

JULIANA CURI MARTINICHEN



**PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICAS DE
POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS DE LIQUENS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

CURITIBA

2005

JULIANA CURI MARTINICHEN

**PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICAS DE
POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS DE LIQUENS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Iacomini

Co-orientador: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

CURITIBA

2005

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

Ao meu grande amor Francisco

AGRADECIMENTOS

Ao Francisco pelo amor, apoio, carinho, paciência, respeito, amizade, incentivo e compreensão em todos os momentos.

A Deus pela graça da vida e sua presença.

Aos meus pais Moacir e Tânia e irmãos, Alessandra, Leonardo e Daniel pelo amor, paciência e ajuda.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela oportunidade, estímulo, confiança, amizade e exemplo de pesquisador.

Ao Prof. Dr. Philip Albert James Gorin pelo apoio, amizade e exemplo.

A coordenação do curso de Pós Graduação em Bioquímica

Às Professoras Leda e Fany Reicher por lutarem pelos nossos interesses como alunos.

A minha amiga e pesquisadora Elaine R. Carbonero, por me ajudar sempre em tudo que precisei e por ser um exemplo de dedicação à ciência.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Ao Dr. Giangiacomo Torri, pelas análises dos polissacarídeos sulfatados.

Ao Prof. Dr. Mauro Pavão e as alunas Juliana e Patrícia Zancan, (Departamento do tecido conjuntivo – UFRJ) por transmitir seus conhecimentos quanto à realização dos experimentos em ratos e mecanismo de ação das moléculas testadas neste trabalho.

Ao meu colega Wellington pelo auxílio na análise estatística.

As Professoras Nadir Marcondes e Nereida Gioppo coordenadoras do curso de Farmácia da UNIOESTE, pelo apoio.

A Prof^a. Veridiana Lenartovicz (UNIOESTE), por sua amizade, incentivo e ajuda durante os anos de 2002 a 2005.

Ao Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki, pelos metilados e análises de RMN de C¹³

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

As minhas amigas Elaine, Lucimara e Caroline pela grande ajuda no envio e correção dos artigos encaminhados as revistas.

Aos meus amigos Ana Helena, Caroline, Cíntia, Clarice, Elaine, Fernanda, Lucimara, Paula, Ricardo, Roseane, pelos ótimos momentos que passamos juntos.

Aos colegas de laboratório Adriano, Andréia, Lauro, Patrícia, Rodrigo Reis, Rodrigo, Selene e Thales.

Ao alunos de iniciação científica: Fernanda, Dirce, Eduardo e Breno.

À Sra. Marilza e Srta Nanci, pelo auxílio prestado

Às bibliotecárias do Setor de Ciências Biológicas pela colaboração.

Aos laboratórios de Química de Carboidratos vegetais, de Oxidações biológicas pelo livre acesso e empréstimo de materiais e equipamentos.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas, em especial ao Luiz e Cândido pelo auxílio com os animais.

Ao CNPQ e Pronex-Carboidratos pelo auxílio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 LIQUENS.....	1
1.1.1 Aspectos Gerais.....	1
1.1.2 Constituintes Químicos dos Liquens.....	2
1.1.2.1 Polissacarídeos de liquens.....	3
1.1.3 Ações Biológicas de Polissacarídeos de Liquens.....	5
1.2 HEMOSTASIA.....	7
1.3 COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	8
1.3.1 Regulação da Coagulação Sanguínea.....	12
1.3.1.1 Inibidor da via do fator tissular (TFPI).....	12
1.3.1.2 Antitrombina (AT).....	13
1.3.1.3 Proteína C (PC).....	14
1.3.1.4 Cofator II da heparina (HC II).....	15
1.3.1.5 Outros inibidores da coagulação sanguínea.....	17
1.4 FIBRINÓLISE.....	17
1.5 AGENTES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICOS.....	19
1.5.1 Heparina.....	19
1.5.1.1 Heparina não fracionada (UFH).....	20
1.5.1.2 Heparina de Baixa Massa Molar (HBMM).....	28
1.5.3 Outros Agentes Anticoagulantes.....	29
1.6 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	30
1.7 JUSTIFICATIVAS.....	34
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 REAGENTES.....	36
3.2 POLISSACARÍDEOS EM ESTUDO.....	36
3.2.1 Galactoglucomanana Sulfatada do Líquen <i>Cladonia ibitipocae</i> (GGM-SO ₄).....	37
3.2.2 β -glucana (1 \rightarrow 6) do líquen <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	37
3.3 OBTENÇÃO DA β -GLUCANA (1 \rightarrow 6) DO LÍQUEN <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	37
3.3.1 Coleta do Líquen.....	37
3.3.2 Extração e Purificação da β -glucana (1 \rightarrow 6).....	37
3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DA β -GLUCANA (1 \rightarrow 6) e β -GLUCANA (1 \rightarrow 6) SULFATADA.....	38
3.4.1 Determinação da Composição Monossacarídica.....	38
3.4.2 Metilação.....	38

3.4.3 Métodos Espectroscópicos.....	39
3.4.3.1 Espectroscopia de ressonância nuclear de carbono 13 (RMN ¹³ C).....	39
3.5 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA DA β-GLUCANA	
(1→6).....	39
3.5.1 Reação de Sulfatação com 6 mols de Ácido Clorosulfônico/ OH livre.....	40
3.5.2 Reação de Sulfatação com 10 mols de Ácido Clorosulfônico/ OH livre.....	40
3.6 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (D.S.).....	41
3.7 ESTUDOS ANTICOAGULANTES <i>in vitro</i>	42
3.7.1 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT).....	42
3.7.2 Tempo de Trombina (TT).....	43
3.7.3 Tempo de Protrombina (PT).....	43
3.7.4 Inibição da Trombina (IIa) pelo Cofator II da Heparina ou Antitrombina (AT).....	44
3.7.4.1 Inibição da trombina (IIa) pelo cofator II da heparina.....	44
3.7.4.2 Inibição da trombina (IIa) pela antitrombina.....	44
3.7.4.3 Inibição da Trombina (IIa) na presença da β-G-S ₂ e ausência de inibidor.....	45
3.8 ANIMAIS.....	45
3.9 DETERMINAÇÃO DO APTT <i>ex vivo</i>	45
3.10 TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS.....	46
3.11 MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS.....	49
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 β-GLUCANA (1→6) DO LÍQUEN <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	51
4.1.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA β-GLUCANA (1→6) NATIVA DO LÍQUEN <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	51
4.1.2 SULFATAÇÃO QUÍMICA DA β-GLUCANA (1→6) NATIVA (β-G) E DETERMINAÇÃO DOS GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO (D.S.) DOS DERIVADOS SULFATADOS β-G-S ₁ E β-G-S ₂	53
4.1.3 ANÁLISE DE RMN ¹³ C DA β-G-S ₂ OBTIDA DO LÍQUEN <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	56
4.1.4 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA β-G-S ₂ OBTIDA DO LÍQUEN <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	57
4.1.5 TESTES DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>in vitro</i>	58
4.1.6 DETERMINAÇÃO DO APTT <i>ex vivo</i>	70
4.1.7 TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS.....	80
4.1.8 TEMPO DE SANGRAMENTO.....	89
4.1.9 INIBIÇÃO DA TROMBINA (IIa) PELO COFATOR II DA HEPARINA OU ANTITROMBINA (AT) NA PRESENÇA DA β-G-S ₂	91
4.2 GALACTOGLUCOMANANA SULFATADA DO LÍQUEN <i>Cladonia ibitipocae</i> (GGM-SO ₄).....	96
4.2.1 TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS DA GGM-SO ₄	97
4.2.2 TEMPO DE SANGRAMENTO DA GGM-SO ₄	100
5. CONCLUSÕES.....	103

REFERÊNCIAS	105
APENDICE - 1	126
APENDICE - 2	127

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA.....	10
FIGURA 2 – MECANISMO DE INIBIÇÃO DA TROMBINA PELA ANTITROMBINA NA PRESENÇA DE HEPARINA.....	22
FIGURA 3 – MECANISMO DE INIBIÇÃO DO FATOR Xa PELA ANTITROMBINA NA PRESENÇA DE HEPARINA.....	23
FIGURA 4 – SEQUÊNCIA DE LIGAÇÃO DA HEPARINA A ANTITROMBINA.....	24
FIGURA 5 – ESQUEMA DA DETERMINAÇÃO DO APTT <i>ex vivo</i> EM RATOS.....	47
FIGURA 6 – ESQUEMA DA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS.....	48
FIGURA 7 – ESQUEMA DO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS.....	50
FIGURA 8 – ESQUEMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA β -GLUCANA (1→6) DO LÍQUEN <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	52
FIGURA 9 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA β -GLUCANA (1→6) NATIVA DO LÍQUEN <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	53
FIGURA 10 – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA β -G-S ₂ DO LÍQUEN <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	56
FIGURA 11 – ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO APTT NO PLASMA HUMANO NORMAL β -G-S ₂ E HEPARINA.....	63
FIGURA 12 – ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO TT NO PLASMA HUMANO NORMAL CONTENDO A β -G-S ₂ E HEPARINA.....	64
FIGURA 13 – ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO PT NO PLASMA HUMANO NORMAL CONTENDO A β -G-S ₂ E HEPARINA.....	65
FIGURA 14 – APTT <i>ex vivo</i> da β -G-S ₂ EM RATOS APÓS 5 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO.....	73
FIGURA 15 – APTT <i>ex vivo</i> da HEPARINA EM RATOS APÓS 5 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO.....	74
FIGURA 16 – APTT <i>ex vivo</i> DETERMINADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA β -G-S ₂	77
FIGURA 17 – APTT <i>ex vivo</i> DETERMINADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA HEPARINA PADRÃO (140 USP/mg).....	79
FIGURA 18 – EFEITO DA β -G-S ₂ E HEPARINA NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE INDUZIDA EM RATOS APÓS 5 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO.....	83
FIGURA 19 – EFEITO DA β -G-S ₂ NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS APÓS 10 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO.....	85
FIGURA 20 – EFEITO DA β -G-S ₂ NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS APÓS 15 MINUTOS DE	

CIRCULAÇÃO.....	86
FIGURA 21 – EFEITO DA β -G-S ₂ NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS APÓS 30 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO.....	87
FIGURA 22 – EFEITO DA β -G-S ₂ NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS APÓS 60 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO.....	88
FIGURA 23 – EFEITO DA β -G-S ₂ E HEPARINA NO TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS	90
FIGURA 24 – EFEITO DA β -G-S ₂ NA INIBIÇÃO DA TROMBINA PELA ANTITROMBINA E COFATOR II DA HEPARINA.....	94
FIGURA 25 – EFEITO DA β -G-S ₂ NA INIBIÇÃO DA TROMBINA NA AUSÊNCIA DOS INIBIDORES ANTITROMBINA E COFATOR II DA HEPARINA	96
FIGURA 26 – EFEITO DA GGM-SO ₄ , E HEPARINA NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE INDUZADA EM RATOS.....	99
FIGURA 27 – EFEITO DA GGM-SO ₄ E HEPARINA NO TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS.....	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (D.S.) E PORCENTAGEM DE ENXOFRE (%S) DA β -G-S ₁ e β -G-S ₂ OBTIDA DO LÍQUEN <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	55
TABELA 2 - ANÁLISE DOS O-METIL ACETATO DA β -GLUCANA (1→6) NATIVA E DA β -G-S ₂ OBTIDA DO LÍQUEN <i>Parmotrema mantiqueirense</i>	57
TABELA 3 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO APTT, TT E PT NO PLASMA HUMANO NORMAL CONTENDO A β -GLUCANA NATIVA (β -G), β -G-S ₁ E HEPARINA.....	60
TABELA 4 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO APTT, TT E PT NO PLASMA HUMANO NORMAL CONTENDO A GLUCANA NATIVA (β -G), β -G-S ₂ E HEPARINA.....	62
TABELA 5 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO APTT NO PLASMA HUMANO NORMAL INCUBADO EM DIFERENTES TEMPOS (5, 10, 15, 20 e 30 minutos) COM A β -G-S ₂	67
TABELA 6 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO TT NO PLASMA HUMANO NORMAL INCUBADO EM DIFERENTES TEMPOS (5, 10, 15, 20 e 30 minutos) COM A β -G-S ₂	68
TABELA 7 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO APTT e TT NO PLASMA DE RATOS CONTENDO A β -G-S ₂	69
TABELA 8 - APTT <i>ex vivo</i> da β -G-S ₂ E HEPARINA EM RATOS.....	71
TABELA 9 - RAZÃO APTT <i>ex vivo</i> da β -G-S ₂ E HEPARINA EM RATOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE.....	72
TABELA 10 - APTT <i>ex vivo</i> DETERMINADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE β -G-S ₂	76
TABELA 11 - APTT <i>ex vivo</i> DETERMINADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA HEPARINA PADRÃO.....	78
TABELA 12 - EFEITO DA β -G-S ₂ , E HEPARINA NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE INDUZIDA EM RATOS APÓS 5 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO.....	82
TABELA 13 - EFEITO DA β -G-S ₂ E HEPARINA NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS APÓS 10, 15, 30 e 60 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO.....	84
TABELA 14 - β -G-S ₂ E HEPARINA NO TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS...	91
TABELA 15 - EFEITO DA β -G-S ₂ NA INIBIÇÃO DA TROMBINA PELA ANTITROMBINA E COFATOR II DA HEPARINA.....	93
TABELA 16 - EFEITO DA β -G-S ₂ NA INIBIÇÃO DA TROMBINA NA AUSÊNCIA DOS INIBIDORES ANTITROMBINA E COFATOR II DA HEPARINA.....	95
TABELA 17 - EFEITO DA GGM-SO ₄ E HEPARINA NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE INDUZIDA EM RATOS.....	98
TABELA 18 - EFEITO DA GGM-SO ₄ E HEPARINA NO TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ - deslocamento químico
ACT - tempo de coagulação ativado
ADP - adenosina difosfato
APC - proteína C ativada
APTT - tempo de tromboplastina parcial ativado
AT - antitrombina
 β -G-S₁ - β - glucana sulfatada S₁
 β -G-S₂ - β - glucana sulfatada S₂
CH₃I - iodeto de metila
D.S. - grau de substituição
Da - Dalton
EPCR - receptor endotelial de proteína C
EPS - exopolissacarídeo
FP-3 - fator plaquetário 3
FP-4 - fator plaquetário 4
GGM-SO₄ - galactoglucomanana sulfatada
HBMM - heparina de baixa massa molar
HBMMs - heparinas de baixa massa molar
HC II - cofator II da heparina
HMWK - cininogênio de alto peso molecular
Ig G - imunoglobulina G
IIa - fator II ativado ou trombina
IXa - fator IX ativado
NaBH₄ - borohidreto de sódio
PAI - inibidor do ativador de plasminogênio
PAI 1 - inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PAI 2 - inibidor do ativador de plasminogênio tipo 2
PBS - solução salina tamponada

PC - proteína C
PT - tempo de protrombina
RMN ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono treze
SNAC - N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprilato
SO₂ - dióxido de enxofre
TAFI - inibidor da fibrinólise ativado pela trombina
TCA - ácido tricloroacético
TF - fator tissular
TFA - ácido trifluoroacético
TFPI - inibidor da via do fator tissular
THI - trombocitopenia heparina induzida
THI I - trombocitopenia heparina induzida tipo I
THI II - trombocitopenia heparina induzida tipo II
TT - tempo de trombina
UFH - heparina não fracionada
Va - fator V ativado
VIIa - fator VII ativado
VWF - fator de Von Willebrand
Xa - fator X ativado
XIa - fator XI ativado
XIIa - fator XII ativado
XIIIa – fator XIII ativado

RESUMO

Uma β -glucana (1 \rightarrow 6) foi obtida através de extração alcalina do líquen *Parmotrema mantiqueirense* Hale e sulfatada, utilizando 6 e 10 mols de ácido clorosulfônico por OH livre da molécula. Os derivados sulfatados resultantes apresentaram grau de substituição (D.S) de 0,63 e 1,95, sendo denominados de β -G-S₁ e β -G-S₂, respectivamente. A atividade anticoagulante da molécula nativa e das moléculas sulfatadas β -G-S₁ e β -G-S₂, foi determinada *in vitro* através dos testes tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT), tempo de trombina (TT) e tempo de protrombina (PT), usando um "pool" de plasma humano normal e comparado com heparina de mucosa intestinal (140 USP/mg). Os derivados β -G-S₁ e β -G-S₂ prolongaram o tempo de coagulação nos testes APTT e TT de uma maneira dose-dependente e não apresentaram ação no teste PT. A melhor ação anticoagulante *in vitro* foi observada para a molécula com maior grau de sulfatação, β -G-S₂. Estudos de metilação demonstraram que a β -G-S₂ apresenta-se sulfatada principalmente nas hidroxilas dos carbonos C-2 e C-4. As propriedades antitrombóticas realizadas *in vivo* para a β -G-S₂ foram determinadas usando um modelo de trombose venosa estase-induzida em ratos, a dose de 0,5 mg/kg inibiu totalmente a formação do trombo. A ação anticoagulante *in vivo* foi determinada através do APTT ex vivo em plasma de ratos. Na dose de 500 μ g/kg, o tempo de sangramento aumentou 48,4% em relação ao controle. A habilidade da β -G-S₂ em inibir a trombina através do cofator II da heparina ou antitrombina foi determinada através de ensaios de atividade amidolítica, constatou-se que a β -G-S₂ é um inibidor direto da trombina e que seu efeito é potencializado principalmente pela antitrombina. Também foi estudada a atividade de uma galactoglucomanana sulfatada do líquen *Cladonia ibitipocae* com D.S. 1,29 (GGM-SO₄), a qual foi avaliada através do modelo de trombose venosa estase-induzida e tempo de sangramento em ratos com o objetivo de verificar o potencial antitrombótico e risco de sangramento, respectivamente. O tratamento dos ratos com a GGM-SO₄, diminuiu a massa do trombo formado de uma maneira dose-dependente. A dose de 2 mg/kg impede completamente a formação do trombo e causa um aumento no tempo de sangramento. Os resultados obtidos demonstram que os polissacarídeos de líquens quando sulfatados, são promissores agentes anticoagulantes e antitrombóticos.

ABSTRACT

A (1→6)-linked β -glucan was isolated from the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale and was sulfated with 6 and 10 mols/ chlorosulfonic acid/OH free. The sulfated polysaccharides were β -G-S₁ and β -G-S₂ having degrees of substitution (D.S) of 0.63 and 1.95, respectively. β -G-S₁ and β -G-S₂ were evaluated by the classical coagulation assays, activated partial thromboplastin (APTT), thrombin time (TT) and prothrombin time (PT), and compared with porcine intestinal mucosa heparin (140 USP units/mg). β -G-S₁ and β -G-S₂ prolonged APTT and TT in a concentration-dependent manner but were inactive with PT. The best *in vitro* activity was observed for β -G-S₂. Methylation analysis of β -G-S₂, demonstrated that sulfate groups were present principally in the OH-groups at C-2 and C-4. The *in vivo* antithrombotic properties of β -G-S₂ were determined using a stasis thrombosis model in Wistar rats, with an intravenous administration of 0.5 mg/Kg body weight totally inhibiting thrombus formation. The *in vivo* anticoagulant action was determined by APTT *ex vivo* in rats. The tail transection bleeding time, was 48.4% higher than that of the control at 500 μ g/kg. The ability of the β -G-S₂ inactivated thrombin by heparin cofactor II or antitrombin was evaluated using experiments based on amidolytic activity, the β -G-S₂ being a direct inhibitor of thrombin, and this effect was potentially and principally by antitrombin.

A chemically sulfated galactoglucomannan from the lichen *Cladonia ibitipocae* (GGM-SO₄), having D.S. of 1.29 was investigated using a stasis thrombosis model and a tail transection bleeding time in rats to verify the antithrombotic efficiencies and risk of bleeding, respectively. Intravenous administration of 2 mg/kg body weight of GGM-SO₄ totally inhibiting thrombus formation. It caused dose-dependent increases in its tail transection bleeding time. The results obtained showed that the sulfated lichen polysaccharides were promising anticoagulant and antithrombotic agents.

1. INTRODUÇÃO

1.1 LIQUENS

1.1.1 Aspectos Gerais

Os líquens são organismos simbióticos de crescimento lento, constituídos de um fungo e uma alga (OLAFSDOTTIR e INGÓLFSDOTTIR, 2001). A alga e o fungo crescem juntos resultando na formação do talo liquênico, o qual não possui semelhança com a alga ou com o fungo quando cultivados separadamente (HALE, 1979). O talo liquênico é constituído em sua maior parte pelas hifas do fungo (micobiontes) e pelos filamentos da alga (ficobionte ou fotobionte) em menor proporção; apresenta uma forma definida que pode ser crustosa, foliosa ou fruticosa (JOLY, 1975; AHMADJIAN e HALE, 1993).

O talo dos fungos liquenizados consiste de um córtex, uma medula e uma camada fotobionte (camada de algas), o córtex protege a camada de algas do ressecamento e da iluminação excessiva, enquanto que a medula facilita a troca gasosa (AHMADJIAN, 1993).

As espécies de fungos mais freqüentes observadas em líquens pertencem às classes Ascomycetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos (CANAANI et al., 1984). Quanto aos fotobiontes, aproximadamente 40 gêneros de algas verdes e cianobactérias já foram descritos como fotobiontes liquênicos, dentre os mais freqüentes estão as clorófitas do gênero *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Cocomyxa* e *Dictyochloropsis* e as cianobactérias do gênero *Nostoc*, *Scytonema*, *Stigonema*, *Gloeocapsa* e *Calothrix* (FRIEDL e BÜDEL, 1996).

Os líquens são principalmente epífitas, mas algumas espécies desenvolvem-se diretamente sobre o solo (JOLY, 1975). Também podem ser encontrados em condições inóspitas, tais como rochas, regiões subárticas e em regiões polares além de troncos de árvores (GORIN et al., 1993). A sua excepcional resistência a variações de

temperatura, que pode abranger um intervalo de - 70 até 50°C é uma característica inerente a esses organismos (XAVIER-FILHO e RIZZINI, 1976).

Devido à excreção de certos ácidos orgânicos (ácidos liquênicos), os líquens são elementos importantes na desagregação de rochas (JOLY, 1975). As diferentes sensibilidades dos líquens ao dióxido de enxofre (SO₂), dióxido de nitrogênio (NO₂) e ozônio (O₃) e sua habilidade para absorver e acumular metais pesados e radionuclídeos tem feito deles indicadores de poluição ao redor de centros urbanos e industriais (HALE, 1979; AHMADJIAN e HALE, 1993).

1.1.2 Constituintes Químicos dos Líquens

De acordo com a localização no talo, as substâncias produzidas pelos líquens são classificadas em produtos intracelulares e extracelulares. Os produtos extracelulares são denominados metabólitos secundários, sendo encontrados na medula ou no córtex, raramente nas duas camadas (HONDA e VILEGAS, 1998).

Os produtos intracelulares são chamados de metabólitos primários e estão ligados na parede celular, dentre eles pode-se citar os carotenóides, aminoácidos, proteínas, glicolípídeos e carboidratos (HALE, 1983). Os carboidratos de líquens são divididos em carboidratos de baixa e alta massa molar (GORIN *et al.*, 1993).

Os metabólitos secundários consistem em uma grande variedade de compostos alifáticos e aromáticos, principalmente ácidos fenólicos fracos (ELIX, 1996), a função fisiológica destes compostos parece estar relacionada aos mecanismos de defesa contra a ação herbívora de animais e proteção contra agentes patogênicos (ELIX, 1984). Além disso, o estudo dos metabólitos secundários tem um importante papel no estudo quimiotaxonômico de líquens morfologicamente semelhantes (ELIX, 1996).

Os carotenóides são pigmentos secundários que possuem a capacidade de absorver luz. O papel fisiológico destas substâncias no talo liquênico é de fotoproteção, pois estes compostos podem reduzir a quantidade de luz que atinge a alga e filtrar determinados comprimentos de onda (ADAM *et al.*, 1993; RODERIC, 1997).

Os carboidratos de baixa massa molecular incluem os polióis, que são moléculas lineares poli-hidroxiladas com 3 a 7 átomos de carbono, monossacarídeos redutores como, pentoses, metilpentoses, hexoses e hexuloses (cetoses) e oligossacarídeos redutores e não redutores (GORIN et al., 1993). Os polióis manitol e arabinitol são os mais observados em líquens. Além destes, já foram evidenciados, glicerol, mio-inositol, xilitol, sifulitol (1-deoxi-D-glicero-D-taloheptitol) e volemitol (GORIN et al., 1988), entre outros.

Os carboidratos de alta massa molar são freqüentemente polissacarídeos, sendo os mais comuns, as glucanas e os heteropolissacarídeos com cadeia principal de manose (GORIN et al., 1993).

Devido à utilização de polissacarídeos como objeto de estudo neste trabalho, na seqüência será feita uma breve abordagem quanto aos principais aspectos estruturais de polissacarídeos obtidos de líquens.

1.1.2.1 Polissacarídeos de líquens

O primeiro relato quanto ao isolamento de um polissacarídeo de líquen foi feito por Berzélius em 1815 utilizando a espécie *Cetraria islandica*, conhecido como “musgo da Islândia”, do qual foi isolado um polissacarídeo insolúvel em água fria (BERZÉLIUS, 1815, citado por CHANDA et al., 1957). Após muitos anos, a mesma espécie foi novamente estudada e o polissacarídeo insolúvel em água identificado como sendo uma β -D-glucana contendo ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção de 3:7, com rotação específica de +8°, denominada atualmente de liquenana (MEYER e GÜRTLER, 1947).

A maioria das glucanas encontradas em líquens apresenta-se como polímeros lineares com as unidades de glucose unidas por uma variedade de ligações O-glicosídicas em configuração α - ou β - e podem ser classificadas em liquenana, isoliquenana, pustulana, pululana, nigerana e laminarana (SASSAKI et al., 2002). β -D-glucanas que contém ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) em proporções variáveis são denominadas de liquenanas. Liquenanas estruturalmente relacionadas foram descritas

em vários líquens, entretanto a proporção de ligações β -(1 \rightarrow 3) e -(1 \rightarrow 4) varia de espécie para espécie (IACOMINI et al., 1988; BARON et al., 1991).

α -D-glucanas que contêm ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) em proporções variáveis são denominadas isoliquenanas. Além da liquenana isolada do líquen *Cetraria islandica*, foi isolada uma glucana solúvel em água, este polímero apresentou uma rotação específica de + 225°, demonstrando ser uma α -D-glucana. Através de estudos de metilação e oxidação com periodato, a relação molar das ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) foi determinada como sendo 3:2 nesta espécie (MEYER e GÜRTLER, 1947; CHANDA et al., 1957). Outras espécies de líquens apresentam isoliquenanas com proporções variáveis de ligações, por exemplo, a isoliquenana de *Ramalina celastri* apresenta uma relação molar de 3:1 (STUELP et al., 1999).

LINDBERG e MCPHERSON (1954) isolaram um polissacarídeo a partir da extração aquosa de *Umbilicaria pustulata* que por hidrólise parcial, forneceu apenas glucose. Em 1968 HELLERQVIST e colaboradores, demonstraram que o polissacarídeo era uma β -D-glucana linear com ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 6), sendo denominada de pustulana. Outras espécies de líquens apresentam β -D-glucanas (1 \rightarrow 6), entre elas *Lasallia pensylvanica* (GORIN, BARON e IACOMINI, 1988) e *Actinogyra muehlenbergii* (IACOMINI et al., 1988).

Nigeranas são polissacarídeos lineares que contêm unidades de α -D-glucose unidas por ligações alternadas do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) na proporção molar 1:1. Estes polissacarídeos podem ser encontrados em diversos líquens como *Cladonia crispata*, *C. squamosa*, *C. rangiferina*, *C. mitis* (NISHIKAWA et al., 1974), *C. alpestris*, *C. confusa* (IACOMINI, SCHNEIDER e GORIN, 1985), *C. clathrata*, *C. conexa*, *C. crispatula*, *C. furcata*, *C. ibitipocae*, *C. imperialis*, *C. penicilata*, *C. signata* (WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999a) e *Ramalina celastri* (STUELP et al., 1999).

Uma α -D-glucana linear com ligação (1 \rightarrow 3), semelhante a nigerana, foi descrita em líquens pela primeira vez por CARBONERO (1999) como um componente do basidiolíquen *Dictyonema glabratum*.

As β -D-glucanas com ligações do tipo (1 \rightarrow 3) são denominadas de laminaranas. A primeira vez que uma laminarana foi identificada em líquens foi em 1988, quando

BARON e colaboradores estudaram o líquen *Stereocaulon ramulosum*. Glucanas do tipo laminarana já foram encontradas em diversos líquens do gênero *Cladonia* (CARBONERO et al., 2001).

Pululanas são polímeros de α -D-glucose unidos por ligações (1→4) e (1→6). A presença de pululana foi descrita recentemente por REIS (2001) na espécie *Teloschistes flavicans*, sendo que a proporção de ligação (1→4) e (1→6) foi de 1:1.

A maior parte das glucanas encontradas nos líquens é linear, entretanto, a presença de uma β -D-glucana altamente ramificada foi identificada no ascolíquen *Collema leptosporum* (PRADO-MALUCELI, 1996).

A partir de 1984 a elucidação das estruturas químicas de heteropolissacarídeos isolados de líquens foi possível em virtude da utilização de procedimentos analíticos mais adequados e modernos. Com os trabalhos de GORIN, IACOMINI e colaboradores, estruturas químicas de várias galactomananas foram identificadas. Em 1984 o heteropolissacarídeo de *Cetraria islandica* foi elucidado por estes autores como sendo constituído por uma cadeia principal de manose unidas por ligações α -(1→6), substituídas por unidades de α -D-galactopiranosose e β -D-galactopiranosose ligadas por ligações (1→2) e (1→4), respectivamente (GORIN e IACOMINI, 1984).

A partir deste grande avanço na elucidação estrutural de heteropolissacarídeos, muitos estudos foram feitos quanto a determinação da estrutura química de heteropolissacarídeos liquênicos, sobretudo, galactomananas, glucomananas e galactoglucomananas (GORIN e IACOMINI, 1985; IACOMINI, SCHNEIDER e GORIN, 1985; TEIXEIRA, IACOMINI e GORIN, 1992, 1995; WORANOWICZ et al., 1997; WORANOVICZ-BARREIRA et al., 1999b).

1.1.3 Ações Biológicas de Polissacarídeos de Líquens

Polissacarídeos obtidos de líquens, modificados quimicamente ou não, têm sido estudados quanto as suas propriedades biológicas tais como as atividades antitumoral, antiviral e anticoagulante.

Várias β -D-glucanas lineares isoladas de líquens foram estudadas para determinar suas atividades anti-tumorais (WHISTLER *et al.*, 1976), entretanto algumas destas moléculas demonstraram ser insolúveis ou com pouca solubilidade em água, este fato prejudica seu uso como modificador da resposta biológica, esta limitação é superada quando modificações químicas são realizadas introduzindo grupos funcionais polares (como o sulfato) com o propósito de aumentar sua reatividade e solubilidade (NISHINO e NAGUMO, 1992; UEHARA, TAKESHITA E MAEDA, 1992; NISHINO, TAKABE e NAGUMO, 1994).

Relatos indicam que estruturas com cadeia principal β -(1 \rightarrow 3)-Glc_p ramificadas ou não em O-6, apresentam a melhor atividade anti-tumoral. Essas moléculas são efetivas contra o sarcoma 180 e carcinoma de Erlich (BOHN e BeMULLER, 1995).

Uma β -D-glucana (1 \rightarrow 6) linear e uma galactomanana altamente ramificada cuja cadeia principal era constituída de unidades de D-manose unidas por ligações do tipo α -(1 \rightarrow 6) foram isoladas do líquen *Gyrophora esculenta*. As atividades antitumorais da galactomanana e da glucana foram testadas frente ao Sarcoma 180 e apresentaram 35,9% e 43,8% de inibição, respectivamente (SONE, ISODA-JOHMURA e MISAKI, 1996).

As α -D-glucanas possuem melhor solubilidade que as β -D-glucanas, podendo desta forma ser testadas quanto à atividade antitumoral. Uma α -D-glucana contendo ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) em uma razão molar 3:1 extraída do líquen *Ramalina celastri* e seu derivado sulfatado (D.S. 0,97) foram avaliados quanto a citotoxicidade *in vitro* crescendo-se células HeLa na presença ou ausência desses polissacarídeos separadamente, e quanto a atividade antitumoral *in vivo* frente ao Sarcoma 180 (CARNEIRO-LEÃO *et al.*, 1997; CARNEIRO-LEÃO, 1998). Quanto à atividade citotóxica *in vitro*, ambos os polissacarídeos causaram alterações morfológicas e sofrimento celular sobre células HeLa. Quanto à atividade antitumoral, a α -D-glucana na concentração 200 mg/kg e a α -glucana sulfatada na concentração 20 mg/kg causaram inibição do crescimento do tumor em 81 e 59%, respectivamente (CARNEIRO-LEÃO *et al.*, 1997; CARNEIRO-LEÃO, 1998).

STUELP-CAMPELO (2002) demonstrou que uma α -D-glucana contendo ligações (1→3) e (1→4) extraída do líquen *Ramalina celastri* apresenta ação antitumoral contra células de Sarcoma-180 e estimula macrófagos em camundongos tratados com este polímero.

STUELP (1997) testou a atividade anticoagulante das α - e β -D-glucanas de *Ramalina celastri* nativas e após derivatizações químicas. Os derivados sulfatados e carboximetilados foram submetidos aos testes APTT (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado) e TT (Tempo de Trombina). Resultados promissores foram obtidos para os derivados sulfatados da α -D-glucana, os quais apresentaram atividade anticoagulante máxima em concentrações de 13 e 18 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, para os testes APTT e TT, respectivamente.

MARTINICHEN (2001) avaliou a ação anticoagulante de galactoglucomanas nativas extraídas dos líquens *Cladonia conexa* e *Cladonia ibitipocae* e modificadas quimicamente por sulfatação. Os derivados sulfatados obtidos apresentaram excelentes ações anticoagulantes *in vitro*, sendo que estas ações foram máximas nas concentrações de 25 e 30 $\mu\text{g/ml}$ de plasma para os testes APTT e TT, respectivamente.

1.2 HEMOSTASIA

A hemostasia é um mecanismo fisiológico, através do qual o organismo se defende das perdas sangüíneas ou da solidificação do sangue em seu interior. Quando os vasos sangüíneos estão íntegros e há um equilíbrio fisiológico entre os fatores plaquetários, os da coagulação e os da fibrinólise, o sangue flui normalmente. Porém qualquer desequilíbrio do sistema vaso-plaquetas-coagulação pode iniciar o mecanismo de ativação da hemostasia e provocar uma série de reações que levam a formação do coágulo ou trombo (MOURA et al., 1998).

Sendo um mecanismo de defesa de todos os vertebrados, a hemostasia, envolve processos complementares: formação do coágulo sangüíneo e dissolução do coágulo ou fibrinólise (GENTRY, 2003).

Existem 4 fases da hemostasia, a primeira fase (fase vascular), consiste na constrição do vaso injuriado para diminuir o fluxo sangüíneo no local. A segunda fase consiste na formação de um tampão de plaquetas, no local da injúria. O colágeno exposto no local da injúria funciona como um sítio de ligação para as plaquetas, as quais em resposta a ligação do colágeno liberam adenosina-difosfato (ADP) (agregante plaquetário), tromboxano A₂ (vasoconstritor e agregante plaquetário), serotonina (vasoconstritor), fator plaquetário-3 e cálcio. O ADP e tromboxano A₂ induzem outras plaquetas a se aderirem a plaquetas já aderidas ao colágeno formando um tampão de plaquetas. A agregação plaquetária é limitada pela ação antiagregante da prostaciclina, oriunda da parede vascular. A terceira fase da hemostasia é a formação do coágulo sangüíneo e a quarta fase é a dissolução parcial ou completa do coágulo através da fibrinólise (MURRAY, 1990; ALMEIDA, 1994; MOURA et al., 1998).

1.3 COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA

Várias substâncias participam do processo de coagulação do sangue, sendo denominadas de fatores da coagulação. As reações que ocorrem durante o processo de coagulação sangüínea são de natureza enzimática, pois muitos desses fatores são pró-enzimas (zimogênios), sintetizadas independentemente. As pró-enzimas encontram-se no plasma sob a forma inativa, devendo ser ativadas para atuarem durante o processo de coagulação. A ativação de cada fator faz-se em seqüência de fases em que cada enzima formada reage com seu substrato específico, convertendo-o em enzima ou fator ativo (LIMA *et al.*, 1992).

Em virtude desta seqüência de transformações pró-enzima-enzima, comparável a uma cascata, foi denominada teoria da cascata (MacFARLANE, 1964) ou teoria da catarata (DAVIE e RATNOFF, 1964). Esquemáticamente, a cascata da coagulação sangüínea está representada na Figura 1.

Foi estabelecido em 1954 pelo "International Committee on Nomenclature of Blood Clotting Factors", que as formas precursoras inativas dos fatores da coagulação devem ser designadas por algarismos romanos de I a XIII, enquanto que as formas ativas

devem ser designadas pelos mesmos algarismos, seguidos da letra a (LIMA et al., 1992; GENTRY, 2003).

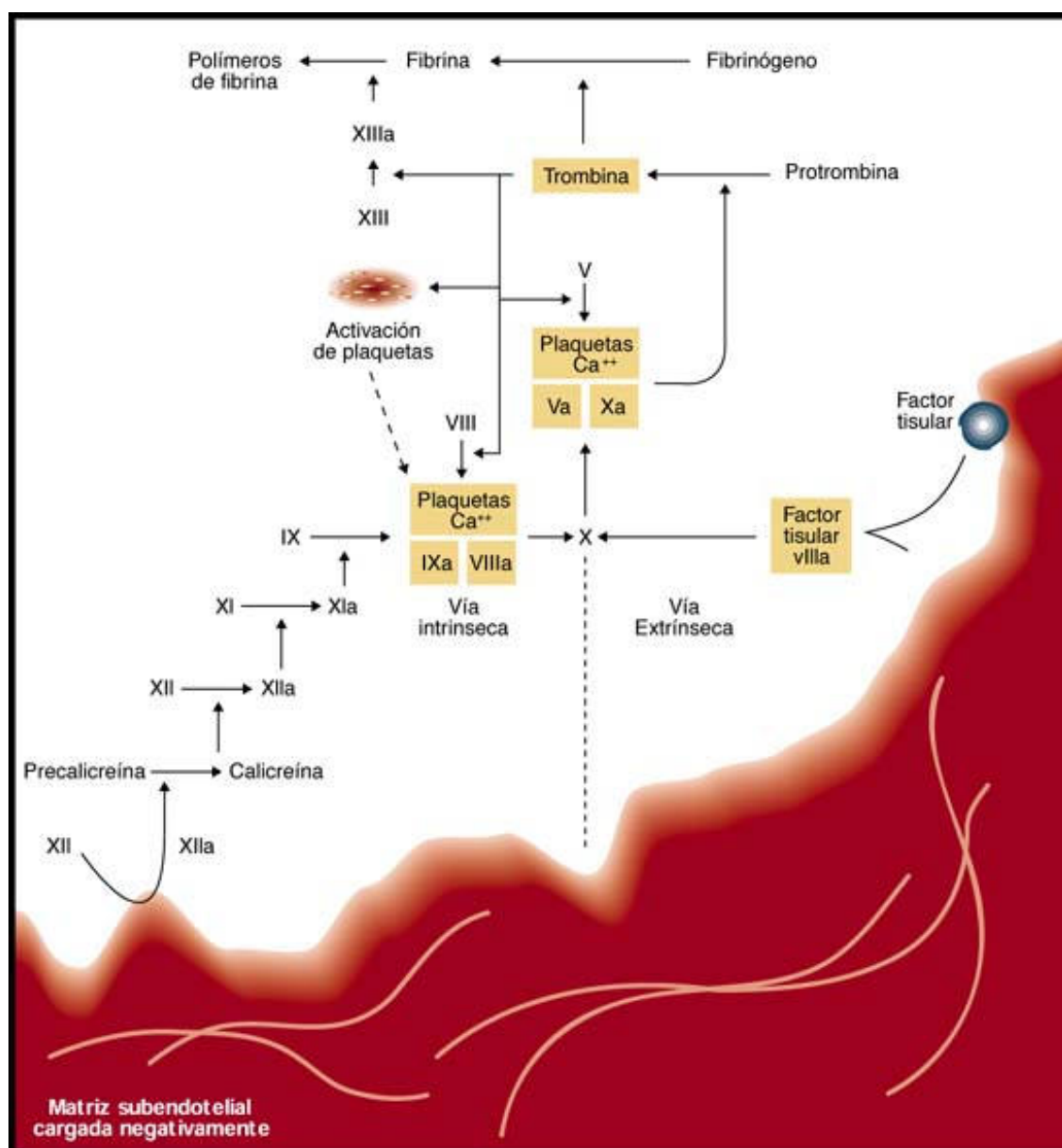
De acordo com as teorias atuais da coagulação sangüínea, o mecanismo da coagulação é ativado de duas maneiras. A primeira via de ativação começa *in vivo*, quando o revestimento endotelial de um vaso sangüíneo sofre lesão, e o sangue entra em contato com o colágeno, ou ainda *in vitro* quando o sangue entra em contato com substâncias carregadas negativamente, como por exemplo, caulim, vidro ou sílica. A ativação é iniciada por substâncias normalmente presentes no sangue, de modo que, a via é denominada via do sistema intrínseco ou via de contato (LIMA et al., 1992; RAVEL, 1997; BITHELL, 1993; NORRIS, 2003).

O segundo fator desencadeante é a tromboplastina tecidual (fator III) ou fator tissular, que não se encontra no sangue, a menos que ocorra desagregação anatômica, permitindo que o sangue tenha acesso ao “envoltório hemostático” em torno dos vasos sangüíneos ou dos órgãos. Os locais ricos em fator tecidual incluem o cérebro, a adventícia dos vasos sangüíneos, as cápsulas dos órgãos, a epiderme e o epitélio da mucosa (RAVEL, 1997; CECIL, 1997; BITHELL, 1993). Como a tromboplastina tecidual não está presente no sangue normalmente, a via de ativação é denominada via do sistema extrínseco ou via do fator tissular (NORRIS, 2003). As duas vias de ativação levam a uma via comum, que resulta na produção de trombina (fator IIa), a principal enzima da coagulação (CECIL, 1997).

O sistema intrínseco é desencadeado pelo contato entre o sangue e uma substância estranha. No interior dos vasos este contato geralmente ocorre após uma lesão no revestimento do endotélio vascular, onde o colágeno fica exposto e ativa o fator XII, o qual torna-se mais hidrofóbico e adquire atividade enzimática (BITHELL, 1993; RAVEL, 1997).

As plaquetas aderem-se ao colágeno exposto e liberam um fosfolípídeo denominado fator plaquetário-3 (FP-3). O fator XIIa juntamente com o cininogênio de alto peso molecular (HMWK), o qual atua como co-fator, convertem a proenzima pré-caliceína em caliceína. A caliceína converte mais fator XII na sua forma ativa (RAVEL, 1997).

FIGURA 1 – COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA



A principal consequência do fator XIIa, consiste na conversão do fator XI inativo em forma ativa, que por sua vez transforma o fator IX na sua forma ativa. Quando o fator IX é ativado, quer pela via intrínseca quer pela via extrínseca, ocorre a formação de um complexo com o fator VIIIa, cálcio e fosfolipídeos, o qual ativa o fator X em Xa. Este complexo é conhecido como complexo tenase e é crucial para a hemostasia (NORRIS, 2003). O fator VIII circula no plasma como um complexo não covalente com o fator de Von Willebrand (vWF), o qual protege o fator VIII da ativação proteolítica a fator VIIIa. O fator de von Willebrand associando-se a plaquetas ativadas na superfície do endotélio danificado facilita a ativação do fator VIII a VIIIa e dissociação do fator vWF (NEISHEIM, PITTMAN e GILLES, 1991). A trombina também pode ativar o fator VIII, sendo que a ativação não é impedida pelo fator de von Willebrand (HAMER, KOEDAM e BEESER-VISSER, 1987; NORRIS, 2003). O fator Xa, juntamente com o fator Va (complexo protrombinase) e FP-3, convertem a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). A trombina por sua vez converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina. Os monômeros de fibrina sofrem polimerização e são estabilizados através da introdução de ligações cruzadas entre as moléculas, com a participação do fator XIIIa (LIMA, 1992; BITHELL, 1993; RAVEL, 1997).

O sistema extrínseco é desencadeado pelo fator tissular (tromboplastina tecidual), o fator tissular (FT) é uma glicoproteína transmembrana que não é normalmente expressa em células que entram em contato com o plasma, contudo quando ocorre injúria vascular as células que expressam o fator tissular ligado à membrana são expostas ao plasma (DAHLBÄCK, 2000; NORRIS, 2003; GENTRY, 2003). Ao contrário de outros fatores envolvidos na coagulação sanguínea, o fator tissular está sempre presente como um fator ativo (BUGGE, XIAU e KOMBRINCK, 1996). Quando o TF exposto no plasma interage com o fator VIIa circulante, torna-se ativo para formar o complexo enzimático FT-VIIa (GENTRY, 2003). O fator VII é uma proteína plasmática dependente de vitamina K produzida no fígado, 99% do fator VII circulante está presente no estado inativo e 1% como fator ativo (VIIa). Quando o fator VIIa não está fazendo parte do complexo FT-VIIa apresenta atividade enzimática fraca (NORRIS, 2003).

O complexo FT-VIIa na superfície celular apresenta dois substratos em potencial: o fator IX, o qual é convertido a fator IXa e o fator X, o qual é convertido a fator Xa (NORRIS, 2003). A conversão dos dois fatores X e IX em formas ativas pelo complexo FT-VIIa, requer a participação de íons cálcio (RAVEL, 1997; LIMA, 1992; BITHELL, 1993). *In vitro* o fator X é o substrato preferido do complexo TF-VIIa, entretanto, a via predominante *in vivo* é desconhecida (NORRIS, 2003). As etapas que seguem à formação do fator Xa são idênticas para as vias extrínseca e intrínseca (LIMA, 1992; BITHELL, 1993; RAVEL, 1997).

1.3.1 Regulação da Coagulação Sangüínea

A regulação da coagulação sangüínea é essencial para evitar a produção maciça de fibrina (NORRIS, 2003). Para ser efetivo, o sistema de regulação deve ser ativo apenas no sítio da injúria, desta maneira, a regulação da coagulação é realizada em cada etapa da cascata, por inibição enzimática ou por modulação da atividade dos cofatores (DAHLBÄCK, 2000). As enzimas geradas durante a ativação da coagulação sangüínea são reguladas *in vivo* por uma série de inibidores fisiológicos, como: o TFPI (inibidor da via do fator tissular - Tissue factor pathway inhibitor), proteína C (PC), antitrombina (AT) e cofator II da heparina (HC II).

1.3.1.1 Inibidor da via do fator tissular (TFPI)

O TFPI é um inibidor de serino-proteases, o qual possui um papel central na via extrínseca da coagulação sangüínea, por bloquear a atividade do complexo fator VIIa/FT e do fator Xa através da formação de um complexo quaternário (FT/ Fator VIIa/ fator Xa/ TFPI) (BAJAJ, et al., 1999). O TFPI é uma glicoproteína com 276 aminoácidos e massa molar de 42 kDa, possui 3 domínios inibitórios, denominados K-1, K-2 e K-3 (WUN et al., 1988; KATO, 2002). O domínio K-1 forma um complexo com o fator VIIa/FT inibindo a atividade de protease deste complexo, o domínio K-2 inibe a atividade do fator Xa

(GIRARD et al., 1989), e o domínio K-3 e a região C- terminal tem afinidade de ligação com a heparina e outros glicosaminoglicanos (MINE et al., 2002).

O principal sítio de síntese do TFPI são as células endoteliais, porém pequenas quantidades podem ser sintetizadas por megacariócitos, monócitos, fibroblastos e células sinoviais (BRINKMANN et al., 2001; OSTERUD, BAJAJ e BAJAJ, 1995). Aproximadamente 85% do TFPI que é produzido permanece ligado à superfície endotelial e 10% permanece na circulação, sendo que destes, 90% circula ligado a lipoproteínas como a LDL colesterol, HDL colesterol, VLDL colesterol e lipoproteína (a), os 10% restantes encontram-se livres para desempenhar sua função inibitória (LINDHAL, SANDSET e ABILGAARDT, 1992; HANSEN et al., 1994).

O TFPI que permanece ligado as células endoteliais é liberado no sangue na presença de heparina. Após a liberação a concentração sanguínea do TFPI aumenta de 2 a 4 vezes comparando com as concentrações normais (54-142ng/ml), demonstrando, forte atividade anticoagulante na regulação da formação do coágulo de fibrina (TSUJI et al., 2001).

1.3.1.2 Antitrombina (AT)

A antitrombina (anteriormente designada antitrombina III), é a proteína inibitória mais importante no sistema da coagulação sangüínea, considerada um inibidor de serino-proteases, pertence à superfamília serpina, pode ser encontrada em diversos organismos como bactérias termofílicas e mamíferos (QUINSEY et al., 2004). Componentes chaves na cascata de coagulação como os fatores IXa, Xa XIa, XIIa e o complexo VIIa/fator tecidual e trombina, são inativados pela antitrombina (MAJERUS et al., 1991; AUSTIN et al., 1992; BOURIN e LINDAHL, 1993; LAWSON et al., 1993; NORRIS, 2003). A habilidade da AT em inibir estes fatores é grandemente acelerada pela heparina, a qual aumenta 1000 vezes a razão da inibição, pelo heparan sulfato

presente nas superfícies luminal e subluminal dos vasos sangüíneos e por substâncias similares a heparina (heparin-like) (NORIS, 2003; LINDHAL e KJELLEN, 1991; OLSON e CHUANG, 2002; CARRELL, 1999). A antitrombina inibe preferencialmente enzimas livres, pois enzimas que estão fazendo parte dos complexos tenase ou protrombinase estão menos acessíveis a inibição, outras enzimas que não participam da coagulação sangüínea, como a plasmina e tripsina também são inativadas pela AT (BJORK e LINDHAL, 1982).

Quanto a sua estrutura, a antitrombina é uma molécula de 58 kDa, que contém 4 sítios de glicosilação, 90% das moléculas encontram-se na forma α , e 10% encontram-se na forma β , a forma α é glicosilada em todas as posições, enquanto que a forma β não é glicosilada na posição Asn¹³⁵. A proteína é composta por 3 folhas β (A-C), por 9 α -hélices (A-I) e pelo centro reativo, que contém uma seqüência de aminoácidos que é complementar ao sítio ativo de proteases alvo (STEIN e CARREL, 1995; WHISSTOCK, SKINNER e CARREL, 1998).

O mecanismo molecular da inibição de serino-proteases pela antitrombina foi recentemente elucidado, neste mecanismo o centro reativo da AT é exposto e reconhecido pela proteinase alvo (Fator Xa, IXa, Trombina, etc.) como um substrato normal a ser clivado, a clivagem do centro reativo pela proteinase alvo é interrompida no estágio de um intermediário acil, quando ocorre a inserção da alça do centro reativo na folha- β A. Esta inserção resulta em uma translocação da protease alvo de um pólo da molécula de AT ao outro, o centro reativo da protease alvo é deformado resultando na inibição irreversível (STRATIKOS e GETTINS, 1999; HUNTINGTON, READ e CARREL, 2000; LAWRENCE, OLSON e MUHAMMAD, 2000).

1.3.1.3 Proteína C (PC)

A proteína C constitui o principal mecanismo de prevenção da trombose na microcirculação (NORRIS, 2003), sua principal função é atuar na modulação da

atividade dos fatores VIIIa e Va (DAHLBÄCK, 1995). A proteína C é uma proteína plasmática vitamina K-dependente, com 62 kDa de massa molar, que circula como zimogênio, sendo que para se tornar ativa deve se ligar a um receptor transmembrana expresso no endotélio chamado de receptor endotelial de proteína C (EPCR) (KISIEL, 1979; ESMON, 2000). A ativação da proteína C também requer a participação da trombina, que por sua vez, deve se ligar a uma outra proteína transmembrana no endotélio, a trombomodulina (WU e MATIJEVIC-ALEKSIC, 2000). A trombina complexada a trombomodulina ativa a proteína C, provavelmente através de uma mudança conformacional na enzima (YE et al., 1991). A proteína C ativada (APC) é inativa como inibidor enquanto permanece ligada ao EPCR. Para tornar-se ativa, APC deve se dissociar do EPCR e ligar-se ao seu cofator, proteína S (LIAW et al., 2000; WALKER, 1980). A proteína S é também uma proteína plasmática vitamina K-dependente com 71 kDa, contudo, diferente da proteína C, não possui atividade enzimática, atuando apenas como um cofator para a APC (WALKER, 1980).

O complexo APC/Proteína S pode inativar os fatores Va e VIIIa, comprometendo a atividade dos complexos protrombinase e tenase, respectivamente (WALKER e FAY, 1992). O complexo APC/Proteína S liga-se preferencialmente aos fatores Va e VIIIa do que seus precursores inativos (V e VIII) (WALKER et al., 1979; VEHAR e DAVIE, 1980). A inativação do fator Va envolve a clivagem da Arg⁵⁰⁶ e Arg³⁰⁶ em um processo que envolve duas fases, primeiro ocorre a clivagem da Arg⁵⁰⁶ e na seqüência a clivagem da Arg³⁰⁶ (NICOLAES, TANSIG e THOMASSEN, 1995). No caso do fator VIIIa, a inativação ocorre pela clivagem da Arg³³⁶ e Arg⁵⁶² (AMANO et al., 1998).

1.3.1.4 Cofator II da heparina (HC II)

O cofator II da heparina (HCII) é um membro da família dos inibidores de serino-proteases (serpinas), tem sido detectado no plasma de vários mamíferos (TOLLEFSEN e BLANK, 1981; SHEFFIELD, SCHUYLER e BLAJCHMAN, 1994), pássaros e anfíbios

(COLWELL e TOLLEFSEN, 1998), sendo responsável por inibir uma das principais proteínas da coagulação sanguínea, a trombina. Além do plasma sanguíneo, o cofator II da heparina foi encontrado em diversos órgãos como o fígado, pulmões, coração, rins e placenta (KAMP, 2001).

O HCII é uma proteína que contém 480 aminoácidos, o domínio N-terminal possui aminoácidos ácidos (Asp³⁹- Asp⁷⁵), quando este domínio se liga ao exossítio I da trombina ocorre o ataque proteolítico através do sítio reativo da molécula de HCII (Leu⁴⁴⁴ – Ser⁴⁴⁵) (CHURCH e HOFFMAN, 1994; COLWELL, GRUPE e TOLLEFSEN, 1999). A região vizinha à hélice D do HCII (Lys¹⁶⁵ – Phe¹⁹⁵), apresenta grande homologia com a região análoga da antitrombina, esta região apresenta vários aminoácidos carregados positivamente que interagem com vários glicosaminoglicanos, como por exemplo, heparina e dermatan sulfato (BLINDER e TOLLEFSEN, 1990). Na ausência de glicosaminoglicanos, a região N-terminal ácida do HCII pode interagir com o sítio de ligação dos glicosaminoglicanos e, então ligar-se ao exossítio I da trombina (VANDEERLIN e TOLLEFSEN, 1991).

Os sítios de ligação do cofator II da heparina para heparina e dermatan sulfato são diferentes (CHURCH e HOFFMAN, 1994). A análise de um cofator II da heparina mutante (Arg¹⁸⁹→His), revelou que dermatan sulfato e heparina interagem com diferentes aminoácidos no sítio de ligação (BLINDER et al., 1989). Esta mutação resulta em uma grande diminuição da afinidade do HCII pelo dermatan sulfato, mas não afeta a afinidade de inibição pela heparina. Mutações na Lys¹⁷³, Arg¹⁸⁴ e Arg¹⁸⁵ diminuem a ligação da heparina e sua habilidade para estimular a reação trombina-HCII, ao passo que, mutações na Arg¹⁸⁴, Arg¹⁸⁵, Arg¹⁸⁹, Arg¹⁹² e Arg¹⁹³, afetam a interação com o dermatan sulfato (BLINDER et al., 1989; RAGG, ULSHOFER, GEREWITZ, 1990; BLINDER e TOLLEFSEN, 1990; WHINNA et al., 1991). Portanto, o sítio de ligação da heparina e dermatan sulfato possui alguns resíduos em comum, porém, não são idênticos (COLWELL, GRUPE e TOLLEFSEN, 1999).

Uma variedade de poliânions sulfatados estimula a reação HCII-trombina, muitos destes poliânions têm sido estudados como potenciais agentes antitrombóticos. Estes poliânions incluem compostos naturais como condroitin sulfato E proveniente de

grânulos de mastócitos, fucoidana de alga marinha, condroitin sulfato fucosilado de pepino do mar, entre outros (SCULLY et al., 1986; CHURCH et al., 1989; MOURÃO et al., 1996), ou compostos semi-sintéticos como dextran sulfato, pentosan polisulfato, etc (YAMAGISHI et al., 1984; SCULLY e KAKKAR, 1984b).

HCII é descrito como o principal inibidor da trombina em sítios extravasculares onde o dermatan sulfato está presente (TOLLEFSEN, 1995) A ligação do HCII a proteoglicanos (dermatan sulfato) presentes nos tecidos pode gerar uma superfície coberta com moléculas inibidoras “pré-ativadas” expondo o domínio N-terminal ácido para interação com a trombina, prevenindo desta forma a deposição de fibrina (MCGUIRE e TOLLEFSEN, 1987; KAMP, STRATHMANN e RAGG, 2001).

A deficiência parcial do HCII está associada a várias desordens tromboembólicas. Vários estudos demonstram que os níveis de HCII no plasma podem mudar em certas condições fisiopatológicas. Mulheres que fazem o uso de contraceptivos orais possuem os níveis plasmáticos de HCII aumentados, pacientes com pneumonia e trombose venosa, também apresentam níveis aumentados de HCII no plasma (KAMP, STRATHMANN e RAGG, 2001).

1.3.1.5 Outros inibidores da coagulação sangüínea

Além dos inibidores descritos acima, a coagulação sanguínea, pode ser inibida pela α_1 -antitripsina, α_2 -macroglobulina e inibidor C-1. O inibidor C-1 é o principal inibidor plasmático do fator XIIa (PIXLEY, SCHAPIRA e COLMAN, 1985). A α_1 -antitripsina inibe o fator XIa, ao passo que, a α_2 -macroglobulina atua como um inibidor secundário de muitas proteinases envolvidas na coagulação sanguínea, incluindo calicreína, trombina e a plasmina do sistema fibrinolítico (NORRIS, 2003).

1.4 FIBRINÓLISE

A fibrinólise é o mecanismo final que limita a formação do coágulo. O sistema fibrinolítico é formado por uma série de enzimas, as quais quando ativadas, clivam a

fibrina em fragmentos conhecidos como produtos da degradação da fibrina. O controle deste mecanismo é fundamental na manutenção do balanço hemostático (NORRIS, 2003).

A enzima responsável pela lise da fibrina em seus produtos de degradação é a plasmina, esta enzima circula como um zimogênio inativo: o plasminogênio (CASTELLINO, 1984). Os fatores XIIa, XIa e calicreína são capazes de converter plasminogênio em plasmina (MANDLE Jr. e KAPLAN, 1979; COLMAN, 1979), entretanto, a contribuição destas enzimas *in vivo* é incerta. O maior ativador do plasminogênio *in vivo* é o ativador de plasminogênio tissular, uma serino-protease produzida por células endoteliais. Na ausência de fibrina, o ativador de plasminogênio tissular é ineficiente, mas na presença da fibrina a ativação é grandemente acelerada (NORRIS, 2003). Outro ativador, o ativador do plasminogênio tipo uroquinase também pode ativar o plasminogênio (CAMIOLO, THORSEN e ASTRUP, 1971; STAHL e MUELLER, 1994). Os dois ativadores têm alta especificidade de ligação com seu substrato (plasminogênio) e promovem a hidrólise de uma única ponte peptídica (Arg⁵⁶⁰ – Val⁵⁶¹), que resulta na formação da plasmina (COLLEN e LIJNEN, 1991).

O principal inibidor da plasmina é a α_2 -antiplasmina, no plasma a α_2 -antiplasmina liga-se rapidamente a plasmina para formar um complexo irreversível, plasmina/antiplasmina. A α_2 -macroglobulina tem um papel limitado na inibição da plasmina, tornando-se importante apenas quando as concentrações de plasmina excedem a capacidade da α_2 -antiplasmina. Similarmente antitrombina, α_1 -antitripsina e inibidor C-1 apresentam poucos efeitos *in vivo* (NORRIS, 2003).

Inibidores dos ativadores de plasminogênio (PAI) apresentam importante papel na regulação da fibrinólise. São descritos quatro tipos distintos de inibidores dos ativadores de plasminogênio, PAI-1, PAI-2, PAI-3 e nexina protease, destes o PAI-1 é o mais importante na inibição do ativador de plasminogênio no plasma (NORRIS, 2003).

O mais recente inibidor da fibrinólise descrito é o inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) (BAJZAR, MORZER e NEISHEIM, 1995). O TAFI é ativado pela trombina, tripsina e plasmina, na forma ativada é capaz de inibir a fibrinólise por

remover unidades de lisina na molécula de fibrina durante o processo de lise do coágulo (BAJZAR, 2000).

1.5 AGENTES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICOS

1.5.1 Heparina

Em 1916, um estudante de medicina chamado Jay McLean, enquanto investigava a natureza dos pró-coagulantes solúveis em éter, descobre um agente anticoagulante presente em fígado de cães, este anticoagulante foi denominado mais tarde por HOWELL e HOLT de heparina (O'NEILL, 1955). Embora tenha sido descoberta em 1916, seu uso clínico na prevenção de tromboembolismo venoso foi iniciado após algumas décadas, em 1940, devido a dificuldades na purificação e padronização terapêutica (MUELLER, 2004; KAKAR, 2004).

Atualmente, existem duas formas de heparina disponíveis para uso clínico: as moléculas com massa molar em torno de 3000 a 30000 Da, em geral 15000 Da que são denominadas heparinas não fracionadas (UFH) e as moléculas com massa molar entre 2000 a 10000 Da em geral 4000-6000 Da, denominadas heparinas de baixa massa molar (HBMM) (SAMANA, BARA e GOUINTHIBAULT, 1996; BONEU, 2000).

1.5.1.1 Heparina não fracionada (UFH)

Sob o ponto de vista químico, a heparina é considerada uma mistura de glicosaminoglicanas altamente sulfatadas de massa molar altamente variável, entre 3000 a 30000 Da, com média em torno de 15000 Da. Sua cadeia é constituída por uma seqüência alternada de unidades sulfatadas de ácido urônico e D-glucosamina que apresentam ligações do tipo α e β (1→4). O ácido urônico pode ser ácido L-idurônico ou ácido D-glucurônico e as unidades de D-glucosamina apresentam-se N-sulfatadas ou N-acetiladas. As moléculas de ácido L-idurônico apresentam-se sulfatadas na posição C-2 e as unidades de D-glucosamina apresentam-se N-sulfatadas e 6-O sulfatadas.

Tanto o ácido L-idurônico como a D-glucosamina apresentam configuração do tipo α , o ácido D-glucurônico apresenta configuração do tipo β (DIETRICH, SILVA e MICHELACCI, 1973; SILVA e DIETRICH, 1975; NADER et al., 1990; JANDIK, GU e LINHARDT, 1994).

O ácido L-idurônico corresponde a 70-80% do conteúdo de ácidos urônicos presentes na estrutura e o ácido D-glucurônico corresponde de 20 a 30% (WOLFROM, WANG e HONDA, 1969; LINDAHL e AXELSSON, 1971).

A heparina é biosintetizada e armazenada exclusivamente em mastócitos. Tecidos animais ricos em mastócitos como os pulmões de bovinos e mucosa intestinal de porcos, são usados como fonte de heparina (BAUGHAN e WOODWARD, 1970). Alguns estudos também têm demonstrado que compostos como a heparina estão presentes em alguns invertebrados (CÁSSARO e DIETRICH, 1977; DIETRICH et al., 1999).

As funções da heparina normalmente existentes no organismo, ainda não estão bem esclarecidas, acredita-se que ela não seja responsável pela manutenção da fluidez do sangue circulante, uma vez que, já é comprovada que esta função cabe a uma outra substância quimicamente semelhante e com menor quantidade de grupos sulfato, denominada de heparan sulfato, o qual está presente no endotélio vascular (GRAVLE et al., 1988; ROSENBERG, 1989; BOURIN e LINDAHL, 1993). Constata-se na literatura científica que: a heparina atua na liberação e ativação de lipoproteínas e lipases hepáticas; apresenta efeitos variáveis na função plaquetária; apresenta efeito diurético, anti-metastático, anti-inflamatório e antiviral; promoção da fibrinólise; aumento na permeabilidade endotelial; supressão de osteoblastos e ativação de osteoclastos; liberação de fosfolipase A2 e superóxido dismutase e inibição da síntese de interferon gama e mineralocorticoides (MUELLER, 2004).

A heparina exerce seu efeito anticoagulante indiretamente, requerendo antitrombina como um cofator (COHEN, 2000). A ligação da antitrombina a heparina induz uma mudança conformacional na molécula de antitrombina, a qual acelera grandemente a inibição de várias serino-proteases, incluindo os fatores IXa, XIa, XIIa,

calicreína e principalmente os fatores Xa e IIa (trombina) (ROSENBERG, 1989; BOURIN e LINDAHL, 1993).

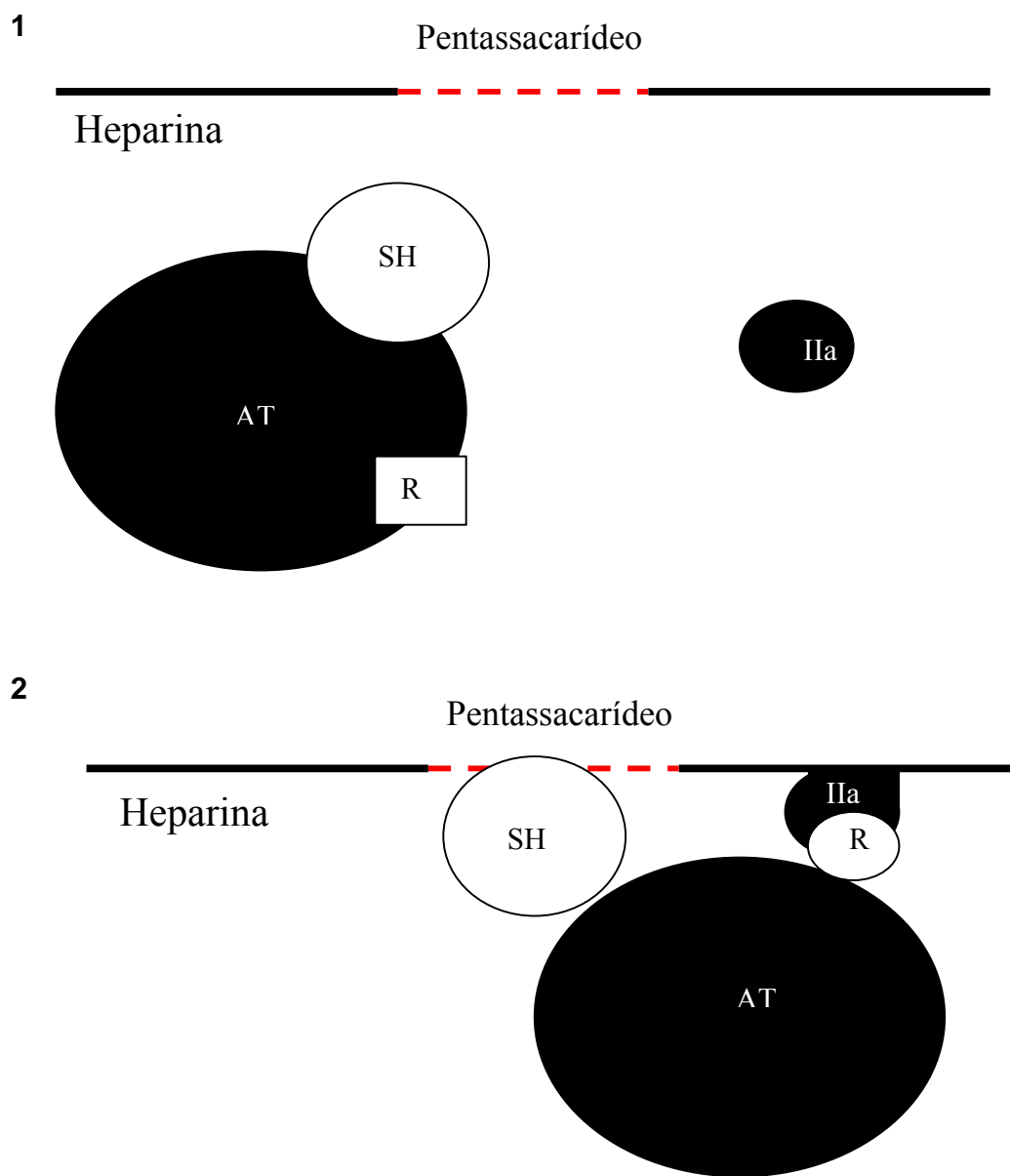
O mecanismo pelo qual ocorre a inibição do fator Xa e trombina pela antitrombina apresenta algumas diferenças importantes. A heparina aumenta a inibição da trombina por servir como um molde para que ambos antitrombina e trombina liguem-se para formar um complexo ternário heparina-antitrombina-proteinase (BOURIN e LINDAHL, 1993) (Figura 2). A dissociação da heparina do complexo ternário ocorre uma vez que um complexo estável entre o inibidor e a enzima tenha sido formado (JORDAN et al., 1980).

O sítio de ligação da heparina a antitrombina (Figura 4) é uma seqüência pentassacarídica específica que contém uma unidade de glucosamina 3-O-sulfatada, que se liga a um sítio rico em lisina na antitrombina, a qual está presente em aproximadamente um terço das cadeias nas heparinas comerciais (CASU, 1985; MAJERUS et al., 1991; RAZI et al., 1995; BRODY et al., 1997).

A inativação da trombina pela heparina é dependente do tamanho da cadeia sacarídica. Moléculas de heparina com menos de 18 unidades monossacarídicas (massa molar menor que 5400 Da), não podem ligar-se a trombina e antitrombina simultaneamente, sendo incapazes de inibir a trombina através da antitrombina (AGNELLI, 1996), neste caso o efeito anticoagulante é produzido principalmente através da inibição do fator Xa pela antitrombina (Figura 3) (MAJERUS et al., 1991).

A atividade anticoagulante da heparina é atribuída ao seu padrão complexo de substituintes sulfato e carboxil, os quais deixam este polímero com uma incomum alta densidade de carga. Estudos com heparinas modificadas e oligossacarídeos obtidos da mesma ou sintetizados, indicaram que cada uma dessas cargas negativas é significativa para assegurar uma alta atividade anticoagulante (REJ, LUDWIGBAXTER e PERLIN, 1991; HIRATA *et al.*, 1994).

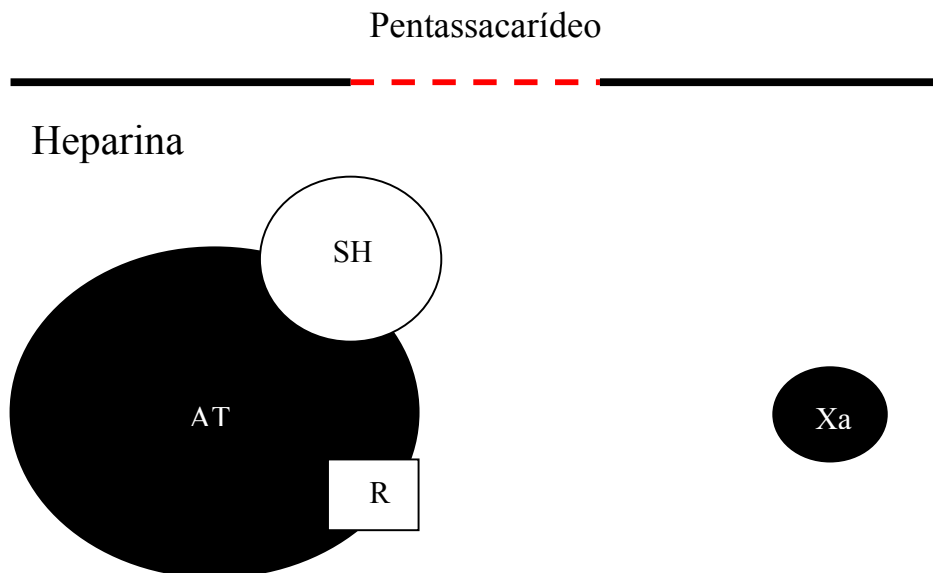
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DA TROMBINA PELA ANTITROMBINA NA PRESENÇA DE HEPARINA



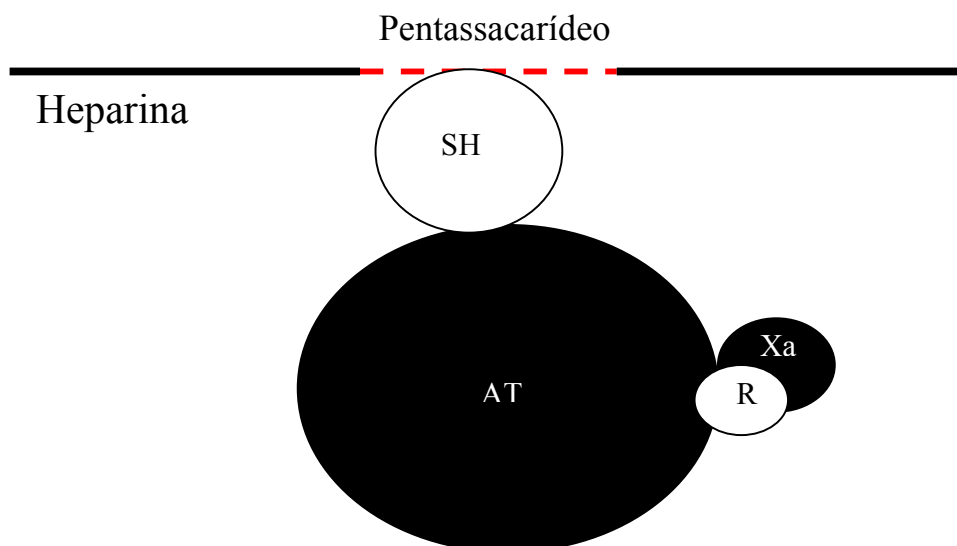
SH - sítio de ligação à heparina, AT - antitrombina, R—sítio reativo, IIa - trombina

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE INIBIÇÃO DO FATOR Xa PELA ANTITROMBINA NA PRESENÇA DE HEPARINA

1

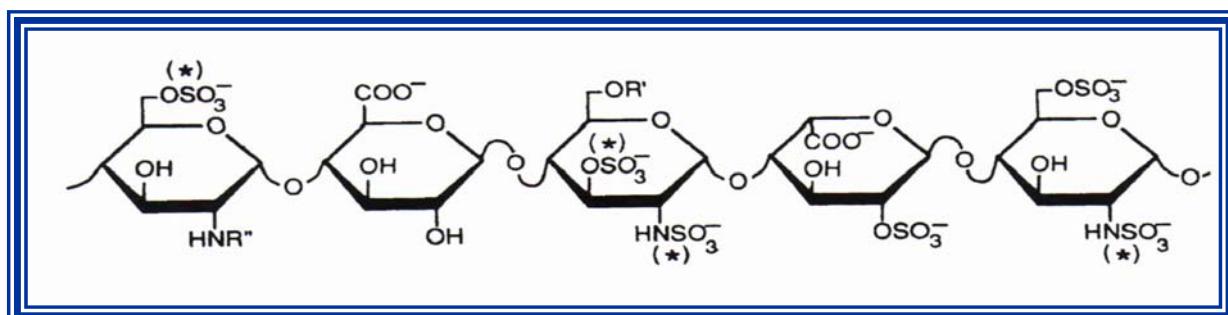


2



SH- sítio de ligação à heparina, AT - antitrombina, R -sítio reativo, Ila - trombina.

FIGURA 4 – SEQUÊNCIA DE LIGAÇÃO DA HEPARINA A ANTITROMBINA



R'(-H ou SO₃) e R''(-SO₃ ou -COCH₃). Os grupos sulfato marcados com asterisco são considerados essenciais para a ligação com a AT III.

FONTE: LINDHAL *et al.*, 1984.

Heparinas supersulfatadas apresentam diminuição significativa de sua atividade anticoagulante quando comparadas com heparinas padrão. Este efeito se deve a provável ocorrência de sulfatação em posições artificiais no polissacarídeo, isto sugere que a atividade anticoagulante da heparina, via antitrombina, não depende somente de seu conteúdo em sulfato, mas também da posição desses grupos na molécula (UCHIYAMA *et al.*, 1990).

A heparina também catalisa a inibição da trombina através do cofator II da heparina, o qual inibe apenas a trombina (TOLLEFSEN, MARJERUS e BLANK, 1982). A heparina liga-se em ambos, cofator II da heparina e trombina, permitindo que o inibidor e a proteinase assumam uma conformação favorável para interação. Em baixas concentrações de heparina, ocorre um aumento na razão de reação, porém em altas concentrações de heparina a razão de reação diminui (CHURCH e HOFFMAN, 1994).

A heparina não fracionada é utilizada na prevenção e tratamento de trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar, ou seja, tromboembolismo venoso, também é utilizada em síndromes coronarianas agudas, incluindo infarto do miocárdio, cirurgias cardiovasculares, coagulação intravascular disseminada e na hemodiálise. É também um importante agente na prevenção de acidentes trombo-embólicos,

freqüentemente observados no período pós-operatório de alguns tipos de cirurgias, principalmente pélvicas e ortopédicas (HIRSH, WARKETIN e RASCHKE, 1998).

A administração da heparina é realizada por via intravenosa ou subcutânea, como injeção intermitente ou infusão contínua. O efeito é imediato quando administrada por via intravenosa, em contraste, existe considerável variação na biodisponibilidade quando a administração é realizada pela via subcutânea. A biodisponibilidade da heparina pela via subcutânea é baixa e dose-dependente, o início da ação da heparina administrada por esta via ocorre de 20 a 60 minutos (MUELLER, 2004). A heparina exibe um perfil de eliminação bifásico, com uma fase inicial saturável e outra fase não saturável (LIU e MURROY, 1998). Após a administração parenteral de doses terapêuticas, a heparina é eliminada da circulação por um mecanismo que envolve células endoteliais e macrófagos, após a saturação deste mecanismo, o excesso de heparina é eliminado através da filtração renal (BONEU, 2000; MUELLER, 2004). A meia-vida da heparina varia com a dose: doses baixas são eliminadas com mais facilidade, enquanto que altas doses de heparina são eliminadas mais lentamente (BONEU, 2000). Quando a heparina é administrada por injeção intravenosa na dose de 25 U/kg a meia vida é de 30 minutos, quando administrada na dose de 400 U/kg a meia vida é de 150 minutos (MUELLER, 2004).

Pacientes que fazem uso da heparina não fracionada como anticoagulante devem ser monitorados através de diversos testes laboratoriais. Os testes usados para monitorar os efeitos anticoagulantes da heparina incluem: o tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT), tempo de coagulação ativado (ACT) e testes que medem interações específicas da heparina com fatores ativados da coagulação sanguínea, estes incluem o ensaio de inibição do fator Xa (o qual mede a habilidade da heparina inibir a atividade enzimática do fator Xa), ensaio da inibição do fator IIa (o qual mede a habilidade da heparina em inibir a atividade enzimática da trombina) e o teste de neutralização da protamina (o qual mede a quantidade de protamina requerida para normalizar o tempo de coagulação na presença de heparina) (HIRSH, 1985.).

Níveis terapêuticos de heparina no plasma são atingidos quando o APTT está entre 55-85 segundos, ou seja, 1,5 a 2,5 vezes o valor do controle (valor de referência do teste) (MUELLER, 2004).

Resistência a heparina pode ocorrer em pacientes que requerem mais que 35.000 U/24h. Existem várias causas para este fenômeno como o aumento na eliminação da heparina, aumento nos níveis de pro-coagulantes, redução nos níveis de antitrombina e aumento dos níveis de proteínas que se ligam a heparina (ex: fator plaquetário 4 e glicoproteína rica em histidina) (YOUNG et al., 1992).

Devido à alta quantidade de cargas negativas e altas massas molares, as heparinas são geralmente ineficientes quando administradas através da via oral (MONEY e YORK, 2001). Entretanto vários estudos têm demonstrado que heparinas não fracionadas e heparinas de baixa massa molar, quando, administradas através de tubo estomacal em camundongos, ratos, e coelhos possuem atividade antitrombótica em baixas doses (HIEBERT, WICE e JAQUES, 1996; HIEBERT, PING e WICE, 2000; HIEBERT et al., 2001; PINEO, HULL e MARDER, 2004). Embora a administração de heparinas através da via oral demonstre atividade antitrombótica, pouco é conhecido sobre a farmacocinética, sabe-se apenas, que quando a heparina é administrada por via oral, as moléculas são incorporadas em células endoteliais tanto na circulação venosa, quanto na circulação arterial, também foi observado que uma quantidade muito pequena é encontrada no plasma (HIEBERT e JAQUES, 1976; JAQUES, HIEBERT e WICE, 1991).

Muitas tentativas para melhorar a absorção oral da heparina estão sendo feitas através do uso de adjuvantes, complexos com diamida e surfactantes, o melhor agente utilizado até o momento parece ser uma substância denominada N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprilato (SNAC). Uma série de estudos demonstra que heparina-SNAC administrada por via oral aumenta o APTT e os níveis de anti-fator Xa. Recentemente estudos demonstram que a adição do SNAC facilita a absorção de heparina através do trato gastrointestinal em doses adequadas para prevenção e tratamento de desordens tromboembólicas (PINEO, HULL e MARDER, 2004).

Os efeitos adversos mais comumente observados com o uso da heparina são a trombocitopenia, hemorragia e osteoporose. Entre os efeitos adversos conhecidos na terapia com heparina, a trombocitopenia induzida por heparina (TIH), é sem dúvida a mais freqüente e importante (FABRIS et al., 2000). A TIH é definida como o desenvolvimento de trombocitopenia, onde a contagem de plaquetas é inferior a $150 \times 10^9 / l$ e/ou quando ocorre a diminuição de 50% do número de plaquetas em relação à contagem de plaquetas antes do início da terapia com heparina (KELTON, 2002).

A trombocitopenia induzida por heparina é classificada em dois tipos distintos: TIH-1 e TIH-2. A TIH-1 é uma trombocitopenia amena, assintomática, passageira e não auto-imune, geralmente sem conseqüências clínicas adversas que ocorre em 10 a 20% dos pacientes durante os primeiros dias de tratamento (FABRIS et al., 2000; MUELLER, 2004). O mecanismo da trombocitopenia induzido por heparina tipo 1 não é imune e parece ser causado por um efeito direto da heparina na ativação plaquetária (SOBEL e ADELMAN, 1988).

A TIH-2 tem origem imunológica, é uma síndrome severa de trombocitopenia que ocorre em aproximadamente 2% dos pacientes, após 6 a 14 dias do início da terapia. Quando as plaquetas são ativadas, o fator plaquetário 4 (FP-4) é liberado do seu interior, e de células endoteliais. A heparina e outros glicosaminoglicanos ligam-se as moléculas de FP-4, ocorre produção de Ig G contra o complexo heparina/FP-4, a Ig G liga-se a este complexo formando o complexo imune Ig G/heparina/FP-4. O complexo imune liga-se as plaquetas ativando-as, as plaquetas ativadas agregam-se e são removidas prematuramente da circulação ocasionando a trombocitopenia. O complexo imune Ig G/heparina/FP-4 pode ativar a coagulação sangüínea permitindo a geração de trombina, o complexo também pode promover a liberação de fator tissular de células endoteliais, estes eventos juntos ocasionam complicações trombóticas em pacientes com TIH-2 (BENTON e GERSH, 1998; WARKETIN, BARKIN e NEWER, 1999; FABRIS et al., 2000; GREINACHER et al., 2001; KELTON, 2002).

Pacientes que recebem altas doses de heparina (15000 a 30000 U/dia) por períodos superiores a 6 meses podem desenvolver osteoporose, entretanto o

mecanismo pelo qual a heparina produz osteoporose é incerto (JONATHAN et al., 2004). Estudos sugerem que a heparina aumenta a atividade colagenolítica, diminui a estabilidade lisossomal e liga-se a diferentes íons incluindo o cálcio, impedindo assim a calcificação (JAQUES, 1979).

Outros efeitos adversos são raros e incluem alopecia, reação de hipersensibilidade, hipercalemia e hipoaldosteronismo (BICK e FRENKEL, 1999).

1.5.2 Heparina de Baixa Massa Molar (HBMM)

O desenvolvimento de heparina de baixa massa molar (HBMM) foi motivado pela necessidade de melhorar o perfil farmacológico e farmacocinético das heparinas não fracionadas (COHEN, 2000). HBMM foi introduzida como droga antitrombótica a partir da década de 1980, inicialmente para prevenir a trombose venosa profunda e alguns anos mais tarde para tratar a trombose venosa profunda já estabelecida (BONEU, 2000).

HBMMs são produzidas a partir de heparinas não fracionadas por vários processos: depolimerização com ácido nitroso (ex. daltaparin, nadroparin, reviparin), degradação enzimática (ex. tizaparin) ou por benzilação seguida de hidrólise alcalina (ex. enoxaparin) (HIRSH et al., 1998). Dependendo da preparação as HBMMs apresentam massa molar entre 2000 a 10000 Da, com média em torno de 4000 a 6000 Da (SAMANA, BARA e GOUIN-THIBAUT, 1996). Contém a seqüência pentassacarídica específica necessária para ligar-se com a antitrombina e facilitar a inibição do fator Xa, entretanto, apresentam tamanho insuficiente para ligar-se e inibir a trombina (KAKKAR, 2004). Como as HBMMs apresentam a habilidade específica para inibir o fator Xa e não a trombina, as HBMMs possuem melhor propriedade antitrombótica e menor propriedade anticoagulante (WEITZ, 1997).

Ao contrário das heparinas não fracionadas, as HBMMs possuem um diferente perfil farmacológico, HBMMs possuem melhor biodisponibilidade (90% para HBMM

versus 30% para a heparina não fracionada) e maior tempo de meia vida devido a baixa afinidade à proteínas plasmáticas e células endoteliais (HIRSH et al., 1995). Como a meia vida é maior, a administração de HBMM pode ser feita de uma a duas vezes ao dia por via subcutânea sem a necessidade de monitoramento laboratorial. HBMMs tem ação anticoagulante menor que as heparinas não fracionadas, observa-se em vários modelos animais que o tempo de sangramento induzido por HBMM é menor que para as heparinas não fracionadas (CARTER et al., 1982; PALM et al., 1990).

A frequência de trombocitopenia induzida por heparina é menor com o uso de HBMMs do que com heparinas não fracionadas, isso ocorre, pois HBMMs interagem menos com o fator plaquetário 4, impedindo a formação do complexo imunogênico (LANE et al., 1984). Além disso, o risco de osteoporose induzido pela heparina é reduzido com o uso de HBMMs (BONEU, 2000).

1.5.3 Outros Agentes Anticoagulantes

Além das heparinas não fracionada e heparinas de baixa massa molar, outros agentes podem ser utilizados nas desordens tromboembólicas.

Drogas antiplaquetárias como aspirina e antiinflamatórios não esteroides, os quais inibem a função plaquetária, são utilizados amplamente em distúrbios da coagulação (WU, 2001). Anticoagulantes orais como a warfarina, por exemplo, são utilizados, pois, interferem na produção de fatores da coagulação ativos vitamina-K dependentes (trombina, fatores VII, IX e X) (WU, 2001; HIRSH, 2003). Os inibidores diretos da trombina como hirudina, bivalirudina e argatroban são aprovados pelo FDA para uso na terapia anticoagulante (AXELROD e WAKEFIELD, 2001; WEITZ e CROWTHER, 2002). Além destes, inibidores diretos e indiretos do fator Xa, inibidores do fator IXa, moduladores da proteína C e inibidores do complexo fator VIIa-fator tissular estão sob desenvolvimento (HIRSH, 2003).

1.6 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Polissacarídeos sulfatados compreendem um complexo grupo de macromoléculas com uma ampla faixa de propriedades biológicas importantes (CHAIDEDGUMJORN *et al.*, 2002). Estes polímeros aniônicos podem ser de origem natural, semi-sintética ou sintética, entre eles pode-se citar dextrana sulfatada, quitina e quitosana sulfatada, carragenanas, fucoidanas, glicosaminoglicanas, glucanas sulfatadas, galactomananas sulfatadas, galactanas sulfatadas, etc. (HUANG *et al.*, 2003; BODE e FRANZ, 1991).

Em relação às propriedades biológicas, a atividade anticoagulante e a atividade antitrombótica são as mais atrativas e têm sido amplamente estudadas nestes polímeros (MARTINICHEN, 2001; MOURÃO *et al.*, 1996,1998; PEREIRA *et al.*, 1999; GERMANO, 1996; STUELP, 1997; PIRES *et al.*, 2001). Os polissacarídeos sulfatados de origem vegetal ou animal, derivados sintéticos de polissacarídeos preparados por sulfatação de polissacarídeos neutros e oligossacarídeos acídicos e seus análogos sintéticos podem ser denominados de heparinóides ou análogos da heparina, desde que tenham ação anticoagulante e/ou antitrombótica. Assim polissacarídeos sulfatados com ação anticoagulante e/ou antitrombótica também podem ser denominados de heparinóides (HOFFMAN, LARM e LARSSON, 1982; SCULLY e KAKKAR, 1984a; GUNAY e LINHARDT, 1999).

Dentre os polissacarídeos sulfatados naturalmente com atividade biológica destacam-se várias fucanas (NISHINO, AIZU e NAGUMO, 1991b; NISHINO e NAGUMO, 1992; MULLOY *et al.*, 1994).

Fucoidana é um polissacarídeo extraído de algas marinhas marrons de alta massa molecular e altamente sulfatada, que possui atividade anticoagulante e antitrombótica (SPRINGER *et al.*, 1957; BOISSON-VIDAL *et al.*, 1991; MAURAY *et al.*, 1995), é composta de unidades de L-fucose em ligação α (1 \rightarrow 2) ou α (1 \rightarrow 3)-4-O-sulfatada com ramificações de unidades de D-xilose, D-galactose, ácido D-glucurônico ou sulfato nas posições 3 ou 2 (PATANKAR *et al.*, 1993). A atividade anticoagulante depende da massa molecular e da composição química da fucoidana, particularmente

dos conteúdos de fucose e sulfato (GRAUFFEL *et al.*, 1989; NISHINO, AIZU e NAGUMO, 1991a), este polissacarídeo catalisa a inibição da trombina pela AT e principalmente pelo cofator II da heparina, (CHURCH *et al.*, 1989; NISHINO, AIZU e NAGUMO, 1991b; COLLIEC *et al.*, 1991; MAURAY *et al.*, 1995).

Fucoidanas típicas apresentando alto conteúdo de fucose e sulfato e baixo conteúdo de ácido urônico e outros açúcares neutros, possuem uma potente atividade anticoagulante. Fucoïdanas com grande quantidade de ácido urônico e outros açúcares neutros além da fucose e pouca quantidade de sulfato, possuem baixa atividade anticoagulante (NISHINO, TAKABE e NAGUMO, 1994).

NISHINO e NAGUMO (1992) em estudo comparativo com fucanas naturalmente sulfatadas demonstraram que a atividade anticoagulante apresentada pelas mesmas dependia não só do conteúdo em sulfato, mas também da sua conformação e massa molecular.

PEREIRA e colaboradores (1999) compararam a atividade anticoagulante de fucanas sulfatadas provenientes de equinodermos com fucanas sulfatadas de algas marinhas marrons. As fucanas sulfatadas dos equinodermos estudados (*Lytechinus variagatus*, *Arbacia lixula* e *Ludwigothurea grisea*) apresentaram estruturas simples, compostas por unidades repetidas de oligossacarídeos, com diferentes padrões de sulfatação, já as fucanas sulfatadas provenientes das algas marrons *Fucus vesiculosos*, *Laminarina brasiliensis* e *Ascophyllum nodosum* demonstraram ser moléculas complexas, heterogêneas, ramificadas com diferentes padrões de sulfatação. Os resultados obtidos quanto à atividade anticoagulante demonstraram que os diferentes aspectos estruturais determinam não apenas o potencial anticoagulante das fucanas sulfatadas, mas também o mecanismo pelo qual essas moléculas exercem sua atividade. As fucanas ramificadas de algas marrons inibiram diretamente a trombina enquanto que as fucanas de equinodermos requerem a presença de antitrombina ou cofator II da heparina para inibir a trombina (PEREIRA *et al.*, 1999).

Em estudos realizados com fucanas de baixa massa molecular, obtidas por hidrólise parcial ou despolimerização de fucoïdanas extraídas da alga marinha marrom *Ascophyllum nodosum*, ficou demonstrado que as unidades de fucose estavam

sulfatadas principalmente em O-2, em menor extensão em O-3 e em menor extensão ainda em O-4 e em O-2,3. A atividade anticoagulante destas fucanas dependeram não apenas da massa molecular e conteúdo de sulfato, como dos níveis de 2-O-sulfato e 2,3-di-O-sulfato nas moléculas (CHEVOLOT, *et al.*, 1999).

Vários extratos aquosos obtidos da alga marinha *Codium dwarkense*, os quais continham polissacarídeos naturalmente sulfatados compostos principalmente por arabinose e galactose, foram testados quanto às propriedades anticoagulantes *in vitro*. A atividade anticoagulante nas diferentes frações analisadas foi proporcional ao conteúdo de carboidrato e sulfato e inversamente proporcional ao conteúdo de proteína e ácido urônico (SIDDHANTA, *et al.*, 1999). Um outro polissacarídeo sulfatado extraído de folhas de *Artemisia princeps* demonstrou aumentar a reação entre a heparina cofator II e a trombina mais que 6000 vezes sendo que este efeito foi abolido pelo tratamento com condroitinase AC I, heparinase ou heparitinase, enquanto que, condroitinase ABC ou condroitinase AC II não teve nenhum efeito (HAYAKAWA, HAYASHI e SAKURAGAWA, 1995).

UEHARA, TAKESHITA e MAEDA (1992) isolaram uma ramnana sulfatada obtida através da extração em água quente da alga *Monostroma nitidum* que apresentou uma atividade anticoagulante cerca de sete vezes maior que a apresentada pela heparina (UEHARA, TAKESHITA e MAEDA, 1992).

Um condroitin sulfato fucosilado extraído do pepino do mar da espécie *Ludwigothurea grisea* exibiu uma potente ação anticoagulante devido sua habilidade em potencializar a inibição da trombina através do cofator II da heparina e antitrombina. Comparações realizadas entre o polissacarídeo nativo e os quimicamente modificados (desulfatado, parcialmente defucosilado e carboxi-reduzido) sugeriram que as ramificações de fucose sulfatadas são responsáveis por sua alta atividade anticoagulante (MOURÃO *et al.*, 1996). Esta mesma molécula e seus derivados modificados quimicamente foram testados em experimentos de estase trombótica em ratos para avaliar as propriedades antitrombóticas. Os resultados obtidos demonstram que o polissacarídeo nativo reduz a trombose de uma maneira dose dependente em 10 minutos após a estase na dose de 1,5 mg/kg (60 UI/kg). Os polissacarídeos

parcialmente defucosilados e desulfatados aboliram completamente a ação anticoagulante e antitrombótica (MOURÃO *et al.*, 1998).

Alguns estudos demonstram que compostos semelhantes a heparina (heparin-like) apresentam atividade anticoagulante. Uma substância denominada de mactina com estrutura semelhante a heparina isolada dos moluscos *Cyprinia islandica* e *Mactrus pussula*, possui ação anticoagulante (CÁSSARO E DIETRICH, 1977). Outra substância com ação anticoagulante e estrutura similar a heparina foi isolada do crustáceo *Penaeus brasiliensis*, a heparina deste invertebrado apresentou massa molar de 8,5 kDa e uma atividade anticoagulante de 95 UI/mg, estudos *in vitro* também demonstraram que a ação anticoagulante é exercida através da inibição do fator Xa e da inibição da trombina mediada pelo cofator II da heparina (DIETRICH *et al.*, 1999).

Acharan sulfato, uma glicosaminoglicana com estrutura similar a heparina isolada de *Achatina fulica* é capaz de prolongar o tempo de coagulação determinado pelo teste APTT (tempo de tromboplastina parcial ativado) e proteger ratos e camundongos de morte induzida pela trombina (LI *et al.*, 2004).

Entre os polissacarídeos modificados por sulfatação química com ação anticoagulante e/ ou antitrombótica destacam-se as glucanas, as galactoglucomananas, as galactomananas e dextranas sulfatadas (SIÈ *et al.*, 1989; BODE e FRANZ, 1991; STUELP, 1997; PIRES *et al.*, 2001; MARTINICHEN, 2001). Em estudos realizados com uma β -glucana (1 \rightarrow 3) com um grau de sulfatação de 0,83 grupos sulfato por unidade de glucose, observou-se que o efeito anticoagulante deste polímero é dose-dependente em todos os testes de coagulação empregados no estudo, além disso, a glucana sulfatada é capaz de inibir a trombina diretamente (ALBAN *et al.*, 1995).

Várias moléculas de α -glucana linear (1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 6) foram sulfatadas em diferentes condições experimentais obtendo-se compostos com graus de sulfatação que variaram entre 0,17 e 1,99. Estas moléculas sulfatadas foram testadas quanto suas propriedades anticoagulantes. A ação anticoagulante destes derivados dependeu de vários parâmetros estruturais como: grau de sulfatação, massa molar e padrão de sulfatação (ALBAN, SCHAUERTE e FRANZ, 2002).

Polissacarídeos sulfatados quimicamente, incluindo uma β -xilana (1 \rightarrow 4), amilose, celulose, β -glucana (1 \rightarrow 3) e β -galactana (1 \rightarrow 3), foram testados quanto às propriedades anticoagulantes, os resultados obtidos indicaram que a atividade anticoagulante pode não depender da configuração anomérica (α ou β) ou tipo de polissacarídeo, mas sim do tipo de ligação glicosídica (CHAIDEDGUMJORN et al., 2002).

Um exopolissacarídeo (EPS) secretado pela bactéria *Alteromonas infernus*, consistindo de glucose, galactose, ácido urônico e ácido galacturônico na proporção de 1:1:0,7:0,4 foi sulfatado quimicamente obtendo-se duas moléculas com 20 e 40% de grupos sulfato, respectivamente. A atividade anticoagulante foi determinada *in vitro* através dos testes TT (tempo de trombina) e APTT, constatando-se que o EPS com maior conteúdo em sulfato apresentou melhor ação (JOUAULT et al., 2001).

WALL e colaboradores (2001) estudaram 17 oligossacarídeos sulfatados quimicamente, destes, apenas, 9 exibiram ação anticoagulante. O tamanho da cadeia, composição monossacarídica e tipo de ligação (α ou β) foram críticos para a atividade anticoagulante. Os compostos com maior atividade apresentaram uma ação de 5 a 6 vezes menor que a da heparina não fracionada, utilizada como controle. O oligossacarídeo mais ativo foi denominado de PI-88 (fosfomanopentose sulfato), este exerce o efeito anticoagulante por aumentar a habilidade do cofator II da heparina em inibir a trombina.

1.7 JUSTIFICATIVAS

A heparina tem sido usada como droga de escolha na profilaxia de eventos trombóticos pré- e pós-cirúrgicos (LINHADART e TOIDA, 1997), contudo, devido a seus efeitos indesejados, várias tentativas para produzir polissacarídeos sulfatados quimicamente que mimetizem suas ações anticoagulantes e antitrombóticas, a partir de polissacarídeos neutros de diversas fontes, têm sido feitas com grande êxito (CASU, 1985; RAZI *et al.*, 1995; STUELP, 1997; PIRES, 1998; PEREIRA et al., 1999; MARTINICHEN, 2001).

Entre os polissacarídeos modificados por sulfatação química destacam-se as glucanas, as arabinogalactanas, as xilanas e as dextranas, os quais, tem-se demonstrado como substitutos da heparina em ensaios *in vitro* (SIÈ *et al.*, 1989).

Devido à constatação de ação antitrombótica e anticoagulante em polissacarídeos produzidos por modificação química (sulfatação), busca-se a obtenção de novos agentes que possam substituir a heparina, nos eventos trombo-embólicos utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral avaliar, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, a possível ação anticoagulante e antitrombótica de polissacarídeos produzidos por sulfatação química

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Isolar e caracterizar uma β -glucana (1→6) linear do líquen *Parmotrema mantiqueirense* Hale;
1. Derivatizar a β -glucana (1→6) linear obtida do líquen *Parmotrema mantiqueirense* Hale através da técnica de sulfatação;
2. Determinar o grau de substituição da molécula sulfatada, através da análise do conteúdo em sulfato;
3. Realizar a análise estrutural do polissacarídeo sulfatado, por estudos RMN ^{13}C e metilação;
4. Realizar estudos quanto à ação anticoagulante *in vitro* e *in vivo* utilizando a β -glucana (1→6) sulfatada quimicamente extraída do líquen *P. mantiqueirense*;
5. Realizar estudos quanto à ação anticoagulante *in vivo* utilizando a galactoglucomanana sulfatada quimicamente, extraída do líquen *Cladonia ibitipocae*;
6. Realizar estudos quanto à ação antitrombótica *in vivo* utilizando a β -glucana (1→6) sulfatada quimicamente extraída do líquen *P. mantiqueirense* e galactoglucomanana sulfatada quimicamente, extraída do líquen *C. ibitipocae*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Heparina de mucosa intestinal de suíno (140 unidades USP/mg) foi adquirida da Sigma (St.LOUIS, MO, USA), tromboplastina de cérebro de coelho e os reativos para determinar o APTT e PT foram obtidos da Instrumentation Laboratory – IL (Lexington, MA, USA), Plasma normal humano foi obtido por centrifugação (2000 x g por 15 min) de um "pool" de sangue citratado (1/10 vol. de citrato de trisódico a 3,8%). O reativo para determinar o TT foi adquirido da Behring (Marburg, Germany). Piridina, formamida, ácido clorosulfônico, metanol, etanol e ácido trifluoroacético foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany). Os demais reativos empregados foram de grau analítico.

3.2 POLISSACARÍDEOS EM ESTUDO

3.2.1 Galactoglucomanana Sulfatada do Líquen *Cladonia ibitipocae* (GGM- SO₄)

A galactoglucomanana proveniente do líquen *Cladonia ibitipocae* foi isolada e caracterizada por WORANOVICZ e colaboradores (1999). O derivado sulfatado denominado neste trabalho de GGM-SO₄ foi estudado quanto às propriedades anticoagulantes *in vitro* por MARTINICHEN (2001) e utilizado neste trabalho para realizar ensaios *in vivo*.

3.2.2 β -glucana (1→6) do líquen *Parmotrema mantiqueirensis*

A β -glucana (1→6) proveniente do líquen *Parmotrema mantiqueirensis* foi obtida em colaboração com a doutoranda Elaine R. Carbonero e denominada de β -G. O polissacarídeo foi quimicamente sulfatado e estudado quanto às propriedades anticoagulantes e antitrombóticas *in vivo* e *in vitro*.

3.3 OBTENÇÃO DA β -GLUCANA (1 \rightarrow 6) DO LÍQUEN *Parmotrema mantiqueirense*

3.3.1 Coleta do Líquen

O líquen *Parmotrema mantiqueirense* Hale (família Parmeliaceae) foi coletado em 1996, na cidade da Lapa-PR e identificado pela prof.^a Dra. Sionara Eliasaro, do departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná e está depositado no Herbário UPCB da UFPR, sob o número 33355.

3.3.2 Extração e Purificação da β -glucana (1 \rightarrow 6)

O líquen seco e moído foi extraído com clorofórmio-metanol (2:1, v/v) por 2 horas a 60°C, sob refluxo, e em seguida filtrado. O material residual foi tratado com metanol:água (4:1 v/v) por 3 horas a 80°C, filtrado e o resíduo foi extraído sucessivamente com solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 2% por três vezes a 100°C por 3h sob refluxo na presença de NaBH₄, o extrato obtido foi filtrado e o material residual foi tratado com KOH a 10% por três vezes a 100°C por 3h sob refluxo, o material foi filtrado e os extratos obtidos com a extração alcalina a 10% foram reunidos, neutralizados com ácido acético glacial, dialisados contra água corrente por 72 horas e liofilizados. O extrato bruto obtido foi parcialmente purificado por um processo de congelamento e descongelamento (GORIN e IACOMINI, 1984), resultando em um precipitado e um sobrenadante. O sobrenadante (gelo-degelo) foi tratado com solução de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965), resultando em um precipitado, o qual foi separado por centrifugação. O precipitado Fehling foi neutralizado com ácido acético e exaustivamente dialisado contra água corrente e deionizado com resina trocadora de íons mista.

3.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DA β -GLUCANA (1 \rightarrow 6) e β -GLUCANA (1 \rightarrow 6) sulfatada

3.4.1 Determinação da Composição Monossacarídica

A hidrólise do polissacarídeo foi realizada com TFA 2M a 100°C por 8 horas. O TFA remanescente foi removido por evaporação até *secura*. Após dissolução em água, o material foi reduzido com borohidreto de sódio (NaBH₄) a temperatura ambiente por 16 horas (pH 9-10). Após os íons sódio foram retirados por tratamento com resina catiônica. A solução foi filtrada e levada à *secura* em evaporador rotatório. O ácido bórico formado foi eliminado na forma de borato de trimetila, através de co-evaporações com metanol. Os alditóis formados foram acetilados com anidrido acético-piridina (1:1, v/v) a temperatura ambiente por 12 horas (WOLFROM e THOMPSON, 1963a, 1963b). A reação foi interrompida por adição de gelo e os acetatos de alditóis formados, extraídos com clorofórmio. A piridina residual presente foi removida por complexação com sulfato de cobre 2%. Após a remoção da piridina, a solução foi desidratada com acetato de sódio anidro e filtrada em papel de filtro. O clorofórmio foi evaporado e os acetatos de alditóis obtidos foram analisados por cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS) usando um cromatógrafo a gás Varian, modelo 3300, acoplado a um espectrômetro de massa da marca Finnigan Ion-Trap, modelo ITD 800 R-12 e equipado com coluna capilar DB-225 (30 m x 0,25 mm).

3.4.2 Metilação

Os polissacarídeos (5 mg) foram metilados segundo o método descrito por CIUCANU e KEREK (1984). As amostras liofilizadas foram solubilizadas em DMSO. Após solubilização, adicionou-se NaOH pulverizado e seco, na proporção 4:1 carboidrato, o sistema foi agitado por 30 minutos em agitador magnético com subsequente adição de iodeto de metila (CH₃I) e agitação por mais 30 minutos. A reação foi interrompida com adição de água e neutralizada com gotas de ácido acético. Este processo foi repetido quatro vezes.

Os derivados per-O-metilados foram metanolizados com solução de ácido clorídrico em metanol a 3,5% em estufa por 2 horas a 80°C. Após a adição de carbonato de prata para a eliminação do ácido na forma de cloreto de prata, foi realizada a filtração em papel de filtro. O filtrado foi evaporado à secura e submetido a hidrólise com 1,5 ml de ácido sulfúrico 0,5 M a 100°C por 14 horas. O excesso de ácido sulfúrico foi eliminado com carbonato de bário. O material hidrolisado presente no filtrado foi reduzido com NaBH₄, acetilado como descrito acima e analisado por GC-MS.

3.4.3 Métodos Espectroscópicos

3.4.3.1 Espectroscopia de ressonância nuclear de carbono 13 (RMN ¹³C)

Os espectros de RMN ¹³C dos polissacarídeos nativos e sulfatados foram obtidos utilizando espectrofotômetro Bruker, série AVANCE, modelo DRX-400, acoplado a um transformador de Fourier.

Os polissacarídeos nativos e sulfatados foram solubilizados em água deuterada (D₂O) e os espectros obtidos à 50°C. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, utilizando como padrão interno acetona ($\delta= 30,2$).

3.5 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA DA β -GLUCANA (1 \rightarrow 6)

A β -glucana (1 \rightarrow 6) foi sulfatada de acordo com a metodologia descrita por O'NEILL (1955), com algumas modificações. Para tal, foram utilizadas proporções molares diferentes de ácido clorosulfônico (agente sulfatante) por hidroxila livre do polissacarídeo, 6 mols de ácido clorosulfônico/OH livre e 10 mols de ácido clorosulfônico/OH livre, respectivamente.

3.5.1 Reação de Sulfatação com 6 mols de Ácido Clorosulfônico/ OH livre

A β -glucana (1 \rightarrow 6) (100 mg) foi dissolvida em formamida (10 ml) e piridina (10 ml) sob agitação, tomando o devido cuidado para não hidratar o sistema, através de uma boa vedação do sistema utilizado. Após completa dissolução, a mistura reacional foi colocada sob banho de gelo e adicionou-se o ácido clorosulfônico gota a gota (0,75 ml), evitando a entrada de umidade no meio reacional através da troca seqüencial das pipetas utilizadas. Após a completa adição do ácido clorosulfônico, a agitação e o banho de gelo foram mantidos por mais 2 horas, decorrido este tempo o sistema foi mantido a 4°C por 12 horas.

O bloqueio da reação foi realizado através da adição de gelo no meio reacional e a neutralização foi feita com solução de bicarbonato de sódio a 10%, até a liberação completa do gás carbônico formado. A solução obtida foi dialisada exaustivamente contra água corrente por aproximadamente 6 dias e, posteriormente liofilizada, obtendo-se assim o sal sódico do derivado sulfatado com 6 mols de ácido clorosulfônico/OH livre, denominado de β -G-S₁.

3.5.2 Reação de Sulfatação com 10 mols de Ácido Clorosulfônico/ OH livre

A β -glucana (1 \rightarrow 6) (2 g) foi dissolvida em formamida (100 ml) e piridina (100 ml) sob agitação, tomando o devido cuidado para não hidratar o sistema, através de uma boa vedação do sistema utilizado. Após completa dissolução, a mistura reacional foi colocada sob banho de gelo e adicionou-se o ácido clorosulfônico gota a gota (25 ml), evitando a entrada de umidade no meio reacional através da troca seqüencial das pipetas utilizadas. Após a completa adição do ácido clorosulfônico, a agitação e o banho de gelo foram mantidos por mais 2 horas, decorrido este tempo o sistema foi mantido a 4°C por 12 horas.

O bloqueio da reação foi realizado através da adição de gelo no meio reacional e a neutralização foi feita com solução de bicarbonato de sódio a 10%, até a liberação completa de CO₂ formado. A solução obtida foi dialisada exaustivamente contra água

corrente por aproximadamente 6 dias e, posteriormente liofilizada, obtendo-se assim o sal sódico do derivado sulfatado com 10 mols de ácido clorosulfônico/OH livre, denominado de β -G-S₂.

3.6 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (D.S.)

O grau de substituição das moléculas foi determinado através do método turbidimétrico, empregando o reagente cloreto de bário–gelatina, descrito por DODGSON e PRICE (1962). Uma amostra de cada polissacarídeo sulfatado (4 mg) foi hidrolisada com 4 ml de ácido clorídrico 1 M por 5 horas a 100°C. Uma alíquota de 0,2 ml do hidrolisado foi tratada com 3,8 ml de TCA a 3% e com 1,0 ml de solução de cloreto de bário/gelatina recém preparada. A mistura reacional permanece 15 minutos à temperatura ambiente e a absorbância foi determinada a 360 nm contra o tubo branco preparado com água ao invés da amostra hidrolisada. O teor de sulfato foi determinado em relação a uma curva padrão de sulfato de sódio (20 a 180 μ g/ml). A determinação foi realizada em triplicata, em dias diferentes foram realizados 3 experimentos independentes e determinada a média.

A partir da fórmula abaixo se calcula o D.S.

$$D.S = 162 \times S^*/3200 - 102 \times S^* \text{ (p/hexoses)}$$

Onde:

162 representa 1 mol da unidade repetitiva (hexose);

3200 representa a massa atômica do enxofre (32 g) x 100

102 representa 1 mol do éster substituinte (SO₃Na) – 1

S representa o teor de enxofre dado em porcentagem (WHISTLER e SPENCER, 1964).

3.7 TESTES ANTICOAGULANTES *in vitro*

Os testes de atividade anticoagulante dos polissacarídeos nativos e sulfatados foram realizados no coagulômetro COAG-A-MATE XM da marca Organon Técnica. Os “pools” de plasma humanos normais utilizados foram cedidos semanalmente pelo Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, sob o aval da Farmacêutica Bioquímica Lismara Bonfim.

3.7.1 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT)

Este ensaio foi realizado com os polissacarídeos: β -glucana (1 \rightarrow 6), β -G-S₁, β -G-S₂ e heparina padrão, os quais foram diluídos em salina em diversas concentrações. Plasma humano normal citratado (90 μ l) ou plasma de rato citratado (90 μ l) foi misturado com 10 μ l de diversas soluções em diferentes concentrações de β -glucana (1 \rightarrow 6), β -G-S₁, β -G-S₂ e heparina padrão imediatamente, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos antes do início do teste. Para controle, salina foi adicionada ao plasma em uma razão de 1:10.

Plasma humano normal (100 μ l) ou plasma de rato (100 μ l) contendo várias concentrações de β -glucana (1 \rightarrow 6), β -G-S₂ ou heparina, foi incubado separadamente a 37°C por 1 minuto, em seguida adicionou-se 100 μ l de cefalina bovina e a incubação persistiu por mais 3 minutos a 37°C, decorrido este tempo adicionou-se cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,25 M e o tempo de coagulação foi determinado. O tempo de coagulação foi medido em duplicata e repetido por 3 vezes em dias diferentes para cada concentração testada usando um coagulômetro.

O tempo máximo de ensaio foi 300 segundos, os resultados foram expressos em μ g de polissacarídeo/ml de plasma e o tempo de coagulação em segundos.

3.7.2 Tempo de Trombina (TT)

Os polissacarídeos β -glucana (1 \rightarrow 6), β -G-S₁, β -G-S₂ e heparina padrão foram diluídos em salina em diversas concentrações. Plasma humano normal citratado (90 μ l) ou plasma de rato citratado (90 μ l) foi misturado com 10 μ l de diversas soluções em diferentes concentrações de β -glucana (1 \rightarrow 6), β -G-S₁, β -G-S₂ e heparina padrão imediatamente, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos antes do início do teste. Para controle, salina foi adicionada ao plasma em uma razão de 1:10.

Para a determinação do TT plasma humano normal (100 μ l) ou plasma de rato (100 μ l) contendo várias concentrações de β -glucana (1 \rightarrow 6), β -G-S₁, β -G-S₂ ou heparina foi incubado a 37°C por 2 minutos, decorrido este tempo adicionou-se 200 μ l de trombina. O tempo para o aparecimento do coágulo de fibrina foi medido em duplicata e repetido por 3 vezes em dias diferentes, para cada concentração testada no coagulômetro. O tempo máximo de ensaio foi 300 segundos, os resultados foram expressos em μ g de polissacarídeo/ml de plasma e o tempo de coagulação em segundos.

3.7.3 Tempo de Protrombina (PT)

Os polissacarídeos β -glucana (1 \rightarrow 6), β -G-S₁, β -G-S₂ e heparina padrão foram diluídos em salina em diversas concentrações. Plasma humano normal citratado (90 μ l) foi misturado com 10 μ l de diversas soluções em diferentes concentrações de β -glucana (1 \rightarrow 6), β -G-S₁, β -G-S₂ e heparina padrão imediatamente, antes do início do teste. Para controle, salina foi adicionada ao plasma em uma razão de 1:10. Para a determinação do PT, plasma humano normal (100 μ l) contendo várias concentrações de β -glucana (1 \rightarrow 6), β -G-S₁, β -G-S₂ ou heparina foi incubado a 37°C por 2 minutos, decorrido este tempo adicionou-se 200 μ l de tromboplastina cálcica de cérebro de coelho. O tempo

para o aparecimento do coágulo de fibrina foi medido em duplicata e repetido por 3 vezes em dias diferentes, para cada concentração testada no coagulômetro.

O tempo máximo de ensaio foi 300 segundos, os resultados foram expressos em μg de polissacarídeo/ml de plasma e o tempo de coagulação em segundos.

3.7.4 Inibição da Trombina (IIa) pelo Cofator II da Heparina ou Antitrombina (AT)

A inibição da trombina pelo cofator II da heparina ou antitrombina na presença da $\beta\text{-G-S}_2$ foi avaliada através do ensaio da atividade amidolítica da trombina usando para tanto, substrato cromogênico de acordo com a metodologia descrita por PAVÃO et al. (1998).

3.7.4.1 Inibição da trombina (IIa) pelo cofator II da heparina

Diferentes concentrações da $\beta\text{-G-S}_2$, foram incubadas em micro-cubetas por 60 segundos a 37°C com $10\ \mu\text{l}$ de trombina (20 nM), $25\ \mu\text{l}$ de cofator II da heparina (120nM) e tampão TS/PEG (Tris/HCl 0,02M, NaCl 0,15 M e polietileno glicol 1,0 mg/ml, pH 7,4). Após o período de incubação, $25\ \mu\text{l}$ do substrato cromogênico S-2238 (Chromogenix AB) em tampão TS/PEG foi adicionado e a absorbância foi medida em 405 nm em espectrofotômetro por 5 minutos. A taxa de variação na absorbância, expressa como $\Delta A_{405}/\text{min}$, foi proporcional a atividade remanescente da trombina no meio reacional. Experimentos controle foram realizados como descrito acima, porém, na ausência do polissacarídeo sulfatado. Para cada dose testada, foram feitas três determinações.

3.7.4.2 Inibição da trombina (IIa) pela antitrombina

A determinação da inibição da trombina pela antitrombina na presença da $\beta\text{-G-S}_2$, foi feita da mesma maneira descrita acima, exceto que, foi utilizado antitrombina (40 nM), ao invés de cofator II da heparina.

3.7.4.3 Inibição da Trombina (IIa) na presença da β -G-S₂ e ausência de inibidor

Diferentes concentrações da β -glucana (1 \rightarrow 6)-SO₄, foram incubadas em microcubetas por 60 segundos a 37°C com 10 μ l de trombina (20 nM) e tampão TS/PEG (Tris/HCl 0.02M, NaCl 0,15 M e polietileno glicol 1,0 mg/ml, pH 7,4) na ausência dos inibidores cofator II da heparina e antitrombina. Após o período de incubação, 25 μ l do substrato cromogênico S-2238 (Chromogenix AB) em tampão TS/PEG foi adicionado e a absorbância foi medida em 405nm em espectrofotômetro por 5 minutos. A taxa de variação na absorbância, expressa como $\Delta A_{405}/\text{min}$, foi proporcional a atividade remanescente da trombina no meio reacional. Experimentos controle foram realizados como descrito acima, porém, na ausência do polissacarídeo sulfatado. Para cada dose testada, foram feitas três determinações.

3.8 ANIMAIS

Os experimentos *in vivo* foram conduzidos em ratos Wistar machos pesando entre 250 a 300g, os quais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (100 mg/kg) e Xilasina (16 mg/kg) intramuscular. Os animais foram obtidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, onde foram alimentados com ração purina® e água *ad libidum*.

3.9 DETERMINAÇÃO DO APTT *ex vivo*

Os ratos foram anestesiados como descrito anteriormente e colocados em posição supina sobre a mesa cirúrgica, as patas dianteiras e traseiras foram fixadas com o auxílio de fita adesiva e a cabeça imobilizada. A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN). Heparina (0-500 μ g/kg), veículo (PBS) ou β -G-S₂ (0-1 mg/kg), foram administradas através da artéria carótida canulada. Amostras de sangue (0,5 ml) foram coletadas após 5, 15, 30 e 60 minutos da administração das substâncias testadas,

usando como anticoagulante citrato trisódico a 3,8%, mantendo a relação de 9 partes de sangue para 1 de anticoagulante. As amostras de sangue foram centrifugadas (2000 x g/10 min) e o plasma obtido testado quando ao teste APTT. Ao final do experimento os ratos foram sacrificados (Figura 5).

O teste APTT foi realizado utilizando um kit comercial obtido da Instrumentation Laboratory-IL. O plasma de rato (100 μ l) foi incubado a 37°C por 1 minuto, em seguida adicionou-se 100 μ l de cefalina bovina e a incubação persistiu por mais 3 minutos a 37°C, decorrido este tempo adicionou-se cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,25 M e o tempo de coagulação foi determinado usando um coagulômetro. O tempo de coagulação foi medido em duplicata para cada concentração testada, sendo que foram utilizados 6 animais para cada dosagem. Para cada grupo a média do APTT *ex vivo* \pm desvio padrão foi determinada.

3.10 TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS

Para avaliar o tempo de sangramento, os ratos foram anestesiados como já descrito e colocados em posição supina sobre a mesa cirúrgica, as patas dianteiras e traseiras foram fixadas com o auxílio de fita adesiva e a cabeça imobilizada. A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD AngiocathTM (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 μ g/kg), veículo (PBS), β -G-S₂ (0,1-1 mg/kg), ou GGM-SO₄ (0,5-2 mg/kg). O sangramento foi induzido por um corte na cauda do animal a 3 mm da extremidade terminal. A cada 30 segundos a extremidade cortada foi seca com papel de filtro e o tempo necessário para parar o sangramento foi medido em segundos (Figura 6). As moléculas testadas foram administradas 5 minutos antes de induzir o sangramento no animal. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média do tempo de sangramento \pm desvio padrão foi determinada.

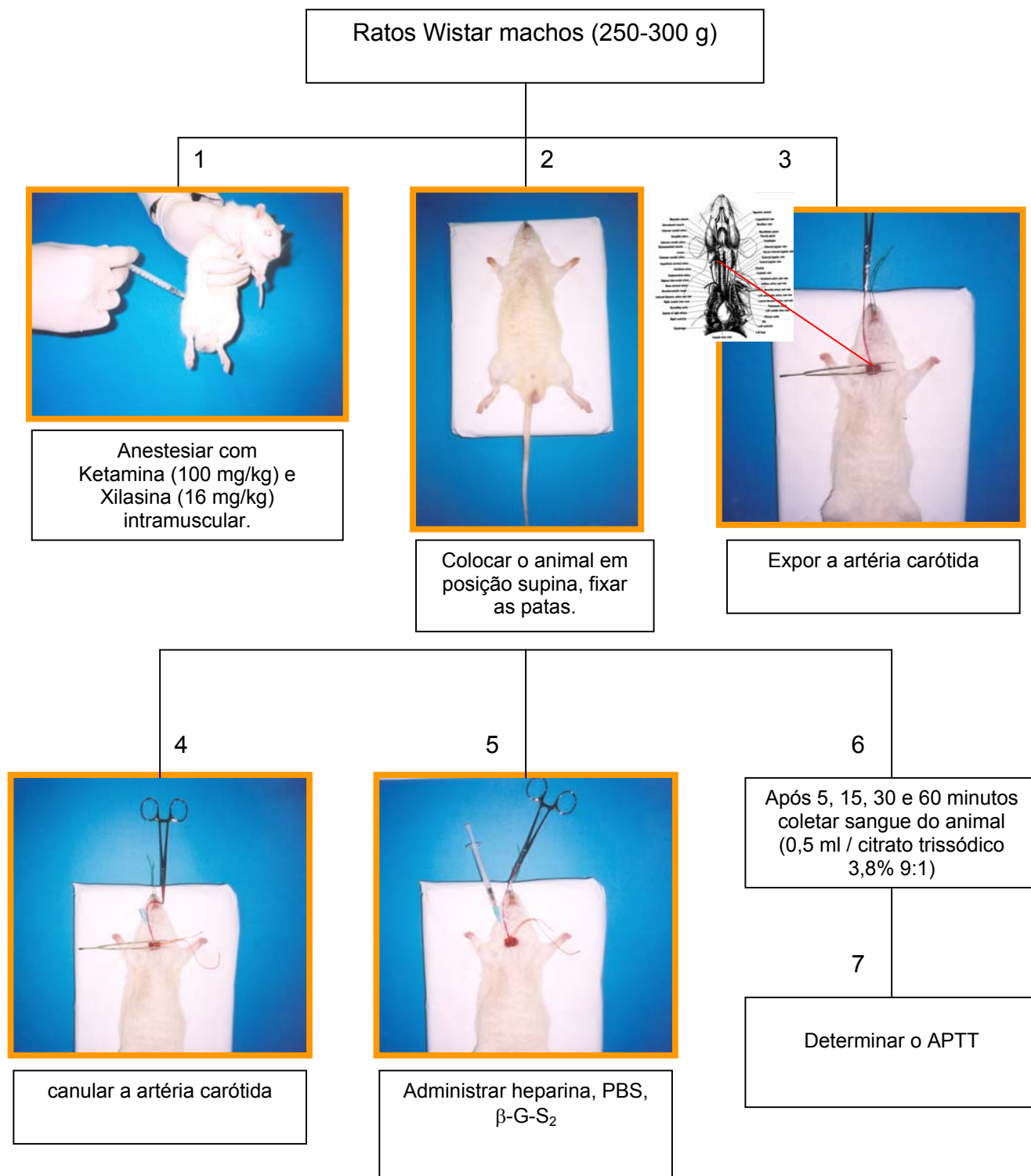
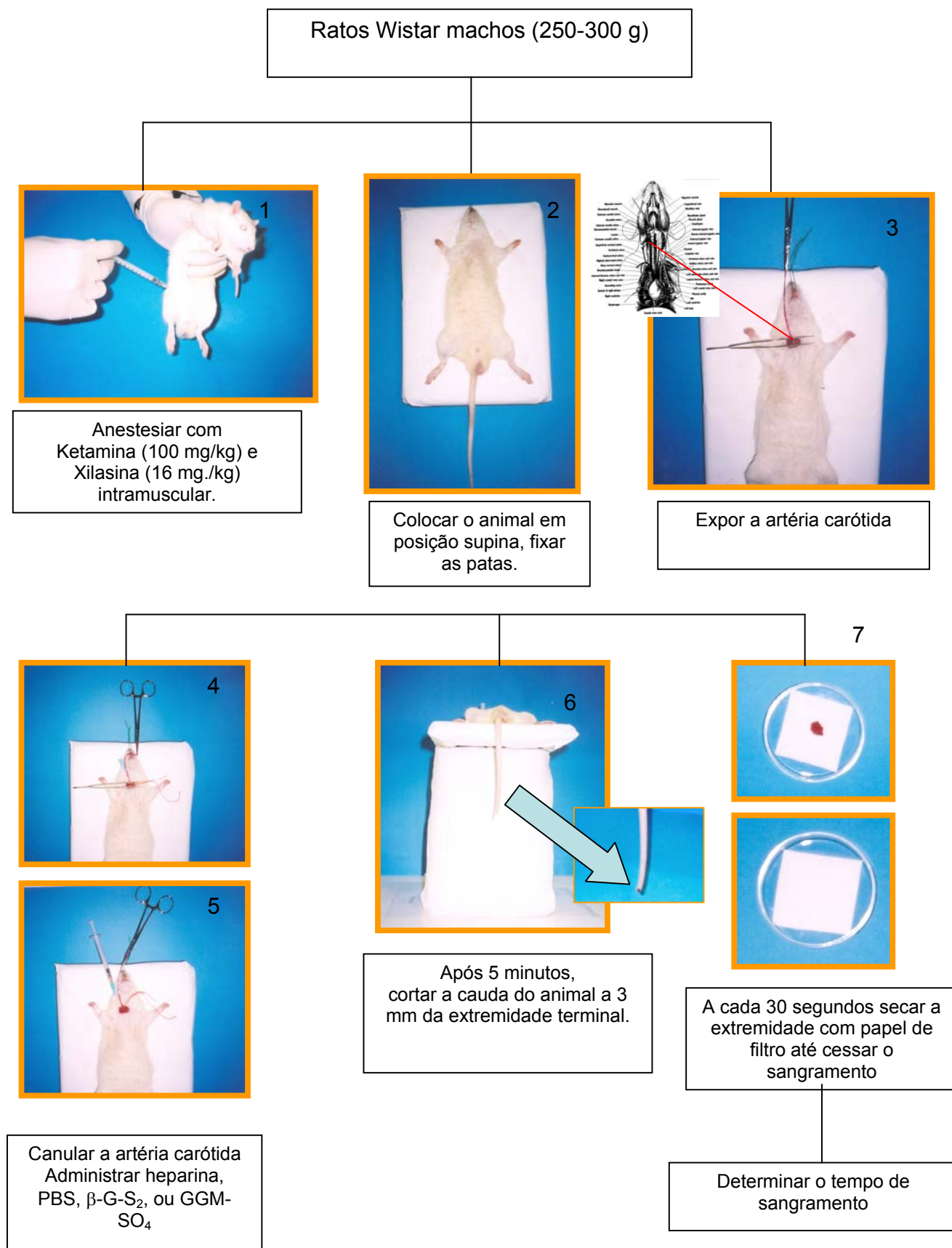
FIGURA 5 – ESQUEMA DA DETERMINAÇÃO DO APTT *ex vivo* EM RATOS

FIGURA 6 – ESQUEMA DA DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS



3.11 MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS

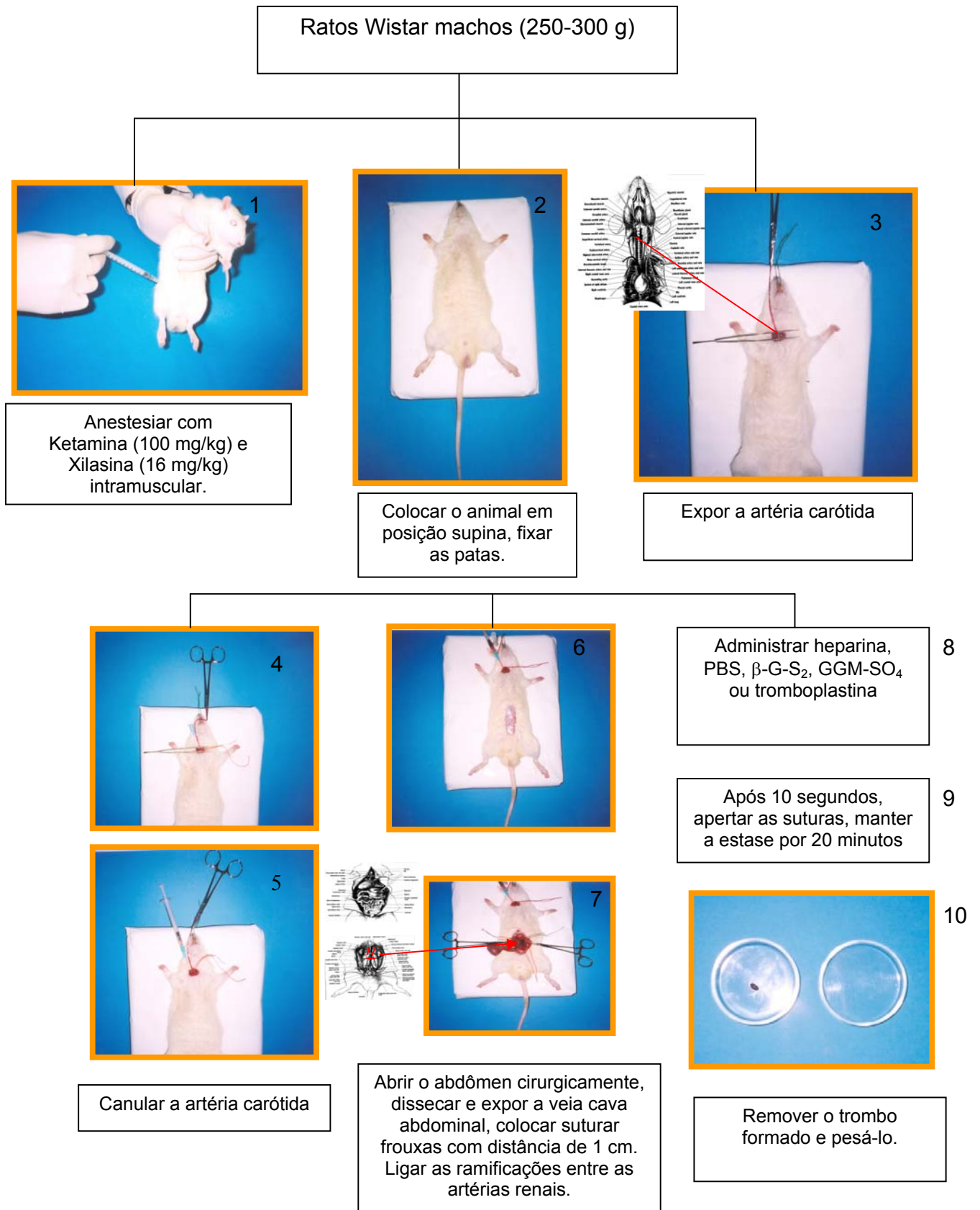
Com o intuito de avaliar o potencial antitrombótico dos polissacarídeos sulfatados estudados, um modelo de trombose venosa estase-induzida em ratos foi realizado. A formação do trombo foi induzida por uma combinação de estase e hipercoagulabilidade (BERRY et al., 1994). Os ratos foram anestesiados como já descrito e colocados em posição supina sobre a mesa cirúrgica, as patas dianteiras e traseiras foram fixadas com o auxílio de fita adesiva e a cabeça imobilizada. A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN)) para a administração de heparina (25-100 µg/kg), veículo (PBS), β-G-S₂ (0,25-2 mg/kg), GGM-SO₄ (0,25-2 mg/kg) e tromboplastina (10 mg/kg). O abdômen de cada animal foi aberto cirurgicamente, a veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e exposta para a colocação de suturas frouxas com distância de 1 cm. As ramificações entre as veias renais foram ligadas. A formação do trombo foi induzida por uma injeção de tromboplastina e 10 segundos após por estase do seguimento de 1 cm da veia cava abdominal. A estase foi mantida por 20 minutos, após este período, o trombo foi removido e pesado em balança analítica (Figura 7).

Os polissacarídeos e o veículo foram administrados 5, 10, 15, 30 e 60 minutos antes que a tromboplastina. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média da massa do trombo formado ± desvio padrão foi determinada.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA, e na seqüência o teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

FIGURA 7 – ESQUEMA DO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 β -GLUCANA (1 \rightarrow 6) DO LÍQUEN *Parmotrema mantiqueirense*

4.1.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA β -GLUCANA (1 \rightarrow 6) NATIVA DO LÍQUEN *Parmotrema mantiqueirense*

Para a obtenção da β -glucana (1 \rightarrow 6), o líquen *P. mantiqueirense* foi inicialmente submetido a uma extração com clorofórmio-metanol (2:1 v/v) a 60°C sob refluxo por 2 horas e filtrado à quente. A finalidade deste procedimento é a remoção de pigmentos e outras substâncias lipossolúveis, como por exemplo, os glicolipídeos. Na seqüência, o líquen foi extraído com metanol-água (4:1, v/v) a 80°C por 3h sob refluxo com o intuito de remover álcoois e oligossacarídeos.

Após a extração com metanol:água, o resíduo liquênico foi tratado com borohidreto de sódio para evitar a degradação das cadeias polissacarídicas e na seqüência extraído com hidróxido de potássio (KOH) 2% a 100°C por 3 horas sob refluxo por três vezes, na presença de NaBH₄. Os extratos obtidos foram filtrados ainda quentes, e o resíduo extraído com hidróxido de potássio (KOH) 10% a 100°C por 3 horas sob refluxo por mais 3 vezes, estes extratos foram reunidos, neutralizados com ácido acético glacial, dializados contra água corrente por 72 horas e concentrados em evaporador rotatório, sendo então submetidos ao processo de purificação pela técnica do congelamento e descongelamento, o sobrenadante obtido por este processo foi tratado com solução de Fehling. O precipitado resultante foi neutralizado com ácido acético e exaustivamente dialisado contra água corrente por 72 horas e deionizado com resina trocadora de íons mista (Figura 8). A análise do precipitado de Fehling por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), demonstrou ser composta por apenas um polissacarídeo devido ao perfil homogêneo, apresentando Mw 4,2 x 10⁵ Da (dn/dc=0,141). A análise por CG-MS mostrou que esta fração apresenta apenas unidades de glucose.

O espectro de RMN ^{13}C desta fração (Figura 9) apresenta seis sinais idênticos aos de uma β -glucana ligada (1 \rightarrow 6) denominada de pustulana. A configuração β foi confirmada pelo sinal em campo baixo, δ 103,5, que corresponde ao carbono C-1 e pelo sinal em campo alto do H-1 em δ 4,51. O sinal de C-6 em δ 69,3 demonstra a presença de unidades de glucopiranosose 6-O-substituídas, confirmado por um correspondente sinal $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ invertido no espectro de DEPT. Os outros sinais observados em δ 73,6, 76,1, 70,0 e 75,4 correspondem aos carbonos C-2, C-3, C-4 e C-5, respectivamente (SASSAKI et al., 2002).

Os dados obtidos na análise do espectro de RMN ^{13}C estão em concordância com os dados observados na análise de metilação do polissacarídeo, onde apenas foi encontrado os derivados 2,3,4,6-tetra-O-metil-Glc (0,6%) e 2,3,4-tri-O-metil-Glc (99,4%), que corresponde ao terminal não redutor e as unidades 6-O-substituídas de glucopiranosose, respectivamente. Desta maneira a molécula obtida do líquen *P. mantiqueirensis* foi caracterizada como uma β -glucana (1 \rightarrow 6) linear.

FIGURA 8 - ESQUEMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA β -GLUCANA (1 \rightarrow 6) DO LÍQUEN *Parmotrema mantiqueirensis*

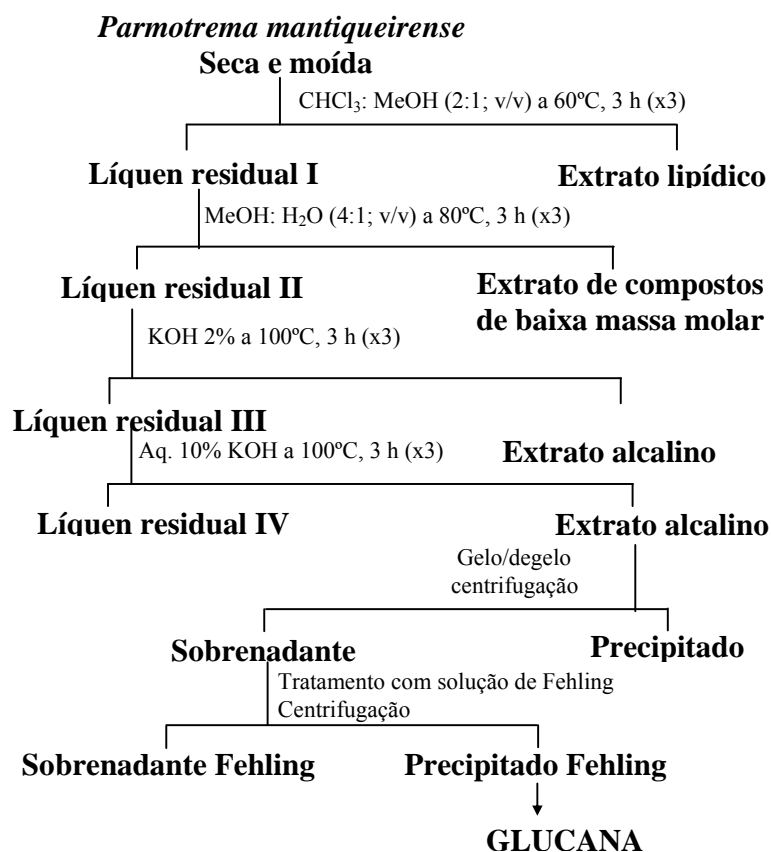
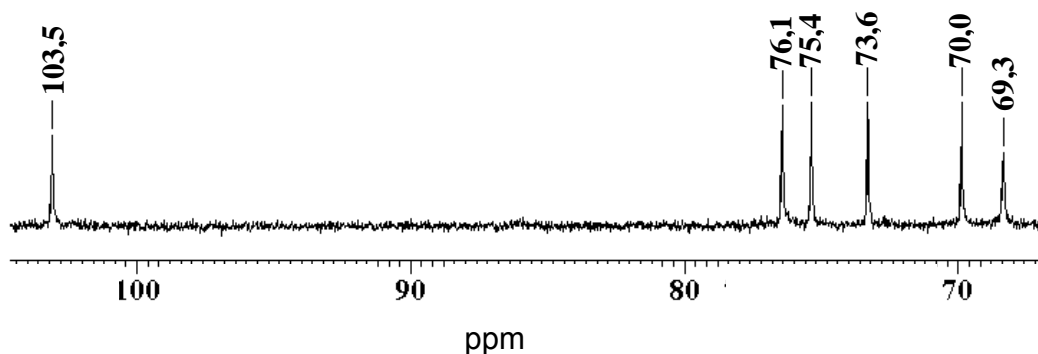


FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA β -GLUCANA (1 \rightarrow 6) NATIVA DO LÍQUEN *Parmotrema mantiqueirense*.



O polissacarídeo foi solubilizado em água deuterada (D_2O) e o espectro efetuado à 50°C , os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, utilizando como padrão interno acetona ($\delta = 30,2$).

4.1.2 SULFATAÇÃO QUÍMICA DA β -GLUCANA (1 \rightarrow 6) NATIVA (β -G) E DETERMINAÇÃO DOS GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO (D.S.) DOS DERIVADOS SULFATADOS β -G-S₁ E β -G-S₂

A sulfatação com ácido clorosulfônico-piridina foi eficiente para o polissacarídeo estudado, neste processo utiliza-se como catalisador piridina, a qual possui um par de elétrons disponível que pode formar pontes de hidrogênio com as hidroxilas livres dos polissacarídeos e isto, faz com que a nucleofilia desses grupamentos aumente, tornando-os mais reativos (HAINES, 1976).

O uso do ácido clorosulfônico como agente sulfatante pode apresentar certas desvantagens, uma delas é a dificuldade de manuseá-lo, por ser um reagente tóxico e cáustico (TURVEY, 1965). Além disso, a umidade deve ser evitada no sistema reacional, pois a água reage com o ácido clorosulfônico inativando-o (ALBAN *et al.*, 1992). A formamida tem a função de melhorar a dissolução do polissacarídeo no sistema, permanecendo inerte no meio reacional.

O grau de sulfatação pode ser aumentado através do aumento da temperatura para $65\text{-}70^\circ\text{C}$ na reação, mas o polissacarídeo poderá ser degradado e, conseqüentemente, perder suas propriedades (O'NEILL, 1955). Para evitar a degradação dos polissacarídeos, as reações de sulfatação foram realizadas à 0°C .

Outra maneira de aumentar o grau de sulfatação é através do aumento na proporção de ácido clorosulfônico utilizado na reação. Para tentar aumentar o grau de sulfatação do polissacarídeo, diferentes proporções de ácido clorosulfônico foram utilizadas, 6 e 10 mol/OH livre, respectivamente.

O método turbidimétrico para a determinação do grau de substituição (D.S.) empregando o reagente cloreto de bário/gelatina descrito por DODGSON e PRICE (1962) é uma técnica que envolve hidrólise ácida, seguida pela determinação do sulfato inorgânico liberado, o qual é medido espectrofotometricamente como sulfato de bário. Apresenta a vantagem de ser simples e rápido, requerer pequenas quantidades de material e estar menos sujeito à interferência de outros materiais que possam estar presentes (DODGSON, 1961; DODGSON e PRICE, 1962). A interferência é provavelmente minimizada pela considerável diluição que ocorre quando grandes volumes de ácido tricloroacético são adicionados a reação. A gelatina é usada como um estabilizador da turbidez desenvolvida quando o sulfato da amostra reage com o cloreto de bário formando sulfato de bário, este fica suspenso por mais tempo para que a turbidez seja medida em espectrofotômetro (360 nm) (DODGSON, 1961; DODGSON e PRICE, 1962).

Segundo a metodologia de O'NEILL (1955), a proporção utilizada de ácido clorosulfônico por OH livre em cada unidade monossacarídica é de 1 mol de ácido/OH. Foi constatado para a β -glucana (1 \rightarrow 6) que, aumentando esta proporção, é possível aumentar o grau de sulfatação. Quando foi utilizado 6 mol de ácido clorosulfônico/OH livre o grau de substituição foi de 0,63 e a molécula sulfatada obtida foi denominada de β -G-S₁, quando a proporção foi aumentada para 10 mol de ácido clorosulfônico/OH, o grau de substituição teve um aumento de 210%, passando a 1,95 e a molécula sulfatada obtida denominada de β -G-S₂ (Tabela 1).

TABELA 1- DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (D.S.) E PORCENTAGEM DE ENXOFRE (%S) DAS FRAÇÕES β -G-S₁ e β -G-S₂ OBTIDA DO LÍQUEN *Parmotrema mantiqueirense*

Derivado sulfatado	Mols de ácido clorosulfônico/OH	D.S.*	%S
β -G-S ₁	6	0,63	8,9
β -G-S ₂	10	1,95	17,3

* média de 3 experimentos realizados em triplicata

Outras tentativas de aumentar o D.S. modificando condições experimentais como relação molar do agente sulfatante, temperatura e tempo de reação constam na literatura. YANG et al. (2002), sulfataram quimicamente uma β -galactana (1→3) extraída de *Rhus vernicifera* em diferentes condições experimentais com o intuito de avaliar a relação estrutura-atividade anticoagulante. Para produzir polissacarídeos sulfatados com diferentes D.S., diferentes razões molares do complexo piridina-SO₃ (agente sulfatante)/unidade de açúcar (1:1, 2:1, 3:1 e 4:1), temperaturas (60°C-70°C) e tempos de reação (1-3h) foram utilizados. O D.S. variou de 0,57 a 1,57, foi constatado ainda, que não houve degradação do polissacarídeo. ALBAN e FRANZ (2002), sulfataram uma α -glucana linear (1→4/1→6), produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, utilizando o complexo piridina-SO₃ em um excesso de 6 mol do agente sulfatante/unidade de glucose, a temperatura de reação variou de 75-95°C e o tempo de 3-5 horas. Os derivados sulfatados obtidos apresentaram um D.S. entre 0,17 a 1,99, entretanto, o aumento da temperatura (95°C) e a prolongação do tempo de reação (5 h) favoreceu a degradação dos polissacarídeos.

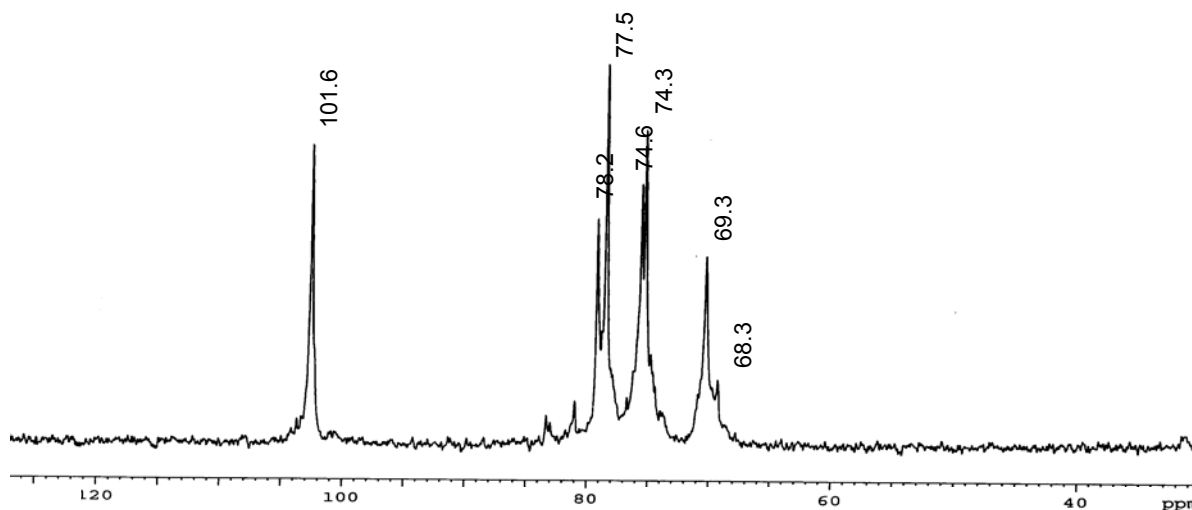
É interessante aumentar o grau de sulfatação uma vez que, a presença de grupos sulfato é essencial para a atividade. Além disso, a ação anticoagulante de polissacarídeos sulfatados resulta da forte interação entre cargas negativas de grupos sulfato com cargas positivas de seqüências peptídicas de proteínas reguladoras no processo de coagulação sanguínea (HUANG et al., 2003).

4.1.3 ANÁLISE DE RMN ^{13}C DA $\beta\text{-G-S}_2$ OBTIDA DO LÍQUEN *Parmotrema mantiqueirense*

A introdução de grupos sulfato nos polissacarídeos dificulta a mobilidade molecular destes polímeros e a aquisição de sinais na análise por ressonância nuclear magnética de carbono treze (RMN ^{13}C). Os sinais tendem a ser mais alargados e com uma resolução comprometida (DOCTOR e ESHO, 1983; STUELP, 1997; MARTINICHEN, 2001).

O espectro de RMN ^{13}C obtido para a $\beta\text{-G-S}_2$ (Figura 10) apresenta um deslocamento do sinal do carbono anomérico C-1 para campo alto (δ 101,6), os demais sinais (C-2-C-6), apresentaram deslocamentos para campo baixo em comparação com o espectro de RMN ^{13}C obtido com o polissacarídeo sem sulfatação. Não foi possível identificar as posições onde o grupo sulfatado foi introduzido na molécula, uma vez que, ocorreu sobreposição de sinais. A determinação da posição onde o grupo sulfato foi introduzido na molécula só foi possível através da análise de metilação.

FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA $\beta\text{-G-S}_2$ DO LÍQUEN *Parmotrema mantiqueirense*



O polissacarídeo sulfatado $\beta\text{-G-S}_2$ (D.S. 1,95) foi solubilizado em água deuterada (D_2O) e o espectro efetuado à 50°C , os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, utilizando como padrão interno acetona ($\delta=30,2$).

4.1.4 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA β -G-S₂ OBTIDA DO LÍQUEN *Parmotrema mantiqueirensis*

As posições onde os grupos sulfatos foram inseridos na molécula sulfatada β -G-S₂ só foram determinadas após a análise de metilação. Comparando as análises de metilação da molécula não sulfatada com a molécula sulfatada observa-se que a β -G-S₂ apresenta-se sulfatada principalmente nas hidroxilas dos carbonos C-2 e C-4, respectivamente (Tabela 2), onde é possível observar a presença dos derivados 3,4-Me₂-Glc_p (25,6%) e 2,3 Me₂-Glc_p (20,3%). Foi constatado pela presença do derivado 3-Me-Glc_p, que a maioria (30%) das unidades de glucose encontram-se sulfatadas nas hidroxilas dos carbonos C-2 e C-4 ao mesmo tempo. A molécula encontra-se sulfatada em menor proporção (5,6%) em todas as posições (C-2, C-3 e C-4) e em C-3 (5,1%).

TABELA 2 - ANÁLISE DOS O-METIL ALDITOL ACETATOS DA β -GLUCANA (1→6) NATIVA E DA β -G-S₂ OBTIDA DO LÍQUEN *Parmotrema mantiqueirensis*

O-metil alditol acetato	Mol%		Posição do grupo Sulfato
	β -glucana (1→6) nativa	β -G-S ₂	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc _p	0,6	0,4	-
2,3,4-Me ₃ -Glc _p	99,4	13	-
2,3 Me ₂ -Glc _p	-	20,3	C-4
2,4 Me ₂ -Glc _p	-	5,1	C-3
3,4-Me ₂ -Glc _p	-	25,6	C-2
3-Me-Glc _p	-	30	C-2 e C-4
Glc _p	-	5,6	C-2, C-3 e C-4

Em geral, a maioria dos grupos sulfato liga-se a hidroxila do carbono C-6 da glucose e como esta posição está comprometida com a ligação glicosídica, isto não ocorreu. O grupo OH do C-2 é o segundo grupo mais favorável a sulfatação e na seqüência o grupo OH do C-3 (ALBAN, SCHAUERTE e FRANZ, 2002). Entretanto, foi observado que para a β -G-S₂, a sulfatação ocorreu principalmente em C-2 e em C-4 ao mesmo tempo, e na seqüência, nas posições C-2 e C-4, sendo que na posição C-3 a molécula encontra-se muito pouco sulfatada (5,1%). Provavelmente a introdução do grupo sulfato na hidroxila do C-2 acabou gerando um impedimento estérico na molécula e com isso a hidroxila do C-3 não pode ser sulfatada.

4.1.5 TESTES DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *in vitro*

O potencial anticoagulante das moléculas sulfatadas β -G-S₁ e β -G-S₂ foi determinado através dos testes TT (tempo de trombina), APTT (tempo de tromboplastina parcial ativado) e PT (tempo de protrombina), usando uma heparina padrão como referência (140 USP/mg). Os testes citados são referidos como testes funcionais, pois, monitoram a formação do coágulo sangüíneo (LEADLEY Jr et al., 2000).

A integridade da via comum da coagulação é medida pelo tempo de trombina (TT), também conhecido por teste anti-fator IIa. Este método consiste em adicionar ao plasma citratado, uma quantidade conhecida de trombina, a qual atua sobre o fibrinogênio formando monômeros de fibrina. A agregação destes monômeros produz um gel que é estabilizado pela formação de interligações entre as cadeias de diferentes moléculas na fibra, por ligações peptídicas entre cadeias laterais específicas de glutamato e lisina, em uma reação de transaminação (DOOLITTLE, 1984). A determinação do tempo de trombina é apropriada para o controle da terapêutica heparínica e fibrinolítica, como prova de investigação de transtornos na formação da fibrina, avaliar estados graves de deficiência de fibrinogênio e avaliar a atividade anticoagulante de heparinóides, principalmente dos inibidores diretos da trombina.

O tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT) baseia-se na ativação do mecanismo intrínseco da coagulação sangüínea, através da cefalina, que é um substituto plaquetário, e da adição de cálcio ao plasma a ser testado. O meio de ativação por contato necessário para desencadear o processo de coagulação é obtido pela adição de caolin ou sílica micronizada (FISCHBACH e FOGDALL, 1985; AIZU, 1991; BOURIN e LINDAHL, 1993). O APTT constitui a melhor prova para investigar as alterações do mecanismo da coagulação sangüínea especialmente as deficiências envolvendo os fatores que participam do sistema intrínseco da coagulação (LIMA *et al*, 1992).

O teste tempo de protrombina (PT) é a prova de escolha para a investigação do sistema extrínseco da coagulação, permitindo revelar deficiências dos fatores que tomam parte deste sistema. A tromboplastina ao lado dos fatores VII, V, e X, na presença de íons cálcio, age sobre a protrombina para formar a trombina, que, por sua vez, conduz a formação de um coágulo de fibrina (LIMA *et al.*, 1992).

A maioria dos estudos anticoagulantes realizados com polissacarídeos sulfatados são iniciados *in vitro* utilizando pelo menos um dos testes acima citados. Na tentativa de verificar em qual via os polissacarídeos sulfatados poderiam estar interferindo na cascata da coagulação sangüínea, optou-se por realizar os três testes (APTT, TT e PT). Os resultados obtidos para a β -G-S₁, β -glucana (1→6) nativa e heparina padrão estão demonstrados na Tabela 3 .

De acordo com os resultados obtidos, a β -G-S₁ foi capaz de prolongar os testes APTT e TT de maneira dose-dependente, quanto maior a concentração utilizada maior foi o tempo necessário para a formação do coágulo de fibrina. Entretanto, a atividade anticoagulante foi inferior a heparina padrão. Na concentração de 100 μ g da β -G-S₁/ml de plasma, a atividade anticoagulante foi aproximadamente 4,8 e 3,5 vezes maior que o controle em relação aos testes APTT e TT, respectivamente. A glucana nativa não foi capaz de interferir em nenhum ponto da cascata da coagulação sangüínea, não demonstrando ação anticoagulante, os valores obtidos nos testes APTT, TT e PT em todas as doses avaliadas foram idênticos ao controle sem o polissacarídeo, $27,7 \pm 0.8$

TABELA 3 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO APTT, TT E PT NO PLASMA HUMANO NORMAL CONTENDO A β -GLUCANA NATIVA (β -G), β -G-S₁ E HEPARINA

Derivado	APTT		TT		PT	
	$\mu\text{g ml}^{-1}$ plasma	Tempo (segundos)	$\mu\text{g ml}^{-1}$ plasma	Tempo (segundos)	$\mu\text{g ml}^{-1}$ plasma	Tempo (segundos)
β -Glucana nativa (β -G)	0	27,7 \pm 0,8 ^(a)	0	18,7 \pm 0,5 ^(a)	0	15,4 \pm 0,5 ^(a)
	10	27,7 \pm 0,8 ^(a)	10	18,7 \pm 0,5 ^(a)	10	15,4 \pm 0,5 ^(a)
	50	27,7 \pm 0,8 ^(a)	50	18,7 \pm 0,5 ^(a)	50	15,4 \pm 0,5 ^(a)
	500	27,7 \pm 0,8 ^(a)	500	18,7 \pm 0,5 ^(a)	500	15,4 \pm 0,5 ^(a)
	1000	27,7 \pm 0,8 ^(a)	1000	18,7 \pm 0,5 ^(a)	1000	15,4 \pm 0,5 ^(a)
β -G-S ₁	10	36,4 \pm 1,3*	10	16,3 \pm 0,9*	10	15,6 \pm 0,6*
	20	46,9 \pm 0,9*	20	21,1 \pm 1,2*	20	15,8 \pm 0,8*
	30	59,9 \pm 1,2*	30	23,2 \pm 1,0*	30	15,3 \pm 1,2*
	40	69,4 \pm 0,8*	40	34,3 \pm 1,6*	40	15,9 \pm 0,6*
	50	79,4 \pm 1,2*	50	36,6 \pm 1,5*	50	16,1 \pm 1,4*
	60	90,3 \pm 1,7*	60	42,3 \pm 1,2*	60	16,2 \pm 1,6*
	70	100,5 \pm 1,0*	70	48,5 \pm 0,9*	70	17,2 \pm 1,3*
	80	111,3 \pm 1,5*	80	55,3 \pm 1,4*	80	17,8 \pm 2,0*
	90	123,6 \pm 1,2*	90	60,7 \pm 1,3*	90	18,0 \pm 1,8*
	100	134,2 \pm 1,3*	100	65,3 \pm 1,0*	100	18,3 \pm 1,4*
Heparina ^(b)	2	85,2 \pm 1,3*	2	59,6 \pm 1,1*	2	17,0 \pm 0,6*
	4	169,2 \pm 1,1*	4	105,3 \pm 0,9*	4	17,5 \pm 0,4*
	6	>300	6	>300	6	18,0 \pm 0,5*

^(a)Tempo de coagulação similar ao pool de plasma humano normal (Valores de referência APTT: 26-37 segundos, TT: 14-21 segundos, PT 11-16 segundos). ^(b)Heparina padrão (140 USP/mg).

O tempo de coagulação foi medido em duplicata e repetido por 3 vezes em dias diferentes, para cada concentração testada usando um coagulômetro (COAG-A-MATE[®]XM -Organon Teknica).

*Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

segundos, $18,7 \pm 0,5$ segundos e $15,4 \pm 0,5$ segundos, respectivamente. Este fato é esperado, uma vez que, a ação anticoagulante de polissacarídeos está diretamente relacionada à presença de grupos sulfato em posições específicas na molécula (HUANG et al., 2003).

O aumento do tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT) sugere que o polissacarídeo em questão atua em um ou mais componentes da via intrínseca da coagulação sangüínea. O prolongamento do teste TT indica inibição da formação de fibrina mediada por trombina, sugerindo que o polissacarídeo pode ser um inibidor direto da trombina (LEBLOND et al., 2000). Nenhuma concentração testada foi capaz de prolongar o teste PT indicando que este polissacarídeo não é capaz de atuar na via extrínseca da coagulação, assim como a heparina e vários outros polissacarídeos sulfatados (YOON et al., 2002).

A β -G-S₂ apresentou uma excelente atividade anticoagulante *in vitro*. A Tabela 4 ilustra a ação anticoagulante da β -G-S₂, β -glucana (1→6) nativa e heparina com respeito aos testes APTT, TT e PT. A β -G-S₂ foi capaz de prolongar os testes APTT (Figura 11) e TT (Figura 12) de uma maneira dose-dependente. Na concentração de 14 μ g/ml de plasma humano tanto o APTT quanto o TT atingem valores superiores a 300 segundos, este mesmo valor foi atingido quando 6 μ g de heparina/ml de plasma humano foi analisado pelos mesmos testes, portanto para obter um valor de 300 segundos nos testes APTT e TT foi necessário em termos de massa uma quantidade 2,4 vezes maior de β -G-S₂ do que heparina.

Com 8, 10 e 12 μ g de β -G-S₂ /ml de plasma humano, a atividade anticoagulante foi de aproximadamente 4,4 ($119,8 \pm 1,9$ segundos), 7,4 ($202,6 \pm 1,0$ segundos) e 9,5 ($261,1 \pm 1,6$ segundos) vezes maior que o controle (27,4 segundos), com respeito ao teste APTT. Em relação ao teste TT a atividade anticoagulante foi 8,6 ($160,7 \pm 1,1$ segundos), 11,5 ($215,9 \pm 0,7$ segundos) e 14,0 ($262,5 \pm 0,8$ segundos) vezes maior que o controle (18,7 segundos), nas mesmas concentrações.

Similar a heparina, um discreto efeito anticoagulante foi observado no teste PT (Figura 13), sugerindo que a molécula é um fraco inibidor da via extrínseca de coagulação, assim como outros polissacarídeos sulfatados (YOON et al., 2002).

TABELA 4 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO APTT, TT E PT NO PLASMA HUMANO NORMAL CONTENDO A GLUCANA NATIVA (β -G), β -G-S₂ E HEPARINA

Derivado	APTT		TT		PT	
	μ g/ml plasma	Tempo (segundos)	μ g/ml plasma	Tempo (segundos)	μ g/ml plasma	Tempo (segundos)
Glucana nativa (β -G)	0	27,7 \pm 0,8 ^(a)	0	18,7 \pm 0,5 ^(a)	0	15,4 \pm 0,5 ^(a)
	10	27,7 \pm 0,8 ^(a)	10	18,7 \pm 0,5 ^(a)	10	15,4 \pm 0,5 ^(a)
	50	27,7 \pm 0,8 ^(a)	50	18,7 \pm 0,5 ^(a)	50	15,4 \pm 0,5 ^(a)
	500	27,7 \pm 0,8 ^(a)	500	18,7 \pm 0,5 ^(a)	500	15,4 \pm 0,5 ^(a)
	1000	27,7 \pm 0,8 ^(a)	1000	18,7 \pm 0,5 ^(a)	1000	15,4 \pm 0,5 ^(a)
β -G-S ₂	0	27,7 \pm 0,8 ^(a)	0	18,7 \pm 0,5 ^(a)	0	15,4 \pm 0,5 ^(a)
	2	45,0 \pm 1,2*	2	21,5 \pm 1,2*	2	16,9 \pm 1,1
	4	64,7 \pm 1,6*	4	56,1 \pm 0,6*	4	17,0 \pm 1,4
	6	95,8 \pm 0,9*	6	100,3 \pm 0,9*	6	18,8 \pm 1,1*
	8	119,8 \pm 1,9*	8	160,7 \pm 1,1*	8	20,3 \pm 1,1*
	10	202,6 \pm 1,0*	10	215,9 \pm 0,7*	10	21,3 \pm 1,0*
	12	261,1 \pm 1,6*	12	262,5 \pm 0,8*	12	22,3 \pm 1,2*
	14	>300	14	>300	14	26,0 \pm 1,1*
Heparina ^(b)	0	27,7 \pm 0,8 ^(a)	0	18,7 \pm 0,5 ^(a)	0	15,4 \pm 0,5 ^(a)
	2	85,2 \pm 1,3*	2	59,6 \pm 1,1*	2	17,0 \pm 0,6
	4	169,2 \pm 1,1*	4	105,3 \pm 0,9*	4	17,5 \pm 0,4
	6	>300	6	>300	6	18,0 \pm 0,5*

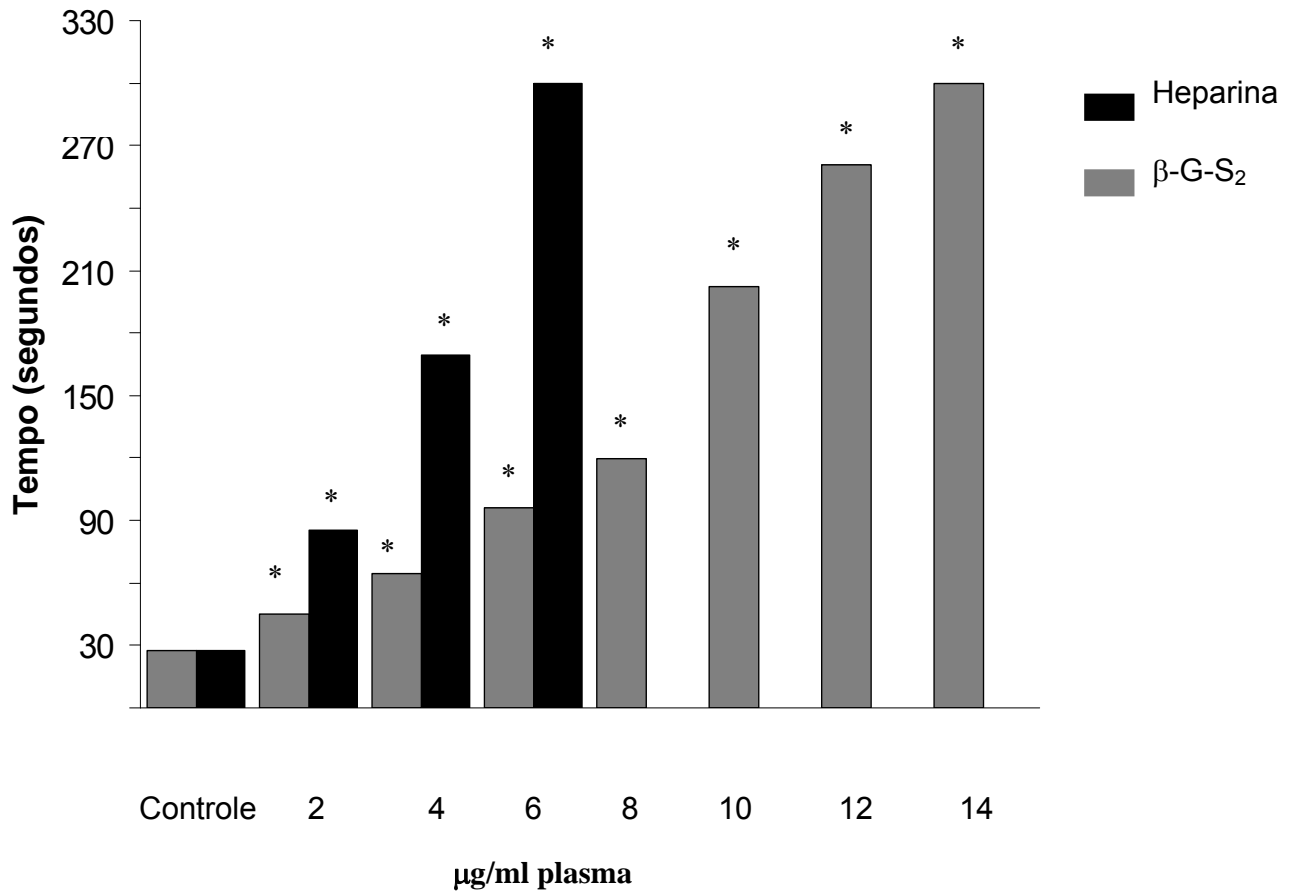
^(a)Tempo de coagulação similar ao pool de plasma humano normal (Valores de referência APTT: 26-37 segundos, TT: 14-21 segundos, PT 11-16 segundos).

^(b)Heparina padrão (140 USP/mg).

O tempo de coagulação foi medido em duplicata e repetido por 3 vezes em dias diferentes, para cada concentração testada usando um coagulômetro (COAG-A-MATE[®]XM -Organon Teknica).

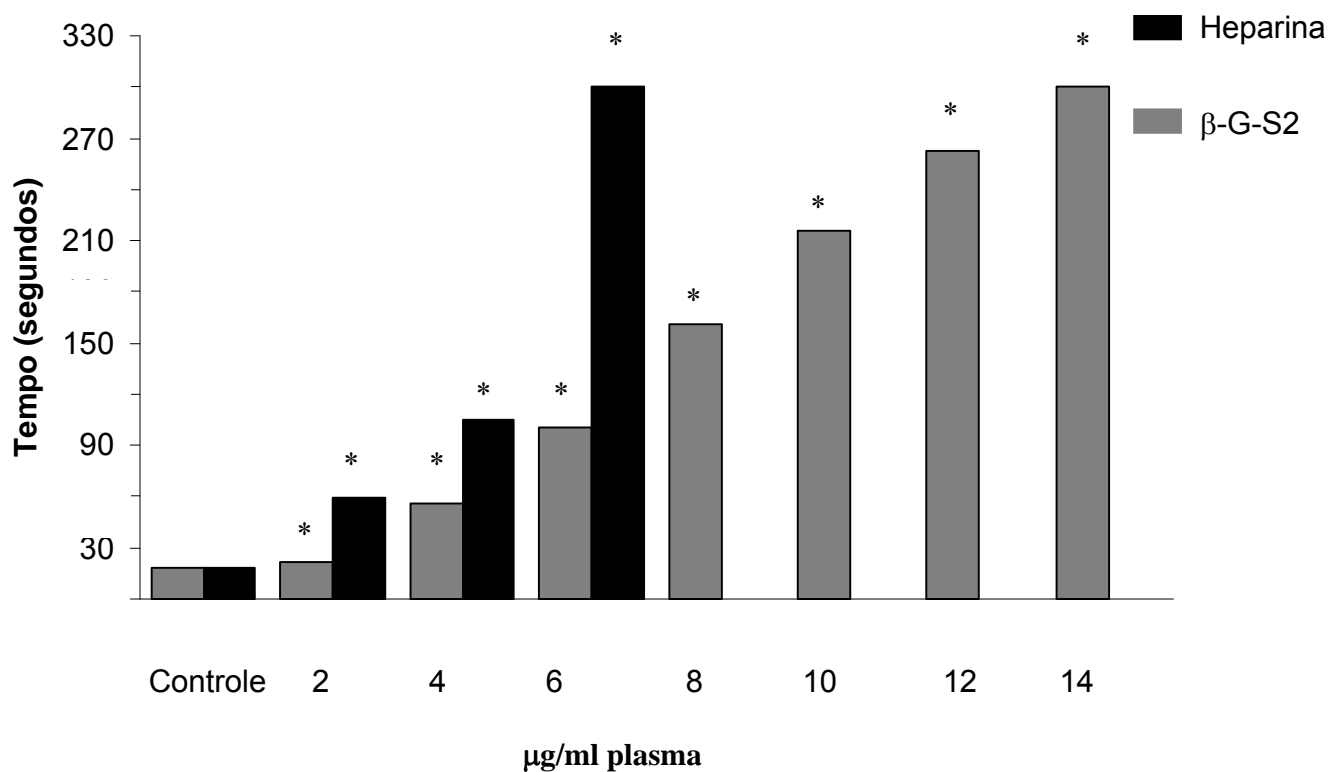
*Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

FIGURA 11 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO APTT NO PLASMA HUMANO NORMAL CONTENDO β -G-S₂ E HEPARINA



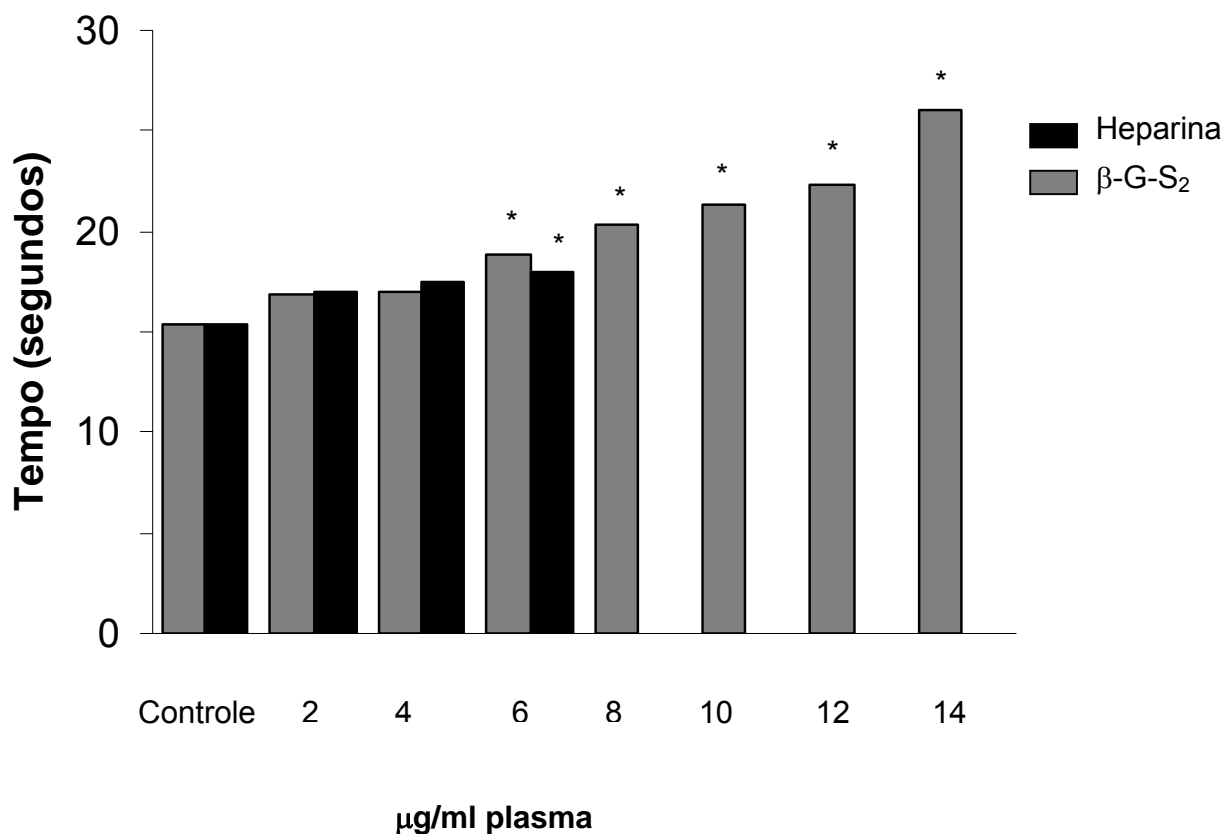
Heparina padrão (140 USP/mg). O tempo de coagulação foi medido em duplicata e repetido por 3 vezes em dias diferentes, para cada concentração testada usando um coagulômetro (COAG-A-MATE[®]XM - Organon Teknica). Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

FIGURA 12 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO TT NO PLASMA HUMANO NORMAL CONTENDO A β -G-S₂ E HEPARINA



Heparina padrão (140 USP/mg). O tempo de coagulação foi medido em duplicata e repetido por 3 vezes em dias diferentes, para cada concentração testada usando um coagulômetro (COAG-A-MATE[®] XM - Organon Técnica). Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

FIGURA 13 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO PT NO PLASMA HUMANO NORMAL CONTENDO A β -G-S₂ E HEPARINA.



Heparina padrão (140 USP/mg). O tempo de coagulação foi medido em duplicata e repetido por 3 vezes em dias diferentes, para cada concentração testada usando um coagulômetro (COAG-A-MATE[®] XM - Organon Técnica). Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

O prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativado (APTT) para a β -G-S₂, sugere que a molécula atua em um ou mais componentes da via intrínseca da coagulação sangüínea, além disso, a habilidade de prolongar o APTT é proporcional a atividade anti-trombina (BONEU, 2000). O prolongamento do teste TT indica inibição da formação de fibrina mediada por trombina, sugerindo que o polissacarídeo atua inibindo diretamente a trombina como relatado para outros inibidores diretos da trombina (LEBLOND et al., 2000; PRASA, SVENDSEN e STURZEBECKER, 1997).

Muitos polissacarídeos sulfatados naturalmente ou quimicamente com diversos graus de sulfatação têm sido investigados quanto às propriedades anticoagulantes *in vitro* no plasma humano, através dos testes APTT, TT e PT. Alguns compostos são mais potentes no teste APTT do que no teste TT, outros, são mais potentes no teste TT do que no APTT, ou ainda, podem ser igualmente potentes em ambos os testes, contudo, a maioria dos polissacarídeos sulfatados não apresenta ação no teste PT ou esta é muito fraca. (MOURÃO et al., 2001).

A excelente ação anticoagulante da β -G-S₂ nos testes APTT e TT *in vitro* é resultado dos altos níveis de cargas negativas produzidas pelos grupos sulfato (D.S. 1,95) e, provavelmente, da disposição dos grupos sulfato nas hidroxilas dos carbonos C-2 e C-4 principalmente, da conformação espacial adquirida pela molécula, entre outros fatores.

A β -G-S₂ foi incubada com o plasma humano em diversos intervalos de tempo e a temperatura ambiente antes de iniciar o teste APTT e o teste TT, na tentativa de verificar se este procedimento poderia aumentar o efeito anticoagulante, uma vez que o polissacarídeo permaneceria por mais tempo em contato com as proteínas envolvidas na coagulação sangüínea. De acordo com os resultados obtidos (Tabelas 5 e 6), o tempo de incubação não interferiu na capacidade anticoagulante, visto que não há nenhuma alteração significativa nos valores obtidos quanto aos testes APTT e TT nos diferentes intervalos de tempo analisados para cada dose testada.

TABELA 5 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO APTT NO PLASMA HUMANO NORMAL INCUBADO EM DIFERENTES TEMPOS (5, 10, 15, 20 e 30 minutos) COM A β -G-S₂

APTT (segundos)						
Polissacarídeo	μ g/ml plasma	5 min incubação	10 min incubação	15 min incubação	20 min incubação	30 min incubação
β -G-S ₂	0	27,7 \pm 0,8 ^(a)	27,7 \pm 0,8 ^(a)	27,7 \pm 0,8 ^(a)	27,2 \pm 0,8 ^(a)	27,7 \pm 0,8 ^(a)
	2	44,5 \pm 1,5*	47,5 \pm 1,2*	42,3 \pm 1,2*	41,0 \pm 1,5*	39,9 \pm 0,9*
	4	64,1 \pm 1,4*	62,8 \pm 1,2*	66,9 \pm 1,5*	65,4 \pm 1,1*	67,9 \pm 1,5*
	6	95,3 \pm 1,7*	97,2 \pm 1,5*	93,0 \pm 0,8*	96,5 \pm 0,9*	90,7 \pm 0,9*
	8	119,0 \pm 1,8*	121,4 \pm 1,4*	118,5 \pm 1,5*	117,7 \pm 1,7*	123,1 \pm 1,4*
	10	203,6 \pm 1,9*	201,6 \pm 1,2*	205,4 \pm 0,9*	206,0 \pm 0,7*	207,9 \pm 0,8*
	12	263,9 \pm 2,4*	259,9 \pm 1,6*	256,9 \pm 0,9*	262,0 \pm 1,1*	266,6 \pm 0,7*
	14	>300	>300	>300	>300	>300

^(a)Tempo de coagulação similar ao pool de plasma humano normal (Valor de referência APTT: 26-37 segundos)
O tempo de coagulação foi medido em duplicata e repetido por 3 vezes em dias diferentes, para cada concentração testada usando um coagulômetro (COAG-A-MATE[®]XM -Organon Tecnica).

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey (p<0.05).

TABELA 6 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO TT NO PLASMA HUMANO NORMAL INCUBADO EM DIFERENTES TEMPOS (5, 10, 15, 20 e 30 minutos) COM A β -G-S₂

TT (segundos)						
Polissacarídeo	μ g/ml plasma	5 min incubação	10 min incubação	15 min incubação	20 min incubação	30 min incubação
β-G-S₂	0	18,7 \pm 0,5 ^(a)	18,7 \pm 0,5 ^(a)	18,7 \pm 0,5 ^(a)	18,7 \pm 0,5 ^(a)	18,7 \pm 0,5 ^(a)
	2	21,2 \pm 1,3*	24,2 \pm 0,8*	20,6 \pm 1,2*	23,4 \pm 1,3*	22,1 \pm 1,1*
	4	56,0 \pm 1,1*	59,0 \pm 0,8*	54,4 \pm 0,8*	55,8 \pm 1,2*	57,6 \pm 0,6*
	6	101,2 \pm 1,9*	103,3 \pm 0,9*	99,1 \pm 1,0*	102,9 \pm 0,7*	106,8 \pm 1,0*
	8	161,6 \pm 1,4*	158,7 \pm 0,8*	164,3 \pm 1,3*	160,5 \pm 0,6*	157,2 \pm 0,7*
	10	216,0 \pm 1,1*	219,1 \pm 0,9*	212,5 \pm 0,7*	218,7 \pm 0,5*	221,4 \pm 1,2*
	12	263,1 \pm 0,7*	252,7 \pm 1,0*	269,8 \pm 1,2*	265,6 \pm 0,8*	262,0 \pm 0,8*
	14	>300	>300	>300	>300	>300

^(a)Tempo de coagulação similar ao pool de plasma humano normal (Valor de referência TT: 14-21 segundos). O tempo de coagulação foi medido em duplicata e repetido por 3 vezes em dias diferentes, para cada concentração testada usando um coagulômetro (COAG-A-MATE[®]XM -Organon Tecnica).

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Compostos que apresentam potencial anticoagulante quando avaliado pelos ensaios funcionais (APTT e TT) *in vitro*, devem ser avaliados pelos mesmos testes, *in vitro*, utilizando plasma obtido da espécie que se pretende realizar os ensaios anticoagulantes e antitrombóticos *in vivo*. Se, os testes APTT e TT, resultantes de plasma de ratos for aceitável, então, os ratos podem ser o objeto de estudo para a avaliação *in vivo*. Por este motivo, os testes TT e APTT foram determinados *in vitro* em plasma de ratos na presença de diversas concentrações da β -G-S₂, pois esta molécula apresentou o melhor resultado nos ensaios *in vitro*.

É importante avaliar a atividade anticoagulante *in vitro* usando plasma da espécie escolhida antes da avaliação dos compostos em modelos animais *in vivo*, pois alguns compostos têm demonstrado ser espécie-específico (HARA et al., 1995). Os resultados obtidos com plasma de rato tanto no teste TT, quanto no teste APTT, são muito semelhantes aos obtidos com plasma humano normal nas mesmas concentrações da β -G-S₂ (Tabela 7), portanto, a utilização de ratos para os testes *in vivo*, neste caso, pôde ser realizada.

TABELA 7: ATIVIDADE ANTICOAGULANTE AVALIADA PELO APTT e TT NO PLASMA HUMANO e EM PLASMA DE RATOS CONTENDO A β -G-S₂

	Concentração (μ g/ml plasma)	APTT (segundos)		TT (segundos)	
		Plasma humano	Plasma de rato	Plasma humano	Plasma de rato
β-G-S₂	0	27,7 \pm 0.8 ^(a)	19,7 \pm 0,8	18,7 \pm 0.5 ^(a)	15,3 \pm 0,6
	2	45,0 \pm 1.2*	34,2 \pm 1,8*	21,5 \pm 1.2*	19,6 \pm 0,9*
	4	64,7 \pm 1.6*	54,5 \pm 1,0*	56,1 \pm 0.6*	51,6 \pm 0,8*
	6	95,8 \pm 0.9*	85,2 \pm 1,1*	100,3 \pm 0.9*	96,7 \pm 1,0*
	8	119,8 \pm 1.9*	109,8 \pm 0,9*	160,7 \pm 1.1*	154,4 \pm 1,0*
	10	202,6 \pm 1.0*	197,2 \pm 0,7*	215,9 \pm 0.7*	210,8 \pm 0,6*
	12	261,1 \pm 1.6*	249,6 \pm 0,5*	262,5 \pm 0.8*	259,2 \pm 0,5*
	14	>300	>300	>300	>300

^(a)Tempo de coagulação similar ao pool de plasma humano normal (Valores de referência APTT: 26-37 segundos, TT: 14-21 segundos).

O tempo de coagulação foi medido em duplicata e repetido por 3 vezes em dias diferentes, para cada concentração testada usando um coagulômetro (COAG-A-MATE[®]XM -Organon Teknica).

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

4.1.6 DETERMINAÇÃO DO APTT *ex vivo*

Para determinar se a β -G-S₂, apresenta ação anticoagulante *in vivo* foi determinado o APTT *ex vivo* usando um modelo experimental em ratos. Os ratos receberam através de injeção endovenosa diferentes doses da β -G-S₂ (0-1000 μ g/kg). O sangue dos ratos foi coletado 5, 15, 30 e 60 minutos após a injeção e na seqüência o APTT foi determinado como descrito no item 3.9, como controle foi utilizado heparina padrão (140 USP/mg) em diferentes doses nas mesmas condições.

O APTT *ex vivo* em ratos determinado após cinco minutos da administração intravenosa da β -G-S₂ e heparina em diferentes doses estão demonstrados nas Tabelas 8 e 9 e Figura 14. Constata-se que após 5 minutos de circulação a β -G-S₂ prolonga o APTT de uma maneira dose-dependente, indicando que o polissacarídeo em questão possui ação anticoagulante *in vivo* e que este efeito é bastante rápido. A dose em que a anticoagulação é considerada eficaz, corresponde ao tempo de coagulação de 4 a 5 vezes superior ao valor basal. Em ratos, na dose de 300 μ g/kg, tem-se o valor para o APTT 4,2 vezes o valor basal, portanto esta dose pode ser considerada eficaz na anticoagulação em ratos. O APTT foi prolongado em todas as doses testadas, sendo que, após a administração de 200, 300, 500, 600, 800, 900 e 1000 μ g/kg da β -G-S₂, o APTT foi prolongado 2,7; 4,2; 7,6; 8,9; 12,5; 13,8 e > 15,2 vezes em relação ao valor basal (Tabela 9).

TABELA 8 - APTT *ex vivo* da β -G-S₂ E HEPARINA EM RATOS

Polissacarídeo	APTT <i>ex vivo</i> ^(a)		Polissacarídeo	APTT <i>ex vivo</i> ^(a)	
	μ g/kg	Tempo (segundos)		μ g/kg	Tempo (segundos)
β-G-S₂	0	19,7 \pm 1,1	Heparina ^(b)	0	19,7 \pm 1,1
	200	53,2 \pm 0,8*		50	19,7 \pm 1,2
	300	82,2 \pm 0,8*		75	21,1 \pm 1,4
	500	150,7 \pm 1,2*		100	41,3 \pm 0,9*
	600	174,8 \pm 1,2*		200	57,3 \pm 0,8*
	800	246,3 \pm 0,9*		300	108,9 \pm 1,0*
	900	273,1 \pm 0,9*		400	161,1 \pm 1,5*
	1000	>300		500	>300

^(a) β -G-S₂ e heparina nas doses indicadas foram administrados por via endovenosa 5 minutos antes da coleta de sangue (0,5 ml, citrato trisódico 3,8%, 9:1 v/v). APTT *ex vivo* foi determinado como descrito em Materiais e Métodos.

Resultados são expressos como a média \pm Desvio padrão (n=6/ grupo).

^(b) Heparina padrão (140 USP/mg)

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey (p<0.05).

TABELA 9 - RAZÃO APTT *ex vivo* DA β -G-S₂ E HEPARINA EM RATOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE

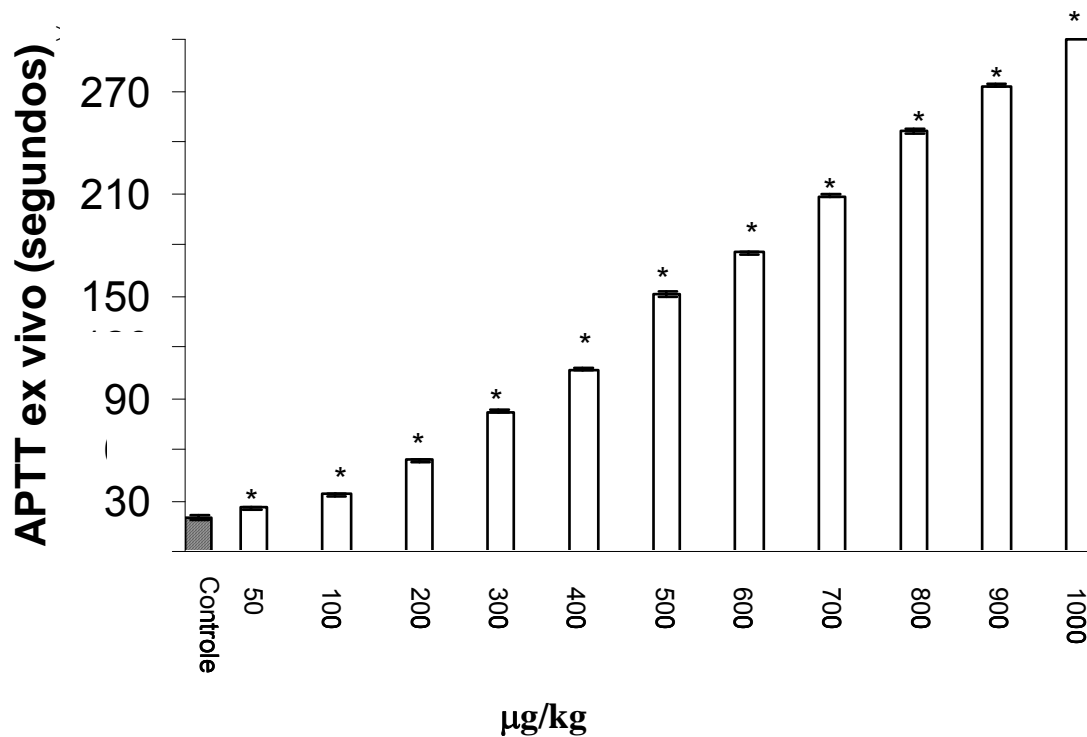
Polissacarídeo	RAZÃO APTT <i>ex vivo</i> /APTT controle ^(a)		Polissacarídeo	RAZÃO APTT <i>ex vivo</i> /APTT controle ^(a)	
	μ g/kg	RAZÃO		μ g/kg	RAZÃO
β -G-S ₂	0	-	Heparina ^(b)	0	-
	200	2,7		50	1
	300	4,2		75	1,1
	500	7,6		100	2,1
	600	8,9		200	2,9
	800	12,5		300	5,5
	900	13,8		400	8,2
	1000	>15,2		500	>15,2

^(a) β -G-S₂ e heparina nas doses indicadas foram administrados por via endovenosa 5 minutos antes da coleta de sangue (0,5 ml, citrato trissódico 3,8%, 9:1 v/v). APTT *ex vivo* foi determinado como descrito em Materiais e Métodos.

^(b) Heparina padrão (140 USP/mg).

A heparina nas concentrações de 50 e 75 μ g/kg apresentou valores idênticos ao valor basal para o APTT *ex vivo* como pode ser observado na Tabela 8 e Figura 15. Enquanto que para a dose de 100 μ g/kg foi observado que a heparina prolonga o APTT 2,1 vezes em relação ao valor basal, como demonstrado na Tabela 9.

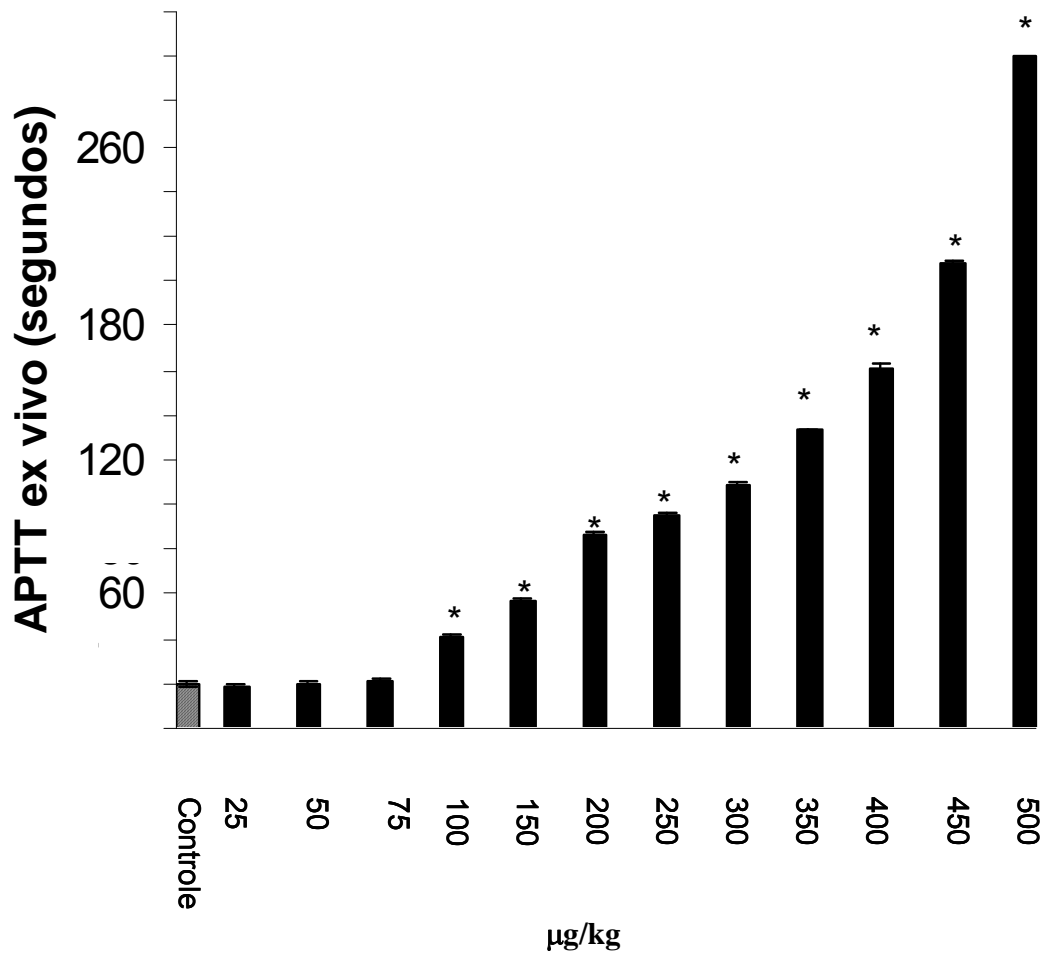
Uma quantidade 2 vezes maior de β -G-S₂ foi necessária para prolongar o APTT para 300 segundos com relação a heparina, 1000 e 500 μ g/kg, respectivamente (Tabela 8). Estes resultados sugerem que a capacidade anticoagulante da β -G-S₂ é a metade da heparina padrão (Figura 15).

FIGURA 14 - APTT *ex vivo* DA β -G-S₂ EM RATOS APÓS 5 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO

β -G-S₂ nas doses indicadas foi administrado por via endovenosa 5 minutos antes da coleta de sangue (0,5 ml, citrato trisódico 3,8%, 9:1 v/v). APTT *ex vivo* foi determinado como descrito em Materiais e Métodos.

Resultados são expressos como a média \pm Desvio padrão (n=6/grupo).

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey (p<0.05).

FIGURA 15 - APTT *ex vivo* DA HEPARINA EM RATOS APÓS 5 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO

Heparina padrão (140 USP/mg) nas doses indicadas foi administrada por via endovenosa 5 minutos antes da coleta de sangue (0,5 ml, citrato trissódico 3,8%, 9:1 v/v). APTT *ex vivo* foi determinado como descrito em Materiais e Métodos.

Resultados são expressos como a média \pm Desvio padrão (n=6/ grupo).

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

O APTT *ex vivo* determinado em diferentes intervalos de tempo após a administração da β -G-S₂ e heparina podem ser visualizados na Tabela 10 e Figura 16. Neste experimento observou-se que a β -G-S₂ apresentou ação anticoagulante até 30 minutos após a administração (Tabela 10 e Figura 16), o efeito foi prolongado mesmo utilizando apenas uma única dose, sugerindo que o polissacarídeo não é facilmente degradado permanecendo por mais tempo na corrente circulatória desempenhando a ação anticoagulante. A heparina, não apresentou um efeito prolongado, como observado na Tabela 11 e Figura 17, em 15 minutos de circulação, o efeito foi bastante reduzido, o APTT determinado após este período diminuiu 60,6%; 27,1%; 40,3%; 33,1% e 27,3% nas doses de 100, 200, 300, 400 e 500 μ g/kg, respectivamente, em relação aos valores obtidos após 5 minutos de circulação. O APTT retornou aos níveis normais após 30 minutos de circulação em todas as doses testadas, indicando que a ação anticoagulante avaliada pelo APTT foi tempo-dependente.

TABELA 10 - APTT *ex vivo* DETERMINADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA β -G-S₂

	Concentração (μ g/Kg)	APTT <i>ex vivo</i> (segundos)			
		TEMPO DE CIRCULAÇÃO ^(a)			
		5 minutos (b)	15 minutos (c)	30 minutos (c)	60 minutos (c)
β-G-S₂	0	19,7 \pm 1,1	19,7 \pm 1,1	19,7 \pm 1,1	19,7 \pm 1,1
	50	25,4 \pm 0,7*	24,5 \pm 1,0*	25,9 \pm 0,9*	17,9 \pm 0,8
	100	33,3 \pm 1,1*	35,2 \pm 0,8*	32,6 \pm 0,5*	17,8 \pm 1,1
	200	53,2 \pm 0,8*	56,4 \pm 0,9*	51,9 \pm 0,7*	18,5 \pm 0,8
	300	82,2 \pm 0,8*	79,0 \pm 0,6*	84,6 \pm 0,6*	18,3 \pm 0,6
	400	106,4 \pm 0,8*	110,2 \pm 0,7*	102,0 \pm 0,7*	17,6 \pm 0,6
	500	150,7 \pm 1,2*	154,4 \pm 1,5*	149,6 \pm 0,9*	17,8 \pm 0,8
	600	174,8 \pm 1,2*	170,8 \pm 0,7*	177,7 \pm 0,5*	18,6 \pm 0,5
	700	207,7 \pm 0,8*	204,9 \pm 0,8*	210,9 \pm 1,0*	17,9 \pm 0,7
	800	246,3 \pm 0,9*	250,2 \pm 0,6*	239,5 \pm 0,5*	18,4 \pm 0,7
	900	273,1 \pm 0,9*	262,4 \pm 0,7*	268,2 \pm 0,6*	18,6 \pm 0,7
1000	>300	>300	>300	18,3 \pm 0,5	

β -G-S₂ nas doses indicadas foi administrado por via endovenosa 5, 15, 30 e 60 minutos antes da coleta de sangue (0,5 ml, citrato trisódico 3,8%, 9:1 v/v). APTT *ex vivo* foi determinado como descrito em Materiais e Métodos.

(b) Resultado expresso como a média \pm Desvio padrão (n=6/ grupo).

(c) Resultado expresso como a média \pm Desvio padrão (n=3/ grupo).

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey (p<0.05).

FIGURA 16 - APTT *ex vivo* DETERMINADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA β -G-S₂ A- 15 min., B- 30 min., C- 60 min. APTT *ex vivo* foi determinado como descrito em Materiais e Métodos. Resultados são expressos como a média \pm Desvio padrão (n=6/ grupo).
* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey (p<0.05).

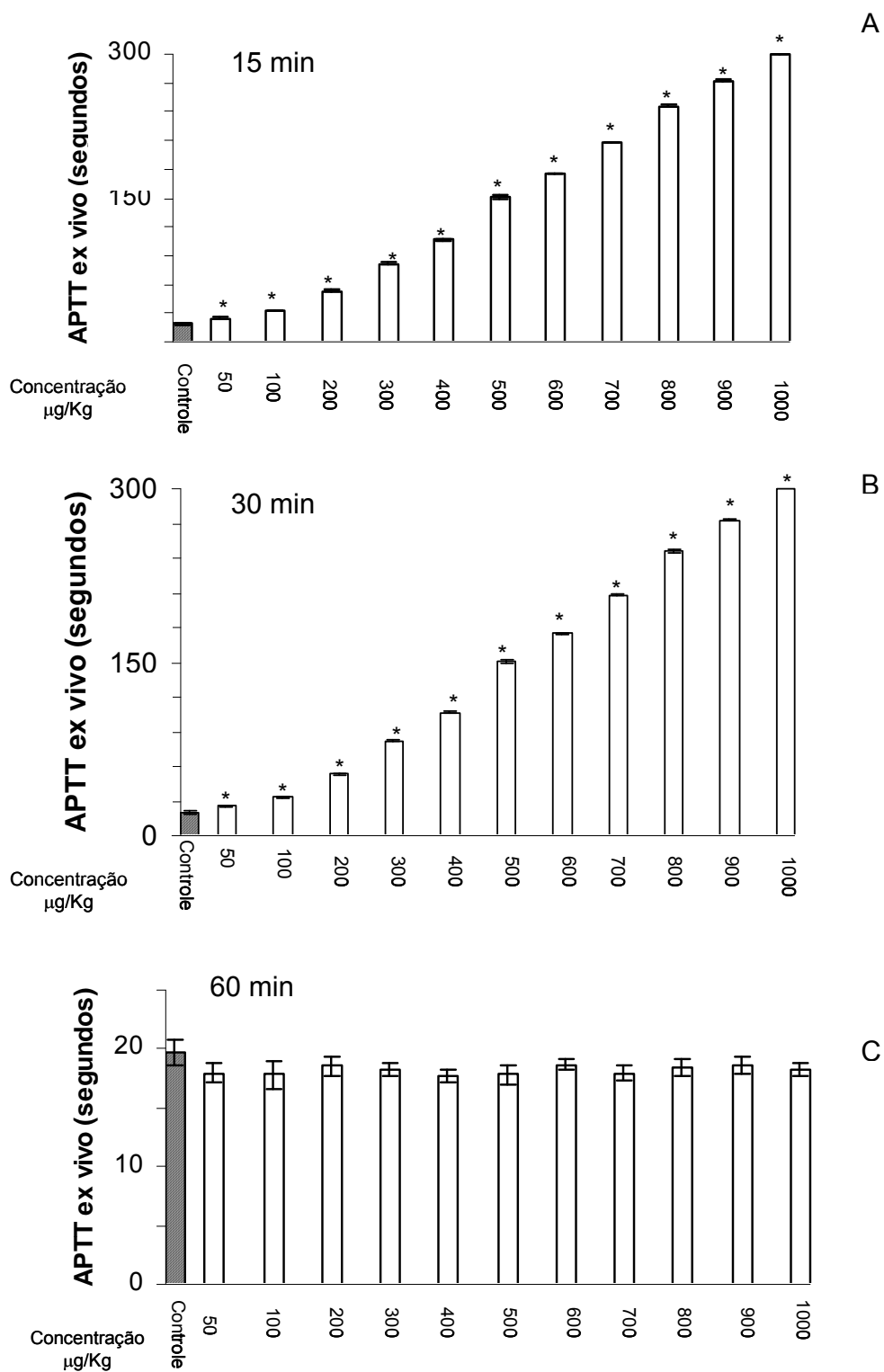


TABELA 11 - APTT *ex vivo* DETERMINADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA HEPARINA PADRÃO

	Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	APTT <i>ex vivo</i> (segundos)			
		TEMPO DE CIRCULAÇÃO ^(a)			
		5 minutos	15 minutos	30 minutos	60 minutos
HEPARINA PADRÃO (140 USP/mg)	0	19,7 \pm 1,1	19,7 \pm 1,1	19,7 \pm 1,1	19,7 \pm 1,1
	50	19,7 \pm 1,2	18,3 \pm 0,5	18,7 \pm 0,8	ND
	75	21,1 \pm 1,4	21,1 \pm 0,7	19,0 \pm 0,8	ND
	100	41,4 \pm 0,9*	25,1 \pm 0,6*	17,9 \pm 0,7	ND
	150	57,3 \pm 0,8*	24,5 \pm 0,7*	18,0 \pm 0,7	ND
	200	87,0 \pm 1,1*	23,5 \pm 0,5*	18,3 \pm 1,1	ND
	250	95,4 \pm 1,0*	33,1 \pm 1,3*	18,4 \pm 0,6	ND
	300	108,9 \pm 1,0*	43,9 \pm 0,8*	18,1 \pm 0,8	ND
	350	133,4 \pm 0,6*	42,9 \pm 1,2*	18,0 \pm 0,8	ND
	400	161,1 \pm 1,5*	53,3 \pm 0,5*	18,2 \pm 0,8	ND
	450	207,6 \pm 1,1*	74,2 \pm 1,0*	17,9 \pm 0,9	ND
	500	>300	81,9 \pm 0,7*	17,9 \pm 1,2	ND

^(a) Heparina nas doses indicadas foi administrada por via endovenosa 5, 15, 30 e 60 minutos antes da coleta de sangue (0,5 ml, citrato trissódico 3,8%, 9:1 v/v). APTT *ex vivo* foi determinado como descrito em Materiais e Métodos.

Resultados são expressos como a média \pm Desvio padrão (n=6/ grupo).

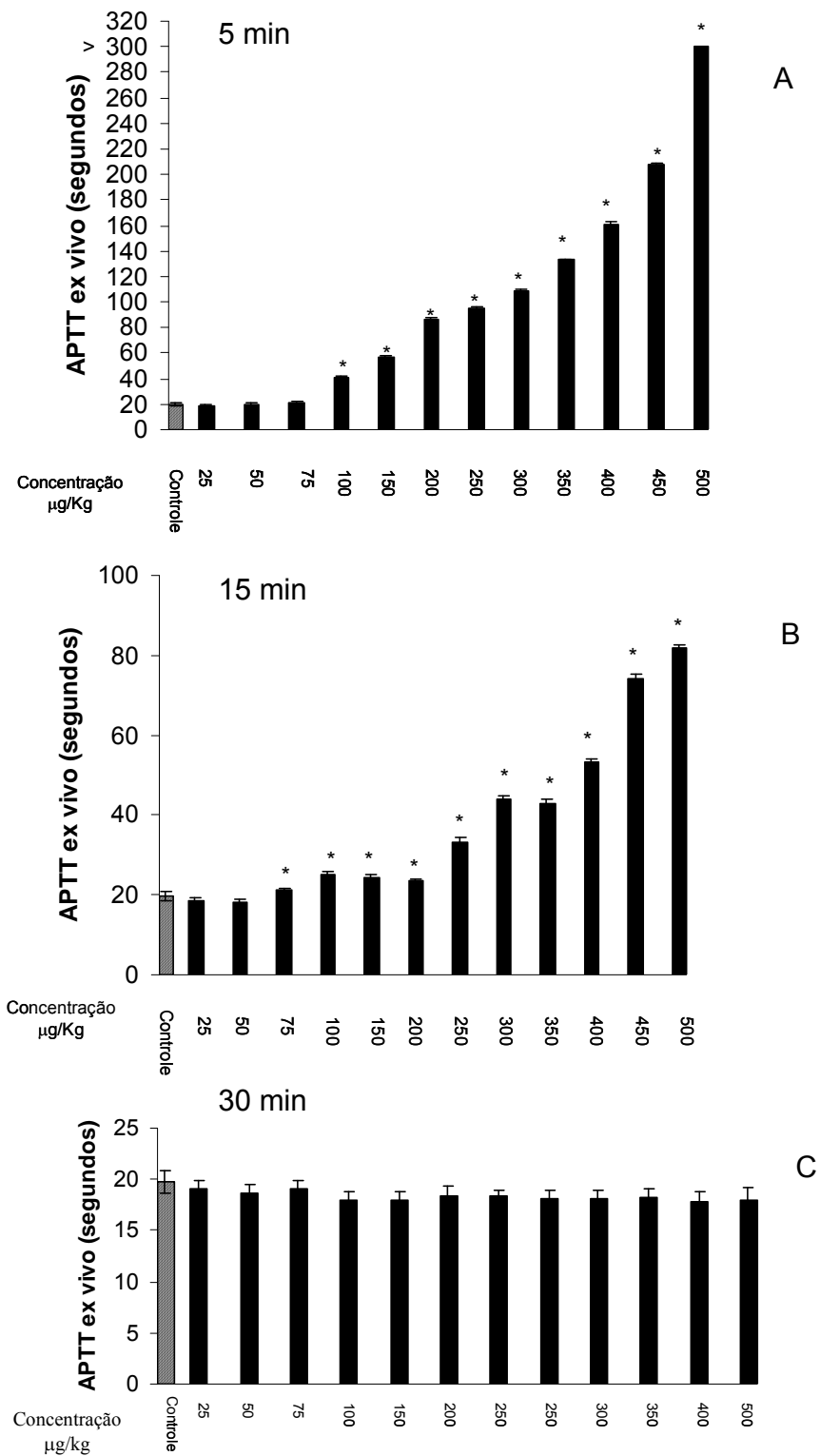
* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey (p<0.05).

ND - Não determinado

FIGURA 17 - APTT *ex vivo* DETERMINADO EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA HEPARINA PADRÃO (140 USP/mg)

A- 5 min., B- 15 min., C- 30 min. Resultados são expressos como a média \pm Desvio padrão (n=6/ grupo).

Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).



A presença de ação anticoagulante *in vivo* confirma os testes realizados *in vitro*. O prolongamento do APTT indica que a β -G-S₂, atua em um ou mais componentes da via intrínseca da coagulação sanguínea *in vivo*, além disso, a habilidade de prolongar o APTT é proporcional a atividade anti-trombina (BONEU, 2000).

A excelente ação anticoagulante da β -G-S₂ no teste APTT *ex vivo*, é resultado, dos altos níveis de cargas negativas produzidas pelos grupos sulfato (D.S. 1,95) e, provavelmente, da disposição dos grupos sulfato nas hidroxilas dos carbonos C-2 e C-4, principalmente (30%), da conformação espacial adquirida pela molécula, entre outros. Outros polissacarídeos sulfatados apresentam um tempo de ação maior na circulação em relação a heparina, pois são capazes de permanecer mais tempo sem serem metabolizados (Li et al., 2004).

4.1.7 TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS

Vários modelos de trombose venosa em ratos têm sido extensivamente estudados e usados para determinar os efeitos antitrombóticos de vários agentes (LEADLEY Jr., 2000).

A eficácia antitrombótica da β -G-S₂ foi determinada em ratos através de uma metodologia que combina estase (obstrução do fluxo sanguíneo) na veia cava abdominal e hipercoagulabilidade, a qual é promovida pela administração de tromboplastina, que é uma substância trombogênica, a qual, promove a formação do trombo. Os resultados obtidos para este experimento após 5 minutos de circulação do polissacarídeo, estão demonstrados na figura 18 e tabela 12. Observa-se que nos ratos tratados com o veículo (PBS), a média do trombo foi $23,4 \pm 1,7$ mg. Ocorreu uma diminuição da massa do trombo formado, tanto para a β -G-S₂, quanto para a heparina. A porcentagem de inibição foi de 24,3%; 44,9%; 64,5%; 78,2%; 83,5%; 90,6% nas doses de 50 μ g/Kg, 75 μ g/Kg, 100 μ g/Kg, 200 μ g/Kg, 300 μ g/Kg e 400 μ g/Kg de β -G-S₂, respectivamente. A dose de 500 μ g/Kg β -G-S₂ impede completamente a formação do trombo. Para a heparina, foram necessários, apenas 100 μ g/kg para obter o mesmo

efeito. A porcentagem de inibição do trombo formado foi de 30,8, 67,5 e 82,9%, nas doses de 25 $\mu\text{g/Kg}$, 50 $\mu\text{g/Kg}$ e 75 $\mu\text{g/Kg}$ para a heparina, respectivamente. Comparando outros polissacarídeos sulfatados com a $\beta\text{-G-S}_2$, observa-se que uma β -glucana ligada (1 \rightarrow 3) sulfatada quimicamente inibe a formação do trombo, apenas em uma concentração 20 vezes maior que a heparina não fracionada utilizada (ALBAN et al., 1995). Um condroitin sulfato fucosilado inibe completamente a formação de trombo na dose de 1,5 mg/Kg, um valor 25 vezes maior que a heparina não fracionada utilizada como padrão (MOURÃO et al., 1998). Para a $\beta\text{-G-S}_2$, apenas uma concentração 4 vezes maior que a heparina padrão foi necessário para abolir completamente a formação do trombo. Este experimento demonstra que a $\beta\text{-G-S}_2$, constitui um promissor agente antitrombótico *in vivo*, uma vez que foi capaz de inibir a formação de trombo produzido por estase venosa e hipercoagulabilidade, podendo ser utilizado no tratamento de diversas doenças trombóticas.

A trombose venosa estase-induzida em ratos foi avaliada após 10, 15, 30 e 60 minutos após a administração intravenosa, os dados obtidos estão representados na Tabela 13 e Figuras 19 a 22.

Os efeitos antitrombóticos após 10 e 15 minutos de circulação da $\beta\text{-G-S}_2$ são muito similares em todas as doses avaliadas (25, 50, 100, 200 e 500 $\mu\text{g/Kg}$), a partir de 30 minutos de circulação, o efeito antitrombótico é reduzido, a porcentagem de inibição em relação ao controle, foi de 8,1%; 45,7%; 63,2% e 76,5%, para as doses de 50, 100, 200 e 500 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente. Após 60 minutos de circulação o efeito antitrombótico é completamente abolido.

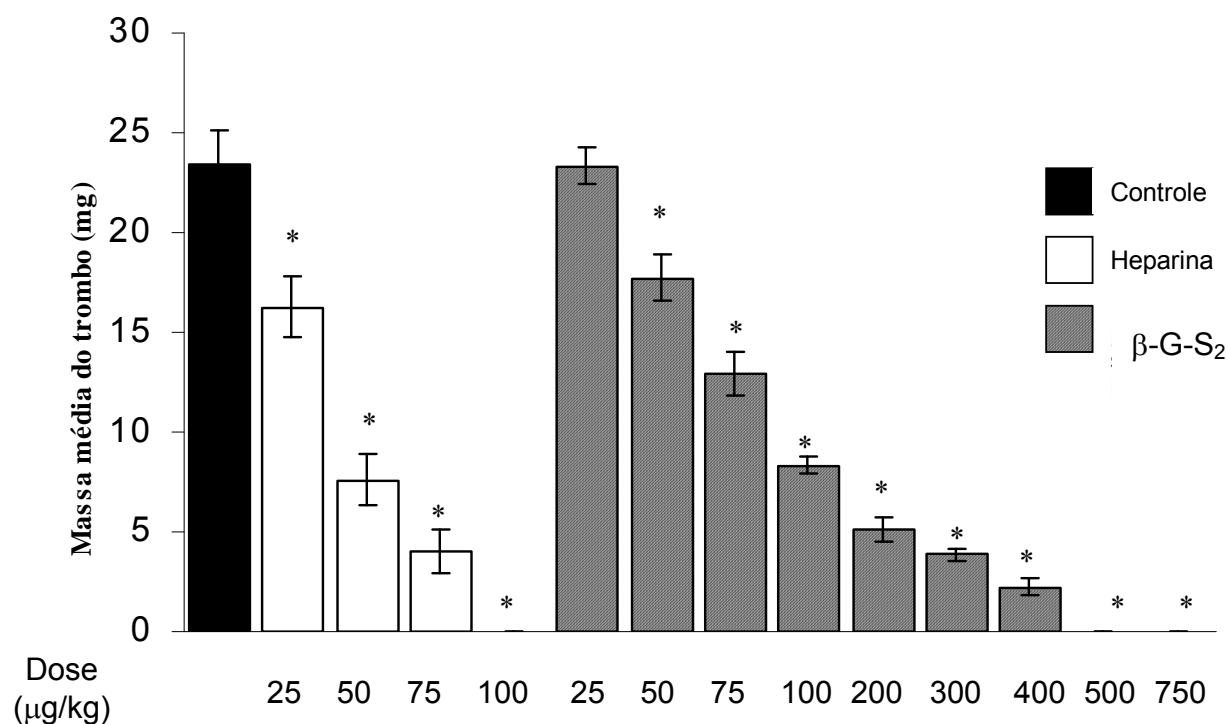
TABELA 12: EFEITO DA β -G-S₂, E HEPARINA NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA-ESTASE INDUZIDA EM RATOS APÓS 5 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO

Composto	Dose (μ g/kg)	Massa do trombo (mg)	% de inibição em relação ao controle
Controle (PBS)	-	23,4 \pm 1,7	-
Heparina Padrão (140 USP/mg)	25	16,2 \pm 1,5*	30,8
	50	7,6 \pm 1,2*	67,5
	75	4,0 \pm 1,0*	82,9
	100	0,0*	100
β-G-S₂	25	23,3 \pm 0,9	-
	50	17,7 \pm 1,1*	24,3
	75	12,9 \pm 1,1*	44,9
	100	8,3 \pm 0,4*	64,5
	200	5,1 \pm 0,6*	78,2
	300	3,8 \pm 0,3*	83,5
	400	2,2 \pm 0,4*	90,6
	500	0,0*	100
	750	0,0*	100

A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 μ g.Kg⁻¹), veículo (PBS), β -G-S₂ (0,25-2 mg. Kg⁻¹), e tromboplastina (10mg. Kg⁻¹). O abdômen de cada animal foi aberto cirurgicamente, a veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e exposta para a colocação de suturas frouxas com distância de 1 cm. As ramificações entre as veias renais foram ligadas. A formação do trombo foi induzida por uma injeção de tromboplastina e 10 segundos após por estase do seguimento de 1 cm da veia cava abdominal. A estase foi mantida por 20 minutos, após este período, o trombo foi removido e pesado em balança analítica. O polissacarídeo, a heparina e o veículo foram administrados 5, antes que a tromboplastina. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média da massa do trombo formado \pm desvio padrão foi determinada.

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey (p<0.05).

FIGURA 18: EFEITO DA β -G-S₂, E HEPARINA NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS APÓS 5 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO



A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 µg/kg), veículo (PBS), β -G-S₂ (0,25-2 mg/kg), e tromboplastina (10 mg/kg). O abdômen de cada animal foi aberto cirurgicamente, a veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e exposta para a colocação de suturas frouxas com distância de 1 cm. As ramificações entre as veias renais foram ligadas. A formação do trombo foi induzida por uma injeção de tromboplastina e 10 segundos após por estase do seguimento de 1 cm da veia cava abdominal. A estase foi mantida por 20 minutos, após este período, o trombo foi removido e pesado em balança analítica. O polissacarídeo, a heparina e o veículo foram administrados 5 minutos antes que a tromboplastina. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média da massa do trombo formado \pm desvio padrão foi determinada.

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

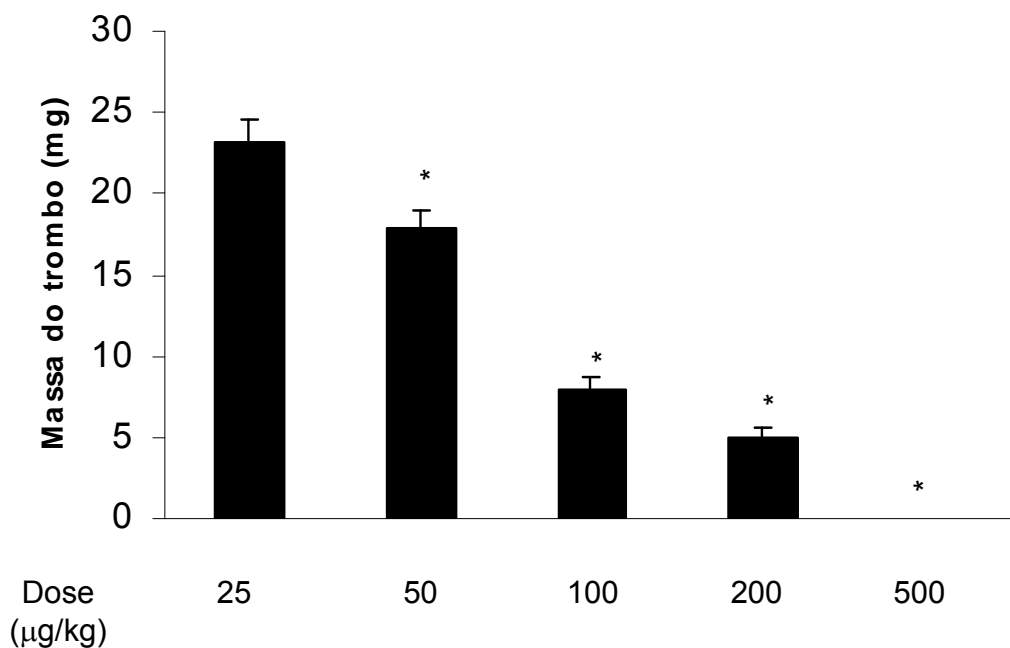
TABELA 13: EFEITO DA β -G-S₂ NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS APÓS 10, 15, 30 e 60 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO

Composto		Tempo de circulação (minutos)							
		10		15		30		60	
	Dose (μ g/kg)	Massa do trombo (mg)	% de inibição em relação ao controle	Massa do trombo (mg)	% de inibição em relação ao controle	Massa do trombo (mg)	% de inibição em relação ao controle	Massa do trombo (mg)	% de inibição em relação ao controle
Controle (PBS)	-	23,4 \pm 1,7	-		-		-		-
β-G-S₂	25	23,2 \pm 1,3	-	22,4 \pm 1,4	-	23,7 \pm 0,9*	-	ND	-
	50	17,9 \pm 1,0*	23,5	18,1 \pm 1,0*	22,6	21,5 \pm 1,5*	8,1	23,9 \pm 0,9*	-
	100	8,0 \pm 0,7*	65,8	8,2 \pm 0,6*	64,9	12,7 \pm 1,0*	45,7	23,7 \pm 1,7*	-
	200	5,0 \pm 0,6*	78,6	5,3 \pm 0,6*	77,3	8,6 \pm 0,6*	63,2	23,5 \pm 1,0*	-
	500	0,0	100	0,0	100	5,5 \pm 0,8*	76,5	22,4 \pm 0,9*	4,3

A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 μ g/kg), veículo (PBS), β -G-S₂ (0,25-2 mg/kg) e tromboplastina (10 mg/kg). O abdômen de cada animal foi aberto cirurgicamente, a veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e exposta para a colocação de suturas frouxas com distância de 1 cm. As ramificações entre as veias renais foram ligadas. A formação do trombo foi induzida por uma injeção de tromboplastina e 10 segundos após por estase do seguimento de 1 cm da veia cava abdominal. A estase foi mantida por 20 minutos, após este período, o trombo foi removido e pesado em balança analítica. Os polissacarídeos e o veículo foram administrados 5, 10, 15, 30 e 60 minutos antes que a tromboplastina. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média da massa do trombo formado \pm desvio padrão foi determinada.

Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

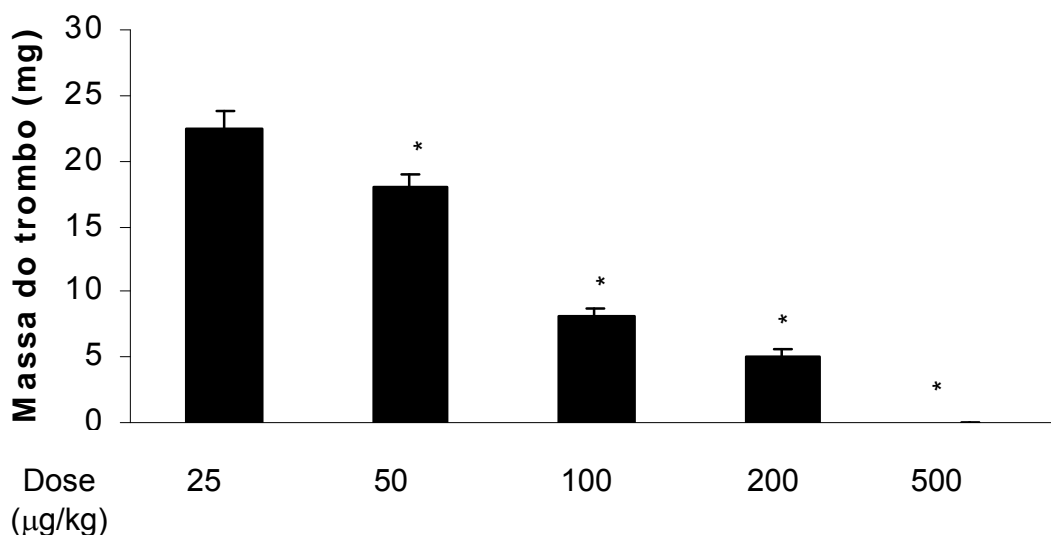
FIGURA 19: EFEITO DA β -G-S₂ NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS APÓS 10 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO



A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 μ g/kg), veículo (PBS), β -G-S₂ (0,25-2 mg/kg) e tromboplastina (10 mg/kg). O abdômen de cada animal foi aberto cirurgicamente, a veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e exposta para a colocação de suturas frouxas com distância de 1 cm. As ramificações entre as veias renais foram ligadas. A formação do trombo foi induzida por uma injeção de tromboplastina e 10 segundos após por estase do seguimento de 1 cm da veia cava abdominal. A estase foi mantida por 20 minutos, após este período, o trombo foi removido e pesado em balança analítica. Os polissacarídeos e o veículo foram administrados 10 minutos antes que a tromboplastina. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média da massa do trombo formado \pm desvio padrão foi determinada.

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

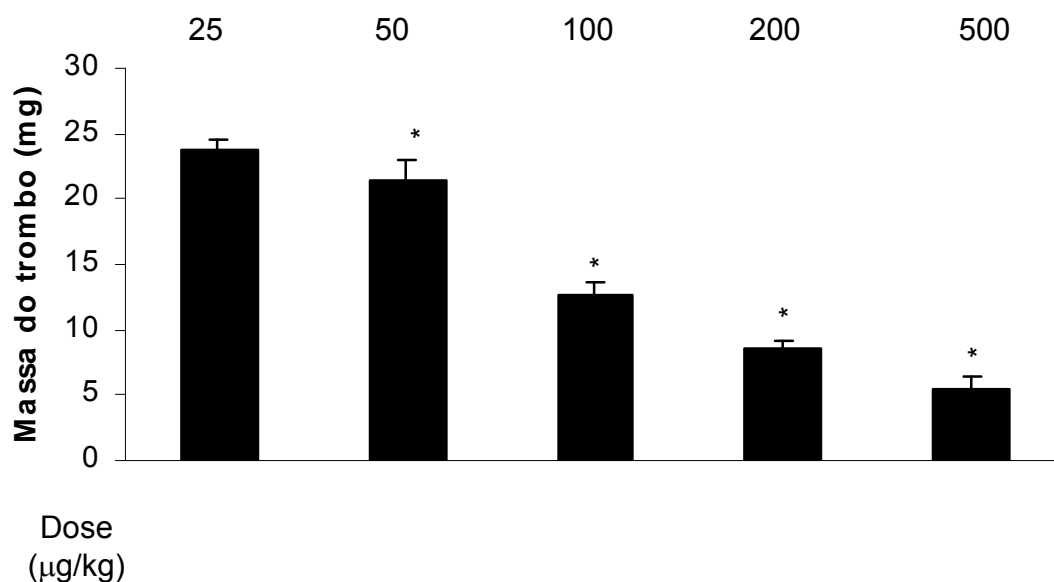
FIGURA 20 - EFEITO DA β -G-S₂ NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS APÓS 15 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO



A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 μ g/kg), veículo (PBS), β -G-S₂ (0,25-2 mg/kg), e tromboplastina (10 mg/kg). O abdômen de cada animal foi aberto cirurgicamente, a veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e exposta para a colocação de suturas frouxas com distância de 1 cm. As ramificações entre as veias renais foram ligadas. A formação do trombo foi induzida por uma injeção de tromboplastina e 10 segundos após por estase do seguimento de 1 cm da veia cava abdominal. A estase foi mantida por 20 minutos, após este período, o trombo foi removido e pesado em balança analítica. Os polissacarídeos e o veículo foram administrados 15 minutos antes que a tromboplastina. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média da massa do trombo formado \pm desvio padrão foi determinada.

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

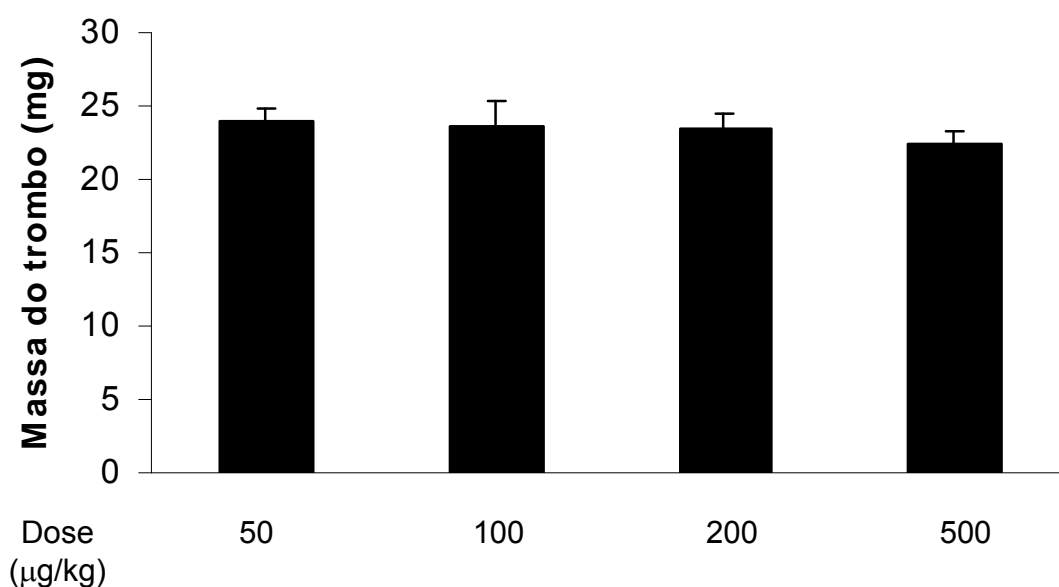
FIGURA 21 - EFEITO DA β -G-S₂ NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS APÓS 30 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO



A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 μ g/kg), veículo (PBS), β -G-S₂ (0,25-0,5 mg/kg), e tromboplastina (10 mg/kg). O abdômen de cada animal foi aberto cirurgicamente, a veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e exposta para a colocação de suturas frouxas com distância de 1 cm. As ramificações entre as veias renais foram ligadas. A formação do trombo foi induzida por uma injeção de tromboplastina e 10 segundos após por estase do seguimento de 1 cm da veia cava abdominal. A estase foi mantida por 20 minutos, após este período, o trombo foi removido e pesado em balança analítica. Os polissacarídeos e o veículo foram administrados 30 minutos antes que a tromboplastina. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média da massa do trombo formado \pm desvio padrão foi determinada.

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

FIGURA 22 - EFEITO DA β -G-S₂, NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS APÓS 60 MINUTOS DE CIRCULAÇÃO



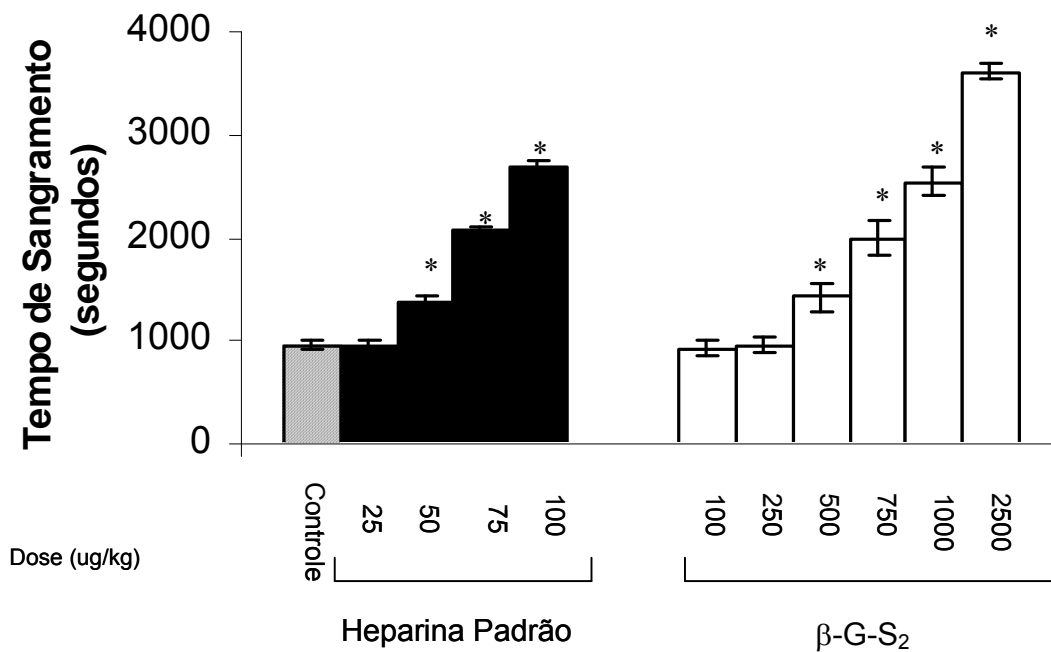
A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 μ g/kg), veículo (PBS), β -G-S₂ (0,25-0,5 mg/kg), e tromboplastina (10 mg/kg). O abdômen de cada animal foi aberto cirurgicamente, a veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e exposta para a colocação de suturas frouxas com distância de 1 cm. As ramificações entre as veias renais foram ligadas. A formação do trombo foi induzida por uma injeção de tromboplastina e 10 segundos após por estase do seguimento de 1 cm da veia cava abdominal. A estase foi mantida por 20 minutos, após este período, o trombo foi removido e pesado em balança analítica. Os polissacarídeos e o veículo foram administrados 30 minutos antes que a tromboplastina. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média da massa do trombo formado \pm desvio padrão foi determinada.

† Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

4.1.8 TEMPO DE SANGRAMENTO

Um dos principais efeitos colaterais com o uso da heparina é o sangramento (FABRIS et al., 2000). Na tentativa de avaliar se a β -G-S₂ poderia apresentar este efeito colateral, o tempo de sangramento foi determinado em ratos. Na literatura são descritos diversos métodos para determinação do tempo de sangramento utilizando modelos animais (LEADLEY Jr et al., 2000). O tempo de sangramento foi determinado em ratos, como descrito no item 3.10. Os resultados deste experimento podem ser visualizados na Figura 23 e Tabela 14. A β -G-S₂, assim como a heparina causam um aumento dose-dependente no tempo de sangramento em ratos, o grupo controle tratado com veículo (PBS) apresenta um tempo de sangramento médio de $960 \pm 50,2$ segundos, β -G-S₂ causa um aumento no tempo de sangramento de 48,4 e 108,3% em 500 e 1000 μ g/kg, respectivamente. A concentração em que a β -G-S₂ inibiu completamente a formação do trombo (500 μ g/kg), o tempo de sangramento aumentou apenas 48,4% em relação ao controle. A heparina produziu um significativo efeito hemorrágico, na concentração onde o efeito antitrombótico é máximo (100 μ g/kg), o aumento no tempo de sangramento foi de 179,7% em relação ao controle. Portanto a utilização da β -G-S₂ como agente anticoagulante e antitrombótico, apresenta menor risco de ocasionar episódios de sangramento em relação a heparina. Este fato pode ser considerado como um mérito para uma droga anticoagulante (HAYASHI et al., 2001). O anticoagulante ideal deve inibir a trombina sem aumentar substancialmente o risco de hemorragias (GUGLIELMONE et al., 2002).

FIGURA 23 - EFEITO DA β -G-S₂ E HEPARINA NO TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS



A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 μ g/kg), veículo (PBS), β -G-S₂ (0,1-1 mg/kg). O sangramento foi induzido por um corte na cauda do animal a 3 mm da extremidade terminal. A cada 30 segundos a extremidade cortada foi seca com papel de filtro e o tempo necessário para parar o sangramento foi medido em segundos. As moléculas testadas foram administradas 5 minutos antes de induzir o sangramento no animal. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média do tempo de sangramento \pm desvio padrão foi determinada.

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey (p < 0.05).

TABELA 14 - β -G-S₂ E HEPARINA NO TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS

Composto	Dose (μ g/kg)	Tempo de Sangramento (segundos)	Aumento (%)
Controle (PBS)	-	960 \pm 50,2	-
β-G-S₂	100	920 \pm 77,4	-
	250	960 \pm 82,7	-
	500	1425 \pm 125,5*	48,4
	1000	2000 \pm 164*	108,3
HEPARINA PADRÃO (140 USP/mg)	25	945 \pm 56,1	-
	50	1380 \pm 65,7*	43,7
	75	2075 \pm 44,1*	116,1
	100	2685 \pm 64,8*	179,7

A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 μ g/kg), veículo (PBS), β -G-S₂ (0,1-1 mg/kg). O sangramento foi induzido por um corte na cauda do animal a 3 mm da extremidade terminal. A cada 30 segundos a extremidade cortada foi seca com papel de filtro e o tempo necessário para parar o sangramento foi medido em segundos. As moléculas testadas foram administradas 5 minutos antes de induzir o sangramento no animal. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média do tempo de sangramento \pm desvio padrão foi determinada.

*Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

4.1.9 INIBIÇÃO DA TROMBINA (IIa) PELO COFATOR II DA HEPARINA OU ANTITROMBINA (AT) NA PRESENÇA DA β -G-S₂

A atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados é devido ao aumento da inibição de proteases mediada por cofatores plasmáticos específicos, principalmente antitrombina e cofator II da heparina (BÉGUN, LINDHOUT e HEMKER, 1988).

A capacidade da β -G-S₂ em inibir a trombina através do cofator II da heparina ou antitrombina foi determinada através de ensaios de atividade amidolítica como descrito nos itens 3.7.4.1 e 3.7.4.2. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Figura 24 e

Tabela 15, onde é possível observar que a β -G-S₂ na presença de antitrombina inibiu a trombina completamente em baixas concentrações (0,125-2 μ g/ml). Na concentração de 4 μ g/ml a inibição da trombina foi de 99,7% (Tabela 15 e Figura 24). A β -G-S₂ também inibiu a trombina na presença do cofator II da heparina, entretanto, a porcentagem de inibição foi menor quando comparado com o ensaio realizado na presença de AT (Tabela 15).

A trombina foi diretamente inibida na presença de β -G-S₂ e ausência de ambos os inibidores, antitrombina e cofator II da heparina (Tabela 16 e Figura 25). Pequenas quantidades do polissacarídeo, até 0,5 μ g/ml inibem parcialmente a atividade da trombina, concentrações maiores aumentam progressivamente a inibição direta da trombina até sua total inibição em 2 μ g/ml. Estes resultados indicam que a β -G-S₂ é um inibidor direto da trombina, e que seu efeito é potencializado principalmente pela antitrombina.

Para a maioria dos polissacarídeos sulfatados, ainda não é conhecida uma seqüência específica para a interação de polissacarídeos sulfatados com cofatores no plasma ou proteases alvo (YOON, et al., 2002). Acredita-se que a ação anticoagulante de polissacarídeos sulfatados resulta da forte interação entre cargas negativas de grupos sulfato com as cargas positivas de seqüências peptídicas de proteínas reguladoras da coagulação (HUANG et al., 2003), sendo que, a posição em que os grupos sulfatos encontram-se na molécula é importante.

A maioria dos polissacarídeos sulfatados é capaz de inibir a trombina através da antitrombina, ou do cofator II da heparina ou ambos. Alguns polissacarídeos sulfatados são capazes de inibir diretamente a trombina independente da antitrombina ou cofator II da heparina. Uma heparina extraída de *Penaeus brasiliensis* apresenta atividade anticoagulante exercida principalmente pela inibição do fator Xa e inibição da trombina através do cofator II da heparina (DIETRICH et al., 1999), um oligossacarídeo denominado fosfomanopentose sulfato (PI-88), atua como anticoagulante por aumentar a habilidade do cofator II da heparina em inibir a trombina não atuando sobre a AT (WALL et al., 2001), outro polissacarídeo sulfatado, uma D-galactana obtida da alga *Botryocladia occidentalis* exerce atividade anticoagulante devido ao aumento na

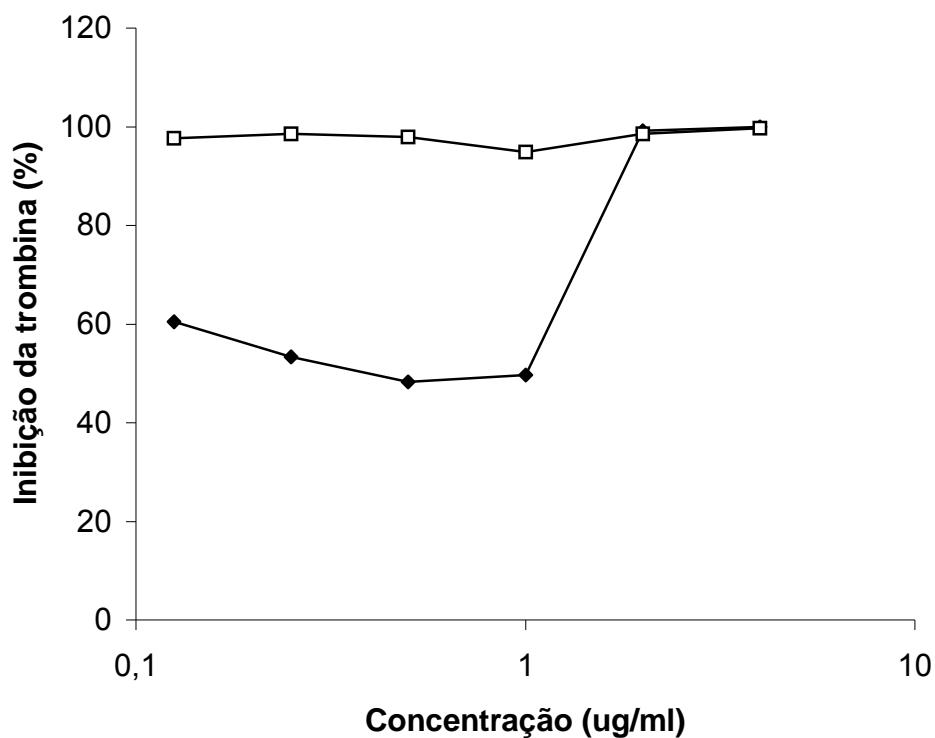
inibição da trombina e fator Xa pela antitrombina e cofator II da heparina (FARIAS et al., 2000). Um dermatan sulfato proveniente de *Styela plicata* inibe a trombina exclusivamente através da inibição da trombina mediada pelo cofator II da heparina (PAVÃO et al., 1998) enquanto que uma fucana sulfatada extraída de *L. brasiliensis* é capaz de inibir diretamente a trombina (PEREIRA et al., 1999). Além destes, diversos outros polissacarídeos sulfatados apresentam o mecanismo de ação elucidado.

TABELA 15 - EFEITO DA β -G-S₂ NA INIBIÇÃO DA TROMBINA PELA ANTITROMBINA E COFATOR II DA HEPARINA

β -G-S ₂ Concentração μ g/ml	COFATOR II DA HEPARINA (HCII)		ANTITROMBINA (AT)	
	% DE ATIVIDADE DA TROMBINA	% DE INIBIÇÃO DA TROMBINA	% DE ATIVIDADE DA TROMBINA	% DE INIBIÇÃO DA TROMBINA
0,125	39,6	60,4	2,3	97,7
0,25	46,7	53,3	1,5	98,5
0,5	51,7	48,3	2,1	97,9
1	50,4	49,6	5,2	94,8
2	0,8	99,2	1,5	98,5
4	0	100	0,3	99,7

Diferentes concentrações da β -G-S₂, foram incubadas em micro-cubetas por 60 segundos a 37°C com 10 μ l de trombina (20 nM), 25 μ l de cofator II da heparina (120nM) ou antitrombina (40nM) e tampão TS/PEG (Tris/HCl 0,02M, NaCl 0,15 M e polietileno glicol 1,0 mg/ml, pH 7,4). Após o período de incubação, 25 μ l do substrato cromogênico S-2238 (Chromogenix AB) em tampão TS/PEG foi adicionado e a absorbância foi medida em 405nm em espectrofotômetro por 5 minutos. A taxa de variação na absorbância, expressa como $\Delta A_{405}/\text{min}$, foi proporcional a atividade remanescente da trombina no meio reacional. Experimentos controle foram realizados como descrito acima, porém, na ausência do polissacarídeo sulfatado. Para cada dose testada, foram feitas três determinações e calculada a % de atividade e de inibição da trombina.

FIGURA 24 - EFEITO DA β -G-S₂ NA INIBIÇÃO DA TROMBINA PELA ANTITROMBINA E COFATOR II DA HEPARINA



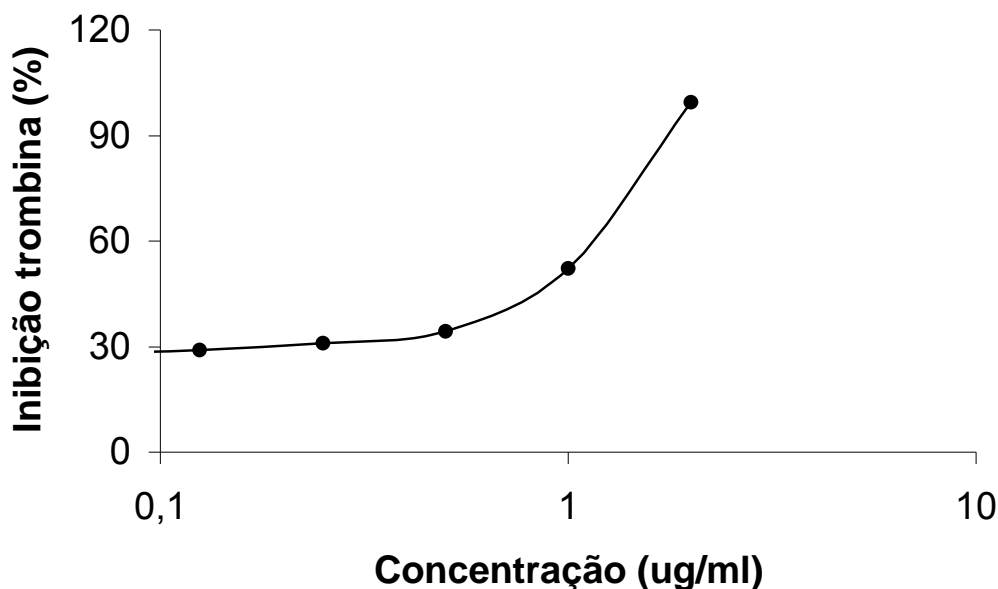
Diferentes concentrações da β -G-S₂, foram incubadas em micro-cubetas por 60 segundos a 37°C com 10 μ l de trombina (20 nM), 25 μ l de cofator II da heparina (120nM) ou antitrombina (40nM) e tampão TS/PEG (Tris/HCl 0.02M, NaCl 0,15 M e polietileno glicol 1,0 mg/ml, pH 7,4). Após o período de incubação, 25 μ l do substrato cromogênico S-2238 (Chromogenix AB) em tampão TS/PEG foi adicionado e a absorbância foi medida em 405nm em espectrofotômetro por 5 minutos. A taxa de variação na absorbância, expressa como $\Delta A_{405}/\text{min}$, foi proporcional a atividade remanescente da trombina no meio reacional. Experimentos controle foram realizados como descrito acima, porém, na ausência do polissacarídeo sulfatado. Para cada dose testada, foram feitas três determinações e calculada a % de atividade e de inibição da trombina. Experimento realizado na presença de AT (quadrados abertos) e na presença de HC II (triângulos fechados).

TABELA 16 - EFEITO DA β -G-S₂ NA INIBIÇÃO DA TROMBINA NA AUSÊNCIA DOS INIBIDORES ANTITROMBINA E COFATOR II DA HEPARINA

β -G-S ₂ Concentração μ g/ml	% DE ATIVIDADE DA TROMBINA	% DE INIBIÇÃO DA TROMBINA
0,032	78,2	21,8
0,0625	72,5	27,5
0,125	71,0	29,0
0,25	69,0	31,0
0,5	65,6	34,4
1	47,8	52,2
2	6	94

Diferentes concentrações da β -glucana (1 \rightarrow 6)-SO₄, foram incubadas em micro-cubetas por 60 segundos a 37°C com 10 μ l de trombina (20 nM) e tampão TS/PEG (Tris/HCl 0.02M, NaCl 0,15 M e polietileno glicol 1,0 mg/ml, pH 7,4) na ausência dos inibidores cofator II da heparina e antitrombina. Após o período de incubação, 25 μ l do substrato cromogênico S-2238 (Chromogenix AB) em tampão TS/PEG foi adicionado e a absorbância foi medida em 405nm em espectrofotômetro por 5 minutos. A taxa de variação na absorbância, expressa como $\Delta A_{405}/\text{min}$, foi proporcional a atividade remanescente da trombina no meio reacional. Experimentos controle foram realizados como descrito acima, porém, na ausência do polissacarídeo sulfatado. Para cada dose testada, foram feitas três determinações e calculada a % de atividade e de inibição da trombina.

FIGURA 25 - EFEITO DA β -G-S₂ NA INIBIÇÃO DA TROMBINA NA AUSÊNCIA DOS INIBIDORES ANTITROMBINA E COFATOR II DA HEPARINA



Diferentes concentrações da β -glucana (1 \rightarrow 6)-SO₄, foram incubadas em micro-cubetas por 60 segundos a 37°C com 10 μ l de trombina (20 nM) e tampão TS/PEG (Tris/HCl 0.02M, NaCl 0,15 M e polietileno glicol 1,0 mg/ml, pH 7,4) na ausência dos inibidores cofator II da heparina e antitrombina. Após o período de incubação, 25 μ l do substrato cromogênico S-2238 (Chromogenix AB) em tampão TS/PEG foi adicionado e a absorbância foi medida em 405nm em espectrofotômetro por 5 minutos. A taxa de variação na absorbância, expressa como $\Delta A_{405}/\text{min}$, foi proporcional a atividade remanescente da trombina no meio reacional. Experimentos controle foram realizados como descrito acima, porém, na ausência do polissacarídeo sulfatado. Para cada dose testada, foram feitas três determinações e calculada a % de atividade e de inibição da trombina.

4.2 GALACTOGLUCOMANANA SULFATADA DO LÍQUEN *Cladonia ibitipocae* (GGM-SO₄)

A galactoglucomanana sulfatada do líquen *C. ibitipocae* com D.S. 1,29 (GGM-SO₄) foi estudada por MARTINICHEN (2001) quanto às propriedades anticoagulantes *in vitro*. Em todas as concentrações testadas, os testes APTT e TT foram prolongados, a concentração de 25 μ g/ml de plasma produziu um aumento 3,5 e 5,3 vezes maior que o controle normal, respectivamente (MARTINICHEN, 2001). Dando continuidade à pesquisa, neste trabalho, a molécula foi avaliada através do modelo de trombose

venosa estase-induzida em ratos e tempo de sangramento com o objetivo de verificar o potencial antitrombótico e risco de sangramento, respectivamente.

4.2.1 TROMBOSE VENOSA ESTASE-INDUZIDA EM RATOS DA GGM-SO₄

A ação antitrombótica da GGM-SO₄ foi determinada em ratos e os resultados obtidos para este experimento após 5 minutos de circulação do polissacarídeo estão demonstrados na Figura 26 e Tabela 17. O tratamento dos ratos com a GGM-SO₄ e com heparina diminuiu a massa do trombo formado de uma maneira dose-dependente. A porcentagem de inibição do trombo foi de 16,2%; 35,0%; 42,3%; 60,2; 74,8% e 88,0% nas doses de 500 µg/kg, 750 µg/kg 1000 µg/kg; 1250 µg/kg; 1500 µg/kg e 1750 µg/kg de GGM-SO₄, respectivamente, a dose de 2000 µg/kg impede completamente a formação do trombo após 20 minutos de estase. Para a heparina, foram necessários 100 µg/kg para obter o mesmo efeito, a porcentagem de inibição do trombo foi de 30,8%, 67,5% e 82,9%, nas doses de 25 µg/kg, 50 µg/kg e 75 µg/kg, respectivamente. De acordo com estes resultados o efeito antitrombótico da GGM-SO₄ foi menor em termos de massa que a heparina, sendo necessário uma concentração 20 vezes maior para obter o mesmo efeito.

Constatou-se que à ação antitrombótica da GGM-SO₄ em relação à ação da β-G-S₂ foi inferior. A GGM-SO₄ impede a formação do trombo na dose de 2000 µg/kg, enquanto que, a β-G-S₂ possui o mesmo efeito na dose de 500 µg/kg, ou seja, em uma dose 4 vezes menor. As razões para esta diferença podem ser decorrentes dos diferentes graus de sulfatação das moléculas, 1,29 e 1,95 para a GGM-SO₄ e β-G-S₂, respectivamente; diferentes padrões de sulfatação, os grupos sulfato encontram-se principalmente no C-6 das unidades de galactose e manose e em menor proporção no C-2 das unidades de manose na GGM-SO₄, e nos carbonos C-2 e C-4 das unidades de glucose na β-G-S₂; diferentes composições monossacarídicas e presença de ramificações na GGM-SO₄.

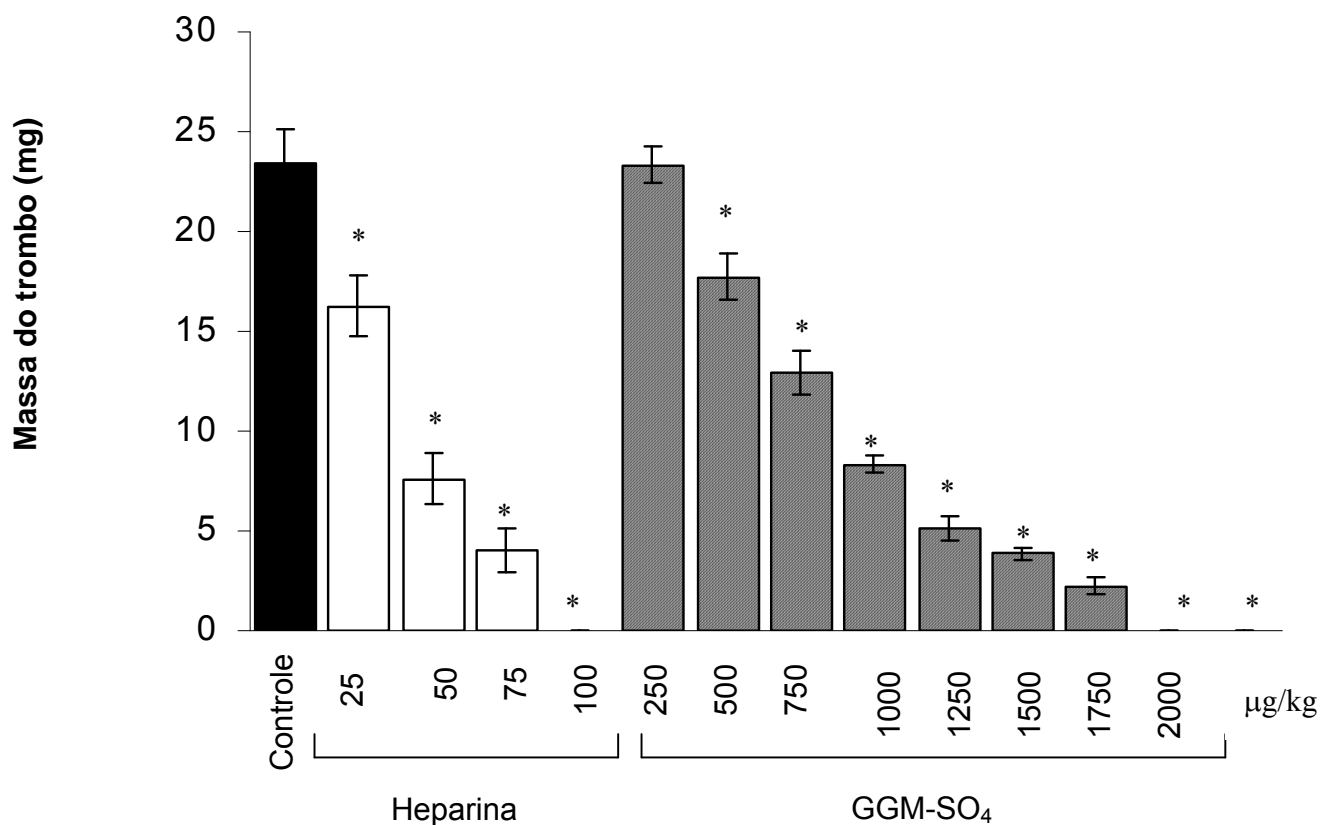
TABELA 17: EFEITO DA, GGM-SO₄ E HEPARINA NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE INDUZIDA EM RATOS

Composto	Dose (µg/kg)	Massa do trombo (mg)	% de inibição em relação ao controle
Controle (PBS)	-	23,4±1,7	-
Heparina Padrão (140 USP/mg)	25	16,2±1,5*	30,8
	50	7,6±1,2*	67,5
	75	4,0±1,0*	82,9
	100	0,0*	100
GGM- SO₄	250	23,3±1,9	-
	500	19,6±1,6*	16,2
	750	15,2±2,2*	35,0
	1000	13,5±1,6*	42,3
	1250	9,3±1,7*	60,2
	1500	5,9±1,3*	74,8
	1750	2,8±1,8*	88,0
	2000	0*	100

A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 µg/kg), veículo (PBS), GGM-SO₄ (0,25-2 mg/kg), e tromboplastina (10 mg./kg). O abdômen de cada animal foi aberto cirurgicamente, a veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e exposta para a colocação de suturas frouxas com distância de 1 cm. As ramificações entre as veias renais foram ligadas. A formação do trombo foi induzida por uma injeção de tromboplastina e 10 segundos após por estase do seguimento de 1 cm da veia cava abdominal. A estase foi mantida por 20 minutos, após este período, o trombo foi removido e pesado em balança analítica. O polissacarídeo, a heparina e o veículo foram administrados 5, antes que a tromboplastina. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média da massa do trombo formado ± desvio padrão foi determinada.

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey (p<0.05).

FIGURA 26: EFEITO DA GGM-SO₄ E HEPARINA NO MODELO DE TROMBOSE VENOSA ESTASE INDUZIDA EM RATOS



A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 µg/kg), veículo (PBS), GGM-SO₄ (0,25-2 mg/kg), e tromboplastina (10 mg/kg). O abdômen de cada animal foi aberto cirurgicamente, a veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e exposta para a colocação de suturas frouxas com distância de 1 cm. As ramificações entre as veias renais foram ligadas. A formação do trombo foi induzida por uma injeção de tromboplastina e 10 segundos após por estase do seguimento de 1 cm da veia cava abdominal. A estase foi mantida por 20 minutos, após este período, o trombo foi removido e pesado em balança analítica. O polissacarídeo, a heparina e o veículo foram administrados 5 minutos antes que a tromboplastina. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média da massa do trombo formado ± desvio padrão foi determinada.

*Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey (p<0.05).

4.2.2 TEMPO DE SANGRAMENTO DA GGM-SO₄

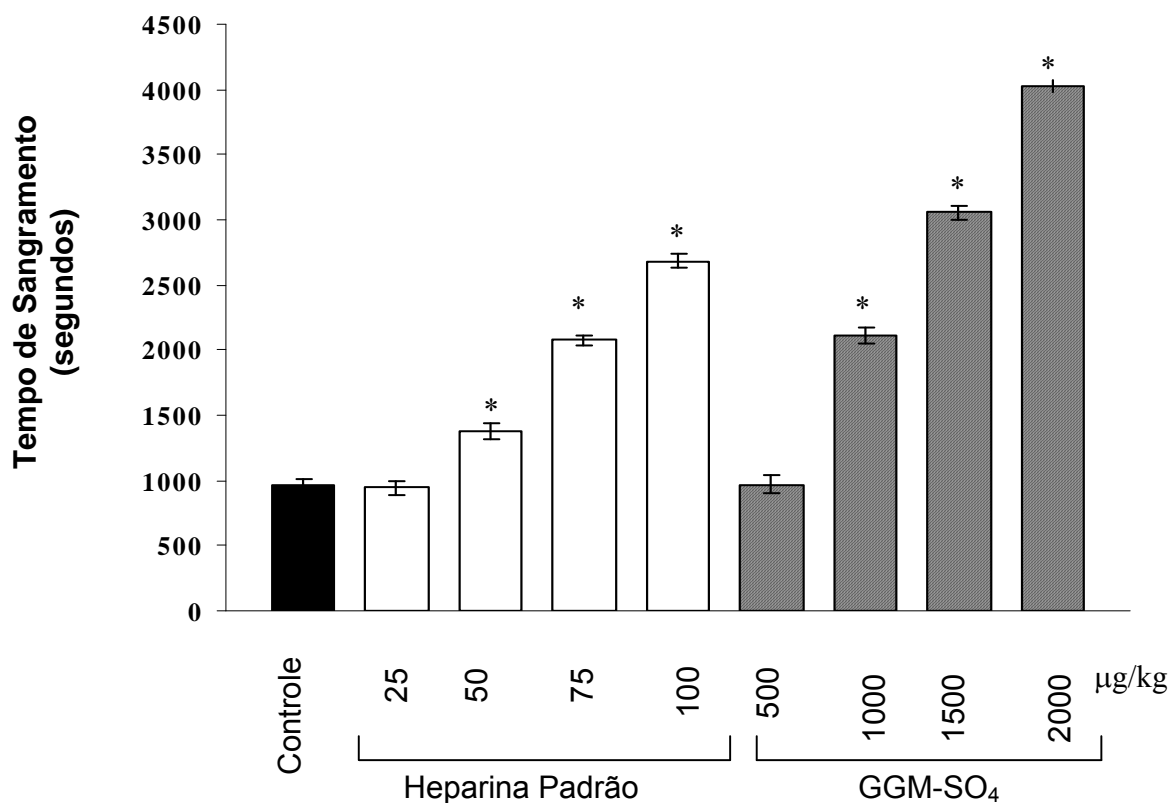
O tempo de sangramento foi determinado para avaliar os efeitos antihemostáticos da GGM-SO₄ em ratos. Os resultados deste experimento podem ser visualizados na Figura 27 e Tabela 18. Os ratos tratados com PBS (grupo controle) apresentaram tempo de sangramento médio de $990 \pm 50,2$ segundos (n=6). Os ratos tratados com ambos, heparina ou GGM-SO₄, apresentaram um aumento dose-dependente no tempo de sangramento. A administração endovenosa da GGM-SO₄ ocasionou um aumento no tempo de sangramento de 120%, 218% e 319% nas concentrações de 1, 1,5 e 2 mg/kg, respectivamente (Tabela 18).

TABELA 18 - EFEITO DA GGM-SO₄ E HEPARINA NO TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS

Composto	Dose (µg/kg)	Tempo de Sangramento (segundos)	Aumento (%)
Controle (PBS)		$960 \pm 50,2$	-
GGM-SO₄	500	$970 \pm 64,8$	-
	1000	$2115 \pm 62,2^*$	120,3
	1500	$3055 \pm 58,2^*$	218,2
	2000	$4025 \pm 51,7^*$	319,2
HEPARINA PADRÃO (140 USP/mg)	25	$945 \pm 56,1$	-
	50	$1380 \pm 65,7^*$	43,7
	75	$2075 \pm 44,1^*$	116,1
	100	$2685 \pm 64,8^*$	179,7

A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 µg/kg), veículo (PBS) ou GGM-SO₄ (0,5-2mg/kg). O sangramento foi induzido por um corte na cauda do animal a 3 mm da extremidade terminal. A cada 30 segundos a extremidade cortada foi seca com papel de filtro e o tempo necessário para parar o sangramento foi medido em segundos. As moléculas testadas foram administradas 5 minutos antes de induzir o sangramento no animal. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média do tempo de sangramento \pm desvio padrão foi determinada.

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey (p<0.05).

FIGURA 27 - EFEITO DA GGM-SO₄ E HEPARINA NO TEMPO DE SANGRAMENTO EM RATOS

A artéria carótida foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada com cateter BD Angiocath™ (22GA x1.00IN) para a administração de heparina (25-100 µg/kg), veículo (PBS), (0,1-1 mg/kg), ou GGM-SO₄ (0,5-2mg/kg). O sangramento foi induzido por um corte na cauda do animal a 3 mm da extremidade terminal. A cada 30 segundos a extremidade cortada foi seca com papel de filtro e o tempo necessário para parar o sangramento foi medido em segundos. As moléculas testadas foram administradas 5 minutos antes de induzir o sangramento no animal. Para cada dose testada 6 animais foram utilizados e a média do tempo de sangramento ± desvio padrão foi determinada.

* Diferença significativa do grupo teste com relação ao grupo controle pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

A heparina padrão nas concentrações de 50, 75 e 100 µg/kg aumentou o tempo de sangramento em 43,7%, 116,1% e 179,7%, respectivamente. Na dose em que a GGM-SO₄ impediu completamente a formação do trombo (2 mg/kg), o tempo de sangramento aumentou 319,2% em relação ao controle, a heparina, na dose que impede a formação do trombo (100 µg/kg), aumentou 179,7%. Os resultados deste experimento demonstram que a GGM-SO₄, embora possua ação antitrombótica, apresenta maior probabilidade de ocasionar episódios de sangramento em relação a

heparina e em relação a β -G-S₂, a qual causa um aumento no tempo de sangramento de 48,4% em relação ao controle.

Este estudo demonstrou que as moléculas β -G-S₂ e GGM-SO₄ são efetivas *in vitro* e *in vivo* como agentes anticoagulantes e antitrombóticos em ratos, sugerindo que estas moléculas poderão ser utilizadas no tratamento de desordens trombóticas.

5. CONCLUSÕES

1- O maior grau de sulfatação para a β -glucana (1 \rightarrow 6) extraída do líquen *Parmotrema mantiqueirense* foi obtido utilizando 10 mol de ácido clorosulfônico/OH livre;

2- O polissacarídeo sulfatado β -G-S1 (D.S 0,63) foi capaz de prolongar os testes APTT e TT realizados *in vitro* de maneira dose-dependente, na concentração de 100 μ g/ml de plasma humano, a atividade anticoagulante foi de aproximadamente 4,8 e 3,5 vezes maior que o controle em relação aos testes APTT e TT, respectivamente. Nenhuma concentração testada prolongou o teste PT *in vitro*. Estes resultados indicam que o polissacarídeo sulfatado atua em um ou mais componentes da via intrínseca da coagulação e não atua sobre a via extrínseca;

3- O polissacarídeo sulfatado β -G-S2 (D.S 1,95) apresentou uma excelente atividade anticoagulante *in vitro* foi capaz de prolongar os testes APTT e TT realizados *in vitro* de maneira dose-dependente, na concentração de 14 μ g/ml de plasma humano tanto o teste APTT quanto o teste TT atingem valores superiores a 300 segundos, indicando que o polissacarídeo sulfatado atua em um ou mais componentes da via intrínseca da coagulação. Um discreto efeito foi observado no teste PT, sugerindo que a molécula é um fraco inibidor da via extrínseca de coagulação;

4- A excelente ação anticoagulante da β -G-S2, é resultado dos altos níveis de cargas negativas produzidas pelos grupos sulfato (D.S 1,95) e, provavelmente pela disposição dos grupos sulfato nas hidroxilas dos carbonos C-2 e C-4, principalmente (30%);

5- O tempo de incubação a temperatura ambiente não interferiu na ação anticoagulante da β -G-S2 em plasma humano, visto que não há nenhuma alteração significativa nos valores obtidos quanto aos testes APTT e TT;

6- A administração intravenosa da β -G-S2 em ratos, prolonga o APTT de uma maneira dose-dependente após 5 minutos da administração, indicando ação *in vivo*. Uma quantidade em termos de massa 2 vezes maior de β -G-S2 é necessária para prolongar o APTT para 300 segundos com relação à heparina, sugerindo que a potência anticoagulante *in vivo* da β -G-S2 é a metade da potência da heparina;

7-A β -G-S2 apresentou ação anticoagulante até 30 minutos após a administração de uma única dose, sugerindo que a molécula não é facilmente degradada;

8- A β -G-S2 impede completamente a formação do trombo em ratos na dose de 500 μ g/kg, uma dose 5 vezes maior que a heparina, a qual inibe a formação do trombo em 100 μ g/kg;

9- A partir de 30 minutos de circulação da β -G-S2, o efeito antitrombótico é reduzido em todas as doses testadas;

10- A utilização da β -G-S2 como agente anticoagulante e antitrombótico, apresenta menor risco de ocasionar episódios de sangramento em relação a heparina;

11- Quanto ao mecanismo de ação, a β -G-S2 pode ser considerada um inibidor direto da trombina e seu efeito é potencializado principalmente pela antitrombina;

12- A galactoglucomanana sulfatada do líquen *Cladonia ibitipocae* com D.S. 1,29 (GGM-SO₄), apresentou ação antitrombótica em ratos, sendo que a concentração de 2 mg/kg inibiu completamente a formação de trombo, entretanto, apresentou maior probabilidade de ocasionar episódios de sangramento em relação a heparina e em relação a β -G-S₂.

REFERÊNCIAS

- ADAM, W.W.; DEMIMING-ADAMS, B.; LANGE, O. L. Carotenoid composition and metabolism in green and blue-green algal lichens in the field. **Oecologia**, Colorado, v. 94 (4); p. 576-584, 1993.
- AGNELLI, G. Pharmacological activities of heparin chains: should our past knowledge be revised? **Haemostasis**, Basel, v. 26 (suppl.2), p. 2-9, 1996.
- AHMADJIAN, V. **The lichen simbiosis**, New York:John Wiley & Sons, 2. ed., 1993.
- AHMADJIAN, V.; HALE, M. E. **The lichens**. New York: Academic Press, 1993. p. 151-545.
- AIZU, Y. The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulphates from the brown seaweed *Eckonia kurome*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokio, v.55, n. 3, p. 791-796, 1991.
- ALBAN, S. JESKE, W.; WELZEL, D.; FRANZ, G.; FARRED, J. Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisyntetic β -1,3-glucan sulfate. **Thromb. Res.**, Tarrytown, v. 78, n.3, p.201-210, 1995.
- ALBAN, S.; KRAUS, J.; FRANZ, G. Syntesis of laminarin sulfates with anticoagulant activity. **Drug Res.**, Aulendorf, v.42(II), n. 8, p. 1005-1008, 1992.
- ALBAN, S.; SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharide: Part I. Synthesis and structure-activity relationship of new pullulans sulfates. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 47, p. 267-276, 2002.
- ALMEIDA, T. V. Hemostáticos e anticoagulantes. In: ZANINI, A. C.; OLGA, S. **Farmacologia aplicada**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, p. 354-364,1994.
- AMANO, K.; MICHIMICK, D. A.; MOUSSALLI, M.; KAUFMAN, R. J. Mutation at either Arg 336 or Arg 562 in factor VIII is insufficient for complet resistance to activated protein C (APC)-mediated inactivation: implications for the APC resistance test. **Thromb. Haemostasis**.,Stuttgart, v. 79, p. 557-563, 1998.
- AUSTIN, R. C.; SHEFFILD, W., P.; RACHBINSKI, R. A.; BLACHMAN, M.A. The N-terminal domain of antithrombin III is essencial for heparin binding and complex-formation with, but not cleavage by, α -thrombin. **Biochem. J.**, London, v. 282, n. 2, p. 345-351, 1992.

AXLRD, D.A.; WAKEFIELD, T. U. Future directions in antithrombotic therapy: Emphasis on venous thromboembolism. **J. Am. Coll. Sug.**, v. 192, n. 5, p. 641-651, 2001.

BAJAJ, M. S.; KUPPUSWAMY, M. N.; MANEPALLI, A. N.; BABA, S. P. Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor trombosmodulin and von Willebrand factor in normal human tissues. **Thromb. Haemostasis.**, Stuttgart, v. 82, p. 1047-1052, 1999.

BAJZAR, L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. **Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.**, Hagerstown, v. 20, p. 2511-2518, 2000.

BAJZAR, L.; MORZER, J.; NESHEIM, M. Purification and characterization of TAFI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor. **J. Biol. Chem.**, Bethesda v. 270, p. 14477, 1995.

BARON, M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Isolation and identification of a linear (1→3)-linked β -D-glucan and other carbohydrates components of the lichen *Stereocaulon ramulosum* (SW) Räscher. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 177, p. 235-239, 1988.

BARON, M.; IACOMINI, M.; FANTA, E. S.; GORIN, P. A. J. Galactomannan, lichenan and isolichenan from the polysaccharide-rich lichen *Neuropogon aurantiaco-ater*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 3125-3126, 1991.

BAUGHAN, D. R.; WOODWARD, P. M. A collaborative study of heparin from different sources. **Bull. Wild. Hith. Org.**, v. 42, p. 129-149, 1970.

BÉGUIN, S.; LINDHOUT, T.; HEMKER, H. C. The mode of action of heparin in plasma. **Thromb, Haemost.**, v. 60, p. 457-462, 1988.

BENTON, R. E.; GERSH, B. J. Cardiology for the primary care provider: Heparin-induced thrombocytopenia. **South. Med. J.**, Birmingham, v. 91, n. 2, p. 133-137, 1998.

BERRY, C. N.; GIRARD, D.; LOCHOT, S.; LECOFFRE, C. Antithrombotic actions of argatroban in rat models of venous, mixed and arterial thrombosis, and its effects on the tail transection bleeding time. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 1209-1214, 1994.

BICK, R.L.; FRENKEL, E. P. Clinical aspects of heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis and others side effects of heparin therapy. **Clin. Appl. Thromb. Hemost.** v. 5 (suppl. 1) S7-15, 1999.

BITHELL, T. C. Blood coagulation. In LEE, G. R.; BITHEL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 9. ed. v. 1. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

BJÖRK, L.; LINDAHL, U. Mechanism of the anticoagulant actions of heparin. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 48, n. 3, p. 161-182, 1982.

BLINDER, M. A.; ANDERSSON, T. R.; ABILDGAARD, U.; TOLLEFSEN, D. M. Heparin cofactor II Oslo. Mutation of arg-189 to His decreases the affinity for dermatn sulfate, **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 264, p. 5128-5133, 1989.

BLINDER, M. A.; TOLLEFSEN, D. M. Site-directed mutagenesis of arginine 103 and lysine 185 in the proposed glycosaminoglycan binding site of heparin cofactor II. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 265, p. 286-291, 1990.

BODE, V.; FRANZ, G. Physicological activity of new heparinoids derived from plant polysaccharides. **Arch. Pharm.**, Athens, v. 324, p. 363-365, 1991.

BOHN, J. A.; Be MULLER, J. N. (1→3)-β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1995.

BOISSON-VIDAL, C.; COLLIEC-JOUALT, S.; FISCHER, A. M.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; STERNBERG, C.; DURAND, P.; JOSEFONVICZ, J. Biological activities of fucans extracted from brown seaweeds, **Drugs Future**, Barcelona, v. 16, p. 539-545, 1991.

BONEU, B. Low molecular weight heparins: are they superior to unfractionated heparins to prevent and to treat deep vein thrombosis? **Thromb. Res.**, New York, v. 100, v113-120, 2000.

BOURIN, M. C.; LINDAHL, U. Glicosaminoglycans and the relation of blood coagulation. **Biochem. J.**, London, v. 289, n.1, p. 313-330, 1993.

BRINKMANN, T., SCHMIDT, M.; PROHASKA, W.; KLEESICK, K.; Tissue factor pathway inhibitor (TFPI): biochemistry, genetics and implications for thrombophilia. **J. Lab.Clin. Med.**, St. Louis, v. 25, p. 269-276, 2001.

BRODY, M. T.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. D.; NEU, H. C. **Farmacologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

BUGGE, T. H., XIAU, Q.; KOMBRINCK, K. W. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell associated initiator of blood coagulation. **Proc. Nat. Acad. of Sci. USA**, Washington, v. 93, p. 6258-6263, 1996.

CAMIOLO, S. M.; THORSEN, S.; ASTRUP, T. Fibrinogenolysis nad fibrinolysis with tissue plasminogen activator, urokinase, streptokinase-activated human globulin, and plasmin. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, v. 138, p. 277-280, 1971.

CANAANI, O.; RONEN, R.; GARTY, J.; CAHEN, D.; MALKIN, S.; GALUN, M. Photoclastic study of the green alga *Trebouxia* in the lichen *Ramalina duriae* in vivo. **Photosynth. Res.**, Dordrecht, v. 5, 1984. p. 297-306.

CARBONERO, E. R. Extração, purificação e determinação estrutural de polissacarídeos extraídos do basidiolíquen *Dictionema glabratum*. Anais VII EVINCI, Curitiba, UFPR, p. 99, 1999.

CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; STUELP, P.; GORIN, P. A. J.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 194, p. 65-69, 2001.

CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. **Atividade antitumoral dos polissacarídeos nativos e quimicamente modificados do líquen *Ramalina celastri***. Curitiba, 1998. 147 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; BUCHI, D. F.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect against HeLa cell of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 503-509, 1997.

CARRELL, R. W. How serpins are shaping up. **Science (Washington DC)**, Washington, v. 285, p. 1861-1862, 1999.

CARTER, C. J.; KELTON, J. G.; HIRSH, J.; CERSKUS, A.; SANTOS, A. V.; GENT, M. The relationship between the hemorrhagic and antithrombotic properties of low molecular weight heparin in rabbits. **Blood**, Philadelphia, v. 59, p. 1239-1245, 1982.

CÀSSARO, C. M.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 252, n. 7, p. 2254-2261, 1977.

CASTELLINO, F. J. Biochemistry of human plasminogen. **Sem. Thromb. Haemost.**, New York, v. 10, p. 18-23, 1984.

CASU, B. Structure and biological activity of heparin. **Adv. Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 43, p. 51-134, 1985.

CHAIDEDGUMJORN, A.; TOYADA, H.; WOO, E.R.; LEE, K. B.; KIM, Y. S.; TOIDA, T.; IMANARI, T. Effect of (1→4)- and (1→3)-linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 337, p. 925-933, 2002.

CHANDA, N. B.; HIRST, E. L.; MANNERS, D.J. A comparison of isolichenin and lichenin from Iceland moss (*Cetraria islandica*). **J. Chem. Soc. (Lond.)**, London, p. 1951-1958, 1957.

CHEVOLOT, L.; FOUCAUT, A.; CHAUBET, F.; KERVAREC, N.; SINQUIN, C.; FISHER, A. M.; BOISSON, V. C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationship with anticoagulant activity. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 319, p. 154-165, 1999.

CHURCH, F. C.; HOFFMAN, M. R. Heparin cofactor II and thrombin: Heparin-binding proteins linking hemostasis and inflammation. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 4, n. 3, p. 140-146, 1994.

CHURCH, F. C.; MEADE, J. B.; TREANOR, R. E.; WHINNA, H. C. Antithrombin activity of fucoidan. The interaction of fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III, and thrombin. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 264, p. 3618-3623, 1989.

CIUCANU, I.; KEREK, F. Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v.131, p.209-217, 1984.

COHEN, M. The role of low-molecular-weight heparins in arterial diseases: optimizing antithrombotic therapy. **Thromb. Res.**, New York, v. 100, v131-v139, 2000.

COLLEN, D.; LIJNEN, H. R. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. **Blood**, Philadelphia, v. 78, n. 12, p. 3114-3124, 1991.

COLLIEC, S.; FISCHER, A. M.; TAPON- BRETAUDIÈRE, J.; BOISSON, C. ; DURAND, P. JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. **Thromb. Res.**, New York, v. 64, p. 143-154, 1991.

COLMAN, R. W. Activation of plasminogen or plasma Kallikrein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 351, p. 273, 1979.

COLWELL, N. S.; GRUPE, M. J; TOLLEFSEN, D. M. Amino acid residues of heparin cofactor II required for stimulation of thrombin inhibitor by sulphated polyanions. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1430, p. 148-156, 1999.

COLWELL, N. S.; TOLLEFSEN, D. M. Isolation of frog and chicken c DNAs encoding heparin cofactor II. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v. 80, p. 784-790, 1998.

DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. **Lancet**, Boston, v. 355, p. 1627-1632, 2000.

DAHLBÄCK, B. The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis. **Thromb. Res.**, New York, v. 77, p. 1-43, 1995.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science (Washington, D C)**, Washington, v. 145, n. 3637, p. 1310, 1964.

DIETRICH, C. P.; PAIVA, J. F.; CASTRO, R. A. B; CHAVANTE, S. F.; JESKE, W.;

FAREED, J.; GORIN, P. A. J.; MENDES, A.; NADER, H. B. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1428, n. 2, p.273-283, 1999.

DIETRICH, C. P.; SILVA, M. E.; MICHELACCI, Y. M. Sequencial degradation of heparin in *Flavobacterium heparinum*. Purification and properties of 5 enzymes involved in heparin degradation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 248, p. 6409-6415, 1973.

DOCTOR, U. M.; LEWIS, D.; COLEMAN, M.; KEMP, M. T.; MARBLEY, E.; SAULS, V. Anticoagulant properties of semisynthetic polysaccharide sulfates. **Thromb. Res.**, New York, v. 64, p. 413-425, 1991.

DOCTOR, V. M.; ESHO, D. Studies, by ¹³C-n.m.r and ¹H-m.n.r spectroscopy of polysaccharide structure following sulfatation. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 121, p. 312-315, 1983.

DODGSON, K. S.. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatics and non-enzymatics hydrolysis of carbohydrates and other sulphate esters. **Biochem. J.**, London, v. 78, n. 2, p.3112-319, 1961.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G.. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, London, v. 84, n.1, p.106-110, 1962.

DOOLITTLE, R. F. Fibrinogen and fibrin. **Ann. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 53, p. 195-229, 1984.

ELIX, J. A. Biochemistry and secondary metabolites. In: NASH III, T.H. **Lichen biology**. Cambridge: University Press, 1996. p. 155-180.

ELIX, J. A.; WITTHON, A. A.; SARGENT, M. V. Recent progress in the chemistry of lichen substances. **Prog. Chem. Org. Nat. Prod.**, v. 45, p. 103-224, 1984.

ESMON, C. T. The endotelial cell protein C receptor. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v. 83, p. 639-643, 2000.

FABRIS, F.; LUZZATO, G.; STEFANI, P. M.; GIROLAMI, B.; CELLA, G.; GIROLAMI, A. Heparin-Induced thrombocitopenia. **Haematologica**, Roma, v. 85, n.1, p. 72-81, 2000.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A-P.; PEREIRA, S. P.; MOURÃO P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FISCHBACH, D. D.; FOGDALL, R. P. **Coagulación**. Buenos Aires: Editora Médica

Panamericana, 1985. p. 14-264.

FRIEDEL, T.; BÜDEL, B. Photobionts. In: NASH, T.H. **Lichen biology**. Cambridge: University press, 1996. p.8-23.

GENTRY, P. A.; Comparative aspects of blood coagulation. **Vet. J.**, London, v. 198, p.238-251, 2003.

GERMANO, S. **Heparinóides produzidos por modificação química em galactomananas de sementes de *Cassia fastuosa* Willd. e *Mimosa scabrella* Betham**. Curitiba, 1996. 84 f. Tese (mestrado em Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GIRARD, T. J.; WARREN, W. F. NOVOTNY, K. M.; LIKERT, S. G.; BROWN, J. P. MILETICH, J. P.; BROZE Jr., G. J. Functional significance of the Kunitz-type inhibitor domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. **Nature (London)**, London, v. 338, p.518-520, 1989.

GORIN, P. A. J.; BARON, M.; SILVIA, M. C. C.; TEIXEIRA, A. Z. A.; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **Ciênc. Cultura (São Paulo)**, São Paulo, v. 45, n.1, p.27-36, 1993.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 128, n.1, p. 119-132, 1984.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan componentes isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 142, n.2, p.253-267, 1985.

GORIN, P. A. S.; BARON, M.; IACOMINI, M. Storage products of lichens. In: GALUN, M. **CRC Handbook of lichenology**. Florida: CRC Press, 1988. V. 3, p. 9-23.

GRAUFFEL, V.; KLOAREG, B.; MABEAU, S.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. New natural polysaccharides with potent antithrombotic activity fucans from brown algal. **Biomaterial**, Oxford, V. 10, p. 363-368, 1989.

GRAVLEE, G. P.; RUGENT, K. C; TUCKER, W. Y.;CASE, L. D.; WALLEUNHAUPT, S. L.; CORDELL, A. R. Early anticoagulation peak and rapid distribution after intravenous heparin. **Anesthesiology (Hargerst)**., Hargestown, v. 68, p. 126-129, 1988.

GREINACHER, A.; EICHLER, P.; LUBENOW, N. et al. Drug induced and drug-dependent immune thrombocytopenias. **Rev. Clin. Exp. Hematol.**, v. 5, p. 166-200, 2001.

GUGLIELMONE, H. A.; AGNESE, A. M.; MONTOYA, S. C. N.; CABRERA, J. L.

Anticoagulant effect and action mechanism of sulphated flavonoids from *Flaverina bidentis*. **Thromb. Res.**, v, 105, p. 183-188, 2002.

GUNAY, N. S.; LINHARDT, R. J. Heparinoids: Structure, biological activities and therapeutic applications. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 65, n. 4, p. 301-306, 1999.

HAINES, A. W. Relative reactivities of hydroxyl groups in carbohydrates. **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York, v. 33, p. 11-110, 1976.

HALE, M. E. **How to know the lichen**. 2.ed. Iowa: Brown Company Publishers, 1979.

HALE, M. E. **The biology of lichens**. Baltimore: Edwards Arnold, 1983.

HAMER, R. J.; KOEDAM, J. A.; BEESER-VISSER, N. H. The effect of thrombin on the complex between factor VIII and von Willebrand factor. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 167, p. 253-259, 1987.

HANSEN, J. B.; HUSEBY, N. E.; SANDSET, P. M.; SVENSSON, B.; LINGMO, V.; NORDOY, A. Tissue factor pathway inhibitor and lipoproteins. Evidence for association with and regulation by LDL in human plasma. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v.14, n. 2, p. 223-229, 1994.

HARA, T.; YOKOYAMA, A.; MORISHIMA, Y.; KUNITADA, S. Species differences in anticoagulant and anti-Xa activity of DX-9065a, a highly selective factor Xa inhibitor. **Thromb. Res.**, New York, v. 80, p. 99-104, 1995.

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; SAKURAGAWA, N. Selective activation of heparin cofactor II by a sulfated polysaccharide isolated from leaves of *Artemisia princeps*. **Blood Coagul. & Fibrinolysis.**, Oxford, v. 6, n. 7, p. 643-649, 1995.

HAYASHI, M.; MATSUO, A.; NAKAMOTO, H.; AISAKA, K. Antithrombotic effects of a synthetic inhibitor of activated factor X JTV-803, in animals. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 412, p. 61-66, 2001.

HELLERQVIST, C. G.; LINDBERG, G. B.; SAMUELSSON, K. Methylation analysis of pustulan. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 22, n. 8, p. 2736-2737, 1968.

HIEBERT, L. M.; WICE, S. M.; JAQUES, L. B. Antithrombotic activity of oral unfractionated heparin. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, Hagerstow, v. 28, p. 26-29, 1996.

HIEBERT, L. M.; JAQUES, L. B. The observation of heparin on endothelium after injection. **Thromb. Res.**, New York, v. 8, p. 195-204, 1976.

HIEBERT, L. M.; PING, T.; WICE, S. M. Antithrombotic activity of orally administered low molecular heparin (logiparin) in a rat model. **Haemostasis.**, Basel, v. 30, p. 196-203,

2000.

HIEBERT, L. M.; WICE, S. M.; PING, T.; HERR, D.; LAUX, V. Antithrombotic efficacy in a rat model of the low molecular weight heparin reviparin sodium, administered by the oral route. **Thromb. Haemostasis.**, New York, v. 85, p. 114-118, 2001.

HIRATA, A. ; ITOH, W.; TABATA, K.; KOJIMA, T.; ITOYAMA, S.; SUGAWARA, I. Anticoagulant activity of sulfated schizophyllan. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v. 58, n. 2, p. 406-407, 1994.

HIRSH, J. Current Anticoagulant Therapy-unmet clinical needs. **Thromb. Res.**, New York, v. 109, S1-S8, 2003.

HIRSH, J. Anticoagulant therapy. **American Hospital Supply Corporation**, p. 1-26, 1985.

HIRSH, J. WARKETIN, T. E.; RASCHKE, R. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations; monitoring efficacy and safety. **Chest**, Northbrook, v. 114, p. 4895-5105, 1998.

HIRSH, J.; WARKETIN, T. E.; RASCHKE, R./ GRANGER, L.; OLMAN, E. M.; DALEN, J. E. Heparin and low-molecular-weight heparin. Mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy and safety, **Chest**, v. 114, p. 4895-5105, 1998.

HIRSH, J.; RASCHKE, R.; WARKETING, A. E.; DALEN, J. E.; DEYLIN, D.; POLLER, L.; Heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. **Chest.**, Northbrook, v. 108 (suppl 4), S585-S755, 1995.

HOFFMAN, J.; LARM, O.; LARSSON, K. Studies on the blood-anticoagulant activity of sulphated polysaccharides with different uronic acid content. **Carbohydr. Polym.** Shannon, v. 2, n. 2, p. 115-121, 1982.

HONDA, N. L.; VILEGAS, W. **A química dos liquens**. Química Nova: São Paulo, v. 21, n. 6, p.110-125, 1998.

HUANG, R.; DU, Y.; YANG, J.; FAN, L. Influence of functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 338, p. 483-489, 2003.

HUNTINGTON, J. A.; READ, R. J.; CARREL, R. W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. **Nature (London)**, London, v. 407, p. 923-926, 2000.

IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; BARON, M.; TULLOCH, A. P.; MAZUREK, M. Novel D-

glucans obtained by dimethylsulfoxide extraction of the lichen *Letharia vulpina*, *Actinogyra muehlenbugii*, and *Usnea* sp.. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 176 (1), p.117-126, 1988.

IACOMINI, M.; SCHNEIDER, C. L.; GORIN, P. A. J. Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer moss), *Cladonia confusa*, and *Cladonia amaurocracia*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 142, n. 2, p. 237-251, 1985.

IRVING, J. A.; PIKE, R. N.; LESK, A.M.; WHISSTOCK, J. C. Phylogeny of the Serpin superfamily: Implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. **Genome Res.**, New York, v. 10, 1845-1864, 2000.

IRVING, J. A.; STEENBAKKERS, P., LESK, A. M., ap Den KAMP, H.; PIKE, R. N.; WHISSTOCK, J. C. **Mol. Biol.**, v. 19, p. 1881-1890, 2002.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydrate Chemistry**. v.5, p.36-38, 1965.

JANDIK, K. A.; GU, K.; LINHARDT, R. J. Action pattern of polysaccharide lyases on glycosaminoglycans. **Glycobiology**., Cary, v. 4, p. 289-296, 1994.

JAQUES, B. L. Heparin:An old drug with a new paradigm. **Science (Washington DC)**, Washington, v. 206, p. 528-533, 1979.

JAQUES, L. B.; HIEBERT, L. M.; WICE, S. M. Evidence from endothelium of gastric absorption of heparin and of dextran sulfates 8000. **J. Labor. Clin. Med.**, v. 117, p. 122-130, 1991.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 2. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1975. p. 100-106.

JONATHAN, R. S.; LANDIS, R. C.; TAYLOR, K. M. Heparin is much more than just an anticoagulant. **Journal of Cardiothoracic and Vascular anesthesia**., v. 18, n. 1, p. 93-100, 2004.

JORDAN, R. E.; OOSTA, G. M.; GARDNER, W. T.; ROSEMBERG, R. D. The kinetics of hemostatic enzyme antithrombin interactions in the presence of low molecular weight heparin. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 255, n. 21, p. 10081-10090, 1980.

JOUAULT, S. C.; CHEVOLOT, L.; HELLEY, D.; RATISKOL, J.; BROS, A.; SINQUIM, C.; ROGER, O.; FISCHER, A. M. Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolisaccharide produced by *Alteromonas infernus*. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1528, p. 141-151, 2001.

KAKKAR A. K. Low- and ultra-low-molecular-weight heparins. **Best Practice &**

Research Clinical Haematology. v. 17, n. 1, p. 77-87, 2004.

KAMP, P-B.; STRATHMANN, A.; RAGG, H. Heparin cofactor II, antithrombin- β and their complexes with thrombin in human tissues. **Thromb. Res.**, New York, v. 101, p. 483-491, 2001.

KATO, H. Regulation of functional of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor: basic and clinical aspects. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Hagerstown, v. 22, p. 539-548, 2002.

KELTON, J. G.; Heparin induced thrombocytopenia: an overview. **Blood**, Philadelphia, v. 16, p. 77-80, 2002.

KISIEL, W. Human plasma protein C: isolation, characterization and mechanism of activation by α -thrombin. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 64, p. 761-769, 1979.

LANE, D. A.; DENTON, J.; FLYNN, A. M.; THUMBERG, L.; LINDAHL, U. Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. **Biochem. J.**, London, v. 218, p. 725-732, 1984.

LAWRENCE, D. A.; OLSON, S. T.; MUHAMMAD, S. Partitioning of serpin-proteinase reactions between stable inhibition and substrate cleavage is regulated by the rate of serpin reactive center loop insertion into β -sheet A. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 275, p. 5839-5844, 2000.

LAWSON, J. G.; BUTENAS, S.; RIBARICK, N. MANN, K. G. Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 268, n. 2, p. 767-770, 1993.

LEADLEY Jr., R.J.; CHI, L. ; REBELLO, S. S.; GAGNON, A. Contribution of in vivo models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. **J. Pharmacol. Tox. Meth.**, v. 43, p. 101-116, 2000.

LEBLOND, L.; GROUX, B.; BOUDREAU, C.; YANG, Q.; SIDDIQUI, M. A.; WINOCOUR, P. D. *In vitro* and *in vivo* properties of bicyclic lactam inhibitors: a novel class of low molecular weight peptidomimetic thrombin inhibitors. **Thromb. Res.**, v. 100, p. 195-209, 2000.

LI, D-W.; LEE, I. S.; SIM, J-S.; TOIDA, T.; LINHARDT, R. J.; KIM, Y. S. Long duration of anticoagulant activity and protective effects of acharan sulfate in vivo. **Thromb. Res.**, New York, v. 113, p. 67-73, 2004.

LIAW, P. C. Y.; NEUENSCHWANDER, P. F.; SMIRNON, M. D.; ESMON, C. T. Mechanism by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 275, p. 5447-5452, 2000.

LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

LINDAHL, U.; AXELSSON, O. Identification of iduronic acid as the major sulfated uronic acid of heparin. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 246, p. 72-82, 1971.

LINDBERG, B.; Mc PHERSON, J. Studies on the chemistry of lichens. VI. The structure of pustulan. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 8, n. 6, p.985-988, 1954.

LINDAHL, A. K.; SANDSET, P. M.; ABILGAARD, U. The present status of tissue factor pathway inhibitor. **Blood coagul. Fibrinolysis**, Boston, v. 3, n. 4, p. 439-449, 1992.

LINDAHL, U. KJELLEN, L. Heparin or heparan sulfate. What the difference? **Thromb. Haemostasis.**, Stuttgart, v. 66, p. 44-48, 1991.

LINDAHL, U. L.; THUMBERG, G.; BACKSTROM, J.; RIESENFELD, K.; NORDLING, I.; BJORK, I. Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 259, n. 20, p. 12368-12376, 1984.

LINHARDT, R.G.; TOIDA, T. **Carbohydrates drugs - heparin oligossacarides - new analogs development and applications**. IN: WITZAK, Z. B. ; NIEFORT K.A. Marcel Dekker: New York. 1997, p. 707-774.

LIU, S. S.; MULROY, M. F. Neuraxial anesthesia and analgesia in the presence of standard heparin. **Reg. Anesth. Pain. Med.**, v. 23 (suppl 3), p. 157-163, 1998.

Mac FARLANE, R. G. na enzyme cascade in blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. **Nature (London)**, London, v. 202, n. 4931, p.498, 1964.

MAJERUS, P.M.; BROZE Jr., G. J.; MILITICH, J. P.; TOLLESFSEN, D. M. drogas anticoagulants trombolíticas e antiplaquetárias. In: GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S., TAYLOR, D. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 874-886.

MANDLE Jr., R. J.; KAPLAN, A. P. Hageman factor dependent fibrinolysis. Generation of fibrinolytic activity by the interaction of human factor XI and plasminogen. **Blood**, Philadelphia, v. 53, p. 850, 1979.

MARTINICHEN, J. C. **Ação anticoagulante de polissacarídeos modificados através de reações de sulfatação**. Curitiba. 61 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2001.

MAURAY, S.; STERNBERG, C.; THEVENIAUX, J.; MILLET, J.; SINQUIN, C.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; FISCHER, A. M. Venous antithrombotic and anticoagulant activities

of a fucoidan fraction. **Thromb. Haemostasis**, stuttgart, v. 74, p. 1280-1285, 1995.

MCGUIRE, E. A.; TOLLEFSEN, D. M. Activation of heparin cofactor II by fibroblasts and vascular smooth muscle cell. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 262, p. 169-175, 1987.

MEYER, K. H.; GÜRTLER, P. Rechercher sur l'amidon. XXXI. La constitution de la lichénine. **Helv. Chim. Acta**, Wolfsburg, v. 30, n.3, p. 751-761, 1947.

MINE, S.; YAMAZAKI, T.; MIYATA, T. HARA, S. KATO, H. Structural mechanism for heparin-binding of the third Kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor. **Biochemistry**, Washington, v. 41, p. 78-85, 2002.

MONEY S.R.; YORK, J. W. Development of oral heparin therapy for profylaxis and treatment of deep venous thrombosis. **Cardiovasc. Surg.**, v. 9, p. 211-218, 2001.

MORRISEY, J. H. Tissue factor: an enzyme cofator and a true receptor. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v. 86, p. 66-74, 2001.

MOURA, R. A.; WADA, C. S.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T. V. **Técnicas de laboratório**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p. 397-412, 1998.

MOURÃO, P. A. S.; BOISSON-VIDAL, C.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; DROUET, B.; BROS, A.; FISCHER, A-M. Inactivation of thrombin by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. **Thromb. Res.**, New York, v. 102, p. 167-176, 2001.

MOURÃO, P. A. S.; GUIMARÃES, M. A. M; MULLOY, B.; THOMAS, S.; GRAY, E. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v. 101, p. 647-652, 1998.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S. G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M.; MOWINCKEN, M-C.; ABILDGAARD, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm sulfated fucose high anticoagulant action, **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 271, p. 23973-23984, 1996.

MOURÃO, P. A. S; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S. G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M.; MOWINCKEL, M. C.; ABILDGARD, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, n. 39, p. 23973-23984, 1996.

MUELLER, R. L. First-generation agents: aspirin, heparin and coumarins. **Best Practice & Research Clinical Haematology**. v. 17, n. 1, p. 23-53, 2004.

MULLOY, B.; RIBEIRO, A. C. ALVES, A. P.; VIEIRA, R. P.; MOURÃO, P. A. S. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by

specific patterns of sulfation at the O-2 and O-4 positions. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 269, n. 35, p. 22113-22123, 1994.

MURRAY, R. K. In: MURRAY, R. K.; GRANNEL, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper Bioquímica**. ed., São Paulo: Atheneu, 1990, p. 617-628.

NADER, H. B.; PORCIONATTO, M. A.; TERSARIOL, I. L. S.; PINHAL, M. A. S.; OLIVEIRA, F. W.; MORAES, C. T.; DIETRICH, C. P. Purification and substrate specificity of heparitinase I and heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 265, p. 16807-16813, 1990.

NEISHEIM, M.; PITTMAN, D. D.; GILES, A. R. The effect of plasma von Willebrand factor on the binding of human factor VIII to thrombin activated platelets. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 266, p. 17815-17820, 1991.

NICOLAES, G. A. F.; TANSIG, G.; THOMASSEN, M. C. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor Va^{R 506Q} by activated protein C. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 270, n. 21, p. 21158-21166, 1995.

NISHIKAWA, Y.; OHKI, K.; TAKAHASHI, K.; KURANO, G.; FUKUOKA, F.; EMORI, M. Studies on the water soluble constituents of lichens.II. Antitumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea*, and *Cladonia* species. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokio, v. 22, n. 11, p. 2692-2702, 1974.

NISHINO, T.; AIZU, Y.; NAGUMO, T. the relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulphates from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v.55, p. 791-796, 1991a.

NISHINO, T.; AIZU, Y.; NAGUMO, T. The influence of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. **Thromb. Res.**, New York, v. 64, p. 723-731, 1991b.

NISHINO, T., NAGUMO, T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 229, n. 2, p. 335-362, 1992.

NISHINO, T.; TAKABE, Y.; NAGUMO, T. Isolation and partial characterization of a novel β -D-galactana sulfate from the brown seaweed *Laminarina angustata* var. *longissima*. **Carbohydr. Polym.**, Shanon, v. 23, n. 3, p. 165-173, 1994.

NORRIS, L. A.; Blood coagulation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 17, n. 3, p. 369-383, 2003.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminarin. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 33, p. 1097-1101, 1955.

OLAFSDOTTIR, E.S.; INGÓLFSTTIR, K. Polysaccharides from lichens: structural characteristics and biological activity. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 67, p. 199-208, 2001.

OLSON, S. T.; CHUANG, Y-J. Heparin Activates antithrombin anticoagulant function by generating new interaction sites (exosites) for blood clotting proteinases. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 12, p.331-338, 2002.

OSTERUD, B.; BAJAJ, M. S.; BAJAJ, S. P. Sites of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and tissue factor expression under physiologic and pathologic conditions. **Thromb. Haemostasis**, Stuttgart, v. 73, n. 5, p. 873-873, 1995.

PALM, M. MATTSSON, C. MAGNUS, S. C.; WEBER, M. Bleeding times in rats treated with heparin, heparin fragments of high and low anticoagulant activity and chemically modified heparin fragments of low anticoagulant activity. **Thromb. Haemost.**, Stuttgart, v. 64, p. 127-132, 1990.

PATANKAR, M. S.; OEHNINGER, S.; BARNETT, T.; WILLIAMS, R. L.; CLARK, G. F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 268, n. 29, p. 21770-21776, 1993.

PAVÃO, M. S. G.; AIELLO, K. R. M.; WERNWICK, C. C.; SILVA, L. C. F.; VALENTE, A-P.; MULLOY, B.; COLWELL, N. S. TOLLEFSEN, D. M. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 43, p. 27848-27857, 1998.

PEREIRA, M. S.; MULLOY, B. MOURÃO, P. A. S. structure and anticoagulant activity of sulfated fucans: Comparison between the regular repetitive and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algal. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 274, n. 12, p. 7656-7667, 1999.

PINEO, G.; HULL, R.; MARDER, V. Oral delivery of heparin: SNAC and related formulations. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 17, n. 1, p. 153-160, 2004.

PIRES, L. **Análogos funcionais da heparina**. Curitiba, 1998. 93 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PIRES, L.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M-R. Na active heparinoid obtained by sulphation of a galactoglucomanna extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 46, p. 165-169, 2001.

PIXLEY, R. A.; SCHAPIRA, M.; COLMAN, R. W. The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitor. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 260, p. 1723-1729, 1985.

PRADO-MALUCELI, S. R. **Análise estrutural de polissacarídeos do líquen *Collema***

leptosporum Malme. Curitiba, 1996. 105 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PRASA, D.; SVENDSEN, L.; STURZEBECKER, J. The ability of thrombin inhibitors to reduce the thrombin activity generated in plasma of extrinsic and intrinsic activation. **Thromb. Haemost.**, v. 77, p. 498-503, 1997.

QUINSEY, N. S.; GREEDY, A. L.; BOTTOMLEY, S. P.; WHISSTOCH, J. C.; PIKE, R. N. Antithrombotin: in control of coagulation. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Kidlington v. 36, p. 386-389, 2004.

RAGG, H.; ULSHÖFER, T.; GEREWITZ, J. On the activation of human leuserpin-2, a thrombin inhibitor by glicosaminoglycans. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 265, p. 5211-5218, 1990.

RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RAZI, N.; FEYZ, E.; BJÖRK, J.; NAGGI, A.; CASU, B.; LINDHAL, V. Structural and functional properties of heparin analogues obtained by chemical sulfation of Eschechia coli K5 capsular polysaccharides. **Biochem. J.**, London, v. 309, n. 3, p. 765-472, 1995.

REIS, R. A. **Caracterização estrutural de glucanas presentes no fungo liqüenizado *Teloschistes flavicans* Norman.** Curitiba, 2001. 75 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

REJ, R. N.; LUDWIG-BAXTER, K. G.; PERLIN, A. S. Sulphation of some chemically-modified heparins formation of a 3- sulfate analog of heparin. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 210, p. 299-310, 1991.

RODERIC, C. Lichens. In: RODERIC, C. **Symbiotic fungi.** London: John Willey& Sons, 1977. p. 226-253.

ROSENBERG, R. D. Biochemistry of heparin antithrombotin interactions, and the physiological role of this natural anticoagulant mechanism. **Am. J. Clin. Med.**, v.87 (suppl 3B), 2S-9S, 1989.

SAMANA, M. M.; BARA, L.; GOUIN-THIBAUT, I. New data on the pharmacology of heparins. **Drugs**, Auckland, v. 52 (Suppl. 7), p. 8-15, 1996.

SASSAKI, G. L.; REIS, R. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The glucan of lichenized fungi. **Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg.**, Hamburg, v. 30-32, p. 195-211, 2002.

SCULLY, M. F. KAKKAR, V. V. The antiheparin effect of a heparinoid, pentosan polysulphate. **Biochem. J.**, London, v. 218, n. 3, p. 657-665, 1984a.

SCULLY, M. F.; KAKKAR, V. V. Identification of heparin cofactor II as the principal plasma cofactor for the antithrombin activity of pentosan polysulphate (SP-54). **Thromb. Res.**, New York, v. 36, p. 187-194, 1984b

SCULLY, M. F.; ELLIS, V.; SENO, N.; KAKKAR, V. V. The anticoagulant properties of mast cell product chondroitin sulphate E. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v. 137, p. 15-22, 1986.

SHEFFIELD, W. P.; SCHUYLER, P. D.; BLAJCHMAN, M. A. Molecular cloning and expression of rabbit heparin cofactor II: a plasma thrombin inhibitor highly conserved between species. **Thromb. Haemostasis.**, Stuttgart, v. 71, p. 778-782, 1994.

SIDDHANTA, A. K. ; SHANMUGAM, M.; MODY, K. H.; GOSWAMI, A. M.; RAMAVAT, B. K. Sulphated polisaccharides of *Codium dwarkense* Boergs from the west coast of india: chemical composition and blood coagulant. **Int. J. Biol. Macromol.**, Oxford, v. 26, p. 151-154, 1999.

SIÉ, P. OFOSU, F. FERNANDEZ, F.; BUCHNAN, M. R. PETITOU, M.; BONEU, B. Respective role of antithrombin II and Heparin cofactor II in the in vitro anticoagulant effects of heparin and various sulfated polysaccharides. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v. 64, p. 707-714, 1989.

SILVA, M. E.; DIETRICH, C. p. The structure of heparin. Characterization of the products formed from heparin by the action of a heparinase and heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 250, p. 6841-6846, 1975.

SILVERMAN, G. A.; BIRD, P. I.; CARREL, R. W.; CHURCH, F. C.; COUGHLIN, P. B.; GETTINS, P. G.; IRVING, J. A.; LOMAS, D. A.; LUKE, C. J.; MOYER, R. W.; PEMBERTON, P. A.; REMOLD-O'DONNELL, L.; SALVESEN, G. S.; TRAVIS, J. WHISSLOCK, J. C. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 276, p. 33293-33296, 2001.

SOBEL, M.; ADELMAN, B. Characterization of platelet binding of heparins and other glycosaminoglycans. **Thromb. Res.**, New York, v. 50, p. 815-826, 1988.

SONE, Y.; ISODA-JOHMURA, M.; MISAKI, A. Isolation and chemical characterization of polysaccharides from *Iwatake*, *Gyrophora esculenta* Miyoshi. **Biosci. Biochem. Biochem.**, Tokyo, v. 60, n. 2, p. 213-215, 1996.

SPRINGER, G. F.; WURZEL, H. A.; Mc NEAL, G. M.; ANSELL, N. J.; DOUGHTY, M. F. Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Baltimore, v. 94, p. 404-409, 1957.

STAHL, A.; MUELLER, B. M. Binding of urokinase to its receptor promotes migration and invasion of human melanoma cells in vitro. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 54, p. 3060-3071, 1994.

STEIN, P. E.; CARREL, R. W. What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? **Nat. Struct. Biol.**, v. 2, p. 96-113, 1995.

STRATIKOS, E.; GETTINS, P. G. W. Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into β -sheet A. **Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)**, Washington, v. 96, p. 4808-4813, 1999.

STUELP, P. M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The glucans of *Ramalina celastri*: relation with chemotypes of other lichens. **Carbohydr. Poly.**, Shannon, v. 40, p.101-106, 1999.

STUELP, P.M. **Atividade de α - e β -D-glucanas extraídas do líquen *Ramalina celastri* modificadas quimicamente.** Curitiba, 1997. 114 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná.

STUELP-CAMPELO, P. M. **Efeitos Biológicos in vivo e in vitro de polissacarídeos extraído de Líquens sobre macrófagos peritoniais de camundongos.** Curitiba, 2002. 103 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

TEIXERA, A. Z. A.; IACOMINI, M. GORIN, P. A. J. An unusual glucomannan from *Tornabenia intricata*. **Phytochemistry (Oxf.)**, Oxford v. 31, n. 10, p. 3467-3470, 1992.

TEIXERA, A. Z. A.; IACOMINI, M. GORIN, P. A. J. Chemotypes of mannose-containing polysaccharides of the lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 266, n. 2, p. 309-314, 1995.

TOLLEFSEN, D. M. Insight into the mechanism of action of heparin cofactor II. **Thromb. Haemostasis.**, Stuttgart, v. 74, p. 1209-1214, 1995.

TOLLEFSEN, D. M.; BLANK, M. K. Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 68, p. 589-596, 1981.

TOLLEFSEN, D. M.; MARJEUS, D. W.; BLANK, M. K. Heparin cofactor II. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 257, p. 2162-2169, 1982.

TSUJI, R.; TATSUMI, N.; HINO, N.; NISHIOKA, T.; TAKUBO, T. Tissue factor pathway inhibitor as a universal anticoagulant for use in clinical laboratory tests. **Tohoku J. Exp. Med.**, Sendai, v. 194, p.165, 2001.

TURVEY, J. R. Sulfates of the simple sugars. **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York, v.20, p.183-218, 1965.

UCHIYAMA, H.; METORI, A.; OGAMO, A.; NAGASAWA, K. Contribution of chemical 6-O-sulfation of the aminodioxy hexose residues in whale heparin with high affinity for antithrombin II to its anticoagulant properties. **J. Biochem.**, London, v. 107, n. 3, p. 377-380, 1990.

UEHARA, T.; TAKESHITA, M.; MAEDA, M. Studies on anticoagulant-active arabian sulfate from the green alga, *Codium latum*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 224, p. 201-208, 1992.

VANDEERLIN, V. M. D.; TOLLEFSEN, D. M. The N-terminal acidic domain of heparin cofactor II mediates the inhibition of α -thrombin in the presence of glycosaminoglycans. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 266, p. 20223-20231, 1991.

VEHAR, G. A.; DAVIE, E. W. Preparation and properties of bovine factor VII. **Biochemistry**, Washigton, v. 19, p. 401-410, 1980.

WALKER, F. J. regulation of activated protein C by a new protein: a role for bovine protein C by a new protein: a role for bovine protein X. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 255, p. 5521-5524, 1980.

WALKER, F. J.; SEXTON, P. W.; ESMON, C. T. Inhibition of blood coagulation by activated protein C through selective inactivation of activated factor V. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 571, p. 333-342, 1979.

WALKER, F.J.; FAY, P. J. Regulation of activated protein C by a new protein C system. **FASEB J.**, Bethesda. v. 6, p.2561-2567, 1992.

WALL, D.; DOUGLAS, S.; FERRO, V.; COWDEN, W.; PARISH, C. Characterisation of the anticoagulant properties of a range of structurally diverse sulfated oligosaccharides. **Thromb. Res.**, New York, v. 103, p. 325-335, 2001.

WARKENTIN, T. E.; BARKIN, R. L. NEWER strategies for treatment of heparin-induced thrombocytopenia. **Pharmacotherapy**, Boston, v. 19, n. 2, p. 181-195, 1999.

WEITZ, J. I.; CROWTHER, M. Direct thrombin inhibitors. **Thromb. Res.**, New York, v. 106, v. 275-v284, 2002.

WEITZ, J. Low Molecular Weight Heparins. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 337, p. 688-698, 1997.

WHINNA, H. C.; BLINDER, M. A.; SZEWCZYK, M.; TOLLEFSEN, D. M.; CHURCH, F. C. Role of lysine 173 in heparin binding to heparin cofactor II, **J. Biol. Chem.**, Bethesda,

v. 266, p. 8129-8135, 1991.

WHISSTOCK, J. C.; SKINNER, R.; CARREL, R. W. An atlas of serpin conformations. **Trend in Biochem. Sci.**, Kidlington, v. 23, p. 63-67, 1998.

WHISTLER, R.L.; BUSHWAY, A.; SINGH, P. P.; NAKAHARA, W.; TOKUZEN, R. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 32, p. 235-275, 1976.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. **Meth. Carbohydr. Chem.**, New York, v. 4, p. 297-298, 1964.

WOLFRON, M. L.; WANG, P. Y.; HONDA, S. On the distribution of sulfate in heparin. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 11, p. 179-183, 1969.

WOLFRON, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-67, 1963a.

WOLFRON, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

WORANOVICZ, S. M.; GORIN, P. A. J.; MARCELLI, M. P.; TORRI, G.; IACOMINI, M. Structural studies on the galactomannans of the lichens of the genus *Cladonia*. **Lichenologist (Oxf.)**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 471-481, 1997.

WORANOVICZ, S. M.; PINTO, M.; GORIN, P. A. S.; IACOMINI, M. Novel structures in galactoglucomannans of the lichens *Cladonia substelata* and *Cladonia ibitipocae*: significance as chemotypes. **Phytochemistry**, v. 51, p. 395-402, 1999.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; ATHI, T.; SASSAKI, G. L.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. Chemotyping studies on the glucans of the genus *Cladonia*. **Phytochemistry (Oxf.)**, Oxford, v. 52, p.1069-1074, 1999a.

WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, P. L.; MARCELLI, M. P.; IACOMINI, M. Galactomannoglucans of lichenized fungi of *Cladonia* spp.: significance as chemotypes. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 181, p. 313-317, 1999b.

WU, C.L. Regional Anesthesia and coagulation. **J. Clin. Anesth.**, v. 13, p. 49-58, 2001.

WU, K. K.; MATIJEVIC-ALEKSIC, N. Thrombomodulin: a linker of coagulation and fibrinolysis and predictor of risk of arterial thrombosis. **Ann. Med.**, London, v. 32, n.1, p. 73-77, 2000.

WUN, T. C.; KRETZMER, K. K.; GIRARD, J. P., MILETICH, G. J.; BROZE Jr., G. J. Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated

coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 263, p. 6001-6004, 1988.

XAVIER-FILHO, L.; RIZZINI, C. T. **Manual de liquenologia brasileira**. 1. ed. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 1976.

YAMAGISHI, R.; NIWA, M.; KONDO, S.; SAKURAGAWA, N.; KOIDE, T. Purification of heparin cofactor II and antithrombin III by dextran sulfate and various glycosaminoglycans. **Thromb. Res.**, New York, v. 36, p. 633-642, 1984.

YANG, J.; DU, Y.; HUANG, R.; WAN, Y.; LI, T. Chemical modification, characterization and structure-anticoagulant activity relationships of Chinese lacquer polysaccharides. **Int. J. Biol. Macromol.**, Oxford, v. 31, p. 55-62, 2002.

YE, J.; ESMON, N. L.; ESMON, C. T.; JOHNSON, A. E. The active site of thrombin is altered upon binding to thrombomodulin: two distinct structural changes are detected by fluorescence but only one correlates with protein C activation. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 266, p. 23019-23021, 1991.

YOON, S-J.; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S. G.; HWANG, J-K.; PYUN, Y_R.; MOURÃO, P. A. S. The medicinal plant *Porona volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. **Thromb. Res.**, New York, v. 106, p. 51-58, 2002.

APÊNDICE 1: Artigo aceito à publicação

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **International Journal of Biological Macromolecules**.

Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*

J. C. Martinichen-Herrero^{a,b}, E. R. Carbonero^a, G. L. Sasaki^a,
P. A. J. Gorin^a, M. Iacomini^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, C.P. 19046, 81531-990, Curitiba-PR, Brasil.

^bUniversidade Estadual do Oeste do Paraná, C.P. 711, 85814-110, Cascavel-PR, Brasil.

* Corresponding author: Tel.: +55 (41) 361 1655; Fax: +55 (41) 266 2042; E-mail adress: iacomini@bio.ufpr.br

Abstract

A galactoglucomannan (GGM), isolated from the lichen *Cladonia ibitipocae*, consisted of a (1→6)-linked main chain of α -mannopyranose units, substituted by α - and β -D-galacto-, β -D-gluco- and α -D-mannopyranosyl groups was sulfated, giving a sulfated polysaccharide (GGM-SO₄) with 42.2% sulfate, corresponding to a degree of substitution of 1.29. NMR studies indicated that after sulfation, the OH-6 groups of galactopyranosyl and mannopyranosyl units were preferentially substituted. GGM-SO₄ was investigated in terms of its *in vitro* anticoagulant and *in vivo* antithrombotic properties. Those of the former were evaluated by its activated partial thromboplastin (APTT) and thrombin time (TT), using pooled normal human plasma, and compared with that of 140 USP units/mg for a porcine intestinal mucosa heparin. Anticoagulant activity was detected in GGM-SO₄, but not in GGM. The *in vivo* antithrombotic properties of GGM-SO₄ were evaluated using a stasis thrombosis model in Wistar rats, intravenous administration of 2 mg/kg body weight totally inhibiting thrombus formation. It caused dose-

dependent increases in tail transection bleeding time. The results obtained showed that this sulfated polysaccharides is a promising anticoagulant and antithrombotic agent.

Keywords: Anticoagulant activity; Sulfated polysaccharide; Galactoglucomannan.

1. Introduction

Polysaccharides are increasingly used for medical applications, taking advantage of some intrinsic functional properties elicited by biological interactions. Biological and pharmacological properties can be induced or modified in such a polymer by chemical derivatization [1].

Chemical derivatization of polysaccharides, such as sulfation is important, because the presence of this group is related to anticoagulant and antithrombotic effects [2,3] and other biological activities, such as inhibition of HIV-1 infectivity [4-7], and the development of Kaposi's Sarcoma related lesions [8-9].

Anticoagulant and antithrombotic activities are among the most widely studied properties of sulfated polysaccharides [10]. The anticoagulant heparin is an important therapeutic agent for prophylaxis and treatment of thrombosis. This anionic polymer acts by accelerating the inhibitory effects of antithrombin and heparin co-factor II on activated clotting factors [11].

Commercial processing of heparin results in a mixture of glycosaminoglycan chains with diverse structure and varying lengths with an average M_r of 9000 – 15000 Da, making it polydisperse and heterogeneous [12].

The anticoagulant activity of heparin is due to the presence of a specific pentasaccharide sequence that mediates interaction with antithrombin [13]. The distinguishing structural feature

of the antithrombin-binding region is the 3-*O*-sulfated glucosamine residue, which is present in commercial heparin in about one-third of the heparin chains [14].

In an attempt to overcome some of the problems associated with heparin, such as bleeding, thrombocytopenia, problems with animal pathogen contamination due to its animal origin, and poor bioavailability [15-18], a number of alternative anticoagulants have been developed. Studies on a number of other sulfated polysaccharides, obtained by sulfation of natural polysaccharide and those occurring naturally, have been carried out, related to *in vivo* and *in vitro* anticoagulant and antithrombotic properties, with the aim of finding substitutes for heparin [3, 19-30].

We have now prepared a sulfated galactoglucomannan (GGM-SO₄) by chemical modification from the native polysaccharide (GGM), extracted from the lichenized fungus *Cladonia ibitipocae*. GGM-SO₄ was then examined for its anticoagulant and antithrombotic properties.

2. Experimental

2.1. Materials

Heparin from porcine intestinal mucosa (140 USP units/mg) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and rabbit brain thromboplastin from Instrumentation Laboratory (Lexington, MA, USA). Normal human plasma was obtained by centrifugation (2000 x g for 15 min at 22 °C) of citrated normal human plasma (1/10 vol. of 3.8% trisodium citrate) from a pool of healthy volunteer donors, and frozen at – 70 °C in aliquots of 0.5 ml until further use. APTT was determined with reagents from Instrumentation Laboratory (Lexington, MA, USA) and TT with reagents from Behring (Marburg, Germany). Pyridine, formamide, chlorosulfonic acid, methanol,

ethanol, potassium hydroxide, trifluoroacetic acid and phenol red were from Merck (Darmstadt, Germany). Dowex 50 x 8 (H⁺ form) resin was from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

2.2. Isolation of galactoglucomannan and its sulfation

The galactoglucomannan (GGM) from the lichen *C. ibitipocae* was extracted, purified and characterized as previous described by WORANOVICZ *et al.* [31]. It was sulfated according to the method described by O'NEILL [32] as follows. The native polysaccharide (1.0 g) was solubilized in formamide (15 ml) and pyridine (10 ml) by vigorous stirring for 24 h, followed by dropwise addition of chlorosulfonic acid (1.6 ml) over 1 h at 0 °C, the mixture being maintained at 4 °C for 12 h. Ice-water was added, followed by 10% (w/v) aqueous NaHCO₃ until effervescence ceased. The solution was then dialyzed against water to remove pyridine, salts, and potential degradation products and then freeze dried, providing the sodium salt of the sulfated galactoglucomannan. This process was repeated five times, resulting in the sulfated derivative (GGM-SO₄).

The degree of substitution (DS) of sulfated derivatives was determined by hydrolysis with 1 M HCl for 5 h at 100 °C, the resulting BaSO₄ being measured turbidimetrically [33].

2.3. NMR spectroscopy

¹³C NMR spectra were obtained using a 400 MHz Bruker model DRX Avance spectrometer with a 5 mm inverse probe. The ¹³C NMR (100.6 MHz) analyses were performed at

50 °C, with samples dissolved in D₂O. Chemical shifts of these are expressed in ppm (δ) relative to acetone at δ 30.20 for ¹³C signals.

2.4 Methylation analysis

GGM-SO₄ was per-*O*-methylated according to the method of Ciucanu and Kerek, using powdered NaOH in Me₂SO-MeI [34]. The per-*O*-methylated derivatives were treated with refluxing 3% HCl-MeOH for 2 h at 80 °C, then 0.5 M H₂SO₄ at 100 °C for 14 h. The resulting mixture of *O*-methylaldoses were reduced with NaBH₄ and acetylated with Ac₂O-pyridine (1:1, v/v; 2ml) at room temperature for 12 h. The resulting partially *O*-methylated alditol acetates obtained were analyzed by GC-MS using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 R-12 mass spectrometer, using a DB-225 capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.), with He as carrier gas. The analysis was carried out from 50-215 °C at 40 °C/min, the final temperature being maintained constant until the end of its analysis (31 min).

2.5 Clotting assay

The assay was carried out using heparin, GGM and GGM-SO₄, dissolved in saline at various concentrations. Normal human plasma (90 μ l) was mixed with 10 μ l of a solution of GGM-SO₄ (0-2 mg), GGM (0-2 mg) or heparin (0-100 μ g). For controls, saline was added to plasma in a ratio of 1:10. APTT measurements were performed using a kit obtained from Instrumentation Laboratory (IL testTM, Lexington, MA, USA). Plasma (100 μ l), containing

various concentrations of GGM-SO₄, GGM or heparin, was incubated at 37 °C for 1 min. 100 µl of bovine cephalin was then added and incubated at 37 °C. After 3 minutes of incubation, 100 µl of prewarmed 0.25 M CaCl₂ solution were added to the mixtures and the clotting time was measured in quadruplicate using a COAG-A-MATE[®] XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durham, NC, USA) up to 120 seconds. For determination of TT, normal human plasma (100 µl) containing various concentrations of heparin, GGM and GGM-SO₄, was incubated at 37 °C for 2 minutes, at which the thrombin time reagent, 200 µl, (Behring, Marburg, Germany) was added. The time for the appearance of a fibrin clot (seconds) was measured up to 100 seconds using a COAG-A-MATE[®] XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durham, NC, USA). All assays were performed in duplicate and repeated at least three times on different days (n = 6).

2.6. *Animals*

Experiments were conducted on male Wistar rats (250-300g), which were anesthetized with a mixture of Ketamine (110 mg . kg⁻¹ i.m.) and Xylazine (10 mg . kg⁻¹ i.m.).

All recommendations of the Brazilian National Law (no. 6.638, 05 Nov. 1979) for scientific management of animals were respected.

2.7. *Stasis-induced venous thrombosis model*

Thrombus formation was induced by promoting a combination of stasis and hypercoagulability, as described by BERRY et al. [35]. Rats were anesthetized and their left jugular veins were cannulated for intravenous injection of GGM-SO₄, vehicle (PBS), heparin, and

thromboplastin. The abdomen of each animal was opened surgically and, after careful dissection, the abdominal vena cava was exposed and dissected free from the surrounding tissue, all its side-branches being ligated between the left renal and femoral veins. GGM-SO₄ (0.25–2 mg · kg⁻¹), heparin (25–100 µg · kg⁻¹), or vehicle were administered as a single bolus injection. After 5 min, thrombus formation was induced by the injection by thromboplastin (10 mg · kg⁻¹) followed 10 sec later by stasis of a 1 cm segment of the abdominal vein cava, which was maintained for 20 min. The formed thrombus was removed, immediately blotted twice on paper and weighed. For each treatment group (n = 6) the mean thrombus weight ± SD was determined.

2.8. Tail transection bleeding time

The left jugular vein of animals was cannulated for intravenous injection of GGM-SO₄ (0.5-2 mg kg⁻¹), vehicle (PBS), or heparin (25-100 µg kg⁻¹). Bleeding was induced by section of the tail extremity 3 mm from the tip. The tails were blotted with tissue paper every 30 sec and the time to cessation of bleeding was noted. The compounds were administered 5 min before tail transection. For each treatment group (n = 6) the mean bleeding time ± SD was determined.

2.9. Statistics

All results are expressed as the mean ± standard deviation (SD). Statistical evaluations were performed by the Tukey test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Sulfation of the galactoglucomannan

The galactoglucomannan (GGM) from the lichen *C. ibitipocae* has been characterized by WORANOVICZ *et al.* [33]. It consisted of galactose, glucose and mannose in a 35:2:60 molar ratio, and had a M_r 2.0×10^6 Da. Its ^{13}C NMR spectrum (Fig. 1A) showed C-1 signals at δ 98.7, 101.6, 102.9 and 107.9, that indicated a branched structure with nonreducing end groups of β -D-Galp (δ 102.9) linked (1 \rightarrow 4) and those of α -D-Manp (δ 101.6) linked (1 \rightarrow 2) to α -D-Manp units, along with unsubstituted units of the (1 \rightarrow 6)- linked α -Manp main chain (δ 98.7). A lower intensity, signal at δ 107.9 was attributed to β -D-Galf units. The intensities of the C-1 signals are in agreement with methylation data (Table 1). Signals at δ 60.6 and 62.6 were attributed to C-6 non-substituted of Galp and Manp units, respectively.

GGM was chemically sulfated to give a product (GGM-SO₄) with 42.2% sulfate, corresponding to a DS 1.29. Sulfation introduced large downfield shift in its ^{13}C NMR spectrum of CH₂OH-6 signal (C-6). The ^{13}C NMR spectrum of GGM-SO₄, contained decreased intensities of signals (δ 62.6 and δ 60.7) of region of the non substituted CH₂ groups (Fig. 1B), this suggest that the primary hydroxyl groups (C-6) were substituted. According to ALBAN *et al.* [36], the CH₂OH-6 group is preferentially sulfated, following by those of OH-2 and OH-4.

3.2. Methylation analysis of GGM-SO₄

Comparison of the GC-MS methylation analyses on partially *O*-methylated alditol acetates of GGM and GGM-SO₄ demonstrated that sulfate groups were inserted principally in CH₂OH-6

groups of non-reducing ends (Table 1). 2,3,4,6-Me₄-Galp (19%) and 2,3,4,6-Me₄-Manp (25%) were formed from GGM and only 8% from nonreducing-end groups from GGM-SO₄. On the other hand, there were increases in the alditol acetates of 2,3,4-Me₃-Galp (18%) and 2,3,4-Me₃-Manp (32%) from the latter. A minor percentage of the sulfate was found at C-2 of Manp (3,4-Me₂-Manp, 16%) unit in the sulfated polymer and small percentage of the fully substituted units, were confirmed by presence of the Manp (3%) and Galp (2%) by the GC-MS analysis.

3.3. Anticoagulant activity of GGM-SO₄

The anticoagulant activity of GGM-SO₄ was investigated by the classical coagulation assays APTT and TT, using heparin as a reference. APTT is related to the intrinsic coagulation phase in plasma and TT with the third coagulation phase in plasma. GGM-SO₄ was able to prolong APTT and TT in a concentration-dependent manner (Table 2). At 10, 20 and 25 μg · ml⁻¹ of plasma, the anticoagulant activity was about 2.4 (82.5 sec), 3.0 (107.1 sec) and > 3.5 (>120 sec) times greater than that of the control (34.8 sec), in respect to APTT. The anticoagulant effect of the GGM-SO₄ was also evaluated by the TT test, the anticoagulant activity being about 2.5 (46.4 sec), 5.1 (96.7 sec) and > 5.3 (>100 sec) times greater than that of the control (18.7 sec), at the same concentrations. The APTT and TT values were compared with those of heparin (140 USP units/mg). A concentration 4 times greater of GGM-SO₄ was necessary to obtain the same effect to heparin in the APTT assay and 6 times greater in the TT assay. GGM did not inhibit the APTT and TT assays.

3.4. Stasis-induced venous thrombosis model

The antithrombotic efficacy of GGM-SO₄ was evaluated in rats by the stasis-induced venous thrombosis model, which can be observed on thrombus formation (Fig. 2). In vehicle-

treated rats, the average thrombus weight was 23.4 ± 1.7 mg. The inhibition of thrombus formation increased in a dose-dependent manner, The percentage of thrombosis inhibition was 16.2%, 42.3% and 74.8% at 0.5 mg kg^{-1} , 1.0 mg kg^{-1} and $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight, respectively. Complete inhibition of thrombus formation was achieved at a dose of $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Unfractionated heparin was more effective than GGM-SO₄ and completely prevented thrombosis in the same experimental model, at a dose of $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight.

3.5. Tail transection bleeding time

The tail rat transection bleeding time was measured to determine the antihemostatic effects of GGM-SO₄. Results showed that both heparin and GGM-SO₄ caused dose-dependent increases in the tail transection bleeding time (Fig. 3). In the vehicle-treated control group, the bleeding time averaged at 990 ± 50.2 sec ($n = 6$). GGM-SO₄ caused an increase in bleeding times of 120, 218 and 319% at 1, 1.5 and $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight, respectively.

4. Discussion

It is well known that some natural polysaccharides and the derivatives of others possess certain biological activities, such as anticoagulation, fibrinolysis, antiviral and antitumoral effects. In an attempt to improve the biological activity a galactoglucomannan obtained from the lichen *C. ibitipocae*, it was subjected to sulfation and the resulting derivative examined for its

anticoagulant and antithrombotic activities. The anticoagulant activity of GGM and GGM-SO₄ was tested *in vitro* by APTT and TT assays and the values compared with those of standard heparin. APTT is related to the intrinsic coagulation phase in plasma and TT with the third coagulation phase in plasma. GGM had no effect on the APTT and TT assays, this being expected because sulfate esters are necessary to provide anticoagulant effects, and anticoagulant activities of polysaccharides: these are not only dependent on the sulfate content, but also on the positions of the sulfate groups [3]. Under our experimental conditions, GGM-SO₄ showed an important *in vitro* anticoagulation action, evidenced by the increased dose-dependence of APTT and TT (Table 2 and 3). This action could be because of a high degree of sulfation of the molecule (DS 1.29). The anticoagulant activity increased with the sulfate ester content, indicating the sulfate esters played a major role in its biological activity. A concentration 4 times greater of GGM-SO₄ was necessary to obtain the same degree of effect as heparin in the APTT assay and 6 times greater in the assay TT. In this respect, polysaccharides with a lower anticoagulant activity than heparin could exhibit a potent antithrombotic effect with less hemorrhagic risk [37].

We evaluated the antithrombotic properties of GGM-SO₄ using a venous stasis model in rats. This polysaccharide was an effective antithrombotic agent, and prevented thrombosis in a dose-dependent manner and a dose of 2 mg/kg body weight completely prevented thrombosis after 20 min stasis. The lack of antithrombotic activity of the native galactoglucomannan, demonstrated the importance of the sulfate groups for antithrombotic activity, as was observed for the anticoagulant action. The antithrombotic effect of GGM-SO₄ was less, in terms of weight than heparin, which completely prevent thrombosis at a dose of 0.1 mg kg⁻¹ body weight. When other sulfated polysaccharides were compared with GGM-SO₄, we observed that a chemically sulfated (1→3)-linked β-glucan completely inhibited thrombus formation, but only at a concentration 20

times greater than that of unfractionated heparin [21], and a fucosylated chondroitin sulfate completely inhibited thrombus formation at a dose of 1.5 mg kg^{-1} body weight, 25 times greater than unfractionated heparin used.

5. Conclusion

Our study shows that GGM-SO₄ is effective *in vitro* and *in vivo* as an anticoagulant and antithrombotic agent for thrombosis in rats. These results suggest that GGM-SO₄ may be a potent antithrombotic agent for the treatment of various thrombotic diseases.

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Dr. Mauro Pavão and MSc. Patrícia Zancan (Depto. de Bioquímica, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, RJ, Brazil) for technical support in the *in vivo* experiments, Profa. Dra. Sandra M. Woranovicz-Barreira (Depto. de Farmácia, UFPR, PR, Brazil) who furnished the native galactoglucomannan, Dra. Lismara Kafka do Bonfim (Hospital de Clínicas, Curitiba, PR, Brasil) for collecting human plasma, Dr. Giangiacomo Torri (Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche “G. Ronzoni”, Italy) for NMR analyses, and the Brazilian agencies, CNPq, CAPES, PRONEX-CARBOIDRATOS and Fundação Araucária for financial assistance. The authors are grateful to Welligton L. Braguini for the statistical analyses.

References

- [1] Bode V, Franz G. Arch Pharm 1991; 324:363-365.
- [2] Nishino T, Aizu Y, Nagumo T. Thromb Res 1991;62:765-773.
- [3] Nishino T, Nagumo T. Carbohydr Res 1992;229(2):335-362.
- [4] Mitsuya H, Loney DJ, Kuno S, Ueno R, Wong-Staal F, Broder S. Science 1988;240(4852):646-649.
- [5] Kaneko Y, Yohida O, Nakawaga R, Yoshida T, Date M, Ogihara S, Matsuzawa Y, Nagashima N, Irie Y, Mimura T, Shinkai H, Yasuda M, Matsuazak K, Uryu T, Yamoto N. Biochem Pharmacol 1990;39:793-797.
- [6] Nishimura SI, Kai H, Shinada K, Yoshida T, Tokura S, Kurita K, Nakashima H, Yamoto N, Uryu T. Carbohydr Res 1998;306(3):427-433.
- [7] Watson K, Gooderham NJ, Davies DS, Edwards RJ. Biochem Pharmacol 1999, 57:775-783.
- [8] Wellstein A, Zugmaier G, Califano JA, Kern F, Paik S, Lippman ME. J Natl Cancer Inst 1991;83:716-720.
- [9] Nakamura S, Sakurada S, Salahuddin SZ, Asada Y, Tanaka NG, Sakamoto N, Sekichi M, Gallo RC. Science 1992;255(5050):1437-1440.
- [10] Farias WRL, Valente AP, Pereira MS, Mourão PAS. J Biol Chem 2000;275(38):29299-29307.
- [11] Beguin S, Lindhout T, Hemker HC. Thromb Haemost 1988;60(3): 457-462.
- [12] Edens RE, Fromm, JR, Fromm, SJ, Linhardt RJ, Weiler JM. Biochemistry 1995;34(8):2400-2407.

- [13] Lindahl U, Thumberg L, Backström G, Riesenfeld J, Nordling K, Bjork I. *J Biol Chem* 1984;259(20):12368-12376.
- [14] Casu B. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1985;43:51-134.
- [15] Doctor UM, Lewis D, Coleman M, Kemp MT, Marbley E, Sauls V. *Thromb Res* 1991;64:413-425.
- [16] Hirsh J, Fuster V. *Circulation* 1994;89(3):1449-1468.
- [17] Beijering RJR, ten Cate H, ten Cate JW. *Ann Hematol.* 1996;72:177-183.
- [18] Wall D, Douglas S, Ferro V, Cowden W, Parish C. *Thromb Res* 2001, 103:325-335.
- [19] Klauser RJ, Raake W, Meinetsberger E, Zeiller P. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;259(1):8-14.
- [20] Siddhanta AK, Shanmugam M, Mody KH, Goswami AM, Ramavat BK. *Int J Biol Macromol* 1999;26:151-154.
- [21] Alban S, Jeske W, Welzel D, Franz G, Farred, J. *Thromb Res* 1995;78(3):201-210.
- [22] Marrayama T, Toida T, Imanari T, Yu G, Linhardt RJ. *Carbohydr Res* 1998;306:35-43.
- [23] Trento F, Cattaneo F, Pescador R, Porta R, Ferro L. *Thromb Res* 2001;102:457-465.
- [24] Mourão PAS, Pereira MS, Pavão MSG, Mulloy B, Tollefsen DM, Mowinckel MC, Abildgard U. *J Biol Chem* 1996;271(39):23973-23984.
- [25] Pereira MS, Mulloy B, Mourão PAS. *J Biol Chem* 1999;274(12):7656-7667.
- [26] Mourão PAS, Guimarães MAM, Mulloy B, Thomas S, Gray E. *Br J Haematol* 1998;101:647-652.
- [27] Gunay NS, Linhardt RJ. *Planta Med* 1999;65(4):301-306.

- [28] Hirata A, Itol W, Tabata K, Kojima T, Itoyama S, Sugawara I. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994;58(2):406-407.
- [29] Dietrich CP, Paiva JF, Castro RAB, Chavante SF, Jeske W, Fareed J, Gorin PAJ, Mendes A, Nader HB. *Biochim Biophys Acta* 1999;1428(2):273-283.
- [30] Alban S, Schauerte A, Franz G. *Carbohydr Polym* 2002;47:267-276.
- [31] Woranovicz SM, Pinto BM, Gorin PAJ, Iacomini M. *Phytochemistry* 1999;51:395-402.
- [32] O'Neill AN. *Can J Chem* 1955;33:1097-1101.
- [33] Dodgson KS, Price RG. *Biochem. J* 1962;84(1):106-110.
- [34] Ciucanu I, Kerek F. *Carbohydr Res* 1984;131:209-217.
- [35] Berry CN, Girard D, Lochot S, Lecoffre C. *Br J Pharmacol* 1994;113:1209-1214.
- [36] Alban S, Kraus J, Franz G. *Drug Res.* 1992;42:1005-1008.
- [37] Jouault SA, Chevolut L, Helley D, Rastiskol J, Bros A, Siquin C, Roger O, Fisher AM. *Biochim Biophys Acta* 2001;1528:141-151.

Table 1
Analysis of *O*-Methylated alditol acetates obtained from methylated polysaccharides

<i>O</i> -Methyl alditol acetate ^a	GGM ^{b,c}	GGM-SO ₄ ^b
2,3,4,6-Me ₄ -Man	25	6
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	2	
2,3,5,6-Me ₄ -Gal	5	-
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	19	2
2,4,6-Me ₃ - Glc	-	2
2,3,6-Me ₃ - Gal	-	2
2,3,4-Me ₃ - Man	7	32
2,3,4-Me ₃ - Gal	7	18
2,3-Me ₂ - Man	5	-
3,4-Me ₂ - Man	7	16
3-Me- Man	23	17
Man	-	3
Gal	-	2

^a The polysaccharides (GGM and GGM-SO₄) were methylated as described by Ciucanu & Kerek [36] and *O*-methyl alditol acetates were obtained after hydrolysis followed by reduction and acetylation, and analysed by GC-MS (DB-225 column).

^b Percentage of peak area relative to total peak area.

^c Methylation data obtained from Woranovicz-Barreira *et al.* [31].

Table 2

Anticoagulant activity measured by activated partial thromboplastin time (APTT) and thrombin time (TT) assays

Derivative	APTT		TT	
	$\mu\text{g ml}^{-1}$ plasma	Time (sec)	$\mu\text{g ml}^{-1}$ plasma	Time (sec)
Native galactoglucomannan (GGM)	0	34.8 ^(a)	0	18.7 ^(a)
	10	34.8 ^(a)	10	18.7 ^(a)
	20	34.8 ^(a)	20	18.7 ^(a)
	25	34.8 ^(a)	25	18.7 ^(a)
Sulfated galactoglucomannan (GGM-SO ₄)	0	34.8 ^(a)	0	18.7 ^(a)
	10	82.5	10	46.4
	20	107.1	20	96.7
	25	> 120	25	> 100
Heparin ^(b)	0	34.8 ^(a)	0	18.7 ^(a)
	2	81.2	1	59.6
	4	110.8	2	80.3
	6	>120	4	>100

Results are expressed as means (n = 6).

^(a) Coagulation time similar to pooled human plasma. Standard values (26–37 and 14–21 sec for APTT and TT, respectively).

^(b) Heparin from porcine intestinal mucosa in the concentration of 140 USP units/mg.

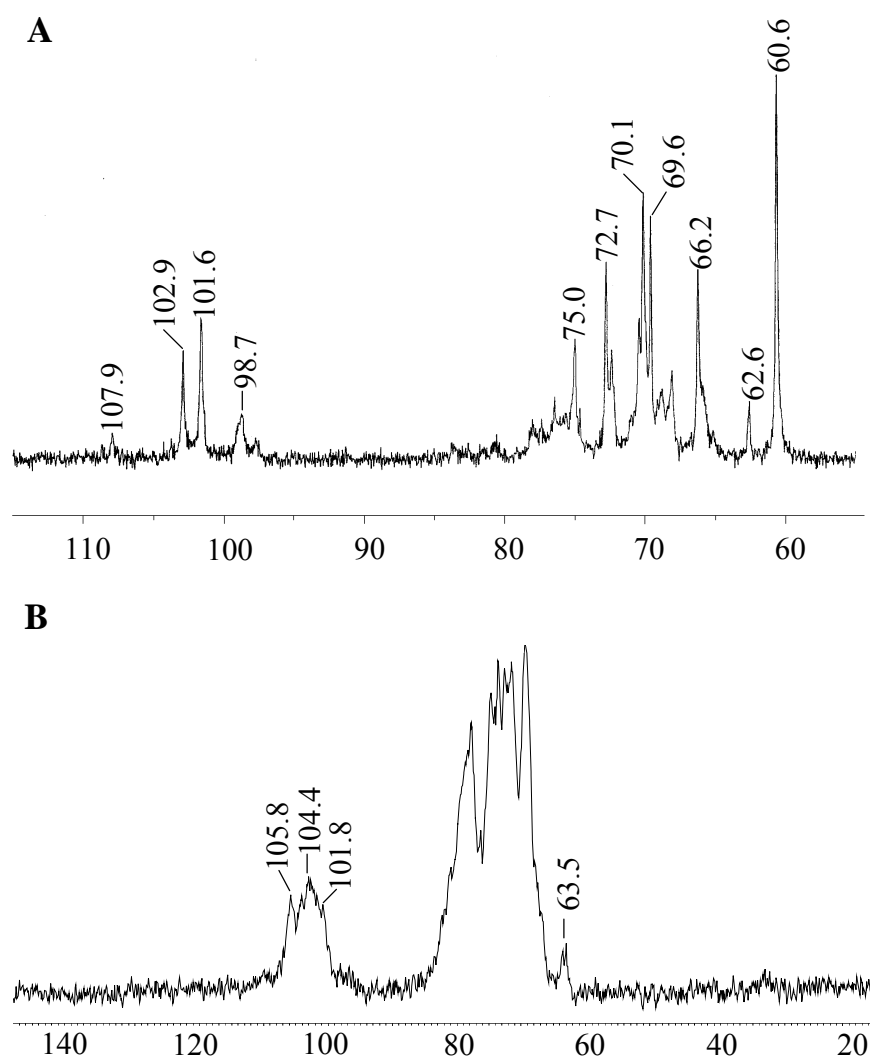


Fig. 1. ^{13}C NMR spectra of GGM (A) and GGM-SO₄ (B) (D₂O at 50°C, chemical shifts are expressed in ppm).

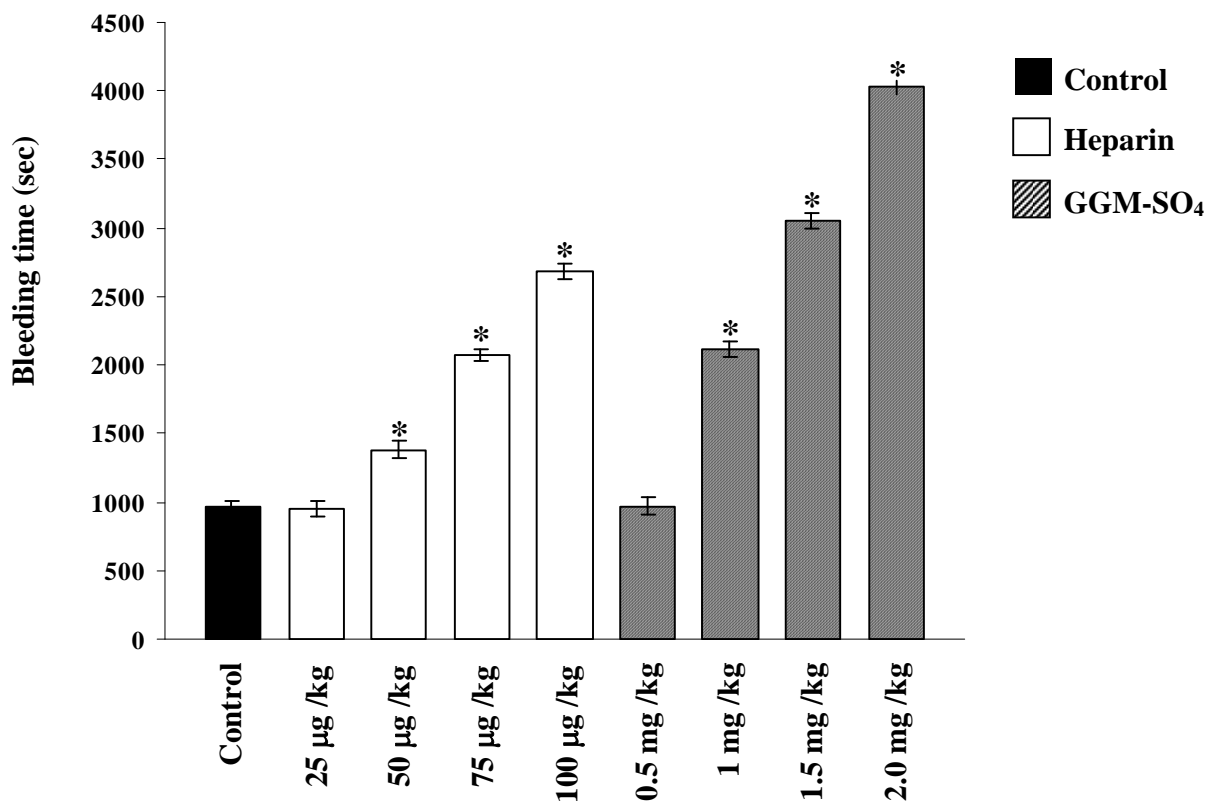


Fig. 2. Effect of GGM-SO₄ on the tail transection bleeding time in rat. The left jugular vein of animals was cannulated for intravenous injection of GGM-SO₄ (0.5-2 mg · kg⁻¹) (hatched columns), vehicle (PBS) (filled columns) or heparin (25-100 µg · kg⁻¹) (open columns). After 5 min, bleeding was induced by section of the extremity of the tail 3 mm from the tip. The tails were blotted with tissue paper every 30 sec the time to cessation of bleeding was noted. For each treatment group the mean bleeding time ± SD was determined for n = 6/group. Statistical significance compared to control values is denoted by asterisks where * *p* < 0.05 versus controls, Tukey's tests.

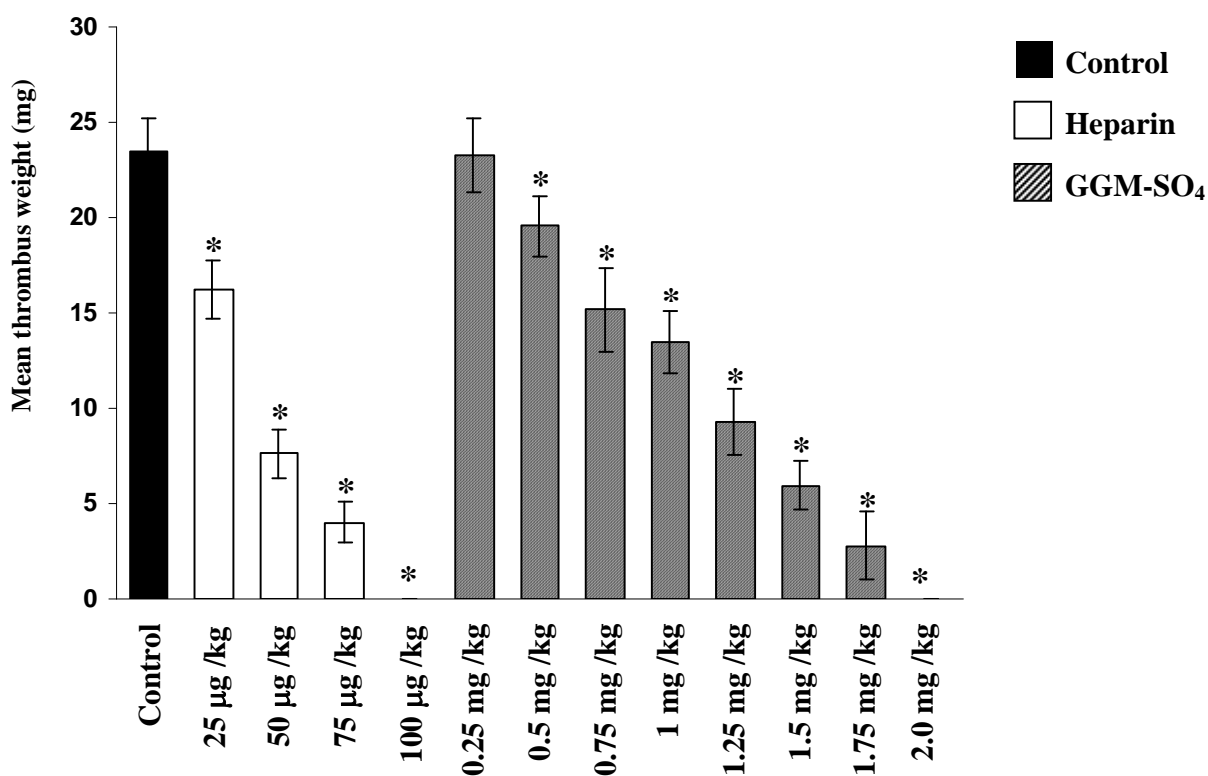


Fig. 3. Effects of GGM-SO₄ on the stasis-induced venous thrombosis model. After cannulated, the abdomen of each animal was opened surgically and, the abdominal vena cava was exposed, all its side-branches were ligated between the left renal and femoral veins. The GGM-SO₄ (0.25–2 mg · kg⁻¹) (hatched columns), heparin (25–100 µg · kg⁻¹) (open columns) or vehicle (PBS) (filled columns) was administered. After 5 min, thrombus formation was induced by the injection by thromboplastin (10 mg · kg⁻¹) followed 10 sec later by stasis of a 1 cm segment of the abdominal vein cava, which was maintained for 20 min. The formed thrombus was removed, immediately blotted twice on paper and weighed. For each treatment group (n = 6) the mean thrombus weight ± SD was determined. Statistical significance compared to control values is denoted by asterisks where * *p* < 0.05 versus controls, Tukey`s tests.

APÊNDICE 2: Artigo aceito à publicação

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale. **Carbohydrate polymers**.

Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale

Juliana Curi Martinichen-Herrero ^{a,b}, Elaine Rosechrer Carbonero ^a,
Philip Albert James Gorin ^a, Marcello Iacomini ^{a,*}

^a *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, C.P. 19046, 81531-990, Curitiba-PR, Brasil.*

^b *Universidade Estadual do Oeste do Paraná, C.P. 711, 85814-110, Cascavel-PR, Brasil.*

* Corresponding author: Tel.: +55 (41) 361 1655; Fax: +55 (41) 266 2042; *E-mail adress:*

iacomini@ufpr.br

Abstract

A β -glucan (β -G) was isolated from the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale and was sulfated, to give a product (β -G-SO₄) with 76.8% sulfate, corresponding to a degree of substitution of 1.95. β -G-SO₄ was investigated for its *in vitro* anticoagulant and *in vivo* antithrombotic properties. Those of the former were evaluated by its activated partial thromboplastin (APTT) and thrombin time (TT), using pooled normal human plasma, and compared with that having 140 USP units/mg (porcine intestinal mucosa heparin). Anticoagulant activity was detected for β -G-SO₄, but not β -G. The *in vivo* antithrombotic properties of β -G-SO₄ were determined using a stasis thrombosis model in Wistar rats, with an intravenous administration of 0.5 mg/kg body weight totally inhibiting thrombus formation. It caused dose-

dependent increases in tail transection bleeding time. The results obtained show that this sulfated polysaccharide is a promising anticoagulant and antithrombotic agent.

Keywords: Anticoagulant activity; Sulfated polysaccharide; Antithrombotic.

1. Introduction

Anticoagulants have been used widely for blood treatment during dialysis and surgery, as medication of disseminated intravascular coagulation and thrombosis in various diseases, and for blood testing *in vitro* (Tamada, 2004). Heparin, a heterogeneous sulfated polysaccharide from the growing family of known glycosaminoglycans, is widely used as a therapeutic anticoagulant and antithrombotic (Jouault et al., 2001). Heparin is a linear polysaccharide with a disaccharide repeated unit containing preponderantly of α -D-glucosamine alternating with α -L-iduronic acid. The structure of heparin is however made more complex by variation in its pattern of substitution with N- and O-sulfate, and N-acetyl groups (Mourão & Pereira, 1999).

The anticoagulant effect of heparin is expressed through binding of the polysaccharide to antithrombin (AT), which leads to acceleration of the rate at which this proteinase inhibitor complexes with and thereby inactivates the enzymes involved in blood coagulation (Razi, Feyzi, Björk, Naggi, Casu & Lindahl, 1995). Heparin has a specific pentasaccharide sequence that mediates the interaction with AT (Lindahl, Balckstroem, Thumberg & Leder, 1980; Atha, Lormeau, Petitou, Rosemberg &

Choay, 1985). Heparin suffer from number of major disadvantages, these include extreme structural diversity, problems with animal pathogen contamination due to its animal origin, poor bioavailability, the problem of heparin-induced thrombocytopenia developing in some heparin recipients, and the risk of bleeding (Hirsh, 1991; Beijering, ten Cate & ten Cate, 1996).

Attempts have been made to develop new anticoagulant and antithrombotic drugs. Various studies have concerned new sulfated polysaccharides that show anticoagulant/antithrombotic properties. Sulfated polysaccharides that are either of natural, semisynthetic, or synthetic origin, among them dextran sulfate, chitin and chitosan sulfate, carrageenan, and others, have multiple biological activities including anticoagulant and antithrombotic activities (Huang, Du, Yang & Fan, 2003). These polysaccharides show no structural homology with heparin, except high sulfate contents (Jouault et al., 2001) It is generally accepted that the anticoagulant activity of the polysaccharides partly results from the strong interaction between the negatively charged sulfated groups and some positively charged peptidic sequences (Bourin & Lindahl, 1993).

We also describe the preparation of a sulfated glucan (β -G-SO₄) by esterification of a β -glucan (β -G), extracted from the lichenized fungus *Parmotrema mantiqueirensis* Hale. β -G-SO₄ was then examined for its anticoagulant and antithrombotic properties.

2. Experimental

2.1. *Lichenized fungus*

The lichenized fungus *Parmotrema mantiqueirense* Hale (Parmeliaceae family) was collected in 1996, in Lapa, State of Paraná, Brazil. It was identified by Prof. Dra. Sionara Eliasaro (Department of Botanic of the Federal University of Paraná - UFPR) and has its voucher (no. 33355) deposited in the Herbarium UPCB of UFPR.

2.2. *Materials*

Heparin from porcine intestinal mucosa (140 USP units/mg) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and rabbit brain thromboplastin from Instrumentation Laboratory (Lexington, MA, USA). Normal human plasma was obtained by centrifugation (2000 x g for 15 min at 22 °C) of citrated normal human plasma (1/10 vol. of 3.8% trisodium citrate) from a pool of healthy volunteer donors, and frozen at – 20 °C in aliquots of 0.5 ml until further use. APTT and PT were determined with reagents from Instrumentation Laboratory (Lexington, MA, USA) and TT with those from Behring (Marburg, Germany). Pyridine, formamide, chlorosulfonic acid, methanol, ethanol, and trifluoroacetic acid were from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

2.3 . *Isolation of glucan and its sulfation*

A lichen sample (100 g) was successively refluxed in CHCl_3 -MeOH (500 ml, 2:1 v/v) and 80% aqueous MeOH (500 ml), in order to extract low molecular components. The residual material was then extracted successively with 2 and 10% aq. KOH (800ml) containing a trace of NaBH_4 at 100°C for 3 h. The extracts obtained with 10% aq. KOH were combined, neutralized with HOAc, dialyzed against tap water for 72 h, and the retained solution was freeze thawed to give a precipitate and supernatant. The latter was then treated with Fehling solution (Jones and Stoodley, 1965) and resulting precipitate of Cu^{++} complexes removed. These were neutralized with HOAc, dialyzed against tap water and deionized with mixed ion exchange resins, giving rise to a glucan (β -G, 2.1 g).

β -G was sulfated according to the method described by O'NEILL (O'Neill, 1955) with slight modifications as follows. The native polysaccharide (2.0 g) was solubilized in formamide (100 ml) and pyridine (100 ml) by vigorous stirring for 24 h, followed by dropwise addition of chlorosulfonic acid (25 ml) over 1 h at 0°C , the mixture being maintained at 4°C for 12 h. Ice-water was added, followed by 10% (w/v) aqueous NaHCO_3 until effervescence ceased. The solution was then dialyzed against water to remove pyridine, salts, and potential degradation products and then freeze dried, providing the sodium salt of the sulfated glucan. Sulfated glucan was stored until use in a dessicator. The degree of substitution (DS) of sulfated derivative was determined by hydrolysis with 1 M HCl for 5 h at 100°C , the resulting BaSO_4 being measured turbidimetrically (Dodgson & Price, 1962).

2.4. Monosaccharide composition

Hydrolysis was carried out with 1 M TFA at 100°C for 8 h and the hydrolyzates then evaporated to dryness, followed by successive reduction with NaBH₄ and acetylation with Ac₂O-pyridine (1:1, v/v; 2 ml) at room temperature for 12 h (Wolfrom & Thompson, 1963a, 1963b). The resulting alditol acetates obtained were analyzed by GC-MS using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap, model 810 R-12 mass spectrometer, with a DB-225 capillary column (30 m x 0.25 mm i.d.), and He as carrier gas. The analysis was carried out from 50-220°C at 40°C/min maintaining the temperature constant at the end of the gradient (18 min).

2.5. Methylation analysis

Fractions β-G and β-G-SO₄ (5 mg) were per-O-methylated according to the method of Ciucanu and Kerek (1984), using powdered NaOH in Me₂SO-MeI. The per-O-methylated derivatives were treated with refluxing 3% HCl-MeOH for 2 h at 80 °C, and then with 0.5 M H₂SO₄ at 100 °C for 14 h. The resulting mixtures of O-methylaldoses were reduced with NaBH₄ and acetylated as cited above to give a mixture of partially O-methylated alditol acetates, which was analyzed by GC-MS. The analysis was carried out from 50-215 °C at 40 °C/min maintaining the temperature constant at the end of the gradient (31 min). The resulting partially O-

methylated alditol acetates were identified by their typical electron impact breakdown profiles and retention times (Jansson, Kenne, Liedgren, Lindberg, & Lönngren, 1976).

2.6. Determination of homogeneity and molar mass

The elution profile of fraction β -G was determined by high performance size-exclusion chromatography (HPSEC), using a WATERS 510 HPLC pump at 0.6 ml/min with four gel permeation columns in series with exclusion sizes of 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , and 5×10^3 Da, using a refractive index (RI) detector. The eluent was 0.1 mol/l aq. NaNO_3 containing 200 ppm aq. NaN_3 . Samples, previously filtered through a membrane (0.22 μm ; Millipore), were injected (250 μl loop) at a 2 mg/ml concentration.

The specific refractive index increment (dn/dc) was determined for fraction β -G. The sample was dissolved in 50 mM NaNO_3 and five increasing concentrations, ranging from 0.2 to 0.7 mg/ml, were used to determine the slope of the increment. Results were processed in software provided by the manufacturer (Wyatt Technologies).

2.7. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

NMR spectra were obtained using a 400 MHz Bruker model DRX Avance spectrometer with a 5 mm inverse probe. ^{13}C -NMR (100.6 MHz) and ^1H -NMR (400.13 MHz) analyses were performed at 50 °C or 30 °C on sample dissolved in D_2O . Chemical shifts of samples are expressed in ppm (δ) relative to acetone at δ 30.20 and 2.22 for ^{13}C and ^1H signals, respectively.

2.8. Clotting assay

The assay was carried out using heparin, $\beta\text{-G}$ and $\beta\text{-G-SO}_4$, dissolved in saline at various concentrations. Normal human plasma (90 μl) was mixed with 10 μl of a solution of $\beta\text{-G-SO}_4$ (0-20 μg), $\beta\text{-G}$ (0-2 mg) or heparin (0-20 μg). For controls, saline was added to plasma in a ratio of 1:10. APTT measurements were performed using a kit obtained from Instrumentation Laboratory (IL testTM, Lexington, MA, USA). Plasma (100 μl), containing various concentrations of $\beta\text{-G-SO}_4$, $\beta\text{-G}$ or heparin, was incubated at 37 °C for 1 min. 100 μl of bovine cephalin was then added and incubated at 37 °C. After 3 min incubation, 100 μl of prewarmed 0.25 M CaCl_2 solution were added to the mixtures and the clotting time was measured in quadruplicate using a COAG-A-MATE[®] XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durham, NC, USA) up to 300 s. For determination of TT, normal human plasma (100 μl) containing various concentrations of heparin, $\beta\text{-G}$ and $\beta\text{-G-SO}_4$, was

incubated at 37 °C for 2 min, at which the thrombin time reagent, 200 µl, (Behring, Marburg, Germany) was added. The time for the appearance of a fibrin clot (s) was measured up to 300 s using a COAG-A-MATE[®] XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durhan, NC, USA). For determination of PT, normal human plasma (100 µl) containing various concentrations of heparin, β-G and β-G-SO₄ was incubated at 37 °C for 2 min, then, 200 µl of rabbit brain calcium tromboplastin was added and the clotting time recorded using a COAG-A-MATE[®] XM coagulometer. All assays were performed in duplicate and repeated at least three times on different days (n = 6).

2.9. Animals

Experiments were conducted on male Wistar rats weighing 250-300 g, which were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg.kg⁻¹ intramuscularly) and xylasine (16 mg.kg⁻¹ intramuscularly).

All recommendations of the Brazilian National Law (no. 6.638, 05 Nov. 1979) for scientific management of animals were respected.

2.10. Ex vivo determination of APTT

Animals were anesthetized as described above and the carotid artery was carefully exposed and dissected free from surrounding tissue. Heparin (0-500 µg.kg⁻¹

¹), vehicle (PBS) or β -G-SO₄ (0-1 mg.kg⁻¹) was administered into the carotid artery. After 5, 15, 30 and 60 min samples of blood was collected (0.5 ml in 3.8% trisodium citrate, 9:1, v/v). Each blood sample was centrifuged (2000 x g, 10 min) and plasma was stored at -20 °C until use. APTT was determined using a kit obtained from Instrumentation Laboratory (IL testTM, Lexington, MA, USA). Plasma (100 μ l), was incubated at 37 °C for 1 min. 100 μ l of bovine cephalin was then added and incubated at 37 °C. After 3 min of incubation, 100 μ l of prewarmed 0.25 M CaCl₂ solution were added to the mixtures and the clotting time was measured using a COAG-A-MATE[®] XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durhan, NC, USA) up to 300 s. For each treatment group (n = 6) the mean *ex vivo* APTT \pm SD was determined.

2.11. Tail transection bleeding time

For evaluation on the bleeding effect, rats were anesthetized as described above. The right carotid artery of animals was cannulated for administration of β -G-SO₄ (0.1-1 mg.kg⁻¹), vehicle (PBS), or heparin (25-100 μ g.kg⁻¹). Bleeding was induced by section of the tail extremity 3 mm from the tip. The tails were blotted with tissue paper every 30 s and the time up to cessation of bleeding were noted. The compounds were administered 5 min before tail transection. For each treatment group (n = 6) the mean bleeding time \pm SD was determined.

2.12 . *Stasis-induced venous thrombosis model*

Thrombus formation was induced by promoting a combination of stasis and hypercoagulability (Berry, Girardi, Lochot, & Lecoffre, 1994). Rats were anesthetized and their right carotid artery was cannulated for injection of β -G-SO₄, vehicle (PBS), heparin, and thromboplastin. The abdomen of each animal was opened surgically and, after careful dissection, the abdominal vena cava was exposed and dissected free from the surrounding tissue, all its side-branches being ligated between the left renal and femoral veins. β -G-SO₄ (0.25–2 mg·kg⁻¹), heparin (25–100 μ g·kg⁻¹), or vehicle, were administered as a single bolus injection. After 5 min, thrombus formation was induced by the injection by thromboplastin (10 mg·kg⁻¹) followed 10 s later by stasis of a 1 cm segment of the abdominal vein cava, which was maintained for 20 min. The formed thrombus was removed, immediately blotted twice on paper and weighed. For each treatment group (n = 6) the mean thrombus weight \pm SD was determined.

2.13 . *Statistics*

All results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). To analyse the data statistically, we performed one way analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements of the same variable, and used Tukey test to determine which means were significantly different from that of the control. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and Discussion

3.1. Chemical characterization of β -G and β -G-SO₄

The precipitate obtained using Fehling solution (fraction β -G; 2.1% yield), contained glucose as the main component. HPSEC analysis showed a homogeneous profile with M_r 4.2×10^5 kDa ($dn/dc = 0.141$). Their ¹³C NMR spectra containing six signals of equal area, identical to those of a (1→6)-linked β -glucan (pustulan) (Sasaki, Ferreira, Glienke-Blanco, Torri, De Toni, Gorin, & Iacomini, 2002). The β -configuration was confirmed by virtue of a high-field H-1 signal at δ 4.51 and a low field C-1 at δ 103.5. The C-6 signal at δ 69.3 shows 6-O-substitution of Glcp units, confirmed by a corresponding inverted $\underline{C}H_2$ signal in the DEPT spectrum. The other signals observed at δ 73.6, 76.1, 70.0, and 75.4 corresponding to C-2, C-3, C-4, and C-5, respectively. These data are in agreement with those of a methylation analysis, which showed only the derivatives 2,3,4,6-Me₄-Glcp (0.6%) and 2,3,4-Me₃-Glcp (99.4%).

Comparison of methylation analysis data for β -G and β -G-SO₄ demonstrated that sulfate groups were inserted principally in the OH-groups at C-2 and C-4. This was readily observed in the methylation analysis, where β -G was originally composed by 2,3,4-Me₃-Glcp (99.4%) and after sulfation a decrease of this derivative occurred to 13.0%. 2,3-Me₂-Glcp (20.3%), 3,4-Me₂-Glcp (25.6%), 2,4-Me₂-

Glc p (5.1%) and 3-Me-Glc p (30.0%) also appeared for β -G-SO $_4$. Small percentages of fully substituted units of Glc p (5.6%), and non-reducing ends of Glc p (0.4%) were also present.

3.2. In vitro *anticoagulant activity of β -G-SO $_4$*

The anticoagulant activity of β -G-SO $_4$ was investigated by the classical coagulation assays APTT, TT and PT, using heparin (140 USP units/mg) as a reference. APTT is related to the intrinsic coagulation phase in plasma, PT with the extrinsic phase, and TT with the third coagulation phase in plasma. These tests are often referred to as functional tests because they monitor clot formation. (Leadley Jr., Chi, Rebello, & Gagnon, 2000). Table 1 illustrates the anticoagulant activity of β -G-SO $_4$, β -G and heparin as measured by APTT, TT and PT. β -G-SO $_4$ was able to prolong APTT and TT in a concentration-dependent manner. β -G-SO $_4$ prolonged APTT and TT beyond 300 s at concentrations greater than 14 μ g/ml, 2.4- fold more β -G-SO $_4$ than heparin being required to prolong APTT and TT to 300 seconds. At 8, 10 and 12 μ g·ml $^{-1}$ of plasma, the anticoagulant activity was \sim 4.4 (119.8 \pm 1.9 s), 7.4 (202.6 \pm 1.0 s) and, 9.5 (261.1 \pm 1.6 s) times greater than that of the control (27.4 s), in respect to APTT. The anticoagulant effect of the β -G-SO $_4$ was also evaluated by the TT test, the anticoagulant activity being about 8.6 (160.7 \pm 1.1 s), 11.5 (215.9 \pm 0.7 s), and 14.0 (262.5 \pm 0.8 s) times greater than that of the control (18.7 s) at the same concentrations. The prolongation of APTT suggested inhibition of the intrinsic

coagulation pathway, whereas prolongation of TT indicated inhibition of thrombin-mediated fibrin formation. Similar to heparin, the weakest effect was observed in the PT assay for the sulfated polysaccharide. Since the anticoagulant effect of heparin is not mainly mediated by a modulation of the extrinsic system, it appears that β -G-SO₄ is a poor inhibitor of the extrinsic pathway. The relative lack of a β -G-SO₄ effect on the PT is consistent with the observation that this test is also not sensitive to heparin and several other sulfated polysaccharides (Yoon, Pereira, Pavão, Hwang, Pyun, & Mourão, 2002). β -G did not inhibit APTT, TT and PT assays, because the presence of sulfated groups is an essential requirement for anticoagulant activity (Huang, Du, Yang, & Fan, 2003). β -G-SO₄ showed an important *in vitro* anticoagulation action, evidenced by a increased dose-dependence of APTT and TT. This action results from its high level of negative charge density produced by the sulfate groups (DS 1.95). The anticoagulant activity increased with the sulfate ester content, indicating the sulfate esters played a major role in its biological activity.

3.3. Stasis-induced venous thrombosis model

The antithrombotic efficacy of β -G-SO₄ was evaluated in rats by the stasis-induced venous thrombosis model, being observed on thrombus formation (Fig. 1). In vehicle-treated rats, the average thrombus weight was 23.4±1.7 mg. The inhibition of thrombus formation increased in a dose-dependent manner. The percentage of thrombosis inhibition was 24.3%, 64.5% and 83.5% at 0.05 mg.kg⁻¹, 0.1 mg.kg⁻¹ and

0.3 mg·kg⁻¹ body weight, respectively. β -G-SO₄ was an effective antithrombotic agent, and prevented thrombosis in a dose-dependent manner and a dose of 0.5 mg·kg⁻¹ body weight completely prevented thrombosis after 20 min stasis. Unfractionated heparin was more effective than β -G-SO₄ and completely prevented thrombosis in the same experimental model, at a dose of 0.1 mg·kg⁻¹ body weight. We evaluated the antithrombotic properties of β -G-SO₄ using a venous stasis model in rats (Berry, Girardi, Lochot, & Lecoffre, 1994). Many models of thrombosis have been developed for rodents, for antitrombotic efficacy on the venous side, several compounds were evaluated using methods that cause stasis of blood in inferior vena cava. In this model, a section of the vena cava is isolated and ligated so that the stasis in this region promotes thrombus generation. The lack of antithrombotic activity of the native glucan, demonstrated the importance of the sulfate groups for antithrombotic activity, as was observed for its anticoagulant action. When other sulfated polysaccharides were compared with β -G-SO₄, we observed that a chemically sulfated (1→3)-linked β -glucan completely inhibited thrombus formation, but only at a concentration 20 times greater than that of unfractionated heparin (Alban, Jeske, Welzel, Franz, & Fareed, 1995) and a fucosylated chondroitin sulfate completely inhibited thrombus formation at a dose of 1.5 mg·kg⁻¹ body weight, 25 times greater than unfractionated heparin (Mourão, Guimarães, Mulloy, Thomas, & Gray, 1998). Only a concentration 4 times greater of β -G-SO₄ was necessary to obtain the same effect as heparin.

3.4. Ex vivo determination of APTT

In order to determine whether β -G-SO₄ could exert its anticoagulant action *in vivo*, we tested for APTT ex vivo using a rat model. APTT determined for β -G-SO₄ doses of 200, 300, 500, 600, 800, 900 and 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, after 5 min of drug administration, was increased in a dose-dependent manner by 2.7, 4.2, 7.6, 8.9, 12.5, 13.8 and >15.3- fold, respectively (Table 2). 2.0- fold more β -G-SO₄ than heparin was required to prolong APTT to 300 s. This result indicates that the β -G-SO₄ has an anticoagulant action *in vivo*.

3.5. Tail transection bleeding time

The tail rat transection bleeding time was measured to determine the antihemostatic effects of β -G-SO₄. The effect of β -G-SO₄ was assessed based on blood loss from a cut rat tail, after intravascular administration of the polysaccharide. Both heparin and β -G-SO₄ caused dose-dependent increases in the tail transection bleeding time (Table 3). In the vehicle-treated control group, the bleeding time averaged at 960 ± 50.2 s (n = 6). β -G-SO₄ caused an increase in bleeding time of 48.4 and 108.3% at 500 and 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight, respectively. Heparin produced a strong hemorrhagic effect at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$: the increased in bleeding times was 179.7%. The ideal clinical anticoagulant would reliably and predictably inhibit thrombin without substantially increasing the risk of bleeding (Guglielmone, Agnese,

Montoya & Cabrera, 2002). According to our results, β -G-SO₄ produced a short prolongation of the rat tail transaction bleeding time, when compared with heparin.

4. Conclusion

Our study shows that β -G-SO₄ is effective *in vitro* and *in vivo* as an anticoagulant and antithrombotic agent for thrombosis in rats. These results suggest that β -G-SO₄ may be a promising antithrombotic agent for the treatment of various thrombotic diseases.

Acknowledgements

The authors would like to thank Depto. de Bioquímica Médica (Laboratório de Tecido Conjuntivo, UFRJ, RJ, Brazil), for technical support in the *in vivo* experiments, Dra. Lismara Kafka do Bonfim (Hospital de Clínicas, Curitiba, PR, Brasil) for collecting human plasma, Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche "G. Ronzoni", Italy, for NMR analyses, and the Brazilian agencies, CNPq, CAPES, PRONEX-Carboidratos and Fundação Araucária for financial assistance. The authors are grateful to Welligton L. Braguini for the statistical analyses.

References

- Alban, S., Jeske, W., Welzel, D., Franz, G., & Fareed, J. (1995). Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic β -1,3-glucan sulfate. *Thrombosis Research*, 78 93, 201-210.
- Atha, D. H., Lormeau, J. C., Petitou, M., Rosemberg, R. D., & Choay, J. (1985). Contribution of monosaccharide residues in heparin binding to antithrombin III. *Biochemistry*, 24, 6723-6729.
- Beijering, R. J. R., ten Cate, H., & ten Cate, J. W. (1996). Clinical applications of new antithrombotic agents. *Annals of Hematology*, 72, 177-183.
- Berry, C.N., Girardi, D., Lochot, S., & Lecoffre, C. (1994). Antithrombotic actions of argatroban in rat models of venous, mixed and arterial thrombosis, and its effects on the tail transection bleeding time. *British Journal of Pharmacology*, 113, 1209-1214.
- Bourin, M. C., & Lindahl, U. (1993). Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochemical Journal*, 289, 313-330.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). Simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209-217.
- Dodgson, K. S., & Price, R. G. (1962). A note on the determination on the ester sulfate. *Biochemical Journal*, 84 (1), 106-110.

- Guglielmone, H. A., Agnese, A. M., Montoya, S. C. N., & Cabrera, J. L. (2002). Anticoagulant effect and action mechanism of sulphated flavonoids from *Flaverina bidentis*. *Thrombosis Research*, 105, 183-188.
- Hirsh, J. (1991). Heparin. *The New England Journal of Medicine*, 324, 1565-1574.
- Huang, R., Du, Y, Yang, J., & Fan, L. (2003). Influence of functional groups on the *in vitro* anticoagulant activity of chitosan sulfate. *Carbohydrate Research*, 338, 483-489.
- Jansson, P., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B., & Lönngren, J. (1976). A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 48, 1-70.
- Jones, J. K. N., & Stoodley, R. J. (1965). Fractionation using copper complexes. *Methods Carbohydrate Chemistry*. 5, 36-38.
- Jouault, S.C., Chevlot, L., Helley, D., Ratiskol, J., Bros, A., Sinquin, C., Roger, O., & Fischer, A.M. (2001). Characterization, chemical modifications and *in vitro* anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1528, 141-151.
- Leadley Jr, R.J., Chi, L., Rebello, S. C., & Gagnon, A. (2000). Contribution of *in vivo* models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 43, 101-116.
- Lindahl, U., Balckstroem, G., Thumberg, L., & Leder, J. G. (1980). Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proceedings of the National Academy of Science*, 77, 6551-6555.

- Mourão, P. A. S., & Pereira, M. S. (1999). Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9 (8), 225-232.
- Mourão, P. A. S., Guimarães, M.A.M., Mulloy, B., Thomas, S., & Gray, E. (1998). Antithrombotic activity of a sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. *British Journal of Haematology*, 101, 647-652.
- O'Neill, A. N. (1995). Sulphated derivatives of laminarin. *Canadian Journal of Chemistry*, 33 1097-11101.
- Razi, N., Feyzi, E., Björk. I., Naggi, A., Casu, B., & Lindahl, U. (1995). Structural and functional properties of heparin analogues obtained by chemical sulphation of *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide. *Biochemistry Journal*, 309, 465-472.
- Sasaki, G. L., Ferreira, J. C., Glienke-Blanco, C., Torri, G., De Toni, F., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2002). Pustulan and branched β -galactofuranan from the phytopathogenic fungus *Guignardia citricarpa*, excreted from media containing glucose and sucrose. *Carbohydrate Polymers*, 48 (4), 385-389.
- Yoon, S-J., Pereira, M. S., Pavão, M. S. G., Hwang, J-K., Pyun, Y-R., & Mourão, P. A. S. (2002). The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. *Thrombosis Research*, 106, 51-58.
- Tamada, Y. (2004). Sulfation of silk fibroin by chlorosulfonic acid and anticoagulant activity. *Biomaterials*, 25, 377- 383.

Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963a). Reduction with sodium borohydride.

Methods in Carbohydrate Chemistry, 2, 65-67.

_____. (1963b). Acetylation. Methods in Carbohydrate Chemistry, 2, 211-

215.

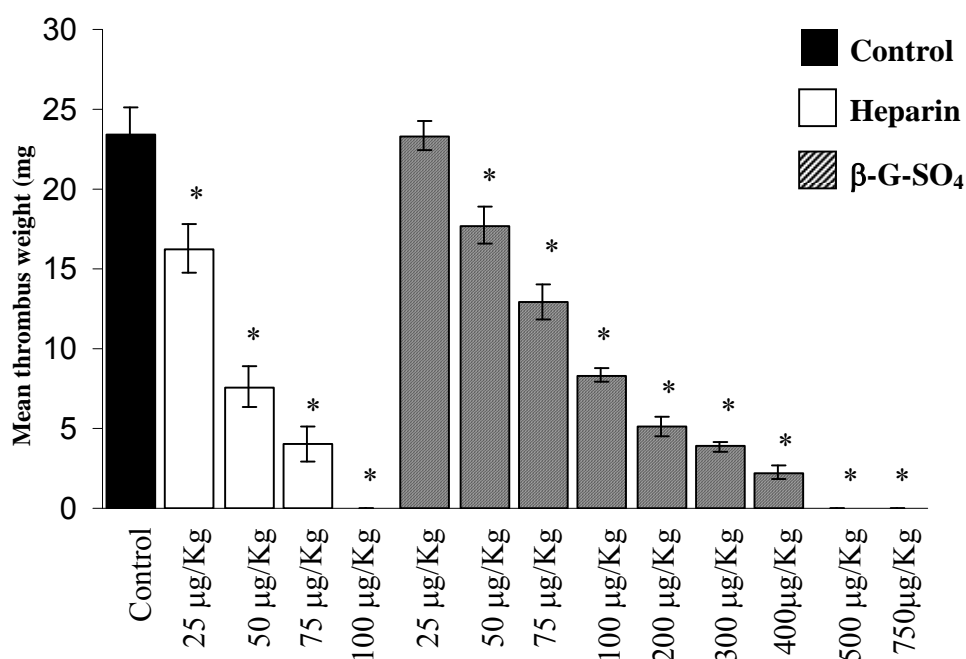


Fig. 1. Effects of β -G-SO₄ on the stasis-induced venous thrombosis model. After being cannulated, the abdomen of each animal was opened surgically and the abdominal vena cava was exposed, all its side-branches being ligated between the left renal and femoral veins. The β -G-SO₄ (25–750 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) (hatched columns), heparin (25–100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) (open columns) or vehicle (PBS) (filled columns) was administered. After 5 min, thrombus formation was induced by the injection by thromboplastin (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) followed 1 min later by stasis of a 1 cm segment of the abdominal vein cava, which was maintained for 20 min. The formed thrombus was removed, immediately blotted twice on paper and weighed. For each treatment group (n = 6) the mean thrombus weight \pm SD was determined. Statistical significance compared to control values is denoted by asterisks where * $p < 0.05$ versus controls, Tukey's tests.

Table 1

Anticoagulant activity measured by activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), and prothrombin time (PT) of normal human plasma containing β -G, β -G-SO₄ and heparin

<i>Derivative</i>	<i>APTT</i>		<i>TT</i>		<i>PT</i>	
	$\mu\text{g.ml}^{-1}$ plasma	Time (s)	$\mu\text{g.ml}^{-1}$ plasma	Time (s)	$\mu\text{g.ml}^{-1}$ plasma	Time (s)
Native glucan (β -G)	0	27.7±0.8 ^(a)	0	18.7±0.5 ^(a)	0	15.4±0.5 ^(a)
	10	27.7±0.8 ^(a)	10	18.7±0.5 ^(a)	10	15.4±0.5 ^(a)
	50	27.7±0.8 ^(a)	50	18.7±0.5 ^(a)	50	15.4±0.5 ^(a)
	500	27.7±0.8 ^(a)	500	18.7±0.5 ^(a)	500	15.4±0.5 ^(a)
	1000	27.7±0.8 ^(a)	1000	18.7±0.5 ^(a)	1000	15.4±0.5 ^(a)
Sulfated glucan (β -G-SO ₄)	0	27.7±0.8 ^(a)	0	18.7±0.5 ^(a)	0	15.4±0.5 ^(a)
	2	45.0±1.2*	2	21.5±1.2*	2	16.9±1.1
	4	64.7±1.6*	4	56.1±0.6*	4	17.0±1.4
	6	95.8±0.9*	6	100.3±0.9*	6	18.8±1.1*
	8	119.8±1.9*	8	160.7±1.1*	8	20.3±1.1*
	10	202.6±1.0*	10	215.9±0.7*	10	21.3±1.0*
	12	261.1±1.6*	12	262.5±0.8*	12	22.3±1.2*
	14	>300 ^(c)	14	>300 ^(c)	14	26±1.1*
Heparin ^(b)	0	27.7±0.8 ^(a)	0	18.7±0.5 ^(a)	0	15.4±0.5 ^(a)
	2	85.2±1.3*	2	59.6±1.1*	2	17.0±0.6*
	4	169.2±1.1*	4	105.3±0.9*	4	17.5±0.4*
	6	>300 ^(c)	6	>300 ^(c)	6	18.0±0.5*

Results are expressed as means time \pm SD (n = 6/group).

^(a) Coagulation time similar to that of pooled human plasma. Standard values (26–37, 14–21, 11–16 s for APTT, TT and PT respectively).

^(b) Heparin from porcine intestinal mucosa at a concentration of 140 USP units/mg.

Statistical significance compared to control values is denoted by asterisks where * $p < 0.05$ versus controls, Tukey's tests.

^(c) No statistical tests were performed with times longer than 300 s.

<i>Polysaccharide</i>	<i>APTT ex vivo</i> ^(a)		Polysaccharide	<i>APTT ex vivo</i> ^(a)	
	$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Time (s)		$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Time (s)
Sulfated glucan ($\beta\text{-G-SO}_4$)	0	19.7 \pm 1.1 ^(b)	Heparin ^(c)	0	19.7 \pm 1.1 ^(b)
	200	53.2 \pm 0.8*		50	19.7 \pm 1.2
	300	82.2 \pm 0.8*		75	21.1 \pm 1.4
	500	150.7 \pm 1.2*		100	41.3 \pm 0.9*
	600	174.8 \pm 1.2*		200	57.3 \pm 0.8*
	800	246.3 \pm 0.9*		300	108.9 \pm 1.0*
	900	273.1 \pm 0.9*		400	161.1 \pm 1.5*
	1000	>300 ^(d)		500	>300 ^(d)

Table 2

Ex vivo anticoagulant activity of $\beta\text{-G-SO}_4$

^(a) $\beta\text{-G-SO}_4$ and heparin at the indicated doses were administered intravenously 5 min before collection of blood samples (0.5 ml) into 3.8% trisodium citrate (9:1, v/v). APTT was determined on *ex vivo* rat plasma as described in Materials and methods.

Results are expressed as means time \pm SD (n = 6/group).

^(b) Coagulation time similar to that of pooled rat plasma.

^(c) Heparin from porcine intestinal mucosa at a concentration of 140 USP units/mg.

Statistical significance compared to control values is denoted by asterisks where * $p < 0.05$ versus controls, Tukey's tests.

^(d) No statistical tests were performed with times longer than 300 s.

Compound	Dose ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Bleeding time (s) ^(a)	Increase (%)
Vehicle	-	960 \pm 50.2	-
β -G-SO ₄	100	920 \pm 77.4	-
	250	960 \pm 82.7	-
	500	1425 \pm 125.5 *	48.4
	1000	2000 \pm 164 *	108.3
Heparin ^(b)	25	945 \pm 56.1	-
	50	1380 \pm 65.7 *	43.7
	75	2075 \pm 44.1 *	116.1
	100	2685 \pm 64.8 *	179.7

Table 3
Effects of β -G-SO₄ on the tail transection bleeding time in rat.

^(a) The left jugular vein of animals was cannulated for intravenous injection of (0.1-1 mg \cdot kg⁻¹), vehicle (PBS) or heparin (25-100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). After 5 min, bleeding was induced by section of the extremity of the tail 3 mm from the tip. The tails were blotted with tissue paper every 30 s the time to cessation of bleeding was noted. For each treatment group the mean bleeding time \pm SD was determined for n = 6/group. Statistical significance compared to control values is denoted by asterisks where * $p < 0.05$ versus controls, Tukey`s tests.

^(b) Heparin from porcine intestinal mucosa at a concentration of 140 USP units/mg.