dissacarídeos são as unidades formadoras dos polissacarídeos, através de ligações glicosídicas (Figura 12).

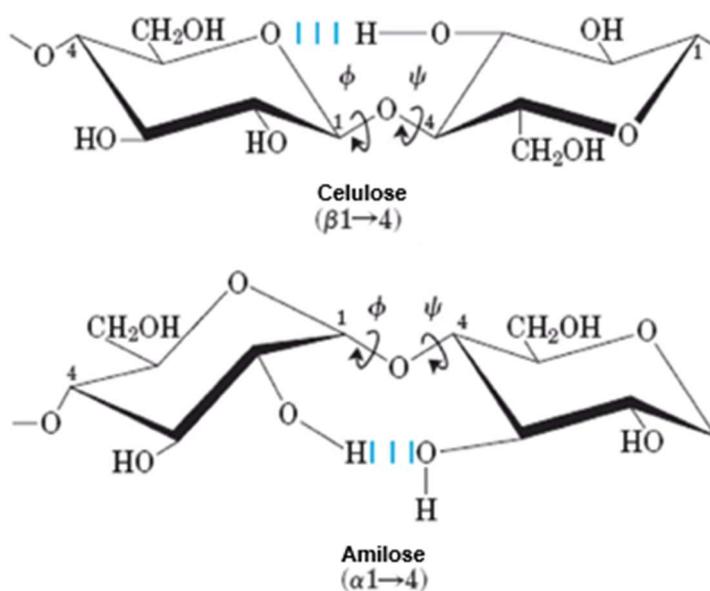


**Figura 12.** Representação esquemática de estruturas químicas de carboidratos e ligações glicosídicas. **(A)** formação da molécula do dissacarídeo sacarose pela ligação dos monossacarídeos glicose e frutose. **(B)** Dois tipos de ligação glicosídica Alfa, na formação da sacarose, e Beta, para a formação da lactose (Adaptado de CLARK, DOUGLAS e CHOI, 2018).

A composição e a sequência de ligação dos monossacarídeos, a massa molecular, a configuração D ou L de cada resíduo, a presença de anéis furano e pirano, a forma alfa ou beta anomérica da ligação glicosídica, além da presença e proporção de ácido urônico são aspectos cruciais que determinam a estrutura dos polissacarídeos. Além disso, os grupos hidroxila dos resíduos podem sofrer diversas modificações, como sulfatação, acetilação e metilação, aumentando ainda mais a complexidade e a diversidade funcional desses importantes biopolímeros. A vasta

gama de conformações possíveis dos carboidratos resulta na diversidade de propriedades físicas e químicas dos polissacarídeos (NELSON e COX, 2017).

A elevada flexibilidade das cadeias polissacarídicas é determinada, em grande parte, pela propriedade de torção dos ângulos  $\phi$  (phi) e  $\psi$  (psi) em torno das ligações glicosídicas. Esses ângulos de torção permitem a rotação ao redor das ligações, conferindo aos polissacarídeos uma grande variedade de conformações tridimensionais (Figura 13).



**Figura 13.** Representação dos ângulos de torção entre dois monossacarídeos em ligação glicosídica. (Adaptado de NELSON e COX, 2017).

## 1.7 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS E ESTUDOS *IN SILICO*

Durante a pesquisa farmacêutica, especialmente na área de Química Medicinal, é crucial compreender as interações entre os ligantes, ou substâncias bioativas, dos compostos candidatos a fármacos, e as macromoléculas alvo, ou receptores. Essas interações elucidam os mecanismos de ação farmacológica, possibilitando o planejamento racional de novos fármacos (CAVELL, SCHILLING e VASCONCELOS, 2020).

A atividade biológica dos ligantes depende das interações químicas entre suas estruturas e as das macromoléculas do organismo, sendo um paradigma fundamental da química medicinal. Para ocorrerem essas interações, é essencial haver complementaridade estrutural entre as moléculas, permitindo interações específicas

como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações iônicas e empilhamento- $\pi$  (VERLI, 2014; AMARAL *et al.*, 2017).

A identificação e desenvolvimento de novas moléculas com atividades farmacológicas representam desafios complexos e dispendiosos no vasto campo do desenvolvimento de medicamentos, convergindo a biologia e a química (LUNDBERG e HEDENMALM, 2020). Historicamente, o processo de desenvolvimento farmacológico dependia de descobertas fortuitas ou de metodologias tradicionais de tentativa e erro, frequentemente consumindo décadas e recursos consideráveis, sem garantia de sucesso (MULLARD, 2014).

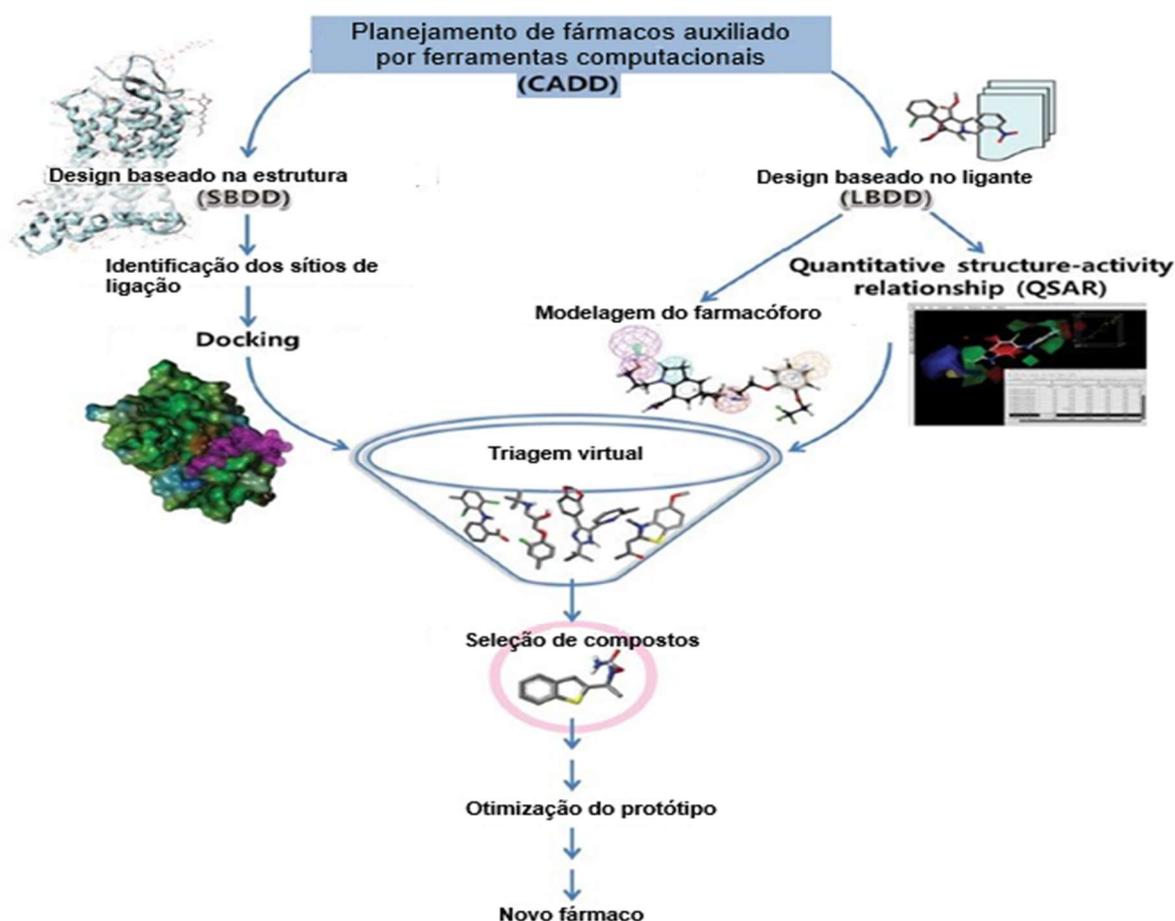
Atualmente, a pesquisa e produção de novas substâncias bioativas para a indústria farmacêutica incorporam múltiplas disciplinas científicas, utilizando diversas tecnologias inter-relacionadas. Essa abordagem multidisciplinar e interdisciplinar é evidenciada pelo emprego do conhecimento especializado em biologia, química, farmacologia e informática (DREWS, 2019).

Os avanços expressivos na capacidade e velocidade computacional, aliados ao maior acesso a equipamentos especializados, têm democratizado o uso de tecnologias computacionais em diversos campos científicos. Além disso, os progressos nas áreas de inteligência artificial e aprendizado de máquina têm impulsionado setores como o farmacêutico e a biotecnológico, acelerando descobertas e reduzindo significativamente o tempo de desenvolvimento de novos fármacos. As novas tecnologias desempenham um papel crucial ao elucidar as complexas interações entre ligantes e moléculas bioativas, como enzimas e receptores farmacológicos (COOPER, 2003; PINZI e RASTELLI, 2019). Nos últimos anos, houve ainda a democratização do acesso às ferramentas robustas de pesquisa como o AlphaFold2, apresentando um progresso sem precedentes para o processo de previsão de estruturas tridimensionais de proteínas (YANG, ZENG e ZHAO, 2023).

Nas últimas décadas, as técnicas computacionais desenvolvidas nas áreas da bioinformática, como a Modelagem Molecular, Dinâmica Molecular e Triagem Virtual, têm sido fundamentais para o entendimento das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de fármacos. Em conjunto com outras técnicas, tornaram-se ferramentas essenciais no estudo e planejamento de novos compostos farmacêuticos (ALVES *et al.*, 2018).

No final do século XX, houve uma transformação significativa com a introdução do Design de Fármacos Assistido por Computador (CADD), que combina as

complexidades dos sistemas biológicos com a capacidade preditiva de algoritmos computacionais e o desenvolvimento contínuo de bancos de dados químicos e biológicos (WERMUTH, 2003; NIAZI e MARIAM, 2024). O CADD pode ser categorizado em duas abordagens principais, os métodos baseados na estrutura (*Structure Based Drug Design* - SBDD) e métodos baseados em ligantes (*Ligand Based Drug Design* - LBDD) (Figura 14). Os métodos SBDD calculam as energias de ligação dos compostos com base na estrutura tridimensional da proteína alvo. São preferencialmente utilizados quando há dados estruturais da proteína alvo obtidos por técnicas como cristalografia de raios-X ou espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Esses métodos visam projetar compostos que se liguem fortemente ao alvo, reduzindo a energia livre de ligação e garantindo alta especificidade (DE VIVO *et al.*, 2016).



**Figura 14.** Diferentes abordagens de planejamento de fármacos auxiliados por ferramentas computacionais. Design baseados no ligante LBDD e na estrutura SBDD (Adaptado de PRAJAPAT, GUPTA e TALESARA, 2017).

Em contrapartida, os métodos baseados nos ligantes utilizam informações derivadas de estruturas de ligantes ativos e inativos, empregando modelos preditivos de Relação Estrutura-Atividade Quantitativa (*Quantitative Structure-Activity Relationship* - QSAR) ou estudos de similaridade química entre moléculas. Tais metodologias são preferidas quando há escassez de dados estruturais sobre o alvo terapêutico (WERMUTH, 2003).

Na ausência de dados experimentais suficientes para o prosseguimento da abordagem pela estrutura, como falhas no processo de cristalografia, pode-se recorrer a modelos comparativos para prever a estrutura tridimensional da molécula alvo por meio de abordagens computacionais. Na chamada modelagem molecular por homologia, a estrutura alvo é inferida a partir de proteínas evolutivamente relacionadas, permitindo a previsão da estrutura da proteína alvo com base na conservação estrutural observada entre proteínas similares (CHERKASOV *et al.*, 2014).

A partir de um grupo de compostos moleculares previamente selecionados durante a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos, as moléculas ligantes líderes podem ser escolhidas e otimizadas. O objetivo é interagir com o sítio de ligação da macromolécula proteica receptora (alvo terapêutico), visando obter uma afinidade intermolecular superior à apresentada pelo ligante endógeno ou substrato. Esta é uma das principais razões para a aplicação das técnicas de CADD (PAGADALA, SYED e TUSZYNSKI, 2017).

O CADD está reduzindo o tempo de pesquisa e os custos associados na busca por novos compostos com atividades farmacológicas, fornecendo dados estruturais dos candidatos a fármacos e estabelecendo relações quantitativas e qualitativas de estrutura-atividade. Esta abordagem utiliza métodos de modelagem molecular para obter informações detalhadas em nível atômico e molecular das estruturas tridimensionais moleculares (SLIWOSKI *et al.*, 2014),

O desenvolvimento contínuo da tecnologia computacional, especialmente na bioinformática e na modelagem molecular, tem ampliado o acesso a métodos anteriormente restritos a pequenos grupos de pesquisa, facilitando o planejamento de compostos bioativos com auxílio computacional (WERMUTH, 2003).

### 1.7.1 MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular tem desempenhado um papel importante na compreensão estrutural de compostos químicos, sendo atualmente, com suas diversas abordagens, uma ferramenta crucial na pesquisa, descoberta e aprimoramento de substâncias candidatas a fármacos. A modelagem molecular, segundo a IUPAC, pode ser definida como o estudo que, com o uso da química computacional e técnicas de computação gráfica, busca uma representação em três dimensões das estruturas e suas propriedades moleculares sob certos conjuntos de circunstâncias pré-definidas (SANT'ANNA, 1997; SANT'ANNA, 2009).

### 1.7.2 MODELAGEM COMPARATIVA

A modelagem comparativa é essencial para superar as limitações das estruturas obtidas por métodos experimentais, como a cristalografia de raios-X e a ressonância magnética nuclear (RMN). Essa técnica permite prever a estrutura tridimensional de uma proteína com base na sua similaridade com proteínas de estruturas conhecidas, chamadas templates, refinando modelos para aumentar a confiabilidade em aplicações computacionais e bioinformáticas (DJINOVIC-CARUGO e CARUGO, 2015).

O acesso facilitado a bancos de dados como o UniProt tem enriquecido a disponibilidade de sequências primárias de proteínas, promovendo o uso direto dessas informações na modelagem comparativa à medida que mais estruturas de proteínas são elucidadas experimentalmente por técnicas como a cristalografia de raios-X e a RMN (BAKER e SALI, 2001; LESK, 2014; KRYSHTAFOVYCH, 2023).

Apesar da eficiência da cristalografia de raios-X na determinação estrutural molecular experimental, essa técnica está limitada às moléculas na fase cristalina, não refletindo necessariamente as conformações estruturais encontradas na biofase, onde as moléculas estão em solução. No entanto, a conformação de um alvo molecular obtida por cristalografia de raios-X é frequentemente utilizada em abordagens como o *docking* molecular para explorar interações moleculares na formação de complexos (MARTIEL e DE LA CRUZ, 2020).

### 1.7.3 DOCKING MOLECULAR

O *Docking* Molecular é uma ferramenta de modelagem molecular que surgiu da necessidade de se prever e modelar a maneira como as moléculas se ligam aos sítios ativos biológicos. Também chamada de ancoragem molecular, esta abordagem permite a predição das melhores posições e orientações, entre moléculas alvo e ligantes, além de fornecer informações sobre suas interações. Como ferramenta, é empregada nas ciências farmacêuticas pela possibilidade e eficiência em predizer a melhor e mais provável interação entre ligantes candidatos a novos fármacos e as moléculas receptoras, em sua maior parte proteínas. Ela tem o objetivo de encontrar o ajuste mais adequado ao sítio de ligação demonstrando a conformação mais adequada entre eles (PINZI e RASTELLI, 2019).

No *Docking* se busca a conformação energeticamente mais estável do ligante em sua ligação ao receptor, na maioria das vezes uma proteína alvo. Utiliza-se da hipótese que as menores energias de ligação representam as melhores e mais prováveis ligações entre proteína e ligante. Portanto, pode ser compreendido como um problema de otimização com a tarefa de encontrar a solução traduzida como posição, de menor energia (MORRIS e LIM-WILBY, 2008).

Os programas de *Docking* executam algoritmos de busca em que são avaliadas as diversas possíveis conformações do ligante de forma repetitiva e exaustiva, até a obtenção da energia mínima. Então, uma função de pontuação de energia de afinidade, *score function*,  $\Delta G$ , em Kcal/mol é empregada, classificando cada conformação candidata, como soma do total das energias que são aplicadas, como as de van der Waals e eletrostática (PAGADALA, SYED e TUSZYNSKI, 2017; LI, FU e ZHANG, 2019).

O problema computacional do *Docking* molecular se torna um desafio maior quando são consideradas a liberdade de flexibilidade, tanto do ligante quanto do alvo molecular, durante a busca conformacional. Além da necessidade de algoritmos específicos que lidam com essas questões, a complexidade do problema e necessidade de força computacional aumentam proporcionalmente com o aumento dos ângulos de torção possíveis (THOMSEN e CHRISTENSEN, 2006).

Podem ser empregadas diferentes estratégias para se lidar com a questão da flexibilidade de proteínas e ligantes:

- (1) Considera-se a proteína rígida e somente os graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional do ligante são explorados;
- (2) Considera-se a proteína rígida e todos os graus de liberdade do ligante são explorados;
- (3) Considera-se a proteína total ou parcialmente flexível e são explorados todos os graus de liberdade do ligante.

A maioria dos algoritmos em softwares de *docking* tratam a proteína receptora como uma estrutura rígida, enquanto consideram o ligante flexível. Mesmo permitindo a rotação das ligações do ligante, os comprimentos e ângulos de ligação são mantidos constantes. De acordo com o sistema de busca, os algoritmos podem ser classificados como sistemáticos, determinísticos e estocásticos, e frequentemente utilizam uma combinação dessas abordagens (FELTES *et al.*, 2014).

Os métodos sistemáticos realizam uma busca exaustiva em todos os graus de liberdade utilizando restrições iniciais, como geométricas ou químicas. O aumento no número de ângulos de torção do ligante aumenta significativamente a complexidade do problema de otimização, exigindo alta capacidade computacional. Por outro lado, os métodos estocásticos alteram aleatoriamente os graus de liberdade do ligante em cada etapa, gerando uma grande variedade de soluções. As poses são então avaliadas segundo um critério probabilístico para a seleção ou rejeição da conformação gerada. Por exemplo, o algoritmo Monte Carlo adota essa abordagem, realizando minimizações de energia a cada alteração aleatória e seleção de conformação. A principal desvantagem dos métodos estocásticos é que não garantem a convergência para a solução ótima, necessitando de execuções repetidas

Nos métodos determinísticos, as modificações são baseadas no estado atual do sistema, guiando-o para o próximo estado. O resultado depende da estrutura inicial, de modo que, com as mesmas configurações e parâmetros iniciais, o resultado será reproduzível. Exemplos dessa abordagem incluem minimização de energia e dinâmica molecular. Embora ofereçam vantagens como a exploração de todos os graus de liberdade do ligante e da proteína alvo, além da possibilidade de usar solventes específicos, desvantagens como a propensão a ficar preso em mínimos locais e a alta demanda computacional são notáveis. Devido a essas características, essa abordagem é frequentemente usada em combinação com outras para melhorar as previsões, como na minimização de energia em métodos estocásticos (GUEDES, PEREIRA e DARDENNE, 2014).

Existem atualmente diversos programas para as análises por *docking* molecular. Diversos são os pacotes de softwares que consistem nos algoritmos de preparação, execução das análises e interface gráficas para a visualização. Entre os programas de *docking* molecular estão AutoDock (MORRIS *et al.*, 1998), AutoDock Vina (TROTT e OLSON, 2009), DockThor (DE MAGALHÃES, BARBOSA e DARDENNE, 2004), FlexX (TORRES *et al.*, 2019) e Molegro Virtual Docker (MVD) (THOMSEN e CHRISTENSEN, 2006).

#### 1.7.4 REDOCKING MOLECULAR

A avaliação da performance de programas utilizados nas análises de *docking*, bem como a validação da metodologia empregada, é possível pela comparação com estruturas cristalinas obtidas por cristalografia de raios-x ou RMN. Para tanto são selecionados modelos experimentais contendo o mesmo ligante complexado na estrutura molecular analisada, possibilitando a comparação entre o modelo gerado e a estrutura obtida experimentalmente. A partir das duas estruturas é possível a comparação das poses de menor energia de ligação dos modelos gerados pelo *docking* e a estrutura cristalográfica (FLACHSENBERG *et al.*, 2024).

Essa comparação, chamada de *redocking*, é feita utilizando o desvio quadrático médio (RMSD), das duas estruturas sobrepostas. O *redocking* permite determinar a robustez dos programas e funções de pontuação específicas utilizadas em encontrar a posição que mais se assemelha a da estrutura determinada experimentalmente, validando-se então o método (LAFIFI *et al.*, 2024.; BASTOS e FIORINI, 2023). Geralmente para a comparação de estruturas por *redocking*, se utiliza a métrica de RMSD com valores inferiores a 2 Å.

As moléculas polissacarídicas apresentam múltiplas conformações energeticamente favoráveis, tornando incomum atingir um RMSD inferior a 2 Å, valor frequentemente esperado para a comparação de moléculas pequenas e rígidas. Portanto, um RMSD superior a 2 Å não indica necessariamente falha no *redocking* de carboidratos, mas sim variações conformacionais naturais que não afetam a eficácia da interação molecular (CAZALS e TETLEY, 2019).

#### 1.7.4 TRIAGEM VIRTUAL

A Triagem Virtual ou *Virtual Screening* (VS) é uma das técnicas mais comumente utilizadas atualmente no CADD. O VS ocupa a partir das últimas décadas um papel importante na pesquisa de novas moléculas biologicamente ativas durante o desenvolvimento farmacêutico. Esta abordagem permite que os grupos de pesquisa concentrem recursos em compostos que tenham maior probabilidade de possuírem alguma atividade de interesse (JORGENSEN, 2009; SLIWOSKI *et al.*, 2014).

O VS se utiliza de bibliotecas previamente selecionadas com milhares, ou até milhões de moléculas, tendo o objetivo de identificar os compostos com maior probabilidade de se ligarem aos alvos moleculares selecionados ou ligantes com as mesmas características de moléculas conhecidas (GRYNIUKOVA *et al.*, 2024).

Os alvos moleculares são geralmente relacionados com alguma patologia, como enzimas de vias metabólicas. A partir de um ligante com atividade conhecida sobre o alvo, é possível mapear as interações ligante-receptor através de outras ferramentas, como o *docking* e a dinâmica molecular (RODRIGUES *et al.*, 2012). O VS pode ser conduzida através de duas abordagens possíveis, a triagem virtual baseada no ligante, e a baseada na estrutura do receptor (OLIVEIRA *et al.*, 2023).

A LBVS compreende a busca por estruturas com similaridade a ligantes previamente conhecidos com atividade farmacológica, a fim de serem identificados novos compostos com melhor perfil de atividade ou características selecionadas. A partir de um modelo tridimensional, a triagem é realizada com base em atributos do composto, como físico-química, topologia e estrutura, propriedades relacionadas com sua atividade biológica (PATEL *et al.*, 2021).

Na abordagem baseada no receptor, as informações acerca do reconhecimento do ligante na estrutura do receptor macromolecular são utilizadas como princípio da busca. Informações como a conformação estrutural do receptor, a afinidade de ligação ao ligante, bem como os resíduos proteicos envolvidos, composição do sítio de ligação, cargas e interações intermoleculares. Esses dados são obtidos através da modelagem tridimensional do receptor, podendo os modelos serem construídos ou selecionados através de banco de dados, e simulações como *Docking* e Dinâmica molecular (LAVECCHIA e GIOVANNI, 2013).

### 1.7.5 SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

Diversas abordagens computacionais podem ser desenvolvidas no CADD para o estudo e análise da interação entre fármacos, ou estruturas em desenvolvimento para a pesquisa farmacêutica e macromoléculas biológicas. Dentre as diversas ferramentas empregadas, a considerada essencial para simulações e compreensão das interações físicas de átomos e sistemas moleculares biológicos, é a simulação de Dinâmica Molecular (DM) (NAMBA, SILVA e DA SILVA, 2008; SILVA, NEGREIROS e SANTOS, 2022).

A DM tem sido utilizada extensivamente no auxílio e complemento do estudo de novos ligantes em alvos terapêuticos, contribuindo largamente no planejamento racional de fármacos. Esta técnica computacional se utiliza de algoritmos baseados na mecânica Newtoniana para obter, em escala atômica, os mecanismos de interação entre as estruturas moleculares e suas características dinâmicas. As simulações de DM produzem uma grande quantidade de dados ao representarem as trajetórias das posições atômicas em escalas de nano e picossegundos. Nessas trajetórias estão especificadas em função do tempo, todas as informações acerca dos movimentos atômicos e informações calculadas através da DM como comprimentos, distribuição dos ângulos e energias das ligações (COUTINHO, CAMARGO e CAMARGO, 2023).

Entretanto, esses dados também podem ser utilizados para extrair supostas mudanças no campo de forças, como um conjunto de estruturas representativas. Com o crescente aumento na capacidade computacional e quantidade de dados nas simulações geradas, se fez necessário também a introdução de ferramentas de análise poderosas para o processamento e compreensão dos processos analisados (SHAO *et al.*, 2007).

Apesar da grande capacidade computacional requerida para as simulações, devido à grande flexibilidade dos carboidratos, a dinâmica molecular de glicoderivados pode também ser explorada através de simulações de DM. Essas simulações permitem uma visão detalhada da interação entre glicanos e proteínas. Simulações, baseadas em mecânica clássica, são essenciais para a amostragem conformacional e a obtenção de conjuntos ponderados de estruturas representativas do equilíbrio tridimensional desses carboidratos. Modelos de campo de forças empíricos específicos para essa classe de macromoléculas, como GLYCAM06 e CHARMM36, são amplamente utilizados para descrever essas interações com alta precisão,

embora desafios, como o balanceamento adequado das interações com o meio aquoso e a extrema possibilidade de ângulos intermoleculares ainda existirem (FADDA, 2022).

Para a preparação e parametrização dos sistemas moleculares e seguinte execução de simulações de DM, diversos pacotes de programas com diferentes algoritmos, podem ser utilizados atualmente. Pacotes como AMBER (SALOMON-FERRER, CASE e WALKER, 2013), CHARMM-GUI e GROMACS são utilizados conforme a natureza do sistema a ser simulado (JO *et al.*, 2008).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

A dissertação tem como objetivo avaliar as interações intermoleculares de polissacarídeos anticoagulantes inibidores de THR, proporcionando novas informações para o desenvolvimento de moléculas anticoagulantes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e otimizar as estruturas tridimensionais por modelagem molecular dos carboidratos ligantes e dos receptores proteicos por modelagem comparativa, garantindo estruturas adequadas para os estudos de interação;
- Realizar e analisar a simulação de DM das estruturas proteicas geradas, avaliando a estabilidade estrutural e dinâmica para um melhor entendimento do comportamento dos receptores;
- Realizar o *docking* molecular da galactana sulfatada e da heparina com o receptor selecionado, identificando os modos de ligação e as interações intermoleculares mais relevantes;
- Realizar simulações de DM dos complexos moleculares obtidos, investigando a estabilidade e energia das interações ligante-receptor ao longo do tempo;
- Analisar os resultados e mapear os principais resíduos envolvidos nas interações intermoleculares, fornecendo informações detalhadas sobre os fatores estruturais que influenciam a afinidade e seletividade dos ligantes.

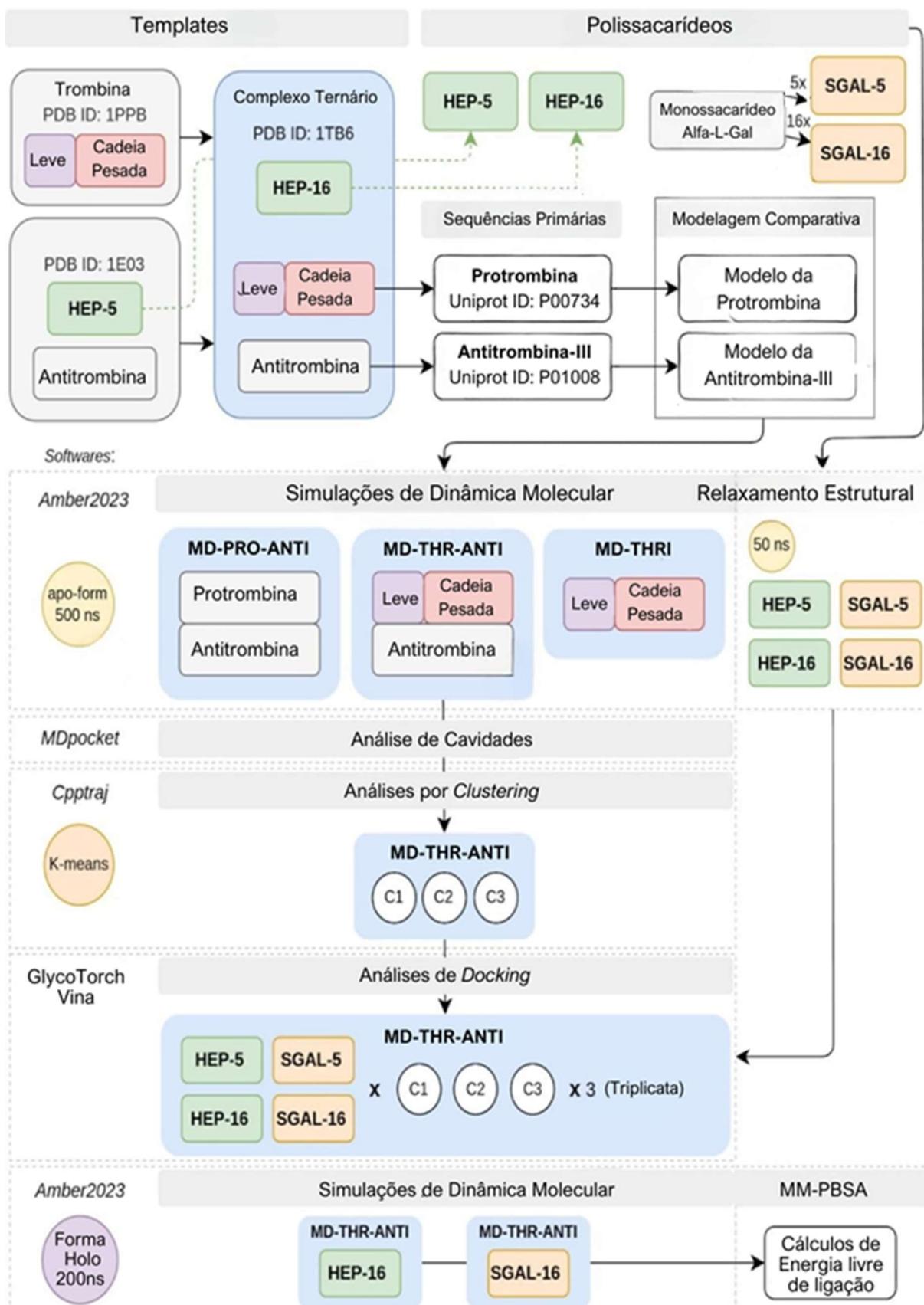
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, selecionou-se o modelo do complexo ternário (PDB ID:1TB6), contendo a heparina de 16 resíduos (HEP-16) com a conformação em ponte, ou seja, ligada à antitrombina III (AT-III) e ao exossítio-II da THR. Incluiu-se também na análise a heparina de 5 resíduos (HEP-5), retirada do modelo cristalográfico precursor da AT (PDB ID:IE03). A modelagem das moléculas da galactana sulfatada foi realizada com base no número de resíduos de heparina dos modelos em comparação, respectivamente dezesseis e cinco resíduos.

Posteriormente, realizou-se por meio de simulações de DM, em sistemas separados, o relaxamento conformacional de todas as estruturas retiradas dos modelos cristalográficos. A modelagem dos polissacarídeos se deu então com a preparação de duas moléculas de heparina (HEP-5 e HEP-16) e de duas moléculas de galactana sulfatada (SGAL-5 e SGAL-16) contendo os números de resíduos cinco e dezesseis, respectivamente.

Para as proteínas foram modelados três sistemas distintos: protrombina/AT-III (MD-PRO-AT), complexo molecular menos estudado e formado pela ligação entre a protrombina e a antitrombina, trombina/AT-III (MD-THR-AT) e trombina (MD-THR). Em seguida, as cavidades transientes foram rastreadas na DM das proteínas e somente o sistema MD-THR-AT seguiu para as etapas de *docking* molecular, a partir da análise dos três principais *clusters* conformacionais representativos. O modelo MD-PRO-AT, representa a

Foram obtidos então quatro sistemas polissacarídeo-proteína, os quais foram submetidos a simulações de DM e aos cálculos de energia livre. O fluxograma, com a representação esquemática da metodologia utilizada neste estudo, é apresentado na Figura 15.



**Figura 15.** Representação esquemática da metodologia seguida no projeto.

## 3.2. MODELAGEM COMPARATIVA DAS PROTEINAS

Como moldes para a abordagem de modelagem comparativa, foram utilizados os modelos cristalográficos selecionados da base de dados PDB (*Protein Data Bank*, <https://www.rcsb.org/>) (Figura 16). A preparação inicial dos moldes foi feita com software de visualização gráfica PyMol 2.5.0 (Schrodinger, LLC. 2010) (Figura 17).

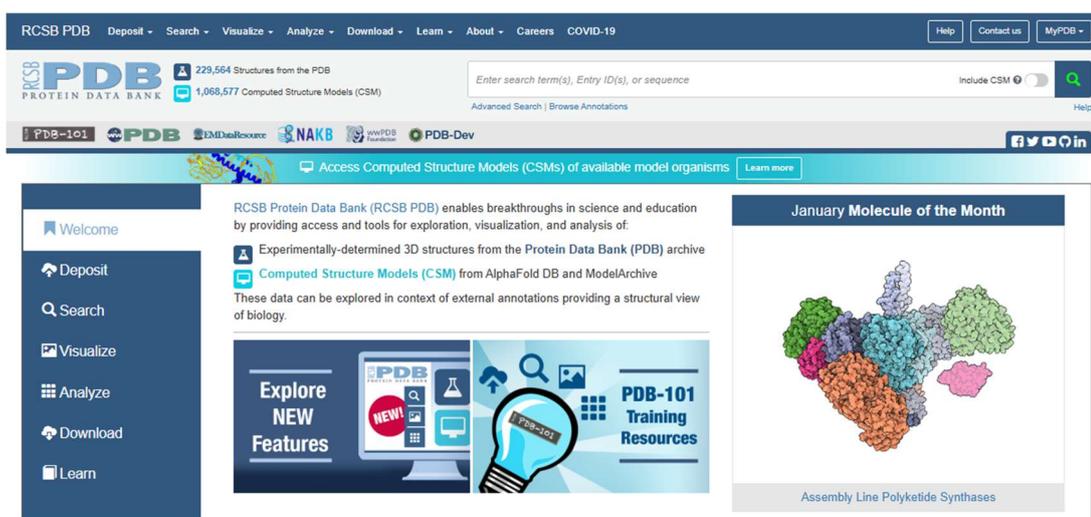


Figura 16. Representação da interface gráfica da base online de dados PDB. <https://www.rcsb.org/>.



Figura 17. Representação da interface gráfica do software PyMol.

Os seguintes modelos cristalográficos, com seus respectivos códigos ID e resoluções indicados abaixo, foram utilizados:

ID:1PPB (resolução de 1,92 Å), representando a THR, com suas subunidades, leve e pesada;

ID:1E03 (resolução de 2,9 Å), representando a AT, contendo uma única subunidade, retirando-se o ligante, a molécula do pentassacarídeo HEP-5 para as posteriores simulações.

ID:1TB6 (resolução de 2,50 Å), representando o complexo ternário AT-Heparina-THR, retirando-se a molécula polissacarídica heparina com 16 resíduos para as posteriores simulações.

Para permitir a modelagem comparativa, as sequências de aminoácidos que formam cada proteína do estudo, AT-III e THR, com respectivos códigos de identificação P01008 e P00734 foram obtidas da base *Universal Protein Resource* (UniProt) (Figura 18). As cadeias proteicas de cada proteína foram selecionadas separadamente de cada sequência primária, totalizando três cadeias. Uma sequência única para a AT e duas cadeias para a THR, leve e pesada, denominadas, L e H respectivamente.

The image shows the UniProt website interface for the protein P01008. The top navigation bar includes 'UniProt', 'BLAST', 'Align', 'Peptide search', 'ID mapping', 'SPARQL', and 'UniProtKB'. The main content area is titled 'Entry' and shows the protein's name 'AT-III' and its accession number 'P01008'. The sequence is displayed in a grid format with residue numbers 10-600. The sequence is: MAHVRGLQLP GCLALALCS LVHSQHVFLA PQQARSLQR VRRANTFLEE VRKGNLEREC VEETCSYEEA FEALESSTAT DVFWAKYTAC ETARTPRDKL AACLEGNAE GLGTNYRGHV NITRSGIECQ LWRSRYPHKP EINSTTHPGA DLQENFCRNP DSSTTGPWCY TTDPTVRRQE CSIPVCGQQQ VTVAMTPRSE GSSVNLSPPL EQCVPDRGQQ YQRLAVTTH GLPCLANASA QAKALSKHQD FNSAVQLVEN FCRNPDGDEE GWWCYVAGKP GDFGYCDLNY CEEAVEEETG DGLDEDSRA IEGRTATSEY QTFNPRTFG SGEADCGLRP LFEKSLLEK TERELLESYI DGRIVEGSDA EIGMSPWQVM LFRKSPQELL CGASLISDRW VLTAACHLLY PPWKNFTEN DLLVRIGKHS RTRYERNIEK ISMLEKIYIH PRYMNRENLD RDIALMKLKK PVAFSDYIHP VCLPDRETAA SLLQAGYKGR VTGWGNLKET WTAIVGKGQP SVLQVNLPI VERPVCCKST RIRITDNMFC AGYKPDDEGKR GDACEGDSGG PFMKSPFNN RMYQMGIVSW GEGCDRDGKY GFYTHVFRLK KWIQKVIDQF GE.

**Figura 18.** Representação da interface gráfica da base online de dados de proteínas. <https://www.uniprot.org/>

Para a geração do modelo da estrutura proteica por modelagem comparativa, foi utilizado o servidor online Robetta ([robetta.bakerlab.org](http://robetta.bakerlab.org)) (Figura 19). A interface online para submissão de dados e criação dos modelos tridimensionais, apresenta métodos precisos baseados em *deep-learning* do algoritmo trRosetta.

Robetta Project - Structure Prediction - arturmaio - Log out

Submit a job for structure prediction  
Please do not submit jobs under different user accounts. Such jobs will be removed.

**Required**

Target Name

Protein sequence

or upload FASTA  Nenhum arquivo escolhido

**Optional**

RoseTTAFold  CM  AB  Predict domains

Upload PDB template  Nenhum arquivo escolhido

or enter PDB + chain IDs  range

3 + 2 =   Keep private

**Figura 19.** Robetta. Representação da interface gráfica online do módulo *Structure Prediction* do servidor. <https://robetta.bakerlab.org/>

As técnicas de modelagem comparativa, bem como a validação do método, podem ser conduzidas através de diferentes mecanismos de análise. Para a avaliação da qualidade dos modelos gerados e validação da estrutura foi utilizado o servidor SWISS-MODEL ([swissmodel.expasy.org](http://swissmodel.expasy.org)), para a obtenção dos gráficos de Ramachandran e QMEAN Zscore dos modelos (Figura 20).

SWISS-MODEL Modelling Repository Tools Documentation Log in Create Account

Start a New Modelling Project

Target Sequence(s):   
(Format must be FASTA, Clustal, plain string, or a valid UniProtKB AC)

Project Title:

Email:

By using the SWISS-MODEL server, you agree to comply with the following terms of use and to cite the corresponding articles.

**Supported Inputs**

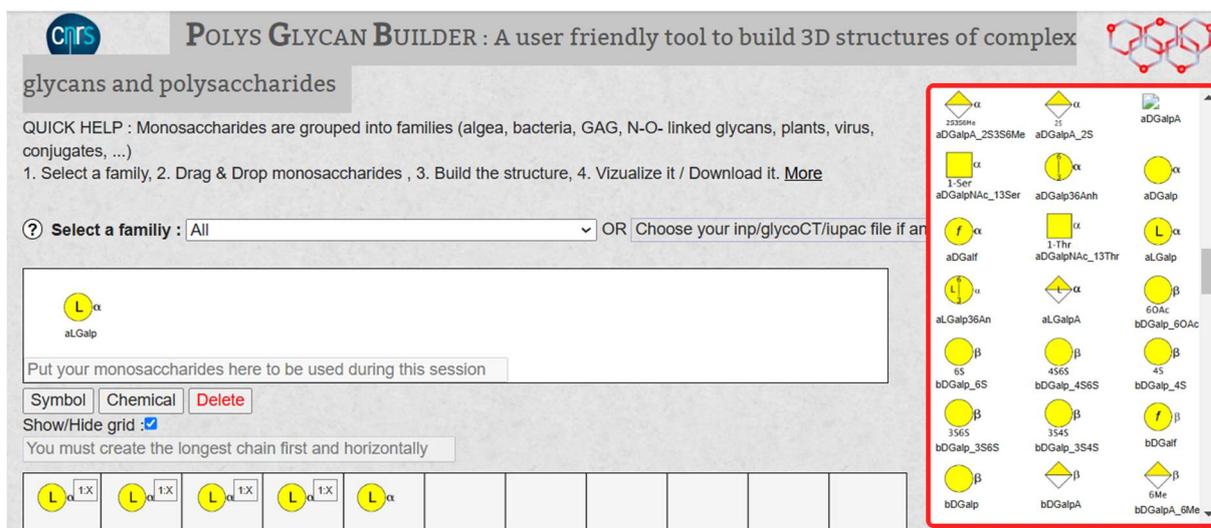
- Sequence(s)
- Target-Template Alignment
- User Template
- DeepView Project

**Figura 20.** SWISS-MODEL. Representação da interface gráfica online do servidor. <https://swissmodel.expasy.org/>

O refinamento final de cada modelo distinto obtido deu-se com a realização de uma simulação de DM em 500 ns por ajuste conformacional e análise da dinâmica intermolecular.

### 3.3. MODELAGEM MOLECULAR DOS POLISSACARÍDEOS

Foi utilizada a base de dados PDB para a seleção das estruturas *templates*. Utilizou-se quatro polissacarídeos, duas galactanas sulfatadas e duas heparinas, sendo as moléculas de heparina extraídas diretamente dos modelos do PDB. O pentassacarídeo sintético de heparina de cinco resíduos (HEP-5) foi obtido extraindo-se a molécula do *template* PDB ID 1E03 e a heparina de dezesseis resíduos (HEP-16) do *template* PDB ID 1TB6. O modelo tridimensional da galactana sulfatada foi gerado a partir das informações dos estudos de RMN que elucidaram a estrutura da molécula de *Echinometra lucunter*. Esta molécula é formada por uma  $\alpha$ -L-galactopiranosose 3-ligada e 2-sulfatada, monômero da galactana (VASCONCELOS *et al.*, 2018; QUEIROZ, VILELA-SILVA e POMIM, 2016). As duas moléculas de galactana, com cinco e dezesseis resíduos, foram construídas utilizando o servidor *Polys Glycan Builder* (PÉREZ *et al.*, 2015), representado na Figura 21, um construtor online específico para a construção de polissacarídeos com a correta isomeria.



**Figura 21.** Polys Glycan Builder. Representação da interface gráfica online do construtor online. <https://glycan-builder.cermav.cnrs.fr/>

Para cada uma das duas moléculas de galactana, formada por cinco e dezesseis resíduos de galactose, foram selecionados cada resíduo denominado aLGalp em ligações 1:3. Posteriormente, as posições de sulfatação no carbono 2 de cada um dos resíduos de galactose foram incluídos pelo software CHARMM-GUI em seu módulo o módulo *Glycan Reader & Modeler* (STEWART, 2007; STEWART, 2013; STEWART, 2016).

### 3.4. SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR: FORMAS APO

Simulações de DM foram realizadas para os sete sistemas diferentes criados. Três sistemas para as proteínas: MD-PRO-AT, MD-THR-AT e trombina isolada MD-THR, e quatro sistemas para os polissacarídeos: HEP-5, HEP-16, SGAL-5 e SGAL-16. A geração dos sistemas foi realizada através do servidor CHARMM-GUI no módulo *input generator*.

As simulações foram conduzidas em caixa cúbica neutra com moléculas de água, cátions ( $K^+$ ) e ânions ( $Cl^-$ ). Os campos de forças utilizados foram, respectivamente, para as proteínas, carboidratos e água: FF19SB, CHARMM36 e TIP3P. Na etapa anterior à simulação em nível de produção, foi realizada a completa minimização de energia com o algoritmo *steepest descent*.

A etapa de produção foi conduzida no conjunto NPT por 500 ns para as proteínas e 50 ns para os polissacarídeos. Utilizou-se a temperatura de 303,15 K e pressão de 1 bar. Para a estabilização da pressão e temperatura, utilizou-se os métodos Langevin e Berendsen, respectivamente, e um *cutoff* de 12 Å. O intervalo de tempo durante a produção foi de 2 fs. A análise das trajetórias da simulação, com o cálculo da flutuação quadrática média (RMSF) e o desvio quadrático médio (RMSD), foi realizada utilizando o programa CPPTRAJ 6.18.1, parte do pacote AMBER 2023 (ROE e CHEATHAN, 2013; CASE *et al.*, 2023).

### 3.5. ANÁLISE CONFORMACIONAL POR CLUSTERING

Após o relaxamento conformacional através das simulações de DM, a trajetória resultante foi analisada utilizando o algoritmo K-means, uma ferramenta de *clustering* amplamente empregada, disponível no CPPTRAJ 6.18.1 (ROE e CHEATHAN, 2013).

Por meio dessa abordagem, é possível identificar estruturas representativas com base nos dados gerados pelas simulações de DM, proporcionando uma compreensão mais aprofundada do comportamento conformacional dos sistemas em estudo. O algoritmo K-means fundamenta-se em cálculos de distância para agrupar dados, empregando a distância euclidiana entre pontos de dados para avaliar a similaridade e agrupar conformações espacialmente próximas. Seu objetivo primário é identificar agrupamentos compactos e independentes (SHAO *et al.*, 2007).

Para os cálculos de agrupamento realizados, foram adotadas as seguintes configurações: estabelecimento de 10 clusters fixos e execução do algoritmo até a conclusão das interações ou até que o limite de 1500 interações fosse atingido. Após cada execução do algoritmo, foram gerados gráficos que foram posteriormente visualizados utilizando o software XMGRACE (XMGRACE, 2023).

A abordagem de clusterização adotada, proporciona uma valiosa análise visual das características conformacionais dos sistemas em estudo, auxiliando na interpretação dos resultados obtidos nas simulações de DM.

### **3.6. ANÁLISE DAS CAVIDADES TRANSITÓRIAS**

Para a análise das cavidades passíveis de serem alvo de fármacos ao longo das trajetórias de MD, foi utilizado o software MDpocket na análise das simulações MD-PRO-AT, MD-THR-AT e MD-THR (SCHMIDTKE *et al.*, 2011). Os vértices de Voronoi dentro de um cubo de  $8 \text{ \AA}^3$  ao redor de cada ponto da grade por quadro de MD (ao longo dos 500 ns), foram analisados para estudar a plasticidade estrutural dos possíveis sítios de ligação de fármacos. A visualização, análise e renderização das imagens moleculares foram realizadas utilizando o PyMol.

Para a identificação das cavidades transitórias (*Binding Pocket Detect*) passíveis de serem locais de ligação de moléculas candidatas a fármacos, ao longo das trajetórias geradas por simulações de DM em receptores proteicos, empregou-se o software MDpocket. Por meio de uma análise minuciosa das simulações de DM, o algoritmo embutido no MDpocket possibilita capturar a dinâmica de movimento da molécula e identificar sítios de ligação, em receptores de proteínas alvo. Esta abordagem combinada de métodos permite ao MDpocket detectar e caracterizar sítios de ligação em proteínas alvo com alta precisão, fornecendo informações fundamentais

para o design de fármacos e a investigação das interações intermoleculares (LE GUILLOUX *et al.*, 2009).

### 3.7. REDOCKING MOLECULAR

Para fins de validação da metodologia de *docking* molecular foi realizado o *redocking*. Utilizou-se o ligante da estrutura cristalográfica escolhida para a modelagem comparativa (PDB ID:1TB6). Após o *redocking* do ligante ao alvo molecular, foi realizada a análise e comparação, por meio do RMSD, entre as estruturas obtidas pelo *redocking* e o modelo cristalográfico utilizado como base.

### 3.8. DOCKING MOLECULAR

Todas as análises de *docking* e *redocking* foram efetuadas seguindo a mesma metodologia com a utilização do software GlycoTorch Vina (GTV) (BOITTIER *et al.*, 2020). Para o *docking*, após a seleção das três conformações mais representativas do *cluster* do complexo MD-THR-AT, corrigiu-se os estados de ionização com a utilização do software MVD. Os polissacarídeos foram obtidos após as simulações de DM em 200 ns, conduzidas para relaxamento conformacional e extraído-se o último quadro de cada simulação. O *docking* foi realizado em triplicata e de forma independente para cada um dos quatro polissacarídeos e os três clusters representativos, totalizando-se 36 análises. Os parâmetros da caixa cúbica de busca da análise e os arquivos de entrada em formato *pdbqt* foram gerados utilizando a interface web em Python do GlycoTorch. Os coeficientes CHI e o valor de *cutoff* foram ajustados para 2 e 2, respectivamente.

Para a visualização dos sistemas moleculares, geração das imagens e análise dos resultados utilizou-se o PyMol. As análises dos dados, pela técnica de mapa de calor, foram realizadas com o uso do plugin *Seaborn* para Python.

### 3.9. SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR: FORMA HOLO

Após as análises de *docking*, com o objetivo de avaliar a estabilidade dos diferentes polissacarídeos foram escolhidos quatro complexos distintos para as

simulações de DM. As simulações de DM foram realizadas através do software AMBER 2023 (CASE *et al.*, 2023). A preparação dos dados e arquivos para as simulações de DM foram realizadas pelo servidor CHARMM-GUI (JO, KIM e IYER, 2008). As simulações utilizaram uma caixa cúbica neutra, contendo o complexo proteico e ligante, cátions ( $K^+$ ) e ânions ( $Cl^-$ ). Empregou-se os seguintes campos de força: TIP3P para a água, FF19SB para a porção proteica e Glycan16, para os carboidratos.

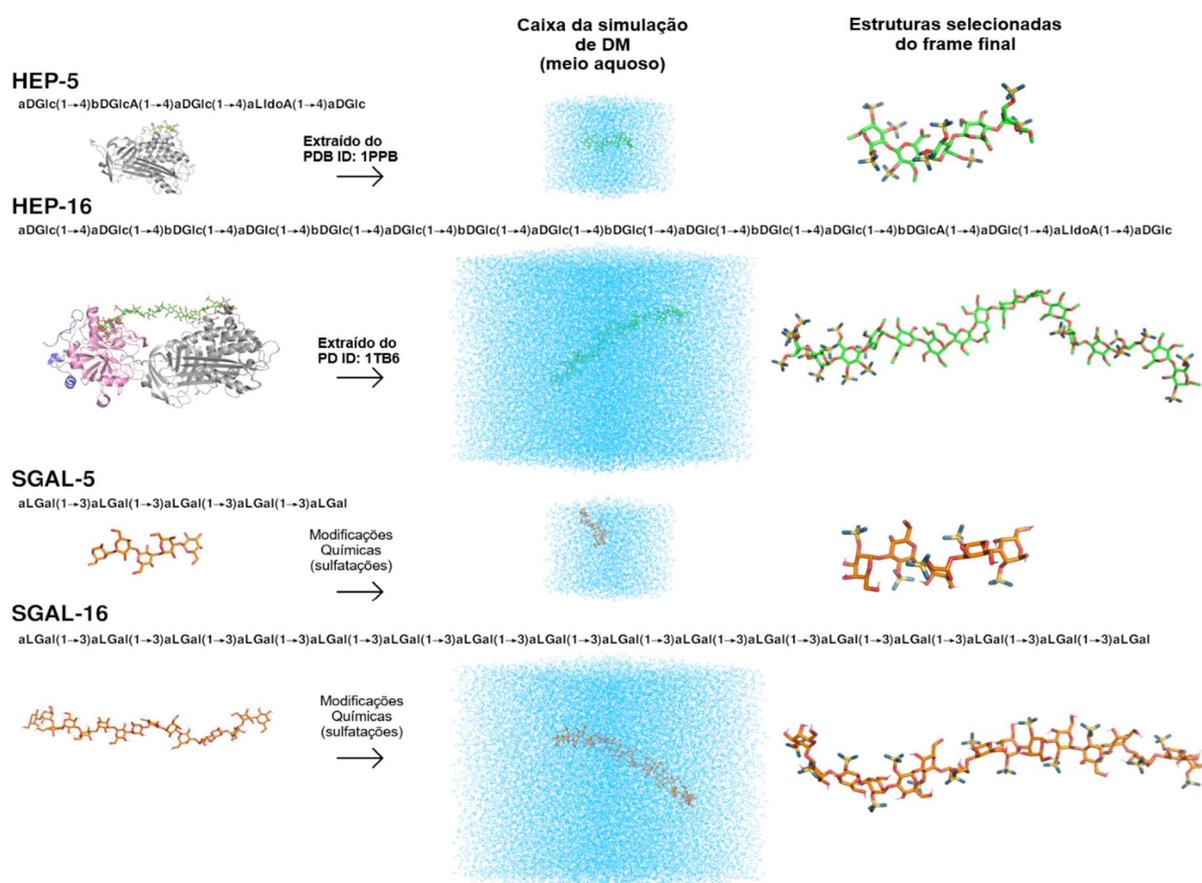
Anteriormente à etapa de simulação, realizou-se a minimização do complexo usando o algoritmo *Steepest Descent*. Durante a equilibração, utilizou-se o *Particle Mesh Ewald* (PME) para as interações eletrostáticas de longo alcance, com um *cutoff* de 12 Å, mesmo *cutoff* aplicado para interações de van der Waals. As simulações foram conduzidas em NVT de 2 ns a 303,15 K para a estabilização do sistema. A simulação de produção foi realizada em NPT, por 1  $\mu$ s, a 303,15 K e 1 bar. Para estabilização de temperatura e pressão, utilizou-se o método Langevin e Berendsen, respectivamente, com *cutoff* de PME e van der Waals de 12 Å. O tempo para as simulações de produção foi definido como 2 fs. As etapas de simulação de DM foram realizadas com minimização na CPU e as etapas seguintes de equilibração e produção em uma GPU NVIDIA GeForce RTX 3080.

Para a análise de cada trajetória das simulações de DM utilizou-se os softwares CPPTRAJ 6.18.1 (ROE e CHEATHAN, 2013) inseridos no pacote AMBER 2023, empregando as funções *atomicfluct* e *rmsd* para obter os dados de RMSF e RMSD, respectivamente.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. MODELAGEM MOLECULAR DOS POLISSACARÍDEOS

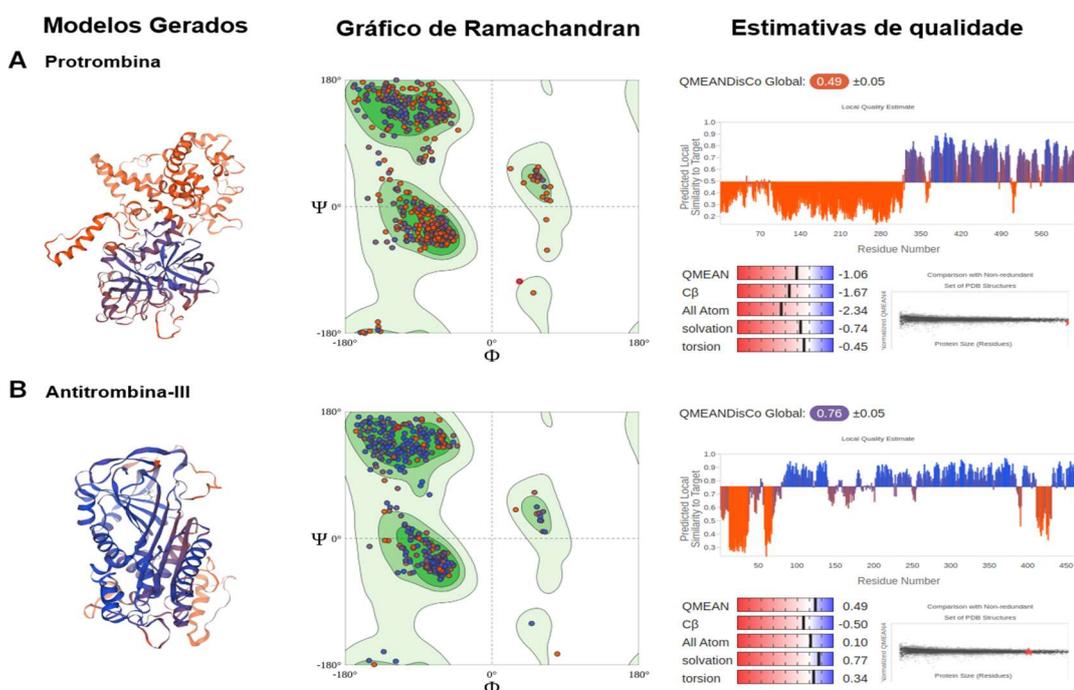
As estruturas das moléculas HEP-16 e HEP-5 foram extraídas diretamente dos modelos *templates* e submetidas a simulações de DM para relaxamento estrutural. Inicialmente a modelagem dessas estruturas sulfatadas deu-se através de resíduos de L-galactose sem a sulfatação na posição C-2 de cada resíduo, sendo posteriormente incluídos pela modificação por esterificação com grupamentos sulfato em cada posição C-2 dos resíduos. Em seguida foi realizada a minimização de energia e simulações de DM em meio aquoso e com íons, com fins de ajuste das torções glicosídicas afetadas por forças intermoleculares com os grupos sulfato. Após as simulações, o último quadro de cada simulação de DM foi extraído para HEP-5, HEP-16, SGAL-5 e SGAL-16, conforme representados na Figura 22.



**Figura 22.** Modelagem molecular dos polissacarídeos. Minimização de energia e ajuste das torções glicosídicas por DM. Últimos quadros da DM extraídos para HEP-5, HEP-16, SGAL-5 e SGAL-16.

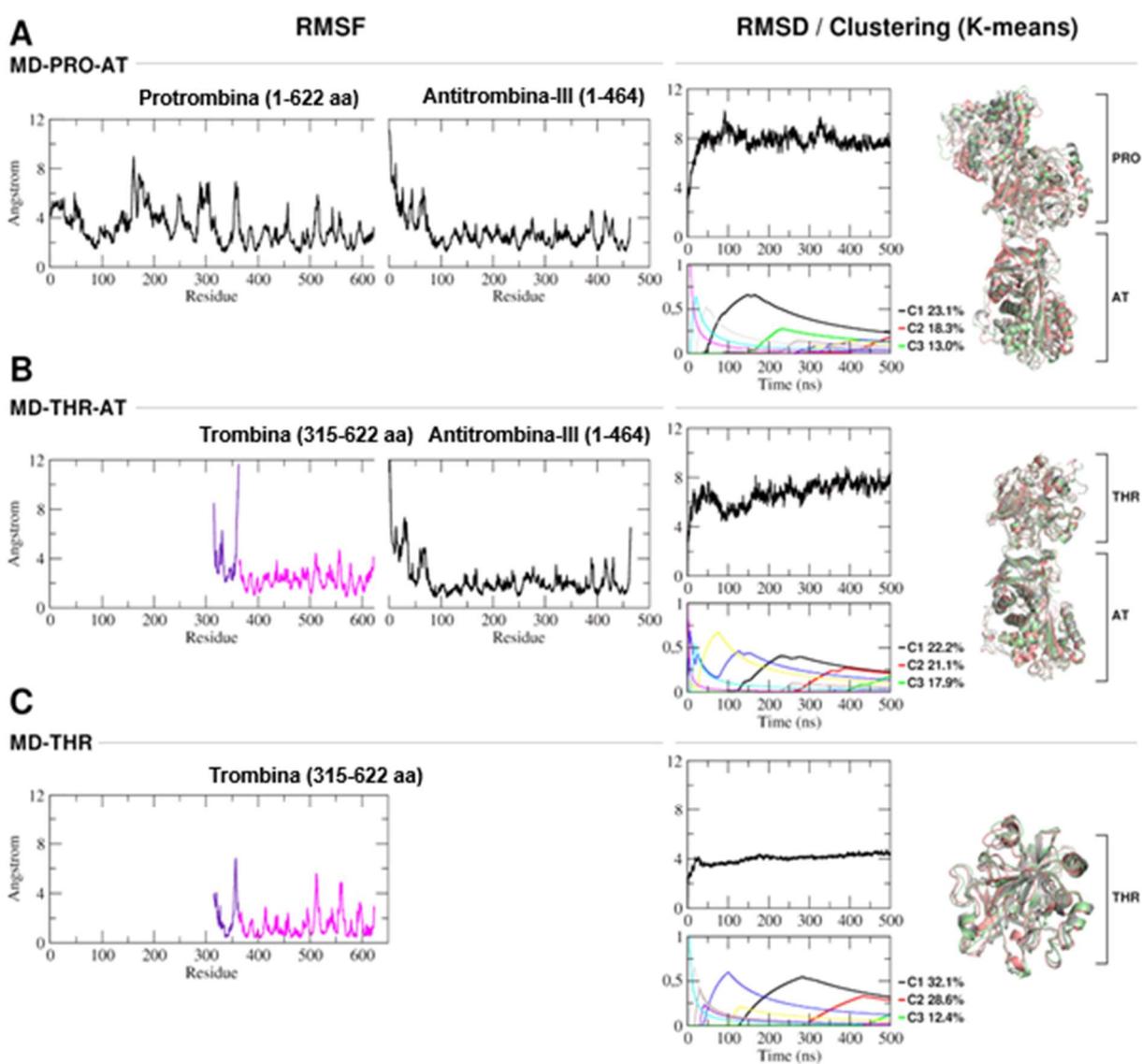
## 4.2. MODELAGEM COMPARATIVA DAS ESTRUTURAS PROTEICAS

A modelagem comparativa partiu das seqüências primárias de aminoácidos de cada proteína. A THR foi reconstruída a partir da PRO, tendo toda a região central até o N-terminal da PRO remodelada. A validação dos modelos das estruturas reconstruídas deu-se com a pontuação do gráfico de Ramachandran. O gráfico de Ramachandran permite identificar os resíduos de aminoácidos localizados espacialmente em conformações energeticamente estáveis, favoráveis, ou instáveis, não favoráveis, permitindo a avaliação da qualidade de modelos teóricos ou experimentais de proteínas. Os modelos analisados obtiveram uma pontuação de conformações favoráveis de 96,45% para a THR e 97,19% para a AT-III, sendo considerados modelos de boa qualidade, conforme mostrado na Figura 23. As estruturas tiveram seu alinhamento de acordo com os modelos experimentais *templates*, sendo criadas três estruturas diferentes: AT-III ligada a PRO completa, AT-III ligada a PRO clivada pelo Fator Xa, e a THR livre sem ligantes, denominadas respectivamente MD-PRO-AT, MD-THR-AT e MD-THR.



**Figura 23.** Análises das estruturas moleculares das proteínas Protrombina e Antitrombina-III geradas por modelagem comparativa. utilização do Gráfico de Ramachandran, ao centro, e a Estimativa de Qualidade das estruturas, a direita. (A) Protrombina e (B) Antitrombina III.

As estruturas foram então submetidas às simulações de DM em 500 ns. Após as simulações foram extraídas as três conformações mais representativas para cada DM, com uso do algoritmo Kmeans do software CPPTRAJ 6.18.1. Os resultados são apresentados na Figura 24.



**Figura 24.** Representação das estruturas proteicas após as simulações de DM e análise das conformações mais representativas. (A) MD-PRO-AT, (B) MD-THR-AT e (C) MD-THR. Gráficos de RMSF, RMSD, distribuição das conformações durante a trajetória da DM e modelo tridimensional das estruturas, respectivamente para cada modelo.

Para assegurar uma análise precisa dos resíduos envolvidos nas interações, realizou-se uma avaliação dos resíduos aminoácidos dos complexos gerados por modelagem comparativa. A sequência primária de cada proteína foi utilizada como

referência. A numeração dos resíduos foi então ajustada para corresponder à sequência primária de aminoácidos. A numeração dos resíduos das principais regiões de cada proteína no complexo MD-THR-AT está listada na Tabela 2.

**Tabela 1.** Numeração dos principais resíduos do complexo MD-THR-AT após a modelagem.

<b>Regiões</b>	<b>Resíduos</b>
<b>Exosítio-I</b>	Lys36, His71, Arg73, Arg75, Tyr76, Arg78, Lys109, Lys110
<b>Numeração ajustada</b>	Lys384, His429, Arg431, Arg433, Tyr434, Arg436, Lys469, Lys470
<b>Exosítio-II</b>	Arg93, Arg101, Arg233, Lys236, Lys240
<b>Numeração ajustada</b>	Arg452, Arg461, Arg608, Lys611, Lys615
<b>Sítio de ligação AT-III</b>	Lys11, Arg13, Asn45, Arg46, Arg47, Glu113, Lys114, Lys125, Arg129
<b>Numeração ajustada</b>	Lys43, Arg45, Asn77, Arg78, Arg79, Glu145, Lys146, Lys157, Arg161

### 4.3. ANÁLISE DAS CAVIDADES TRANSITÓRIAS

Com a utilização do software MDpocket, realizou-se a busca nas trajetórias das simulações de DM pelas cavidades transitórias passíveis de serem sítios estáveis para a ligação de fármacos. Foi possível identificar a plasticidade e a quantidade dos sítios de ligação nas diferentes estruturas.

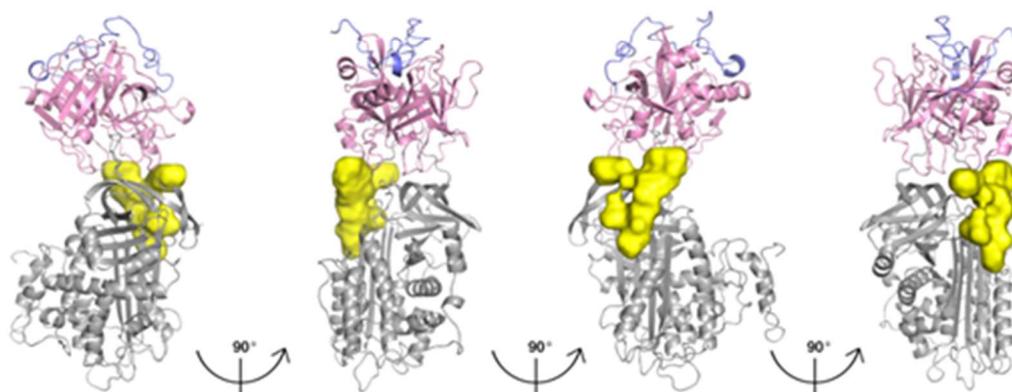
Destaca-se a maior quantidade de sítios de ligação na estrutura MD-PRO-AT, apenas um sítio na estrutura MD-THR-AT localizado entre as duas cadeias e a ausência de sítios na estrutura da MD-THR, conforme mostrado pela Figura 25.

### Cavidades transitórias detectadas (500 ns)

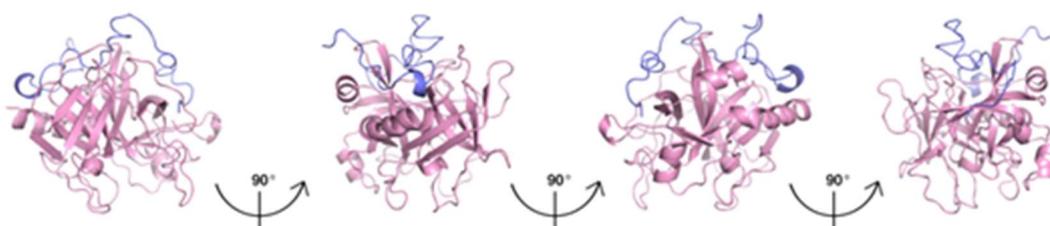
#### MD-PRO-AT



#### MD-THR-AT



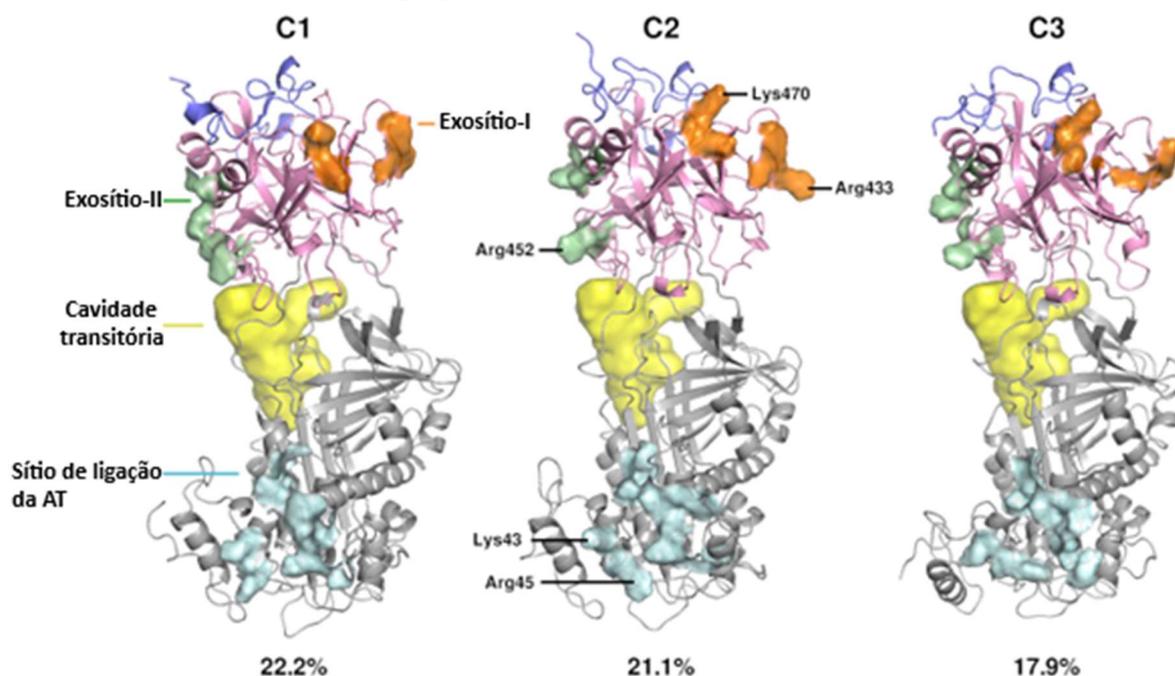
#### MD-THR



**Figura 25.** Representação das cavidades transitórias na trajetória da DM das estruturas MD-PRO-AT, MD-THR-AT e MD-THR. Trombina representada em lilás na cadeia h, e em azul na cadeia L. Antitrombina representada em cinza. Cavidades transitórias representadas em amarelo.

Posteriormente a estrutura MD-THR-AT foi analisada em detalhes, com a identificação das regiões específicas de interesse para os estudos de *docking* molecular, conforme demonstrado na Figura 26.

## MD-THR-AT Sítios de Ligação



**Figura 26.** Sítios de ligação da estrutura MD-THR-AT nos clusters C1, C2 e C3. Trombina representada em lilás, cadeia H, e azul, cadeia L. Resíduos Arg433, Lys470 do exosítio-I em laranja e resíduo Arg452 do exosítio-II em verde. Antitrombina representada em cinza com o sítio de ligação em ciano. Cavity transitória representada em amarelo

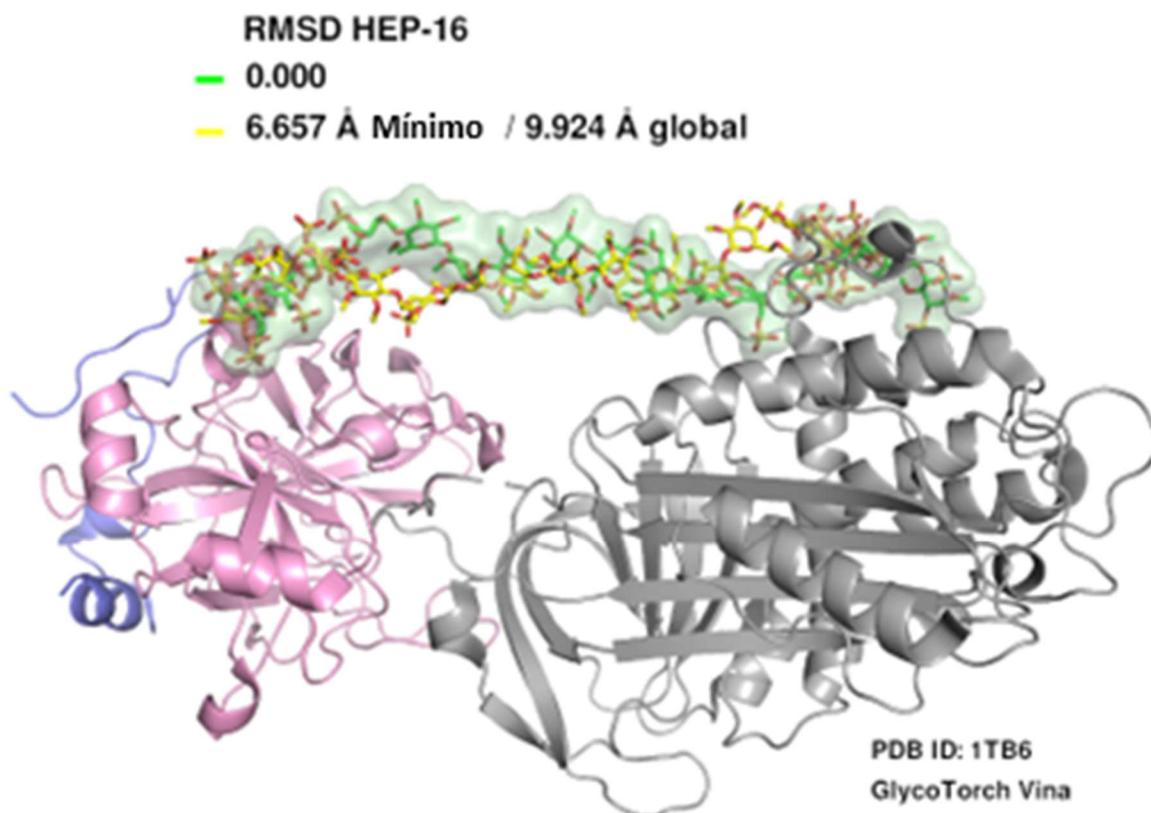
## 4.4. REDOCKING MOLECULAR

Anteriormente às análises de *docking*, realizou-se o *redocking* visando a validação da metodologia a ser utilizada no trabalho. A estrutura cristalográfica do complexo ternário Trombina-Heparina-Antitrombina (PDB ID:1TB6) foi escolhida para a modelagem comparativa. Essa estrutura foi escolhida para que seja possível a reprodução, através do *docking*, da estrutura já validada pelo método experimental de cristalografia de raios-x. Na fase de preparação dos ligantes separou-se o ligante cristalizado do receptor utilizando-se o PyMol. Posteriormente, foi efetuado o processo de *docking* molecular do ligante separado do cristal à AT e THR, considerado como receptor, reproduzindo-se então o complexo ternário.

A Figura 27 mostra a sobreposição da pose do modelo cristalográfico com a molécula de HEP-16. O RMSD obtido foi de 6,57 Å. Após o *redocking* molecular do ligante à estrutura do complexo ternário, procedeu-se com a comparação entre a conformação da pose e o ligante da estrutura cristalográfica 1TB6, observando-se

regiões de ligação semelhantes ao cristal, o sítio de ligação da AT-III e o exosítio 2.

### Redocking do complexo trombina/AT-III



**Figura 27.** Redocking do ligante HEP-16 no complexo THR/AT-III (PDB ID: 1TB6). Antitrombina em cinza, Cadeia H da trombina em lilás e cadeia L da trombina em azul. Ligante do cristal em verde e ligante do *redocking* em amarelo.

## 4.5. DOCKING MOLECULAR

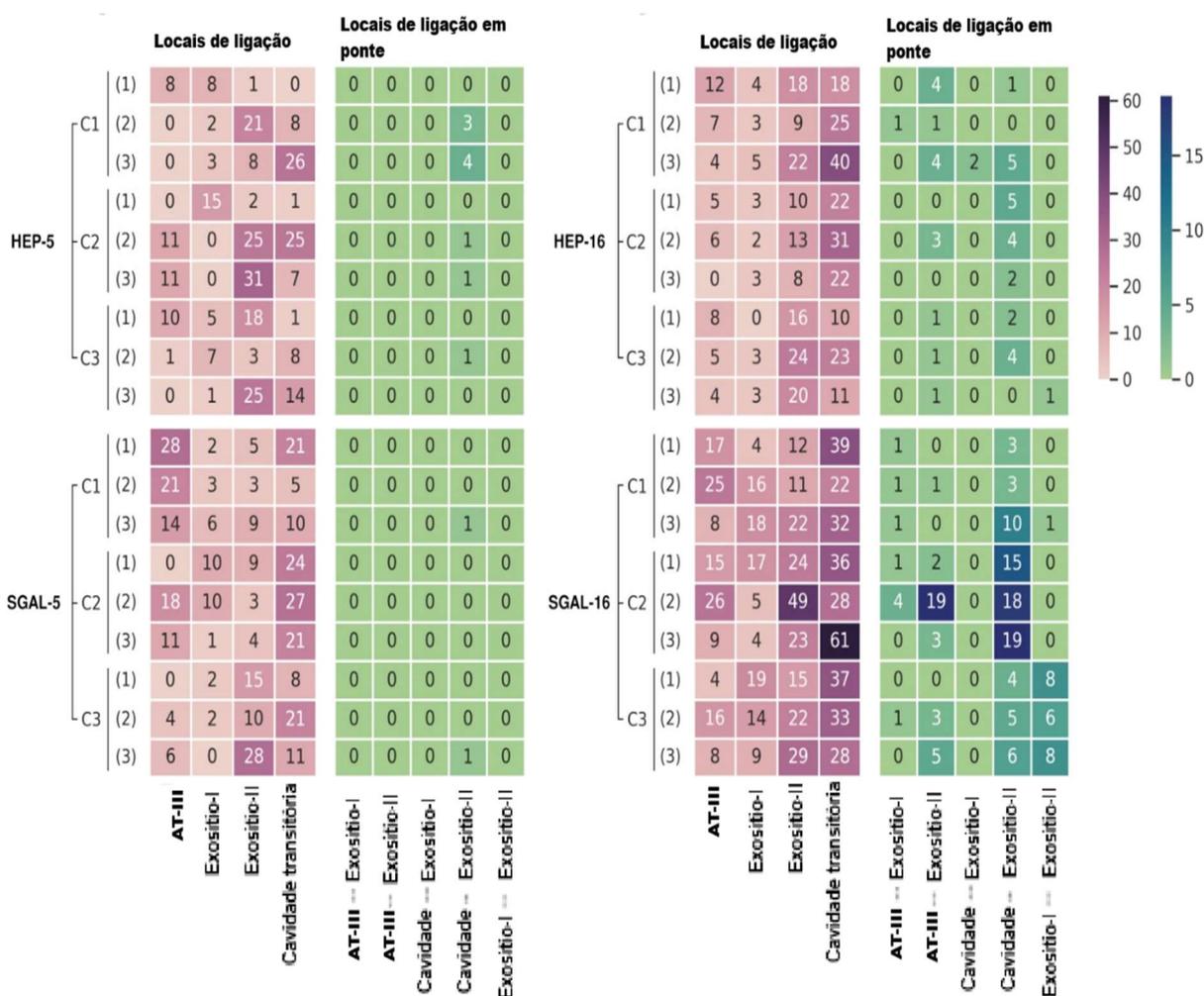
As análises de *docking* foram realizadas em separado para os quatro polissacarídeos na estrutura das três conformações selecionadas do complexo MD-THR-AT. As posições foram analisadas considerando-se os sítios de ligação já mapeados e as cavidades detectadas. As energias de ligação foram analisadas pelo algoritmo do GTV. Cada polissacarídeo foi submetido a nove procedimentos de *docking* totalizando em cem poses geradas para cada execução.

A finalização do processo de *docking*, se deu com a análise e comparação da energia livre de ligação de cada complexo para se analisar a afinidade da ligação entre proteína e ligante. Foi selecionada como base a estrutura HEP-16 formando interação

em ponte entre o sítio de AT-III e o exosítio-II, comparando-a com as demais estruturas.

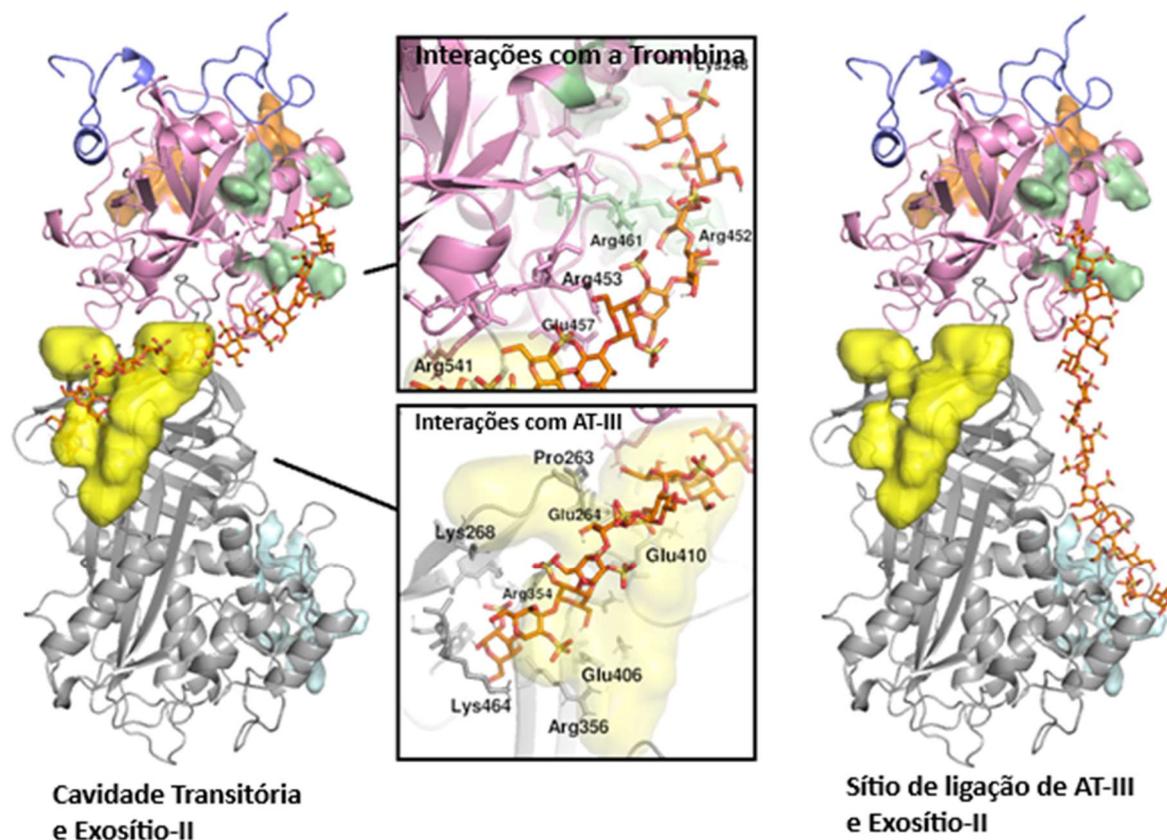
Os resultados do *docking* do complexo MD-THR-AT com os diferentes polissacarídeos foram analisados quanto a frequência dos locais de interação, sendo compilados na Figura 28. As poses do docking da SGAL-16 representada na Figura 29 foram escolhidas para representar as diversas poses em que a interação com o sítio de ligação a fármacos ou ao exosítio-II se dá através do mecanismo de ponte. Para as posteriores análises, foram destacados na Figura 29 os resíduos com interação em ponte entre o sítio transitório e o exosítio-II.

### FREQUÊNCIA DOS LOCAIS DE LIGAÇÃO



**Figura 28.** Análise dos locais de ligação dos diferentes polissacarídeos ao complexo MD-THR-AT.

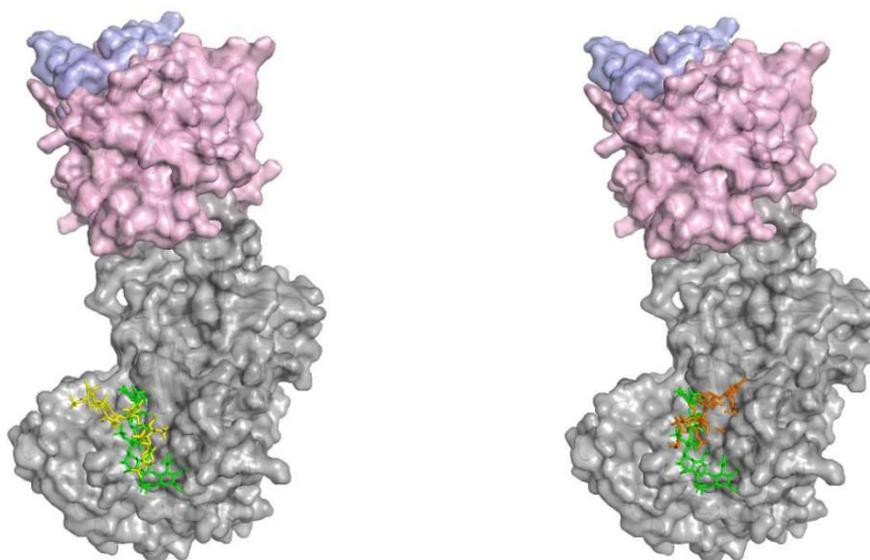
### SGAL-16 ligada ao complexo Trombina-Antitrombina



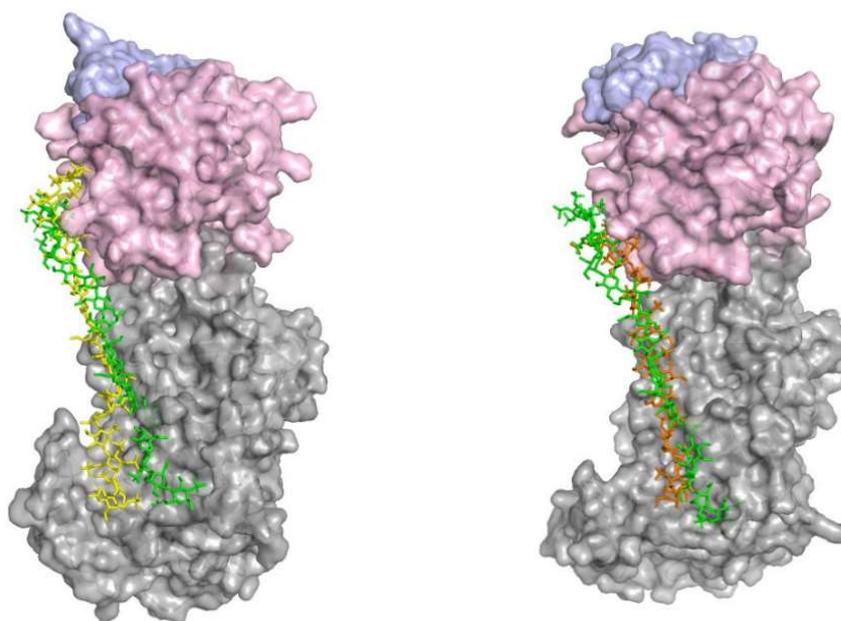
**Figura 29.** SGAL-16 em interação em ponte com o complexo THR/AT-III. Interações com sítio transitório na esquerda e interações com o exosítio-II à direita.

## 4.6. SELEÇÃO DOS COMPLEXOS MOLECULAR TERNÁRIOS

A partir das análises de *docking* das diferentes estruturas de heparina HEP e da galactana sulfatada SGAL nos três diferentes *clusters* determinados nas etapas anteriores, selecionou-se as conformações para as subseqüentes simulações de DM. Foi determinado como critério de escolha para as duas estruturas de 16 resíduos, as conformações que além de manterem a conformação em ponte, se sobrepuseram às cavidades transitórias da trajetória da dinâmica do complexo APO identificadas pelo algoritmo MDPocket. Para as estruturas com cinco resíduos foram selecionadas as estruturas ligadas ao sítio de ligação da AT-III. As conformações escolhidas estão representadas pelas Figuras 31 e 32, respectivamente para as moléculas de cinco e dezesseis resíduos.



**Figura 30.** Representação tridimensional das poses escolhidas referentes as moléculas de 5 resíduos, galactana GAL-5 e heparina HEP-5, respectivamente, do *docking* no complexo THR/AT-III. Antitrombina em cinza, Cadeia H da Trombina em lilás e cadeia L em azul. Heparina em verde, e galactana em amarelo e laranja.

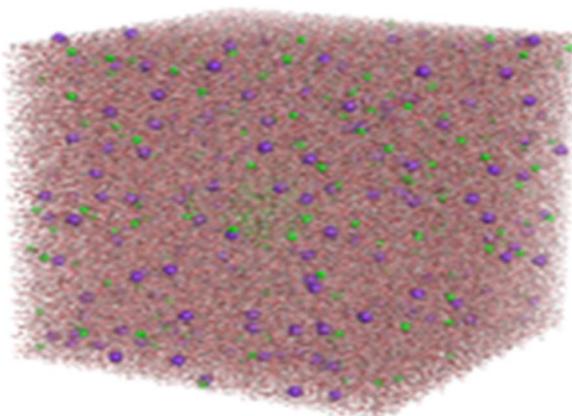


**Figura 31.** Representação tridimensional das poses escolhidas referentes as moléculas de 16 resíduos, galactana GAL-16 e heparina HEP-16, respectivamente, do *docking* no complexo THR/AT-III. Antitrombina em cinza, Cadeia H da Trombina em lilás e cadeia L em azul. Heparina em verde, e galactana em amarelo e laranja.

#### 4.7. SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR

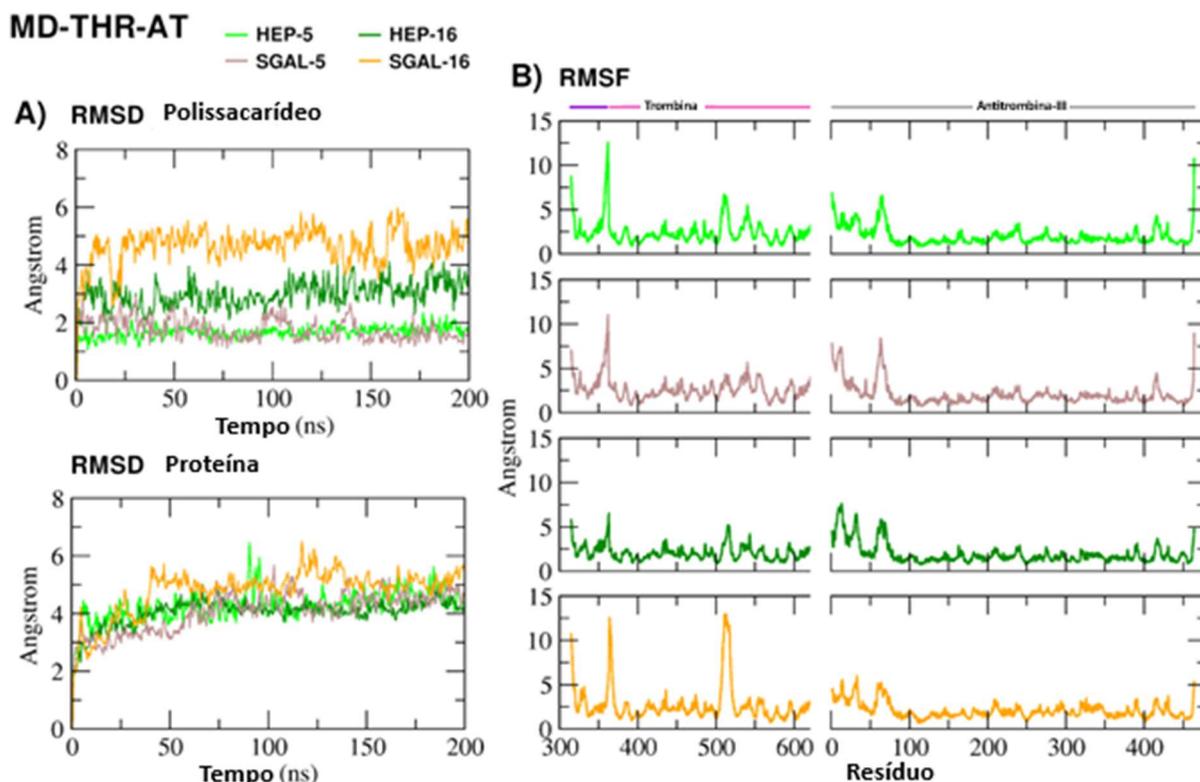
As simulações de DM ocorreram para os complexos formados com a estrutura MD-THR-AT selecionada e os polissacarídeos de cinco e dezesseis resíduos. Os pentassacarídeos ligados ao sítio da AT-III, HEP-5 e SGAL-5 e os polissacarídeos de dezesseis resíduos, formando interação em ponte entre a AT-III e o exossítio-II, HEP-16 e SGAL-16.

Cada sistema em separado foi preparado para a DM em 200 ns utilizando-se o servidor CHARMM-GUI. A caixa cúbica da simulação foi configurada com os íons e dimensionada para o tamanho do receptor proteico, sendo então gerada a caixa de simulação representada na Figura 32. Após o término da geração dos inputs pelo CHARMM-GUI, foi efetuado o download dos diferentes arquivos de input, para a DM. Iniciando-se em seguida os cálculos.



**Figura 32.** Representação 3D da caixa de simulação em meio aquoso, com íons de sódio e potássio. Imagem gerada pelo CHARMM-GUI durante a preparação da DM.

Após as simulações de DM foram extraídos os dados de RMSD e RMSF da trajetória de cada DM com os sistemas MD-THR-AT complexados com os diferentes polissacarídeos. Permitindo a análise das diferentes trajetórias, dinâmica de movimentação dos resíduos e regiões dos diferentes polissacarídeos em interação com o sistema proteico analisado.



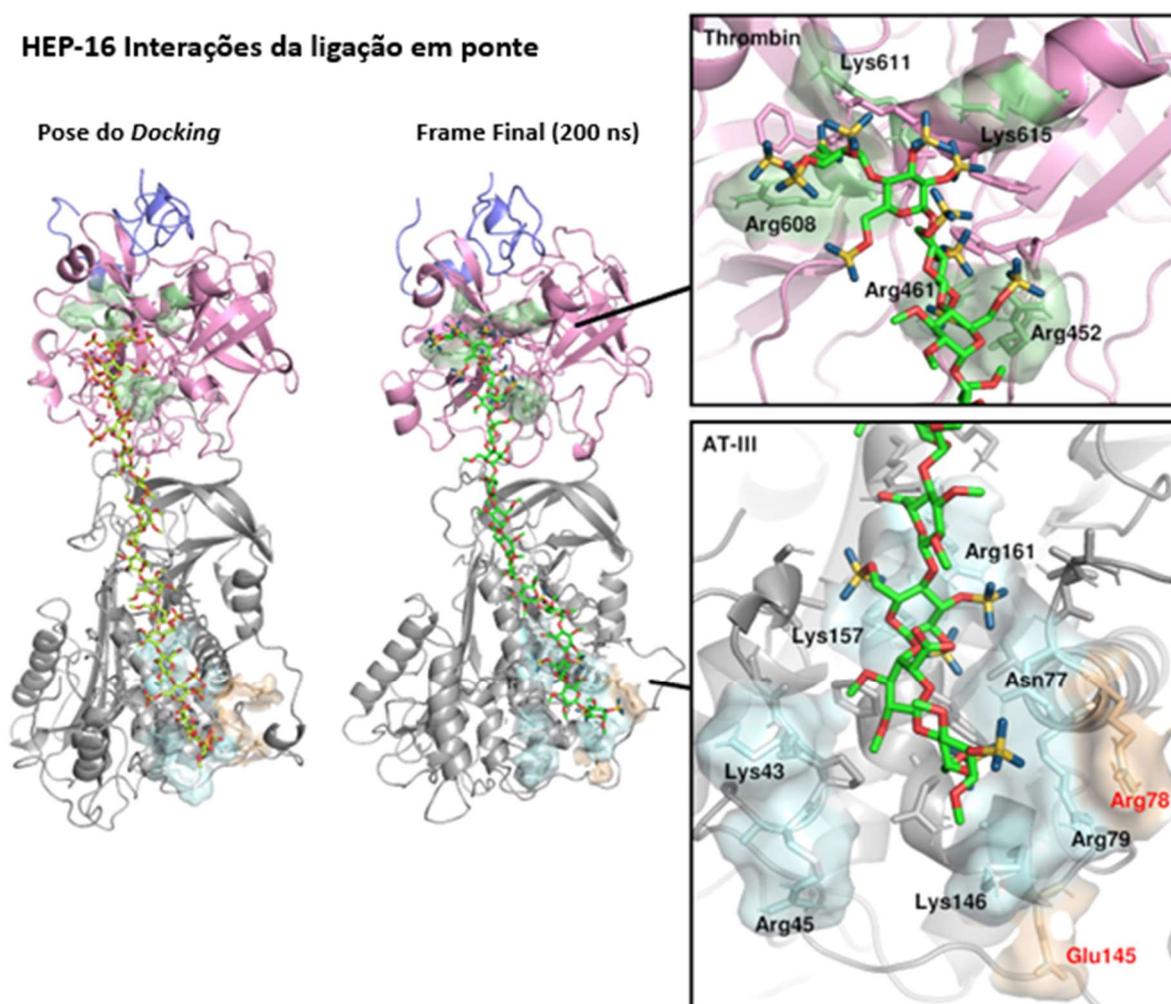
**Figura 33.** Representação dos resultados da DM dos diferentes ligantes com a estrutura MD-THR-AT. Gráficos de RMSD e RMSF dos polissacarídeos e do complexo proteico.

Após as simulações de DM os resultados foram analisados pelo método MMPBSA permitindo a quantificação das energias livres de ligação demonstradas pelos diferentes ligantes, sendo os resultados apresentados na Tabela 3. Observa-se a maior energia de ligação da estrutura HEP-16 em comparação com os outros ligantes.

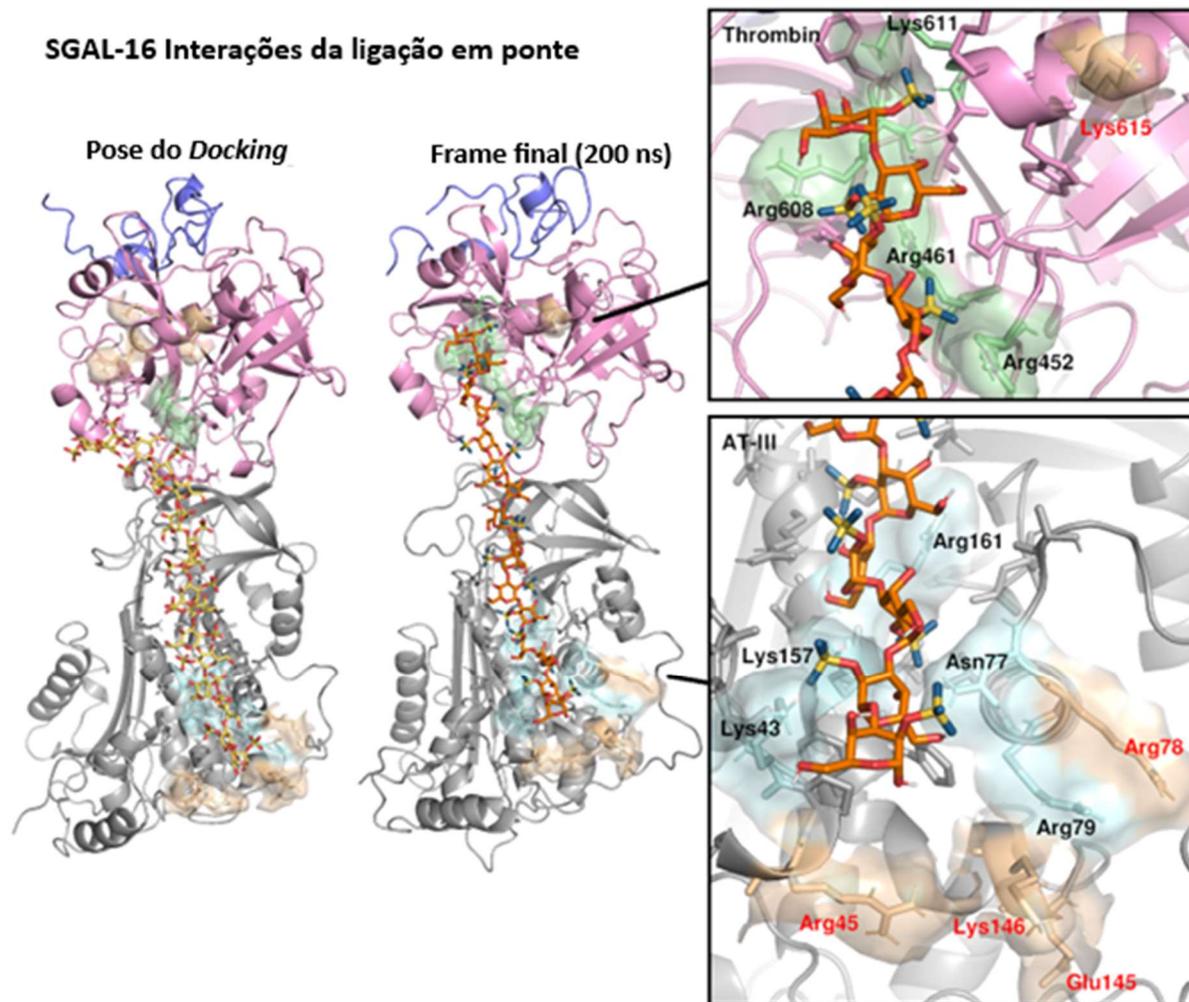
**Tabela 2.** Resultado da análise de energia livre de ligação dos diferentes polissacarídeos ligados com o complexo THR/AT-III.

Polissacarídeo ligante	Energia livre de ligação (Kcal/mol)
HEP-5	$-213,18 \pm 8,713$
SGAL-5	$-205,26 \pm 8,895$
HEP-16	$-222,94 \pm 15,713$
SGAL-16	$-200,48 \pm 12,256$

Para uma caracterização mais detalhada das interações da ligação em ponte da SGAL-16 em comparação à molécula de heparina representada pelo HEP-16, um dos focos principais do estudo, foram mapeadas as interações com os resíduos proteicos das principais regiões de cada proteína do complexo trombina-antitrombina, conforme representado nas Figuras 35 e 36.



**Figura 34.** Caracterização das interações de HEP-16 ligada pelo mecanismo de ponte com os resíduos da estrutura proteica MD-THR-AT. Acima os Resíduos principais de THR e abaixo os resíduos de AT-III.



**Figura 35.** Caracterização das interações de SGAL-16 ligada pelo mecanismo de ponte com os resíduos da estrutura proteica MD-THR-AT. Acima Resíduos principais de THR e abaixo os resíduos de AT-III.

## 5. DISCUSSÃO

Atualmente, diversos estudos investigam polissacarídeos e glicoconjugados que mimetizam a ação das heparinas não fracionadas e de baixo peso molecular. Embora alguns já tenham alcançado a fase de ensaios clínicos, enfrentam desafios como dificuldades na síntese e na padronização da atividade biológica (AL NAHAIN *et al.*, 2018). Um dos principais obstáculos é a necessidade de uma compreensão mais aprofundada da relação estrutura-atividade, essencial para garantir que esses compostos apresentem eficácia e perfis de segurança superiores aos das heparinas.

A modelagem das estruturas base dos polissacarídeos extraídos dos modelos templates HEP-5 e HEP-16 revelou que essas moléculas apresentam diferenças que vão além do tamanho da cadeia. O modelo HEP-5, análogo à sequência pentassacarídica primária da heparina, exibe um elevado grau de sulfatação distribuído ao longo de toda a sua estrutura. Em contraste, o modelo HEP-16, representativo da heparina de baixo peso molecular, concentra os grupos sulfato predominantemente em suas extremidades, com ausência nos resíduos intermediários, conforme demonstrado na Figura 23. Essas características, aliadas ao maior tamanho da sequência polissacarídica de HEP-16, podem, em parte, justificar sua capacidade diferenciada de formar interações em ponte, conferindo-lhe propriedades distintas em relação ao HEP-5.

A influência do peso molecular de diferentes polissacarídeos sulfatados na modulação da atividade anticoagulante já foi descrita anteriormente (MELO *et al.*, 2004; QUINDERÉ *et al.*, 2014). Além disso, a relação entre os padrões de sulfatação, conformação estrutural e variações no perfil anticoagulante dessas moléculas foi abordada em estudos prévios, incluindo análises *in silico* e por RMN (BECKER *et al.*, 2007).

As estruturas proteicas obtidas no presente estudo por modelagem comparativa, validadas e analisadas quanto à qualidade dos modelos, apresentaram resultados favoráveis nos gráficos de Ramachandran, QMEAN e QMEANDisCo, conforme mostrado na Figura 24. Com a modelagem comparativa, ao se comparar os resíduos da estrutura com a sequência primária, observa-se a mudança na numeração dos resíduos, os quais necessitaram ser ajustados para uma correta

análise dos resultados e obtenção de imagens passíveis de comparação, conforme mostrado pela Tabela 2.

Assim o sítio de ligação da AT-III foi ajustado para Lys43, Arg45, Asn77, Asn78, Asn79, Glu145, Lys146, Lys157, Arg161. O exosítio-I formado pelos resíduos Lys36, His71, Arg73, Arg75, Tyr76, Arg78, Lys109 e Lys110. Foi ajustado para Lys384, His429, Arg431, Arg433, Tyr434, Arg436, Lys469, Lys470. O exosítio-II formado pelos resíduos Lys11, Arg13, Asn45, Asn46, Asn47, Glu113, Lys114, Lys125, Arg129, teve a numeração dos resíduos ajustada para Lys43, Arg45, Asn77, Asn78, Asn79, Glu145, Lys146, Lys157, Arg161. Estes resíduos estão mostrados na Tabela 2.

As três estruturas geradas (MD-PRO-AT, MD-THR-AT e MD-THR) submetidas a simulações de DM em 500 ns, tiveram as populações conformacionais ao longo das trajetórias analisadas com base nos valores de RMSD e RMSF, conforme mostrado na Figura 25. Para o modelo MD-THR-AT (Figura 25 B), o qual apresenta similaridade com o modelo experimental, a estabilidade conformacional foi alcançada a partir de 150 ns. As três populações mais representativas, que juntas correspondem a 61,2% do total, surgiram de forma sequencial, como demonstrado na Figura 25. Essas três conformações representativas forneceram estruturas adequadas para as análises posteriores.

A análise da flutuação dos resíduos através do RMSF revelou, em comparação com os outros sistemas, a mobilidade reduzida entre os resíduos 500 e 600 da THR. Já para o modelo MD-PRO-AT (Figura 25 A), a análise dos gráficos indica que a possível estabilidade conformacional é atingida apenas em 450 ns. Apesar dos aspectos estruturais do complexo MD-PRO-AT ter sido menos estudado na literatura, é importante desenvolver modelos estruturais com o intuito de se estudar a ocorrência de locais de interação para ligantes diretos na forma não ativa da trombina, a protrombina, uma vez que há dados de que esse complexo molecular pode se formar em meio fisiológico (ESTRY e TISHKOFF, 1984; TURECEK *et al.*, 2004).

A formação precoce, por volta de 50 ns, do cluster de maior população (C1, representando 23,1% das conformações), seguida pelo surgimento do segundo cluster (C2) somente ao final da trajetória, pode ser explicada pela maior movimentação da parte reconstruída por modelagem comparativa da protrombina. Com base nas análises dos gráficos, conclui-se que o C2 é a conformação mais representativa dessa estrutura. Para o sistema MD-TR (Figura 25 C), observa-se pelo gráfico RMSD, extrema estabilidade ao longo da trajetória da DM e estabilidade

atingida rapidamente. Isto pode ser explicado pelo seu menor tamanho em relação as outras estruturas moleculares, além do formato esférico da estrutura.

A análise das cavidades pelo algoritmo MDPocket permitiu a identificação dos sítios transitórios de ligação de pequenas moléculas durante as trajetórias de cada DM das diferentes estruturas, mostrada na Figura 26, possibilitando as seguintes observações:

Comparando-se o número de cavidades detectadas nas três estruturas, pode-se inferir que ligantes diretos preferem se ligar à THR quando esta não está clivada. Devido ao maior número de cavidades detectadas nessa estrutura, o que facilitaria a maior probabilidade de interação.

A estrutura MD-PRO-AT apresentou mais sítios de ligação na região reconstruída da estrutura. Região essa, próxima ao exosítio-1, sítio conhecido pela ligação aos anticoagulantes orais diretos. Essa estrutura hipotética, formada pela protrombina e AT ligadas, pode sugerir que os sítios detectados estejam disponíveis anteriormente a clivagem pelo Fator Xa, uma das reações principais da cascata de coagulação.

A estrutura do complexo MD-THR-AT exibiu apenas uma cavidade entre as duas cadeias proteicas. Pela análise em detalhes desse complexo conforme mostrado na Figura 28, foi possível observar consideráveis diferenças na conformação espacial do *cluster 2* (C2). Os resíduos destacados Arg433 e Lys470 no exosítio-I e Arg452 no exosítio-II da THR e os resíduos Lys43 e Arg45 da AT-III estão mais expostos ao solvente. Já no complexo MD-THR, não se observou cavidades detectáveis que se mantêm estáveis durante as variações conformacionais da macromolécula.

Através das análises de *docking* dos diferentes pentassacarídeos sulfatados com a estrutura MD-THR-AT, observa-se que embora as estruturas HEP-5 e SGAL-5 tenham preferência pelo sítio de ligação transitório detectado anteriormente, o HEP-5 é mais suscetível de se ligar ao exosítio-II. Essa maior frequência de interações com o exosítio-II da HEP-5 pode sugerir um mecanismo de ação direto para as heparinas de ultrabaixo peso molecular (ULWHs), além do já conhecido mecanismo de ativação da AT-III através de ligação ao sítio específico de heparina (HIRSH e WARKENTIN, 2023). Entretanto, o SGAL-5, com seu padrão de sulfatação específico da unidade de galactose formadora, apresenta maior suscetibilidade em se ligar ao sítio de ligação da AT-III, demonstrando a importância do seu padrão de sulfatação para a

ocorrência dessa interação (QUEIROZ, VILELA-SILVA e POMIN, 2016; PEREIRA *et al.*, 2018).

As análises das moléculas maiores com 16 resíduos, apresentaram as interações em ponte das moléculas HEP-16 e SGAL-16 com o complexo proteico. Essas análises, foco principal da realização dos estudos de *docking*, revelaram uma distribuição equilibrada da SGAL-16 entre os três principais *clusters* na ligação em ponte ao sítio transitório e exosítio-II. As análises com HEP-16 mostraram que essas estruturas se dispersam mais ao longo do complexo THR-AT-III.

Destaca-se que enquanto a HEP-16 demonstrou afinidade pelo exosítio-II, não formando ponte com o sítio transitório, a SGAL-16 especialmente em C2, apresentou forte tendência em formar ponte entre o sítio transitório e o exosítio-II. Esses resultados também destacam a importância da conformação estrutural e do padrão de sulfatação da molécula como um todo para a formação desse tipo de interação com o sítio transitório.

As análises de energia de ligação por meio do algoritmo GTV mostraram que HEP-16 apresentou maior energia de ligação entre as moléculas analisadas, embora apresentando energia positiva, considerada desfavorável, a partir da 40ª pose. As outras três moléculas polissacarídicas analisadas, apresentaram valores negativos, considerados favoráveis, em todas as poses.

A pose do *docking* da SGAL-16, destacada na Figura 31, revela os resíduos participantes da interação em ponte entre o sítio transitório e o exosítio-II. As interações com o exosítio-II da THR ocorreram em Lys248, Arg452, Arg453, Glu457, Arg461 e Arg541. Estando os resíduos Arg452 e Arg461 do exosítio-II mais expostos no *cluster* dois. Na AT-III os resíduos em interação são Pro263, Glu264, Lys268, Arg354, Arg356, Glu406, Glu410 e Lys464. Esses resultados destacam a capacidade da galactana sulfatada em promover interações em regiões alternativas, como em questão, o sítio transitório farmacologicamente relevante. O padrão único de sulfatação dessa estrutura pode estabilizar estruturas proteicas com diferentes dinâmicas, modulando a neutralização da THR pela AT-III, via formação de complexo ternário conforme já descrito por QUEIROZ e colaboradores (2016).

Para as simulações de DM foram selecionadas as poses dos pentassacarídeos e dos polissacarídeos de dezesseis resíduos representadas na Figura 30 e 31. Para os pentassacarídeos foi selecionada a pose de ligação ao exosítio-II enquanto para

os de dezesseis resíduos selecionou-se a pose com ligação em ponte entre o exossítio-II e a AT-III.

A análise das trajetórias de DM de todos os ligantes, Figura 34, mostrou uma característica semelhante entre eles, os quais permanecem ligados ao sítio do *docking* durante toda a trajetória, com somente diferenças observadas em SGAL-16, que apresentou maior flutuação. Esse ligante apresentou certa movimentação em seu RMSD, além de um pico próximo ao resíduo 512 da THR, resíduo este pertencente a um loop adjacente ao sítio transitório.

Os resultados da DM, representados pela Figura 34 nos gráficos de RMSD e RMSF, mostram que a HEP-16 apresenta alta estabilidade, contribuindo para a estabilização do complexo como um todo. Esta observação é corroborada pela análise da energia livre de ligação do complexo, que apresentou maior energia em comparação com todos os ligantes analisados.

Isto pode ser explicado com a ausência de grupos sulfato nos resíduos intermediários da molécula. Essa ausência pode facilitar a ocorrência de interações intra e intermoleculares de menor energia. Essa maior estabilidade do complexo com HEP-16 pode ser correlacionada a ocorrência de certos efeitos do fármaco, como a extrema anticoagulação, acarretando conhecidos efeitos adversos de sangramento da heparina. Já as sulfatações dos resíduos intermediários de SGAL-16 podem impedir essa estabilização do complexo, tornando essa estrutura menos estável e acarretando o melhor perfil anticoagulante do mecanismo de ponte dessa molécula. Estudos anteriores já demonstraram que a molécula derivada da espécie *E. Lucunter* apresenta um perfil anticoagulante superior em comparação com outras moléculas sulfatadas de origem marinha. Ensaios *in vitro* e *in vivo* confirmaram sua maior eficácia em relação a compostos extraídos de outros organismos da fauna e marinha (VASCONCELOS *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos reforçaram a importância das características estruturais desses carboidratos, como o tamanho e o padrão de sulfatação único de cada molécula na modulação das interações com proteínas envolvidas nos processos de coagulação. Interações estas essenciais para a modulação da atividade anticoagulante destas moléculas. Conforme mostrado em estudos anteriores com diferentes moléculas sulfatadas de origem marinha, as diferentes estruturas com conformações de sulfatação distintas, apresentaram dinâmicas de ligação diferentes (BECKER *et al.*, 2007; QUEIROZ, VILELA e POMIN, 2016).

As análises das simulações de DM revelaram que todos os ligantes analisados permaneceram ligados aos sítios de ligação durante toda a trajetória da DM, porém com diferenças nas estabilidades de ligação. O análogo de heparina, HEP-16 apresentou maior estabilidade estrutural ao complexo THR-ATIII, o que pode ser correlacionado à formação de interações intermoleculares favoráveis à um perfil energético mais estável.

A menor estabilidade do complexo com SGAL-16 em comparação com HEP-16, pode ser correlacionado às sulfatações nos resíduos intermediários que impedem a formação dessa estabilidade. Pode-se correlacionar esses resultados ao melhor perfil anticoagulante já demonstrado da galactana sulfatada em testes *in vitro* e *in vivo*. Estudos anteriores com essas moléculas, apresentaram resultados que podem ser relacionados a menores efeitos colaterais, especialmente a anticoagulação excessiva que pode acarretar sangramento aos usuários de heparina (VASCONCELOS, 2018).

No contexto dos polissacarídeos sulfatados analisados, a hipótese de que a estrutura do  $\alpha$ -L-galactana 2-sulfatado (SGAL-16) pode ser explorada como base para novos agentes anticoagulantes é particularmente promissora. Sua capacidade de formar ligação no mecanismo de ponte entre os sítios de ligação-chave diferentes da heparina, sugere um mecanismo diferenciado de ação que pode ser explorado no desenvolvimento de fármacos mais eficazes e seguros.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1. CONCLUSÕES

A análise dos polissacarídeos galactana sulfatada (SGAL-16) e heparina (HEP-16), ambos com dezesseis resíduos, evidenciou o potencial de formação de interações em ponte com os sítios de ligação na formação do complexo ternário THR-ligante-AT, embora com preferências distintas. Enquanto HEP-16, análogo da heparina, mostrou afinidade pelo exosítio-II, sem estabelecer ponte com o sítio transitório, SGAL-16, caracterizada por um padrão repetitivo de sulfatação, especialmente em sua segunda conformação representativa, pode percorrer na forma de ponte entre o sítio transitório e o exosítio-II. Essas observações sugerem um mecanismo de ação da galactana sulfatada semelhante ao da heparina, embora envolvendo resíduos distintos no processo de interação intermolecular e na formação dos complexos moleculares.

Além disso, os resultados evidenciaram a elevada estabilidade da pose de ligação da heparina na conformação em ponte entre AT e THR. As variações conformacionais do complexo AT/THR permitiram a identificação dos principais sítios de ligação dos polissacarídeos e dos resíduos essenciais para as interações intermoleculares. Esses achados podem contribuir para a compreensão do efeito anticoagulante mais potente da heparina em comparação à  $\alpha$ -L-galactana 2-sulfatada.

Dessa forma, este estudo aprofunda o entendimento das interações moleculares entre polissacarídeos sulfatados e proteínas reguladoras da coagulação, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de anticoagulantes baseados em polissacarídeos modificados estruturalmente, com potencial aplicação no desenvolvimento de novos fármacos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 7.1 OBRAS CITADAS

AL NAHAIN, A.; IGNJATOVIC, V.; MONAGLE, P.; TSANAKTSIDIS, J.; FERRO, V. Heparin mimetics with anticoagulant activity. *Medicinal Research Reviews*: v. 38, n. 5, p. 1582-1623, 2018.

ALVES, V. M.; BRAGA, R. C.; MURATOV, E. N.; ANDRADE, C. H. Quimioinformática: uma introdução. *Química Nova*: v. 41, n. 2, p. 200–209, 2018.

AL-KOUSSA, H.; ALZAIM, I.; EL-SABBAN, M. E. Pathophysiology of coagulation and emerging roles for extracellular vesicles in coagulation cascades and disorders. *Journal of Clinical Medicine*: v. 11, n. 16, p. 4932, 2022.

AMARAL, A. T. do; ANDRADE, C. H.; KÜMMERLE, A. E.; GUIDO, R. V. C. A evolução da química medicinal no Brasil: avanços nos 40 anos da Sociedade Brasileira de Química. *Química Nova*: v. 40, n. 6, p. 694–700, 2017.

BAKER, D.; SALI, A. Protein structure prediction and structural genomics. *Science*: v. 294, n. 5540, p. 93-96, 2001.

BASTOS, L. L.; FIORINI, G. Re-docking Molecular Utilizando o PyMOL e AutoDock VINA. *Bioinfo*: v. 3, p. 21, 2023.

BECKER, C. F.; GUIMARÃES, J. A.; MOURÃO, P. A.; VERLI, H. Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: implications to their anticoagulant activities. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*: v. 26, n. 1, p. 391–399, 2007.

BLAIR, J. A.; MEADE, J. L.; MACDONALD, K. C. et al. Structural insights into the exosites of thrombin: a focus on thrombin exosite one and its role in interactions with fibrinogen. *Blood*: v. 101, p. 3730-3737, 2003.

BORGOMONI, G. B.; MEJIA, O. A. V.; ORLANDI, B. M. M.; et al. Impacto atual da circulação extracorpórea na cirurgia de revascularização miocárdica no Estado de São Paulo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*: v. 115, n. 4, p. 595-601, 2020.

BRANDÃO, G. M. S. et al. Anticoagulantes orais diretos para o tratamento da trombose venosa profunda: revisão de revisões sistemáticas. *Jornal Vascular Brasileiro*: v. 17, n. 4, p. 310–317, out. 2018.

CAMIRE, R. M. New Advances Along the Common Coagulation Pathway. *Blood*: v. 132, supl. 1, p. SCI-44, 2018.

CASE, D. A. et al. Amber 2023. University of California, San Francisco, 2023.

CASE, D. A. et al. Amber Tools. *Journal of Chemical Information and Modeling*: v. 63, p. 6183-6191, 2023.

CAVELL, M.; SCHILLING, J.; VASCONCELOS, M. Ligand-receptor interactions in drug design: An overview. *Journal of Medicinal Chemistry*: v. 63, n. 10, p. 4474-4488, 2020.

CAZALS, F.; TETLEY, R. Characterizing molecular flexibility by combining least root mean square deviation measures. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*: v. 87, n. 5, p. 356-368, 2019.

CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*: v. 29, n. 1, p. 17-24, 2015.

CHEE, Y. L. Coagulation. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*: v. 44, n. 1, p. 42-45, 2014.

CHERKASOV, A. et al. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? *Journal of Medicinal Chemistry*: v. 57, n. 12, p. 4977-5010, 2014.

CLARK, M. A.; DOUGLAS, M.; CHOI, J. *Biology 2e*. Houston: OpenStax, 2018.

CONNOLLY, S. J.; SHARMA, M.; COHEN, A. T.; DEMCHUK, A. M.; CZŁONKOWSKA, A.; LINDGREN, A. G.; MOLINA, C. A.; BERECZKI, D.; TONI, D.; SEIFFGE, D. J.; TANNE, D.; SANDSET, E. C.; TSIVGOULIS, G.; CHRISTENSEN, H.; BEYER-WESTENDORF, J.; COUTINHO, J. M.; CROWTHER, M.; VERHAMME, P.; AMARENCO, P.; ROINE, R. O.; ANNEXA-I INVESTIGATORS. Andexanet for Factor Xa Inhibitor-Associated Acute Intracerebral Hemorrhage. *The New England Journal of Medicine*, Boston, v. 390, n. 19, p. 1745–1755, 2024.

COUTINHO, N. D.; CAMARGO, L. T. F. M.; CAMARGO, A. J. Fundamentos da Dinâmica Molecular Ab Initio. *Revista Processos Químicos*: v. 17, n. 33, p. 39-48, 2023.

DAVIE, E. W.; KULMAN, J. D. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin Thromb Hemost*: v. 32, Suppl. 1, p. 3-15, 2006.

DE MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. Selection-Insertion Schemes in Genetic Algorithms for the Flexible Ligand Docking Problem. *Lect. Notes Comput. Sci*: v. 3102, p. 368-379, 2004.

DE VIVO, M.; MASETTI, M.; BOTTEGONI, G.; CAVALLI, A. Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*: v. 59, n. 9, p. 4035-4061, 2016.

DI CERA, E. Thrombin Review. *Molecular Aspects of Medicine*: v. 29, p. 203-254, 2008.

DINISIO, M.; MIDDELDORP, S.; BULLER, H. R. Direct thrombin inhibitors. *New England Journal of Medicine*: v. 353, n. 10, p. 1028-1040, 2005.

DJINOVIC-CARUGO, K.; CARUGO, K. O. Missing strings of residues in protein crystal structures. *Intrinsically Disord Proteins*: v. 3, n. 1, p. 1095697, 2015.

DREWS, J. Drug discovery: a historical perspective. *Science Translational Medicine*: v. 11, n. 507, p. 3546, 2019.

ESTRY, D. W.; TISHKOFF, G. H. Apparent intrinsic prothrombinase activity of human factor X zymogen: Identification with factor VIII inhibitor by passing activity (FEIBA). *Thrombosis Research*: v. 36, n. 6, p. 549–562, 1984.

FADDA, E. Molecular simulations of complex carbohydrates and glycoconjugates. *Current Opinion in Chemical Biology*: v. 69, p. 102175, 2022.

FELTES, C. B.; MAGALHÃES, C. S.; STAATS, C. C.; JUNQUEIRA, D. M.; BONATTO, D.; YATES, E. A.; CUSTÓDIO, F. L.; SILVA, F. R.; MALUF, F. V.; OLIVA, G.; ROCHA, G. K.; MORAIS, G. L.; NADER, H. B.; VERLI, H.; GUEDES, I. A.; TERSARIOL, I. L. S.; MUNIZ, J. R. C.; POLONI, J. F.; DARDENNE, L. E.; LIMA, L. M. T. R.; LIMA, M. A.; ALMEIDA, M. S.; CAPRILES, P. V. S. Z.; TREVIZANI, R.; GUIDO, R. V. C.; BRAUN, R. L.; MARGIS, R.; CORDEIRO, Y. Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular. 1. ed. São Paulo: *Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq*, 2014

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FIGUEIREDO, W. A.; PINTO, A. V.; FREIRE, R. Nomenclatura e classificação de carboidratos. *Química Nova na Escola*: v. 29, n. 2, p. 7-12, 2007.

FLACHSENBERG, F.; EHRT, C.; GUTERMUTH, T.; RAREY, M. Redocking the PDB. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 64, n. 1, p. 219-237, 2024.

GETTINS P. G. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev*: v. 102 p. 4751-4803, 2002

GRYNIUKOVA, A.; KAISER, F.; MYZIUK, I.; ALIEKSIEIEVA, D.; LEBERECHE, C.; HEYM, P. P.; TARKHANOVA, O. O.; MOROZ, Y. S.; BORYSKO, P.; HAUPT, V. J. AI-powered virtual screening of large compound libraries leads to the discovery of novel inhibitors of Sirtuin-1. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 66, n. 15, p. 10241–10251, 2023.

GUEDES, I. A.; PEREIRA, F. S. S.; DARDENNE, L. E. Empirical scoring functions for structure-based virtual screening: applications, critical aspects, and challenges. *Frontiers in Pharmacology*: v. 9, p. 1089, 2018.

HIRSH, J.; WARKENTIN, T. E. Heparin and low-molecular-weight heparin: Mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. In:

HOFFMAN, R.; BENNETT, J. S.; SILBERSTEIN, L. E.; HESLOP, H.; MULLAWEITZ, J.; ANASTASI, J. *Hematology: Basic Principles and Practice*: v. 7. ed. Philadelphia: Elsevier, 2023.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, v. 2006.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. Fundamentos em hematologia. In: Tradução e revisão técnica. Renato Failace. 6. ed. Dados eletrônicos. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HUNTINGTON, J.; READ, R.; CARRELL, R. Structure of a serpin–protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*: v. 407, p. 923–926, 2000.

HSU, E.; MOOSAVI, L. Biochemistry, Antithrombin III. 2021. In: *StatPearls.Treasure Island (FL)*: StatPearls Publishing; 2022.

KRYSHTAFOVYCH, A.; SCHWEDE, T.; TOPF, M.; FIDELIS, K.; MOULT, J. Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP) - Round XIII. *Proteins*: v. 87, n. 12, p. 1539-1549, 2023

IUPAC International Union Of Pure And Applied Chemistry; International Union Of Biochemistry And Molecular Biology; Joint Commission On Biochemical Nomenclature.. Nomenclature of carbohydrates (Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry*: v. 68, n. 10, p. 1919-2008, 1996. Printed in Great Britain.

JIN, N. Z.; GOPINATH, S. C. B. Potential blood clotting factors and anticoagulants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*: v. 84, p. 356–365, 2016.

JO, S.; KIM, T.; IYER, V. G.; IM, W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*: v. 29, n. 11, p. 1859–1865, 2008.

JORGENSEN, W. L. Efficient drug lead discovery and optimization. *Accounts of Chemical Research*: v. 42, n. 6, p. 724-733, 2009.

KOMIVES, E. A. Dynamic allostery in thrombin—a review. *Frontiers in Molecular Biosciences*: v. 10, 2023.

LAVECCHIA, A.; DI GIOVANNI, C. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. *Current medicinal chemistry*: v. 20, n. 23, p. 2839-2860, 2013.

LAFIFI, Z.; BJIJ, I.; SOLIMAN, M. E. S. Covalent flexible peptide docking in drug discovery: current challenges and potential interventions. *Innovative Discoveries*: v. 1, n. 2, p. 15, 2024.

LEE, C. J.; ANSELL, J. E. Direct thrombin inhibitors. *British Journal of Clinical Pharmacology*: v. 72, n. 4, p. 581-592, 2011.

LE GUILLOUX, V.; SCHMIDTKE, P.; TUFFERY, P. Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics*, v. 10, p. 168, 2009.

LEME, L. E. G.; SGUIZZATTO, G. Profilaxia do tromboembolismo venoso em cirurgia ortopédica. *Revista Brasileira de Ortopedia*: v. 47, n. 6, p. 685-693, 2012

LESK, A. M. Introduction to Bioinformatics. 4. ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2014.

LICHOTA, A.; SZEWCZYK, E. M.; GWOZDZINSKI, K. Fatores que afetam a formação e o tratamento da trombose por compostos naturais e sintéticos. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 21, p. 7975, 2020.

LI J.; FU A.; ZHANG, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein-Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdiscip Sci.* (2):320-328. março, 2019.

LIN, J.; CHEN, S.; ZHANG, C.; LIAO, J.; CHEN, Y.; DENG, S.; MAO, Z.; ZHANG, T.; TIAN, N.; SONG, Y.; ZENG, T. Recent advances in microfluidic technology of arterial thrombosis investigations. *Platelets*: v.35(1), 2024.

LUNDBERG, D.; HEDENMALM, K. Drug development in the era of precision medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*: v. 107, n. 1, p. 50-60, 2020.

MARTIEL, I.; DE LA CRUZ, X. Protein structure determination by X-ray crystallography: Recent advances and applications. *International Journal of Molecular Sciences*: v. 21, n. 22, p. 8499, 2020.

MONTINARI, M. R.; MINELLI, S. From ancient leech to direct thrombin inhibitors and beyond: New from old. *Biomedicine & Pharmacotherapy*: v. 149, 112878, 2022.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem*: v. 19, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular docking. *Methods in Molecular Biology*: v. 443, p. 365-382, 2008.

MULLARD, A. New drugs cost US \$2.6 billion to develop. *Nature Reviews Drug Discovery*: v. 13, p. 877, 2014.

MELO, F. R.; PEREIRA, M. S.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P. A. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides: different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *The Journal of Biological Chemistry*: v. 279, n. 20, p. 20824–20835, 2004.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; da SILVA, C. H. T. P. da. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*: v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.

NIAZI, S. K.; MARIAM, Z. Computer-Aided Drug Design and Drug Discovery: A Prospective Analysis. *Pharmaceuticals*: v. 17, n. 1, p. 22, 2024.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

ODUAH, E. I.; LINHARDT, R. J.; SHARFSTEIN, S. T. Heparin: Past, present, and future. *Pharmaceuticals (Basel)*: v. 9, n. 3, p. 38, 2016.

OLIVEIRA, T. A. de; SILVA, M. P. da; MAIA, E. H. B.; SILVA, A. M. da; TARANTO, A. G. Virtual screening algorithms in drug discovery: a review focused on machine and deep learning methods. *Drugs and Drug Candidates*: v. 2, n. 2, p. 311-334, 2023.

PATEL, A. R.; PATEL, H. B.; MODY, S. K.; SINGH, R. D.; SARVAIYA, V. N.; VAGHELA, S. H.; TUKRA, S. Virtual screening in drug discovery. *Journal of Veterinary Pharmacology and Toxicology*: v. 20, n. 2, p. 1-9, 2021.

PÉREZ, S.; SARKAR, A.; RIVET, A.; BRETON, C.; IMBERTY, A. Glyco3D: a portal for structural glycosciences. *Methods in Molecular Biology*: p. 241–258, 2015.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences, Basel*: v. 20, n. 18, p. 4331, 2019

POMIN, V. H. Marine medicinal glycomics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*: v. 4, p. 5, 2014.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. DE S. Structure versus anticoagulant and antithrombotic actions of marine sulfated polysaccharides. *Revista Brasileira de Farmacognosia*: v. 22, n. 4, p. 921–928, jul. 2012.

PRAJAPAT, D.; GUPTA, S.; TALESARA, G. Significance of Computer Aided Drug Design and 3D QSAR in Modern Drug Discovery. *Journal of Medicinal and Organic Chemistry*: v. 1, p. 1-2, 2017.

QUEIROZ, I. N. L.; VILELA-SILVA, A. C. E. S; POMIN, V. H. Oligosaccharides from the 3-linked 2-sulfated alpha-L-fucan and alpha-L-galactan show similar conformations but different dynamics. *Glycobiology*: v. 26, p. 1-8, 2016.

QUINDERÉ, A.-L. G.; SANTOS, G. R. C.; OLIVEIRA, S.-N. M. C. G.; GLAUSER, B. F.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; BENEVIDES, N. M. B.; POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Is the antithrombotic effect of sulfated galactans independent of serpin? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*: v. 11, n. 12, p. 1855–1867, 2013.

RASKOB, G. E.; ANGCHAIKSUKSIRI, P.; BLANCO, A. N.; BULLER, H.; GALLUS, A.; HUNT, B. J.; HYLEK, E. M.; KAKKAR, A.; KONSTANTINIDES, S. V.; MCCUMBER, M.; OZAKI, Y.; WENDELBOE, A.; WEITZ, J. I.; ISTH STEERING COMMITTEE FOR WORLD THROMBOSIS DAY. Thrombosis: a major contributor to global disease burden. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*: v. 34, n. 11, p. 2363–2371, 2014.

REZAIE, A. R.; GIRI H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J Thromb Haemost*: v. 18, p. 3142-3153, 2020.

RODRIGUES, E. S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; COVAS, D. T.; FONTES, A. M. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*: v. 10, p. 218-233, 2012.

ROE, D. R.; CHEATHAM, T. E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *Journal of Chemical Theory and Computation*: v. 9, n. 7, p. 3084-3095, 2013.

ROUDSARI, Z. O.; GHASEMI, H.; KHATAMI, S. H.; KHORSAND, M.; RAHDAN, F.; CHEHRI, D.; SHEYDAEI, O.; AIIASHI, S.; MAHMOUDI, R.; MOVAHEDPOUR, A. Aptamer biosensors for thrombin. *Clinica Chimica Acta*: v. 565, p. 119976, 2025.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). *Química Nova*: v. 25, n. 3, p. 505–512, 2002.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. *Revista Virtual de Química*: v. 1, n. 1, p. 49–57, 2009.

SHAO, J.; TANNER, S. W.; THOMPSON, N.; CHEATHAM, T. E. Clustering Molecular Dynamics Trajectories: one. Characterizing the Performance of Different Clustering Algorithms. *Journal of Chemical Theory and Computation*: v. 3, n. 6, p. 2312–2334, 2007.

SCHMIDTKE, P.; BIDON-CHANAL, A.; LUQUE, F. J.; BARRIL, X. MDpocket: open-source cavity detection and characterization on molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics*: v. 27, n. 23, p. 3276–3285, 2011.

SCHLÖMMER, C.; BRANDTNER, A.; BACHLER, M. Antithrombin and Its Role in Host Defense and Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.*: v. 22(8), p. 4283, 2022.

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE-JR., E. W. Computational methods in drug discovery. *Pharmacological Reviews*: v. 66, n. 1, p. 334–395, 2014.

SMYTHE, M. A.; TRUJILLO, T.; FANIKOS, J. Reversal agents for use with direct and indirect anticoagulants. *American Journal of Health-System Pharmacy*: v. 73, n. 10, Sup. 2, p. 27–48, 2016.

STEWART, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements. *J. Mol. Modeling*: v. 13, p. 1173–1213, 2007.

STEWART, J. J. P. MOPAC 2016. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, 2016.

STEWART, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods VI: More Modifications to the NDDO Approximations and Re-optimization of Parameters. *J. Mol. Mod.*: v. 1, p. 32, 2013.

SILVA, A. P. O.; LIMA, J. P. C.; NASCIMENTO, S. R.; AMORIM, A. T. Anticoagulantes orais: aspectos farmacológicos e monitorização terapêutica. *Research, Society and Development*: v. 11, n. 8, e20911830677, 2022.

SILVA, M. R. M.; NEGREIROS, P. dos S.; SANTOS, P. S. dos. Integrating the use of computational analysis techniques into modern pharmaceutical R&D. *Research, Society and Development*: v. 11, n. 7, 2022.

SOBREIRA, M. L.; MARQUES, M. Á.; PASCHOA, A. F.; RIBEIRO, A. J. A.; CASELLA, I. B.; BURIHAN, M. C.; MATIELO, M. F.; SOARES, R. de A.; ARAUJO, W. J. B. de.; JOVILANO, E. E. & Oliveira, J. C. P. de. Diretrizes sobre trombose venosa profunda da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*: v. 23, p. e20230107, 2024.

SOLOMONS, T. W. G.; FRUHLE, C. B., Química Orgânica, 7ª edição, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., Rio de Janeiro, p. 76-77, 2007.

SALOMON-FERRER, R.; CASE, D. A.; WALKER, R. C. Uma visão geral do pacote de simulação biomolecular Amber. *WIREs Computational Molecular Science*: v. 3, p. 198–210, 2013.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H., MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J. Med. Chem*: 49, 3315–3321. 2006.

TORRES, P. H. M.; SODERO, A. C. R.; JOFILY, P.; SILVA-JR, F. P. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int. J. Mol. Sci*: v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.*: v. 28, p. 455-461, 2009.

TROISI, R.; BALASCO, N.; AUTIERO, I.; VITAGLIANO, L.; SICA, F. Exosite binding in thrombin: a global structural/dynamic overview of complexes with aptamers and other ligands. *International Journal of Molecular Sciences*: v. 22, n. 19, p. 10803, 2021.

TURECEK, P.; VARADI, K.; GRITSCH, H.; SCHWARZ, H. FEIBA: mode of action. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*: v. 10, suppl. 2, p. 3–9, 2004.

VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D.; FREEZE, H. H.; STANLEY, P.; MARTH, J. D.; BERTOZZI, C. R.; HART, G. W.; ETZLER, M. E. Symbol nomenclature for glycan representation. *Proteomics*: v. 9, n. 24, p. 5398–5399, 2009.

VASCONCELOS, A. A.; SUCUPIRA, I. D.; GUEDES, A. L.; QUEIROZ, I. N. L.; FRATTANI, F. S.; FONSECA, R. J.; POMIN, V. H. Anticoagulant and antithrombotic properties of three structurally correlated sea urchin sulfated glycans and their low-molecular-weight derivatives. *Marine Drugs*: v. 16, n. 9, p. 304, 2018.

VERLI, H.; GUIMARÃES, J. A. Insights into the induced fit mechanism in antithrombin-heparin interaction using molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*: v. 24, n. 3, p. 203–212, 2005.

WALKER, C. P. R.; ROYSTON, D. Thrombin generation and its inhibition: a review of the scientific basis and mechanism of action of anticoagulant therapies. *British Journal of Anaesthesia*: v. 88, n. 6, p. 848–863, 2002.

WERMUTH, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. London: Academic Press, 2003.

XMGRACE. XMGRACE: A Data Analysis and Graphing Software. V. 5.1.25, 2023.

YAMADA, T.; KURIHARA, K.; OHNISHI, Y.; TAMADA, T.; TOMOYORI, K.; MASUMI, K.; TANAKA, I.; KUROKI, R.; NIIMURA, N. Neutron and X-ray crystallographic analysis of the human alpha-thrombin-bivalirudin complex at pD 5.0: protonation states and hydration structure of the enzyme-product complex. *Biochim. Biophys. Acta*: v. 1834, p. 1532-1538, 2013.

YANG, Z.; ZENG, X.; ZHAO, Y. AlphaFold2 e suas aplicações nos campos da biologia e da medicina. *Signal Transduction and Targeted Therapy*: v. 8, p. 115, 2023.

YONG, J.; TOH, C. The convergent model of coagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*: v. 22, n. 8, p. 2140-2146, 2024.

## 7.2 OBRAS CONSULTADAS

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; GATTO JR, G. J.; STRYER, L. *Biochemistry*. 8. ed. New York: W.H. Freeman, 2015.

BATISTA, C. Dissacarídeos. Toda Matéria. Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/dissacarideos/>.

CASTRO-ALVAREZ, A.; COSTA, A. M.; VILARRASSA, J. The performance of several docking programs at reproducing protein–macrolide-like crystal structures. *Molecules*: v. 22, n. 1, p. 136, 2017.

FRANCO, R. F. Overview of Coagulation, Anticoagulation and Fibrinolysis. *Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: Hemostasia e Trombose*: v. 34, p. 229-237, 2001.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. *Fundamentos em hematologia*. Tradução e revisão técnica: Renato Failace. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. Dados eletrônicos.

KUBINYI, H. QSAR and 3D QSAR in drug design part 1: methodology. *Drug Discovery Today*: v. 2, n. 11, p. 457-467, 1997.

PINHEIRO, A. A.; HASSUNUMA, R. M. *Trombina: precursores, ligantes e inibidores*. Bauru: Canal 6, 2018. 56 f.

VERLI, H. *Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular*. 1. ed. Porto Alegre: Bookman, 2014.

VEMULA, D.; JAYASURYA, P.; SUSHMITHA, V.; KUMAR, Y. N.; BHANDARI, V. CADD, AI and ML in drug discovery: a comprehensive review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*: v. 181, p. 106324, 2023.

WEITZ, J. I. Emerging anticoagulants for the treatment of venous thromboembolism. *Thrombosis and Haemostasis*: v. 96, p. 274-284, 2006.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia molecular básica* [recurso eletrônico]. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. ISBN 978-85-8271-058-6.

## 8. APÊNDICE

### 8.1 ARTIGO PUBLICADO

MENDES, G. E. M.; MAIO, A. R.; OLIVEIRA, G. S. R.; ROSA, L. C.; COSTA, L. C.; OLIVEIRA, L. C. V.; FREITAS, M. S.; SILVA, R. C.; GALVAO, R. M. S.; COUTINHO, R. C.; SANTOS, T. C. R.; CARVALHO, T. S.; LIMA, V. H. S.; BELLO, M. L. Biomolecular conformational changes and transient druggable binding sites through full-length AMPK molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*: v. 138, 109039, 2025.