

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA HELENA PEREIRA GRACHER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICO DE
POLISSACARÍDEOS NATIVOS E QUIMICAMENTE SULFATADOS DE
BASIDIOMICETOS**

CURITIBA

2010

ANA HELENA PEREIRA GRACHER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICO DE
POLISSACARÍDEOS NATIVOS E QUIMICAMENTE SULFATADOS DE
BASIDIOMICETOS**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica

Orientadores: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin

Prof. Dr. Marcello Iacomini

CURITIBA


2010

TERMO DE APROVAÇÃO

ANA HELENA PEREIRA GRACHER

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICO DE
POLISSACARÍDEOS NATIVOS E QUIMICAMENTE SULFATADOS DE
BASIDIOMICETOS

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Philip A. J. Gorin (Orientador)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



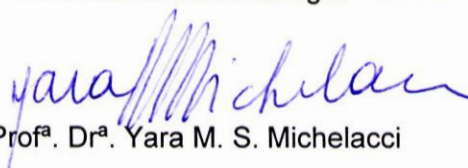
Prof^a. Dr^a. Juliana B. B. Maurer

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof^a. Dr^a. Eliana Barreto-Bergter

Departamento de Microbiologia – UFRJ



Prof^a. Dr^a. Yara M. S. Michelacci

Departamento de Bioquímica – UNIFESP



Prof. Dr. Paulo A. S. Mourão

Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Curitiba, 26 de fevereiro de 2010.

Aos meus pais, Nelson e Maria Inez, por todo o apoio, dedicação, exemplo e educação. Sem vocês não seria nem um terço do que sou! Esta tese também é uma conquista de vocês! Ao Marcelo pelo amor, paciência, carinho e apoio!

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a vida e por conseqüência, a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores Prof. Marcello Iacomini e Prof. Philip A. J. Gorin pelos ensinamentos, orientação, “puxões de orelha” e conversas. Prof. Marcello, muito obrigada por me apresentar a esta área de pesquisa, que após muito trabalho aprendi a amar. Prof. Gorin, é sempre ótimo conversar com o Sr., com quem aprendi muito, além de me mostrar que o amor a ciência nos mantém ativos.

Aos professores Juliana B. B. Maurer e Thales R. Cipriani pela correção da tese na banca interna, o tempo foi curto, mas vocês foram muito criteriosos e detalhistas.

Aos meus pais, Nelson e Maria Inez, que tanto me ensinaram, ajudaram, cuidaram, escutaram e pelo exemplo. Pelo amor e dedicação de vocês. Amo muito vocês!

Ao Marcelo pelo apoio, carinho, torcida, compreensão e amor. Não é fácil, mas estamos achando um equilíbrio! Te amo!

A minha irmã Juliane, ao Tico, a Amanda, Victória e João Victor. Muito obrigada pela torcida, carinho e amor! A distância dificulta um pouco as coisas, mas sempre estaremos juntos. Amo vocês!

A minha irmã Paula e ao Celso, muito obrigada pelo carinho, conversas e orações. Sempre com frases ótimas de motivação. Amo vocês!

A Ilda, meu anjo da guarda, que até hoje cuida de mim e faz minha vontades, além de agüentar todos nós! Também te amo!

A tia Lurdinha pela torcida, apoio e propaganda (enganosa) que faz de mim. Te amo!

Aos meus sogros Seu Nilton e D. Marlene pelo apoio, torcida e abrigo (por alguns meses).

As minhas amigas desde a infância Fernanda, Sulamitha e ao Bruno que chegou para ficar. Obrigada pelas conversas, desabafos, conselhos e diversão. Afinal a vida precisa muito disso tudo.

A Giane, Drehna e Gabi pela torcida, apoio e pelas ótimas reuniões de família.

A Giselle e ao Piri, Lu e Beto e toda família Honório, pois a lista é grande, muito obrigada pela torcida, apoio e festinhas!

A minha madrinha Stela pelo apoio, torcida e carinho.

A minha enorme família pelas reuniões e festas sempre alegres. Família grande sempre tem muitas histórias!

Aos meus primos Otto, Eliane, Gabi e Otto Filho por me receberem tão bem em sua casa no Rio de Janeiro, foi muito bom o carinho de vocês! Espero visitá-los a passeio agora!

A Profa. Elaine R. Carbonero pelas amostras, RMN e amizade. Agora estamos mais longe, mas o carinho sempre estará presente.

Ao Thales pela ajuda, discussões, troca de idéias e incentivo.

Aos Prof. Guilherme L. Sassaki e Miguel D. Nosedá pelas análises de RMN.

As técnicas Andréia T. e Elizangela pelas análises de HPSEC-MALLS.

A Rosane e ao Lauro pelas análises de GC-MS, que eram sempre complicadas.

A Profa. Consuelo e as alunas Yanna e Sandra Crestani do Depto. de Farmacologia por me ensinarem, me ajudarem e pela paciência nos primeiros experimentos com animais. Vocês me ajudaram muito para eu perder o medo de lidar com eles!

Ao Prof. Dr. Mauro Pavão e aos alunos de Depto. de Bioquímica Médica da UFRJ Angélica M. Gomes, Roberto Fonseca e Stephan Oliveira por me ensinarem os modelos de trombose em ratos, pelas dicas e ajuda.

A Amanda L. Heyse, que trabalhou como iniciação científica no nosso laboratório e me ajudou, sempre com um sorriso.

Aos alunos do Lab. de Metabolismo Celular pela ajuda com o leitor de microplacas-Tecan.

A Profa. Lucy Ono do Depto. de Patologia pela ajuda nas primeiras tentativas dos ensaios de mecanismo e por disponibilizar o leitor de microplaca do seu laboratório.

As minhas amigas já Dras. Carol (Caroline Mellinger), Paulinha (Paula C. Tischer) e Fer Simas (Fernanda F. S. Tosin) pelas conversas, conselhos, desabafos e “terapia de grupo”, que sempre foram muito importantes. Tô chegando lá! Adoro vocês!

A minhas companheiras de laboratório e amigas Giovana Alquini, Fhernanda, Andrea e Dirce pela ajuda, conversas e amizade.

As novas companheiras e amigas de laboratório Carol Aires e Yanna, pessoas especiais que tive a sorte de conhecer.

Aos amigos de laboratório (E1, 247 e 250) pelo dia a dia, conversas, risadas, e lógico, cafezinhos, Lauro, Rodrigo Vassoler, Thales, Guilherme, Lucimara, Arquimedes, Carol S., Daniel, Phelipe, Nessana e Elaine.

Aos amigos dos outros laboratórios Nanna (“raposa”), Andrea, Beti, Luciano e todo o pessoal que sempre me ajudaram, pelo empréstimo de material, conversas, apoio, etc. Posso dizer que já “incomodei” muita gente!

As minhas amigas de turma do mestrado Ju Inaba, Tati, Gio, Pati e Gra pelas conversas, confidências e apoio.

Aos professores de alunos dos laboratórios de oxidações pelo ajuda e por disponibilizar o espectrofotômetro.

A todos os professores e funcionários do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular e da Pós-graduação. As disciplinas e fazer parte das reuniões como representante discente me ensinaram muito. Adorei a oportunidade.

Aos atuais coordenadores do Progama de Pós-Graduação Profs. Drs. Miguel D. Nosedá e Leonardo M. Cruz e a Profa. Dra. Leda S. Shubatsu, pelo exemplo.

A D. Marilza D. Lamour pela dedicação e correria para resolver os problemas que surgem na pós-graduação.

Aos funcionários do biotério da UFPR pela disponibilidade e ajuda com os animais.

Ao CNPq, PRONEX-Fundação Araucária e CAPES pelo suporte financeiro.

A todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente na realização deste trabalho!

“O sucesso deve ser medido não só por aquilo que se conquistou na vida, mas também pelos desafios e obstáculos que se teve que enfrentar.”

Booker Washington

RESUMO

A heparina é um importante agente terapêutico para tratamento e profilaxia da trombose. No entanto, sua fonte é limitada e alguns problemas são associados ao seu uso, tais como hemorragias e trombocitopenia induzida por heparina. Modificações químicas de polissacarídeos, como a sulfatação, têm atraído interesse, pois aumentam a semelhança estrutural com a heparina. Na busca de alternativas à heparina, três polissacarídeos isolados de basidiomicetos e previamente caracterizados, foram quimicamente sulfatados: uma β -D-glucana linear (1→6)-ligada de *Agaricus blazei* (GAb-S1), uma β -D-glucana com cadeia principal (1→3)-ligada substituída em O-6 por unidades de β -D-glucopiranosose de *Pleurotus florida* (GPf-S1 e GPf-S2, primeiro e segundo ciclo de sulfatação, respectivamente), uma fucomanogalactana com uma cadeia principal de α -D-galactopiranosose (1→6) ligadas e substituídas em O-2 por terminais não redutores de α -L-fucopiranosose e β -D-manopiranosose de *Lentinus edodes* (FmgLe-S1) e um manogalactana com cadeia principal de α -D-galactopiranosose (1→6) ligada, substituídas em O-2 por β -D-manopiranosose e parcialmente 3-O-metiladas de *Pleurotus ostreatoroseus* (MgPr-S1). Os graus de substituição (DS) foram determinados, sendo: 1,38 (GAb-S1), 0,57 (GPf-S1), 0,60 (GPf-S2), 2,04 (FmgLe-S1) e 1,31 (MgPr-S1). Os espectros de RMN- C^{13} de todos os polissacarídeos sulfatados apresentaram um maior número de sinais do que os dos polissacarídeos nativos e as análises de metilação sugerem substituição nos grupos OH-6 (terminais não-redutores), OH-4 e OH-3. A ação anticoagulante dos polissacarídeos nativos e sulfatados foi avaliada *in vitro* pelos testes de aPTT e TT, com concentrações crescentes (5 a 100 μ g/ml). Os polissacarídeos nativos não apresentaram ação anticoagulante e todos os polissacarídeos sulfatados apresentaram uma atividade dose-dependente. GAb-S1 apresentou uma maior atividade anticoagulante, comparada aos outros polissacarídeos testados, enquanto que GPf-S1 e GPf-S2 não foram capazes de inibir completamente a coagulação do plasma pelo teste de aPTT. Todos os polissacarídeos sulfatados foram capazes de suprimir a coagulação do plasma pelo teste de TT na maior concentração (100 μ g/ml). No modelo *in vivo* de trombose venosa, GAb-S1 apresentou um efeito pró-coagulante em altas doses e inibiu em 72% a trombose na dose de 0,250 mg/kg. MgPr-S1 inibiu a formação de trombo em uma maneira dose-dependente e com uma dose de 6 mg/kg a inibição foi completa. GPf-S2 também teve uma forte atividade antitrombótica e na dose de 1,5 mg/kg suprimiu em 87% a geração de trombo. MgPr-S1 apresentou uma menor tendência em causar hemorragia na concentração de 6 mg/kg, comparado com a heparina e GPf-S2 na concentração de 1,5 mg/kg não alterou o volume de sangue perdido (valores iguais ao grupo salina). Os polissacarídeos também foram avaliados quanto à sua influência sobre a agregação plaquetária estimulada por ADP e trombina. GPf-S2 e MgPr-S1 inibiram, respectivamente, em 54% e 100% a agregação plaquetária estimulada por ADP. Todos os polissacarídeos suprimiram a agregação de plaquetas estimuladas por trombina, na dose de 0,200 μ g/ml. FmgLe-S1 estimulou a agregação plaquetária, sem outro agonista. Todos os polissacarídeos inibiram a trombina na presença de AT e HCII. No entanto, GAb-S1 e MgPr-S1 apresentaram uma maior atividade mediada pelo HCII, inibindo a atividade da trombina, em uma menor concentração que a heparina. A maioria dos polissacarídeos sulfatados não apresentou uma forte atividade inibitória mediada pela AT contra o fator Xa, porém em doses mais elevadas GPf-S1 e GPf-S2 foram capazes de inibir esta serino-

protease. Estes resultados ilustram a variedade de respostas sobre a coagulação sanguínea geradas pelos polissacarídeos sulfatados.

Palavras-chave: sulfatação química, polissacarídeos, atividade antitrombótica e anticoagulante, agregação plaquetária, trombina, antitrombina, cofator II da heparina e fator Xa

ABSTRACT

Heparin is an important therapeutic agent for prophylaxis and treatment of thrombosis. However, sources of heparin are limited, while some problems are associated with its use, such as bleeding and heparin-induced thrombocytopenia. Chemical modification of polysaccharides, such as sulfation, has attracted interest, because it enhances a structure with some similarities to those of heparin. In an attempt to study an alternative, three polysaccharides, previously isolated and characterized from basidiomycete, were chemically sulfated, namely: 1) a linear (1→6)-linked β -D-glucan from *Agaricus blazei* (GAb-S1), 2) a branched β -D-glucan with a (1→3)-linked main-chain substituted at O-6 by single-unit glucopyranose from *Pleurotus florida* (sulfated twice: GPf-S1 and GPf-S2), 3) a fucomannogalactan with a (1→6)-linked α -D-galactopyranose main-chain, substituted at O-2 by β -D-mannopyranosyl or α -L-fucopyranosyl units from *Lentinus edodes* (FmgLe-S1), and 3) a mannogalactan with a (1→6)-linked α -D-galactopyranose main-chain, some of the units being 3-O-methylated, substituted at O-2 by β -D-mannopyranose residues from *Pleurotus ostreatoroseus* (MgPr-S1). Degrees of sulfate substitution (DS) were determined as: GAb-S1 = 1.38, GPf-S1 = 0.57, GPf-S2 = 0.60, FmgLe-S1 = 2.04, and MgPr-S1=1.31. ^{13}C -NMR spectra of all sulfated polysaccharides had a higher number of signals than those of the native ones and methylation analysis showed substitution at HO-6 (non-reducing ends), HO-4, and HO-3 groups. The anticoagulant action of native and sulfated polysaccharides was evaluated *in vitro* by aPTT and TT assays, with increasing concentrations (5 to 100 $\mu\text{g/ml}$). The native polysaccharides did not have activity and all sulfated polysaccharides had a dose-dependent activity, but with some differences. GAb-S1, on aPTT, had a stronger anticoagulant activity than the others sulfated polysaccharides, while GPf-S1 and GPf-S2 did not completely inhibit plasma coagulation. All sulfated polysaccharides, on TT, suppressed plasma coagulation at the highest concentration (100 $\mu\text{g/ml}$). An *In vivo* model of venous thrombosis, GAb-S1 was pro-coagulant at higher doses and inhibiting at 72% thrombosis with a dose of 0.250 mg/kg. MgPr-S1 inhibited thrombus formation in a dose-dependent manner and at a dose of 6 mg/kg, inhibition was complete. GPf-S2 also had a strong antithrombotic activity and at a dose of 1.5 mg/kg suppressed at 87% thrombus generation. MgPr-S1 had a lower tendency to cause bleeding in the concentration of 6 mg/kg, compared with heparin and GPf-S2 at a concentration of 1.5 mg/kg did not affect the volume of blood lost (values equal to the saline group). Polysaccharides were also evaluated for their influence on platelet aggregation, stimulated by ADP and thrombin. GPf-S2 and MgPr-S1 inhibited at 54% and 100% platelet aggregation stimulated by ADP respectively. All polysaccharides suppressed platelet aggregation, stimulated by thrombin, at a dose of 0.200 $\mu\text{g/ml}$. FmgLe-S1 stimulated platelet aggregation in the absence of another agonist. All polysaccharides were thrombin inhibitors, on AT and HCII mediation. However, GAb-S1 and MgPr-S1 had a stronger activity, suppressing thrombin activity mediated by HCII, at a lower concentration than with heparin. Most of the sulfated polysaccharides did not have a strong AT-mediated activity against factor Xa, but at higher doses GPf-S1 and GPf-S2 suppressed this protease. These results illustrate a great variety of coagulation responses generated by the sulfated polysaccharide.

Key-words: chemical sulfation, polysaccharides, antithrombotic and anticoagulant activity, platelet aggregation, thrombin, antithrombin, heparin cofactor II and factor Xa

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- MODELO CLÁSSICO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO	27
FIGURA 2	- MODELO DE HEMOSTASIA BASEADO NA CÉLULA	30
FIGURA 3	- TROMBOSE ARTERIAL.....	33
FIGURA 4	- TROMBOSE VENOSA	34
FIGURA 5	- SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA ESPECÍFICA DE LIGAÇÃO DA HEPARINA A ANTITROMBINA	36
FIGURA 6	- ESTRUTURA QUÍMICA DA β -D-(1→6)-GLUCANA (A) ISOLADA DO BASIDIOMICETO <i>Agaricus blazei</i> (B).	48
FIGURA 7	- ESTRUTURA QUÍMICA DA β -D-(1→3)-(1→6)-GLUCANA (A) ISOLADA DO BASIDIOMICETO <i>Pleurotus florida</i> (B)	49
FIGURA 8	- ESTRUTURA QUÍMICA DA FUCOMANOGLACTANA (A) ISOLADA DO BASIDIOMICETO <i>Lentinus edodes</i> (B)	49
FIGURA 9	- ESTRUTURA QUÍMICA DA MANOGLACTANA (A) ISOLADA DO BASIDIOMICETO <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (B)	50
FIGURA 10	- PERFIS DE ELUIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS E SULFATADOS EM HPSEC USANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO.....	62
FIGURA 11	- ESPECTROS DE RMN- C^{13} DE GAb (A), OBTIDO A 40 °C EM D_2O E DE GAb-S1 (B), OBTIDO A 70 °C EM D_2O	63
FIGURA 12	- ESPECTROS DE RMN- C^{13} DE GPf(A), GPf-S1 (B) E GPf-S2 (C)	66
FIGURA 13	- ESPECTROS DE RMN- C^{13} DE FmgLe (A), OBTIDO A 40 °C EM D_2O E DE FmgLe-S1 (B), OBTIDO A 70 °C EM D_2O	69

FIGURA 14	- ESPECTROS DE RMN-C ¹³ DE MgPr (A), OBTIDO A 40 °C EM D ₂ O E DE MgPr-S1 (B), OBTIDO A 70 °C EM D ₂ O	73
FIGURA 15	- TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (aPTT) para GAb e GAb-S1 (A), GPf, GPf-S1 e GPf-S2 (B), FmgLe e FmgLe-S1 (C) e MgPr e MgPr-S1 (D)	77
FIGURA 16	- TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (aPTT) .	78
FIGURA 17	- TEMPO DE TROMBINA PARA GAb e GAb-S1 (A), GPf, GPf-S1 e GPf-S2 (B), FmgLe e FmgLe-S1 (C) e MgPr e MgPr-S1 (D)	81
FIGURA 18	- TEMPO DE TROMBINA (TT).....	82
FIGURA 19	- EFEITO ANTITROMBÓTICO VENOSO DE GPf-S2, FmgLe-S1 e MgPr-S1 EM RATOS	83
FIGURA 20	- INFLUÊNCIA DE GPf-S2 (A) e MgPr-S1 (B) NA HEMORRAGIA	89
FIGURA 21	- EFEITO DE GPf-S2, FmgLe-S1 E MgPr-S1 NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ADP	91
FIGURA 22	- EFEITO DE GPf-S2 NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ADP	92
FIGURA 23	- EFEITO DE GPf-S2 e FmgLe-S1 NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA NA AUSÊNCIA DE ADP	93
FIGURA 24	- EFEITO DE HEPARINA, GPf-S2, FmgLe-S1 E MgPr-S1 NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR α-TROMBINA	94
FIGURA 25	- EFEITO DE GAb-S1 NA INIBIÇÃO DE TROMBINA POR AT (A) OU HCII (B) E DO FATOR Xa POR AT (C)	97
FIGURA 26	- EFEITO DE GPf-S1 e GPf-S2 NA INIBIÇÃO DE TROMBINA POR AT (A) OU HCII (B) E DO FATOR Xa POR AT (C)	98

FIGURA 27	- EFEITO DE FmgLe-S1 NA INIBIÇÃO DE α -TROMBINA POR AT (A) OU HCII (B) E DO FATOR Xa POR AT (C).....	100
FIGURA 28	- EFEITO DE MgPr-S1 NA INIBIÇÃO DE TROMBINA POR AT (A) OU HCII (B) E DO FATOR Xa POR AT (C)	102
FIGURA 29	- EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS NA INIBIÇÃO DA TROMBINA POR AT (A), POR HCII (B) E DO FATOR Xa POR AT (C).....	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- QUANTIDADE DE REAGENTES UTILIZADOS PARA SULFAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS	51
TABELA 2	- POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS	59
TABELA 3	- COMPONENTES ESTRUTURAIS DE GAb E GAb-S1, BASEADOS NA ANÁLISE DE METILAÇÃO	64
TABELA 4	- COMPONENTES ESTRUTURAIS DE GPf, GPf-S1 E GPf-S2, BASEADOS NA ANÁLISE DE METILAÇÃO	68
TABELA 5	- COMPONENTES ESTRUTURAIS DE FmgLe E FmgLe-S1, BASEADOS NA ANÁLISE DE METILAÇÃO	71
TABELA 6	- COMPONENTES ESTRUTURAIS DE MgPr E MgPr-S1, BASEADOS NA ANÁLISE DE METILAÇÃO	74
TABELA 7	- ATIVIDADE ANTICOAGULANTE, AVALIADA POR aTPP, DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	79
TABELA 8	- ATIVIDADE ANTICOAGULANTE, AVALIADA POR TT, DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	83

LISTA DE SIGLAS E DE ABREVIATURAS

δ	- deslocamento químico
Ac ₂ O	- anidrido acético
ADP	- adenosina difosfato
aPTT	- Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada
AT	- antitrombina
D ₂ O	- água deuterada
DP	- desvio padrão
DS	- grau de substituição
dn/dc	- variação do índice de refração em relação à concentração
EPM	- erro-padrão da média
EPCR	- receptor no endotélio da proteína C reativa
FmgLe	- fucomanogalactana obtida de <i>Lentinus edodes</i>
FmgLe- S1	- fucomanogalactana obtida de <i>Lentinus edodes</i> quimicamente sulfatada
GAb	- glucana obtida de <i>Agaricus blazei</i>
GAb-S1	- glucana obtida de <i>Agaricus blazei</i> quimicamente sulfatada
GC-MS	- cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GPf	- glucana obtida de <i>Pleurotus florida</i>
GPf- S1	- glucana obtida de <i>Pleurotus florida</i> quimicamente sulfatada, um ciclo

GPf- S2	- glucana obtida de <i>Pleurotus florida</i> quimicamente sulfatada, dois ciclos
HCII	- cofator II da heparina
HPSEC-MALLS	- cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada à detectores de índice de refração e espalhamento de luz
IC ₅₀	- concentração capaz de inibir em 50% a atividade enzimática
MeI	- iodeto de metila
Me ₂ SO	- dimetilsulfóxido
Me ₂ SO ₄	- dimetilsulfato
MgPr	- manogalactana obtido de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>
MgPr-S1	- manogalactana obtido de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> quimicamente sulfatada
min	- minutos
M _w	- massa molar ponderal média
NaB ² H ₄	- boroidreto de sódio deuterado
NaN ₃	- azida de sódio
NaOH	- hidróxido de sódio
NaSO ₃	- sulfato de sódio
ppm	- parte por milhão
PAI	- inibidores dos ativadores de plasminogênio
PRP	- plasma rico em plaqueta
RMN-C ¹³	- ressonância magnética nuclear de carbono treze
TAFI	- inibidor ativado pela trombina
TFA	- ácido trifluoracético

TF	- fator tissular
TFPI	- inibidor da via do fator tissular
TIH	- trombocitopenia induzida por heparina
t-PA	- ativador do plasminogênio tecidual
UI	- unidades internacionais
u-PA	- ativador de plasminogênio tipo uroquinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 HEMOSTASIA.....	25
2.2.1 Modelo Clássico da Cascata de Coagulação Sanguínea	25
2.2.1.1 Via extrínseca	26
2.2.1.2 Via intrínseca	26
2.2.1.3 Via final comum.....	27
2.2.2 Modelo de Hemostasia Baseado na Célula	27
2.2.2.1 Fase de iniciação	28
2.2.2.2 Fase de amplificação	28
2.2.2.3 Fase de propagação	29
2.2.3 Sistema Anticoagulante.....	31
2.2.3.1 Inibidor da via do fator tissular.....	31
2.2.3.2 Antitrombina	31
2.2.3.3 Proteína C	32
2.2.3.4 Cofator II da heparina.....	32
2.2.3.5 Fibrinólise.....	32
2.2 TROMBOSE	33
2.3 AGENTES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICOS	35
2.3.1 Heparina	35

2.3.1.1 Atividade anticoagulante da heparina.....	36
2.3.1.2 Limitações do uso da heparina.....	37
2.3.2 Heparina de Baixa Massa Molar	38
2.3.3 Outros Agentes Anticoagulantes	39
2.4 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	39
2.5 POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS.....	42
3 JUSTIFICATIVAS	46
4 OBJETIVOS	47
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
5.1 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E AVALIADOS QUANTO ÀS ATIVIDADES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICAS	49
5.1.1 β -D-(1 \rightarrow 6)-Glucana	49
5.1.2 β -D-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-Glucana	49
5.1.3 Fucomanogalactana.....	49
5.1.4 Manogalactana.....	50
5.2 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS	50
5.3 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO	51
5.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	52
5.4.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	52
5.4.2 Análise de Metilação dos Polissacarídeos Sulfatados	52
5.4.3 Determinação da Homogeneidade e Massa Molar.....	53
5.5 TESTES ANTICOAGULANTES <i>IN VITRO</i>	54

5.5.1 Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (aPTT)	54
5.5.2 Tempo de Trombina (TT)	55
5.6 TESTES <i>IN VIVO</i>	56
5.6.1 Modelo de Trombose Venosa Estase-Induzida em Ratos	56
5.6.2 Determinação da Tendência Hemorrágica	56
5.7 ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	57
5.7.1 Agregação Plaquetária com ADP	57
5.7.2 Agregação Plaquetária com α -Trombina	57
5.8 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE α -TROMBINA OU FATOR Xa	58
5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	58
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1 SULFATAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS	59
6.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS	61
6.2.1 Análise da Homogeneidade e Cálculo da M_w dos Polissacarídeos Quimicamente Modificados	61
6.2.2 Análise de RMN-C ¹³ e Metilação dos Polissacarídeos Quimicamente Modificados	62
6.3 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>IN VITRO</i>	76
6.3.1 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT)	76
6.3.1 Tempo de Trombina (TT)	79
6.4 TESTES <i>IN VIVO</i>	85
6.4.1 Modelo de Trombose Venosa Estase-Induzida em Ratos	85
6.4.2 Determinação da Tendência Hemorrágica	88

6.5 ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	90
6.5.1 Agregação Plaquetária com ADP	90
6.5.2 Agregação Plaquetária com α -Trombina.....	93
6.6 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TROMBINA OU FATOR Xa	95
7 CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS	109
ANEXO I.....	120
ANEXOII.....	122
ANEXOIII.....	124

1 INTRODUÇÃO

A hemostasia é um processo fisiológico que envolve a coagulação sanguínea e sua interrupção, sendo que o desequilíbrio neste processo é a origem de muitas doenças isquêmicas e hemorrágicas. Vários agentes antitrombóticos são utilizados na prevenção e tratamento de desordens tromboembólicas, sendo a heparina, uma glicosaminoglicana altamente sulfatada, o agente mais comumente utilizado. Porém, diversos efeitos adversos da heparina têm sido descritos, como por exemplo, hemorragia, trombocitopenia, necrose quando aplicada por via subcutânea e osteoporose (DE KORT; BUISMAN; VAN BOECKEL, 2005; GREINACHER e WARKENTIN, 2006). Além desses efeitos adversos, a heparina apresenta uma diversidade estrutural, problemas com contaminação por patógenos animais e poucas fontes de extração (PERRINAUD *et al.*; 2006). Sendo assim, é importante a busca de novos compostos com atividades semelhantes, menos efeitos adversos e que sejam provenientes de fontes não- animais.

Dentre os compostos que podem ser utilizados como agentes anticoagulantes, destacam-se os polissacarídeos sulfatados. Estes polímeros compreendem um complexo grupo de macromoléculas, naturalmente ou quimicamente sulfatadas, com uma ampla faixa de propriedades biológicas (CHAIDEDGUMJORN *et al.*, 2002). Polissacarídeos naturalmente sulfatados que apresentam atividade anticoagulante e antitrombótica são, em geral, isolados de algas e invertebrados, os quais também podem apresentar uma grande diversidade estrutural (MULLOY; MOURÃO; GRAY, 2000). Dentre os polissacarídeos quimicamente sulfatados que podem atuar como anticoagulantes pode-se citar a quitina e quitosana, glucanas, galactomananas, galactanas, que podem ser obtidos de diversas fontes, como por exemplo, de líquens, fungos e plantas. Estas moléculas também podem apresentar atividades antivirais e antiinflamatórias (SIÈ *et al.*, 1989; BODE e FRANZ, 1991; STUELP, 1997, HUANG *et al.*, 2003; MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005a; MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005b).

Polissacarídeos de fungos, principalmente de basidiomicetos, têm sido amplamente estudados devido às suas atividades antitumorais, antivirais, entre outras (SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002). Estas estruturas podem ser isoladas do corpo de frutificação, do esclerócio, do micélio ou de exopolissacarídeos

provenientes das culturas em laboratório destes organismos. Devido aos altos teores de polissacarídeos encontrados nos basidiomicetos, as atividades biológicas atribuídas a estes polissacarídeos e por estes organismos serem de fácil cultivo, o estudo de polissacarídeos extraídos destes fungos irá contribuir na busca de novos compostos que possam ser usados como agentes anticoagulantes e antitrombóticos. Como estas moléculas não apresentam grupos sulfatos naturais em sua estrutura, a modificação química dos polissacarídeos nativos é importante, uma vez que a atividade anticoagulante é relacionada à presença de grupos sulfatos.

Este trabalho busca polissacarídeos obtidos de basidiomicetos e quimicamente sulfatados que possam atuar como uma alternativa ao uso da heparina como droga anticoagulante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HEMOSTASIA

A hemostasia é um processo fisiológico de equilíbrio da formação do coágulo (pré-coagulação), dos processos de parada de formação de coágulo (anticoagulação) e de dissolução do coágulo (fibrinólise).

Quando ocorre a lesão de um vaso, uma série de reações ocorre para tentar reparar a injúria. Primeiro há uma constrição do vaso para diminuir o fluxo sanguíneo no local. A fase seguinte, pró-coagulação, leva à produção de fibrina a partir de fibrinogênio e agregação de fibrina em uma rede insolúvel. Durante o mesmo período há agregação plaquetária. As alterações morfológicas nas plaquetas causam a liberação de compostos químicos que aumentam a agregação plaquetária, entre eles, vasoconstritores e enzimas que atuam diretamente na formação do coágulo. A próxima fase é a anticoagulação, a qual impede a formação excessiva do coágulo. A fibrinólise ocorre quando o vaso lesionado está reparado para impedir novos sangramentos (COLMAN, 2006).

2.1.1 Modelo Clássico do Sistema de Coagulação Sanguínea

O modelo clássico do sistema de coagulação foi introduzido em 1964 por dois grupos independentes, Macfarlane (1964) e Davie & Ratnoff (1964). Neste modelo, a ativação de cada fator de coagulação promove a ativação de outros fatores de coagulação, como consequência, ocorre à produção de trombina e formação do coágulo. Neste modelo a coagulação envolve duas vias: intrínseca (via do fator do contato) e extrínseca (via do fator tissular), sendo que ambas levam à ativação do fator X (via final comum - FIGURA 1). Essa divisão da cascata de coagulação auxilia a interpretação de exames laboratoriais, porém as vias não ocorrem de maneira independente. (VINE, 2009).

2.1.1.1 Via extrínseca ou via do fator tecidual

Esta via recebeu este nome após observarem que o fator desencadeante que facilitava a coagulação não se encontrava no sangue circulante, sendo este fator a tromboplastina tecidual (fator III) ou fator tissular (TF) (MURRAY *et al.*, 2007).

Quando o fator tissular é exposto após uma lesão do vaso, liga-se ao fator VII, o qual é dependente de cálcio, formando um complexo que inicia o processo de coagulação do sangue ativando o fator X. Os fatores III e VII são exclusivos da via extrínseca (FRANCO, 2001; DEVLIN, 2007; MURRAY *et al.*, 2007).

O fator Xa e o fator Va formam um complexo que catalisa a formação de trombina por proteólise da protrombina. A pequena quantidade de trombina formada catalisa a ativação dos fatores V, VII, VIII e XIII, além da formação de fibrina (FRANCO, 2001; DEVLIN, 2007; MURRAY *et al.*, 2007).

2.1.1.2 Via intrínseca ou via do contato

A via intrínseca recebeu esta denominação, pois se observou que a coagulação do sangue ocorre espontaneamente quando este entra em contato com superfícies aniônicas, como por exemplo, vidro. Quando há uma lesão no endotélio superfícies de membrana aniônica são expostas. Essas superfícies aniônicas ligam-se a pré-caliceína, um cininogênio de alto peso molecular, ao fator XII e ao fator XI. Esse episódio é denominado de “fase de contato”. Essa fase ativa o fator XII, o qual ativa a pré-caliceína, gerando caliceína, desencadeando uma ativação recíproca. O fator XIIa ativa o fator XI. Na presença de Ca^{2+} o fator XIa ativa o fator IX e o fator IXa ativa o fator X. Para esta reação é necessário a montagem de um complexo na superfície das plaquetas, o qual é formado por Ca^{2+} e fator VIIIa. O fator VIII é ativado por pequenas quantidades de trombina (FRANCO, 2001; DEVLIN, 2007; MURRAY *et al.*, 2007).

2.1.1.3 Via final comum

Na via final comum da coagulação, o fator Xa ativa a protrombina (fator II) em trombina, a qual converte o fibrinogênio em fibrina formando um coágulo frouxo. Para estas reações ocorrerem é necessária a formação de um complexo de fosfolípidios plaquetários aniônicos, Ca^{2+} , fator Va, fator Xa e protrombina. A estabilização do coágulo é feita pelo fator XIIIa (JAY; LIU, 2006).

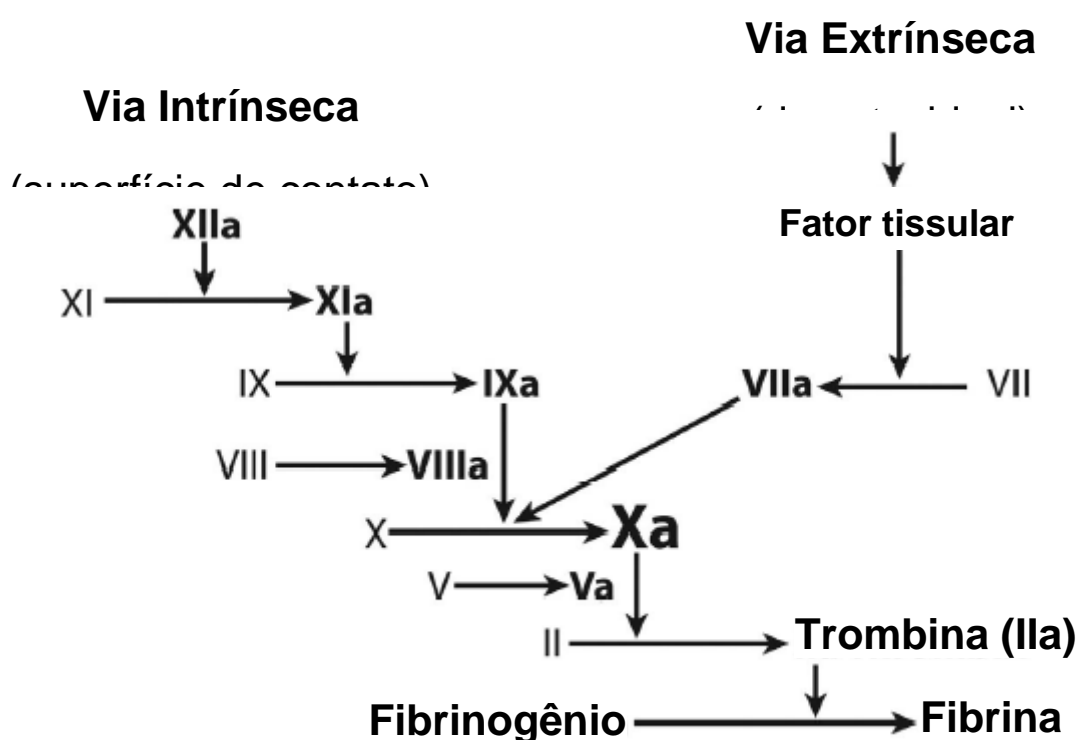


FIGURA 1 - MODELO CLÁSSICO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO

2.1.2 Modelo de Hemostasia Baseado na Célula

Atualmente outro modelo de coagulação tem sido sugerido: o modelo de hemostasia baseado na célula, como explicação do porquê que a ativação do fator X pela via extrínseca não compensa a falta do fator VIII (hemofilia A) ou do fator IX (hemofilia B). Neste modelo o processo de hemostasia é descrito como a

sobreposição de três fases: iniciação, amplificação e propagação (HOFFMAN e MONROE III, 2001).

2.1.2.1 Fase de iniciação

O processo de coagulação do sangue inicia-se quando ocorre a lesão do vaso e há exposição de colágeno e das células que expressam fator tissular. O fator VII circulante, liga-se rapidamente ao TF celular exposto formando um complexo TF/VIIa. Este complexo ativa o fator IX e o fator X. O fator IXa migra e liga-se a superfície das plaquetas. O fator Xa liga-se as células endoteliais e, caso o fator Xa se dissocie das células, ele é rapidamente inativado por antitrombina e pelo inibidor da via do TF. O fator Xa que continua ligado à célula ativa o fator V e o complexo formado, Xa/Va, converte uma pequena quantidade de protrombina em trombina (FIGURA 2A), que é a chave para a fase de amplificação (ROMMEY; GLICK, 2009; VINE, 2009).

2.1.2.2 Fase de amplificação

A adesão das plaquetas ao colágeno subendotelial é mediada por um receptor específico (glicoproteína Ia/IIa) e pelo fator de von Willebrand, os quais formam uma ligação entre as fibras de colágeno e as plaquetas, ativando-as.

A pequena quantidade de plaquetas ativadas gerada amplifica o processo de ativação das plaquetas, aumenta a adesão plaquetária e ativa os fatores V, VIII e XI. Na superfície dessas plaquetas ativadas estão os fatores Va, VIIIa, e IXa (FIGURA 2B) (ROMMEY; GLICK, 2009; VINE, 2009).

2.2.2.3 Fase de propagação

A fase de propagação é caracterizada pela produção de complexos de tenase (VIIIa/IXa) que ativam o fator X, o qual se complexa com o fator Va (protrombinase), o qual converte uma grande quantidade de protrombina em trombina que irá converter o fibrinogênio solúvel em fibrina e também ativar o fator XIII (estabilizador da rede de fibrina), formando um coágulo de fibrina estável (FIGURA 2C) (ROMMEY; GLICK, 2009; VINE, 2009).

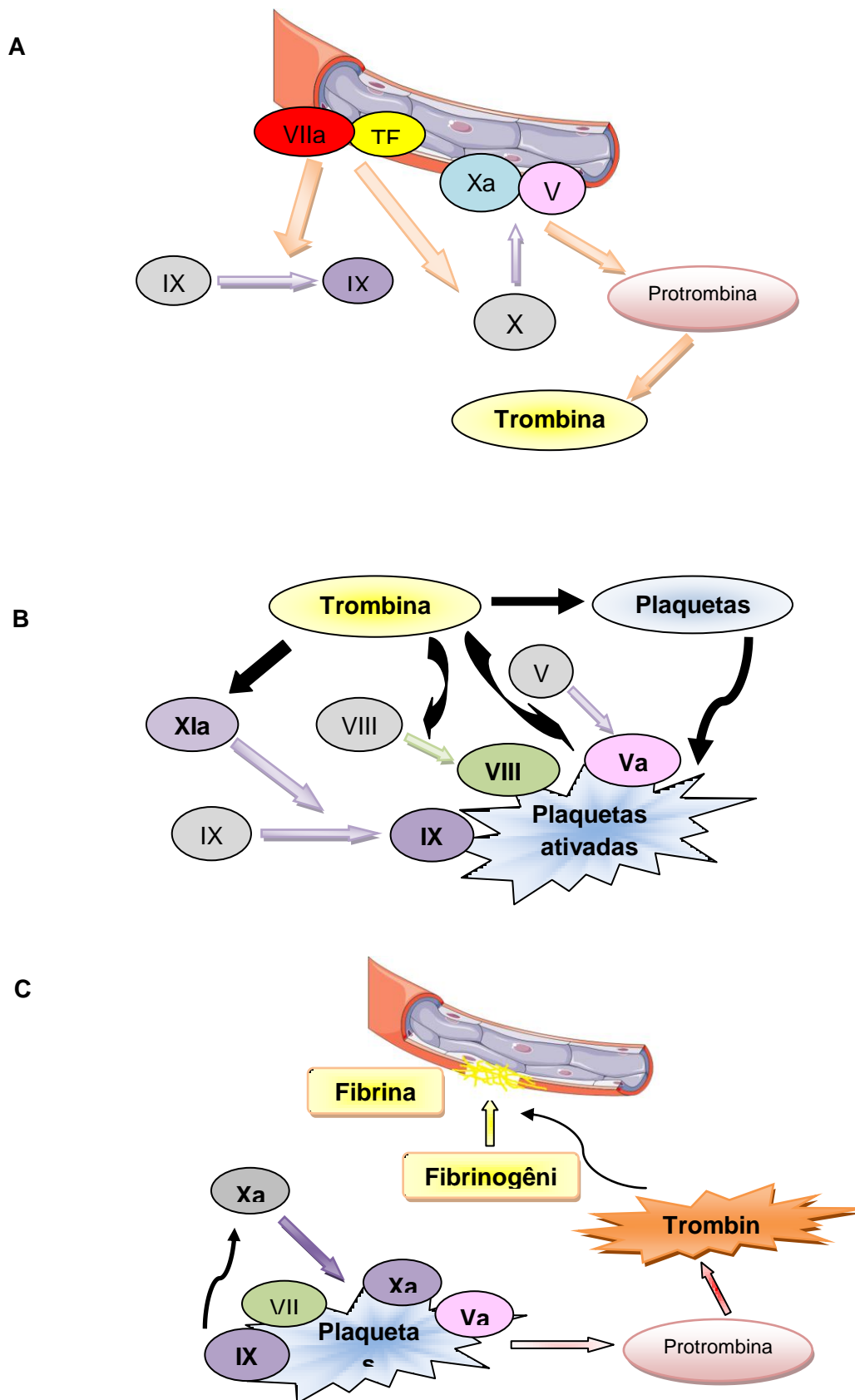


FIGURA 2 - MODELO DE HEMOSTASIA BASEADO NA CÉLULA. A) FASE DE INICIAÇÃO, B) FASE DE AMPLIFICAÇÃO E C) FASE DE PROPAGAÇÃO

2.1.3 Sistema Anticoagulante

O sistema de coagulação deve ser controlado, sendo que a concentração de trombina formada deve ser adequada e proporcional a injúria existente. Este sistema também deve prevenir a formação subsequente de fibrina ou ativação plaquetária.

2.1.3.1 Inibidor da via do fator tissular

A inibição do início da coagulação ocorre através do inibidor da via do fator tissular (TFPI), o qual bloqueia a atividade do complexo VIIa/TF (DEVLIN, 2007). O TFPI é uma glicoproteína com três domínios inibitórios, denominados de K-1, K-2 e K-3. O domínio K-1 forma um complexo com VIIa/TF inibindo-o, o domínio K-2 inibe a atividade do fator Xa e o domínio K-3 tem afinidade com a heparina e outros glicosaminoglicanos (MINE *et. al.*, 2002). O TFPI é produzido, principalmente, nas células endoteliais.

2.1.3.2 Antitrombina

A antitrombina (AT) é uma serpina de 58 KDa, produzida pelo fígado e circula pela corrente sanguínea em uma concentração de 2,4 μ M. Esta serpina é um inibidor primário da trombina, além de exercer efeito inibitório sobre outras enzimas da coagulação, incluindo os fatores IXa, Xa e XIa. A antitrombina também acelera a dissociação do complexo VIIa/TF (FRANCO, 2001; PATEL; BERRY; CHAN, 2007).

A atividade endógena da AT é enormemente aumentada pela presença de heparina. Esta se liga a sítios específicos da AT, induzindo uma alteração conformacional promovendo sua ligação à trombina e outras moléculas (WINDSTETTER; HUBER; GULBA, 1994).

2.1.3.3 Proteína C

A proteína C é uma proteína plasmática vitamina K-dependente. Esta proteína para tornar-se ativa deve se ligar ao seu receptor no endotélio (EPCR) e ao complexo formado entre a trombina e a trombomodulina (outra proteína endotelial). Para a proteína C clivar os fatores Va e VIIIa, ela deve dissociar-se do EPCR e ligar-se a proteína S (um cofator não enzimático) (FRANCO, 2001).

A proteína C ativada também exerce uma atividade citoprotetora, antiinflamatória e de modulação da expressão gênica (VINE, 2009).

2.1.3.4 Cofator II da heparina

O cofator II da heparina (HCII) é outro inibidor de trombina dependente de heparina. É uma glicoproteína, homóloga à antitrombina e a outros membros da família das serpinas. O cofator II não tem atividade contra outras proteases envolvidas na coagulação ou fibrinólise e, sozinho, inibe a trombina em uma baixa taxa, mas esta inibição aumenta drasticamente na presença de heparina, heparan sulfato ou dermatan sulfato. Em comparação com a AT, maiores concentrações de heparina são necessárias para ativar o HCII e, em concentrações terapêuticas no plasma, a heparina preferencialmente estimula a AT (TOLLEFSEN, 2007).

2.1.3.5 Fibrinólise

A lise do coágulo de fibrina é mediada pela plasmina, a qual é formada a partir do plasminogênio pelo ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e pelo ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA).

A regulação da formação de plasmina é realizada, principalmente, pela α_2 -antiplasmina, a qual se liga a plasmina formando um complexo irreversível. Além

disso, a regulação é também realizada por inibidores dos ativadores de plasminogênio (PAI), sendo o PAI-1 o mais importante.

Outro inibidor da fibrinólise é o inibidor ativado pela trombina (TAFI). Este inibidor é ativado pela trombina, tripsina e plasmina, sendo capaz de inibir a fibrinólise pela remoção de unidades de lisina da molécula de fibrina (DEVLIN, 2007; MURRAY *et al.*, 2007).

2.2 TROMBOSE

A trombose é um distúrbio da hemostasia, caracterizada como um coágulo sanguíneo localizado, o qual pode ocorrer tanto nas artérias, quanto nas veias e tem um grande impacto médico. A patofisiologia da trombose arterial e da trombose venosa é diferente, resultando em diferentes tratamentos (MACKMAN, 2008). Porém, ambas as doenças estão relacionadas com os mecanismos da coagulação sanguínea e são problemas mundiais de saúde.

A trombose arterial (FIGURA 3) é caracterizada por uma ruptura da placa arteriosclerótica, envolvendo a ruptura do endotélio e a liberação dos constituintes da placa no lúmen do vaso sanguíneo, sendo o trombo formado rico em plaquetas (MAKCMAN, 2008).

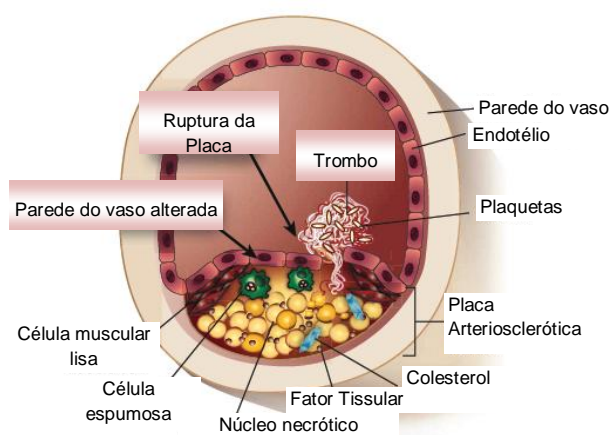


FIGURA 3 - TROMBOSE ARTERIAL. Adaptado de Mackman (2008)

Trombose profunda das veias e embolismo pulmonar são chamados, conjuntamente, de tromboembolismo venoso. Esta é uma doença de alta incidência, que atinge em média 108 pessoas a cada 100.000/ano e esta taxa aumenta progressivamente com o aumento da idade, sendo estimados 900.000 casos anualmente de tromboembolismo incidente ou recorrente nos EUA (HEIT, 2008). O trombo formado nestes casos é rico em fibrina e células sanguíneas vermelhas (FIGURA 4), onde o endotélio vascular continua intacto, porém pode ser convertido de uma superfície com propriedades anticoagulantes, para uma superfície com propriedades pró-coagulantes (MACKMAN, 2008). Geralmente, este problema, ocorre por mudanças na composição do sangue, redução ou parada do fluxo sanguíneo e/ou mudanças na parede do vaso promovendo a trombose (MACKMAN, 2008; VINE, 2009).

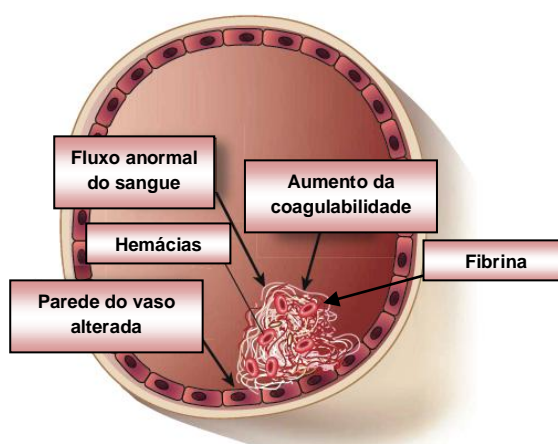


FIGURA 4 - TROMBOSE VENOSA. Adaptado de Mackman (2008)

Antigamente, os fatores de riscos para trombose arterial e trombose venosa eram considerados distintos, porém, recentemente tem-se aceitado que vários fatores são comuns entre as duas doenças, como: idade, obesidade, infecções, diabetes e síndromes metabólicas (FRANCHINI e MANNUCCI, 2008; MARTINELLI; BUCCIARELLI; MANNUCCI, 2010).

Alguns fatores de risco são relacionados com a trombose arterial, como hiperlipidemia e hipertensão (FRANCHINI e MANNUCCI, 2008).

Os fatores de risco de trombose venosa estão bem determinados, sendo relacionados a gravidez, terapia com estrógeno, paralisia, insuficiência cardíaca crônica, insuficiência pulmonar crônica, doença inflamatória crônica, tabagismo, histórico familiar, idade, obesidade, insuficiência venosa, trombofilias (resistência a

proteína C ativada), deficiência de proteína C, deficiência de proteína S, mutação do gene de protrombina (SHERMAN, 2006; MARTINELLI; BUCCIARELLI; MANNUCCI, 2010).

2.3 AGENTES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICOS

Doenças trombóticas são uma das principais causas de mortes mundiais, e o risco de desenvolvê-las aumenta com a idade. Nas últimas décadas, novos anticoagulantes têm sido desenvolvidos para a prevenção e tratamento da trombose.

Estes compostos evitam a coagulação sanguínea por interferirem nas vias deste processo. Os anticoagulantes são representados, principalmente, pela heparina, heparinas de baixa massa molar, anticoagulantes orais e inibidores diretos do sistema de coagulação.

2.3.1 Heparina

A heparina foi descoberta por Jay McLean em 1916, o qual demonstrou que este composto apresentava uma potente atividade anticoagulante. Porém, somente na década de 40 estudos demonstraram que a atividade anticoagulante da heparina era dependente de um componente plasmático, inicialmente chamado de cofator da heparina. Em 1968, Abildgaard confirmou estes dados após isolar, pela primeira vez, a antitrombina. A estrutura do local de ligação da heparina na antitrombina foi descrita em 1979 por Lindahl e colaboradores (PETITOU; CASU; LINDAHL, 2003).

A heparina é uma glicosaminoglicana, altamente sulfatada, de massa molar variável, entre 3 a 30 kDa, sintetizada por mastócitos. É um polissacarídeo linear, com unidades alternadas de α -D-glucosamina e ácido urônico (α -L-idurônico ou β -D-glucurônico) com ligações do tipo 1→4. As moléculas de ácido α -L-idurônico apresentam-se sulfatadas em OH-2 e em OH-6 e as moléculas de α -D-glucosamina apresentam-se N-sulfatadas ou N-acetiladas.

As funções da heparina no organismo ainda não estão bem esclarecidas. Acredita-se que ela não seja responsável pela fluidez sanguínea, pois esta função é desempenhada pelo heparan sulfato, uma molécula similar à heparina, mas com menor quantidade de grupos sulfato, o qual se localiza no endotélio vascular (STRINGER e GALLAGHER, 1997).

2.3.1.1 Atividade anticoagulante da heparina

O efeito anticoagulante da heparina é indireto, pois requer a antitrombina como cofator. A heparina aumenta a inibição da trombina pela antitrombina, por servir como um molde para que a trombina e a antitrombina liguem-se para formar um complexo ternário. Esta sequência específica também favorece a ligação da AT ao fator Xa.

O sítio de ligação da heparina à antitrombina é uma sequência pentassacarídica específica (FIGURA 5), a qual contém uma unidade de glucosamina 3-O-sulfatada, a qual se liga a um sítio rico em lisina da AT (LINDAHL *et al.*, 1979).

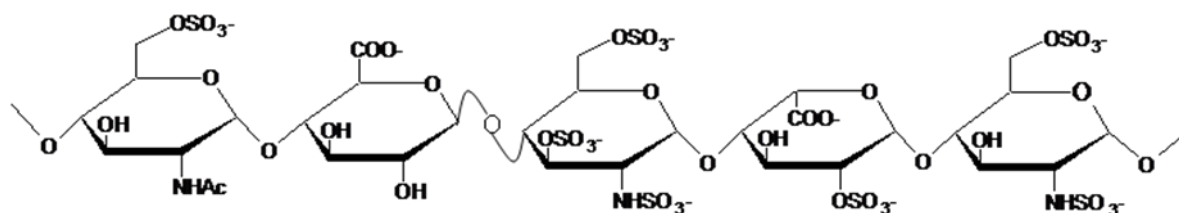


FIGURA 5 - SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA ESPECÍFICA DE LIGAÇÃO DA HEPARINA A ANTITROMBINA

Em concentrações mais altas, a heparina também catalisa a inibição da trombina pelo HCII. Esta reação ocorre com a ligação da heparina ao cofator e à trombina, criando uma conformação favorável para a interação. Este efeito,

aparentemente, não requer uma sequência oligossacarídica específica (SIÈ *et al.*, 1989)

Clinicamente a heparina é utilizada no tratamento de trombose venosa profunda, síndromes coronarianas, coagulação intravascular disseminada, hemodiálise, cirurgia com circulação extracorpórea e em coleta de sangue. Sua administração deve ser realizada por via intravenosa ou subcutânea, pois não é absorvida pelo trato gastrointestinal. Quando administrada pela via intravenosa, apresenta um efeito imediato. A via subcutânea apresenta uma absorção mais lenta e a duração do efeito depende da dose utilizada (MERLI, 2005).

2.3.1.2 Limitações do uso da heparina

Aproximadamente 10 a 20% dos pacientes que usam heparina desenvolvem trombocitopenia não imunogênica, a qual não é progressiva e não está associada a sangramento ou trombose. Uma forma menos frequente, mas mais severa de trombocitopenia, chamada de trombocitopenia induzida por heparina (TIH), ocorre em 1 a 5% de todos os pacientes expostos a heparina não fracionada (MENAJOVSKY, 2005). Esta doença é caracterizada pela presença de anticorpos contra o complexo formado, heparina-fator plaquetário 4, induzindo a ativação das plaquetas, que promovem geração de trombina e agregação plaquetária, sendo considerado um estado protrombótico (ALVING, 2003; SAVI *et al.*, 2003). Estes pacientes podem apresentar como consequência trombose venosa, embolia pulmonar, oclusão trombolítica de artérias, infarto agudo do miocárdio e derrame cerebral (GREINACHER e WARKENTIN, 2006). Além disso, a aplicação da heparina também pode causar hematomas, dermatites de contato, urticária e necrose da pele, quando administrada pela via subcutânea (PERRINAUD *et al.*; 2006; SANCHEZ-POLITTA; ANGELILLO-SCHERRER; BORRADORI, 2006).

Como a heparina é extraída da mucosa intestinal de porco e pulmão bovino, há um potencial risco de contaminação por patógenos animais. Após os problemas enfrentados com a encefalopatia espongiiforme bovina, ou doença da vaca louca, somente a heparina derivada de porco pode ser utilizada nos Estados Unidos da América e Europa (DE KORT; BUIJSMAN; VAN BOECKEL, 2005).

A heparina também apresenta um alto risco de causar hemorragia, por isso o paciente que a utiliza deve ser submetido a um monitoramento laboratorial contínuo. A dose deve ser individualizada, pois não há uma padronização, sendo indicado para o tratamento de trombose uma dose de 5.000 unidades intravenosa, seguido pela administração de 15-25 unidades/kg/h (MERLI, 2005; SHANNON, 2007).

2.3.2 Heparina de Baixa Massa Molar

Na tentativa de um melhor perfil farmacológico e farmacocinético da heparina, foram desenvolvidas heparinas de baixa massa molar (HBMM) (COHEN, 2000). Estas moléculas são produzidas a partir de heparinas não fracionadas por despolimerização controlada, obtendo-se heparinas com massa molar que varia entre 2 a 10 kDa (CAUGHEY, 2003). Estas moléculas apresentam a sequência pentassacarídica específica para a ligação com a AT e por consequência inibem o fator Xa, porém devido ao seu menor tamanho, as HBMM não conseguem se ligar a trombina e inibi-la (KAKKAR, 2004).

Apesar das HBMM apresentarem menos efeitos adversos que a heparina não fracionada, estes polímeros ainda apresentam algumas limitações. Também são polímeros heterogêneos, pois não têm uma massa molar definida e, apesar de apresentarem a sequência sacarídica necessária para ação anticoagulante, sua cadeia polissacarídica é variável (CAUGHEY, 2003). As HBMM não respondem bem ao sulfato de protamina, antagonistas da heparina, no caso de uma superdosagem (SHANNON, 2007).

2.3.3 Outros Agentes Anticoagulantes

Existem outros agentes anticoagulantes utilizados clinicamente. O mecanismo de ação é diferente daquele da heparina, assim como seu uso clínico.

A warfarina é um composto cumarínico e sua ação anticoagulante é por inibição da síntese das formas ativas de quatro proteínas pró-coagulantes dependentes de vitamina K: fatores II, VII, IX e X. A ativação destas proteínas é dependente da γ -carboxilação por uma enzima carboxilase dependente de vitamina K, ou seja, a warfarina atua bloqueando a regeneração da vitamina K reduzida (JAY e LIU, 2006; WU, 2001).

Além destes, há alguns inibidores diretos e indiretos do fator Xa, como por exemplo, o Fondaparinux e Denaparóide (JAY e LIU, 2006).

Inibidores da trombina também estão sendo amplamente estudados. Estes anticoagulantes são os medicamentos de escolha para o tratamento de pacientes com trombocitopenia induzida por heparina (MACKMAN, 2008). O Hirudin é um polipeptídeo isolado da saliva da sanguessuga *Hirudo medicinalis*. A partir desta molécula outras substâncias foram desenvolvidas, entre elas, Hirulog, Hirugen e Argotroban (WINDSTETTER; HUBER; GULBA, 1997; JAY e LIU, 2006).

A proteína C ativada, *in vivo*, destrói os fatores V e VIII ativados interrompendo assim a cascata de coagulação. A administração de trombomodulina solúvel também inibe diretamente os fatores V e VIII ativados (WINDSTETTER; HUBER; GULBA, 1997; HIRSH, 2003; YAVIN; WOLOZINSKY; COHEN, 2005).

Outras drogas utilizadas são os inibidores da agregação plaquetária, por exemplo, o ácido acetil salicílico e anti-inflamatórios não-esteróides, os quais inibem o sistema da ciclo-oxigenase plaquetária envolvida com a formação do tromboxano A₂ (JAY e LIU, 2006). O Triclopídine e Clopidogrel bloqueiam irreversivelmente a ligação do ADP ao receptor plaquetário P2Y, inibindo a agregação plaquetária (JAY e LIU, 2006).

Estes anticoagulantes são usados na prevenção de tromboembolia, porém não são tão eficazes quanto à heparina no tratamento de tromboembolia aguda, especialmente nas tromboembolias pulmonares (CAHGHEY, 2003).

2.4 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Atualmente, há um grande interesse na busca de compostos que possam atuar como alternativas para a heparina. Como dito anteriormente, os grupos

sulfatos presentes na molécula de heparina são grandes contribuintes para sua atividade anticoagulante. Como resultado, uma das estratégias na busca de alternativas tem sido a avaliação do potencial anticoagulante de outros polissacarídeos sulfatados, os quais podem ser naturais ou quimicamente modificados. A ação anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados é, principalmente, por potencializar a ação de inibidores das proteases plasmáticas, tais como AT e HCII, ou inibi-las diretamente (POMIN, 2009).

Polissacarídeos sulfatados são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados como componentes de matriz extracelular, na superfície de células de vertebrados ou são sintetizados por organismos marinhos (ALBAN; SCHAUERTE; FRANZ, 2001).

Dentre os polissacarídeos naturalmente sulfatados, destacam-se os polímeros isolados de algas marinhas, como carragenanas e fucoidanas. A atividade anticoagulante destes compostos depende da massa molar e da composição química, especialmente dos conteúdos de fucose e sulfato (NISHINO; AIZU; NAGUMO, 1991).

Galactanas sulfatadas isoladas de algas marinhas, carragenanas ou agaranas, são compostas por unidades alternadas de β -galactopiranosose 3-O-ligadas e α -galactopiranosose 4-O-ligadas. Uma galactana sulfatada da alga *Gelidium crinale*, composta por estas unidades repetitivas e quantidades variáveis de sulfato apresentou uma menor atividade anticoagulante quando comparada com um polissacarídeo similar obtido da alga *Botryocladia occidentalis* e heparina padrão (PEREIRA *et al.*, 2005). Em outro estudo com polissacarídeos destas duas algas, o polissacarídeo isolado de *G. crinale* exibiu uma atividade pró-coagulante em baixas doses, e em altas doses inibiu a trombose arterial e venosa em ratos. Em contraste, a galactana de *B. occidentalis* apresentou um potente efeito anticoagulante e antitrombótico em baixas doses (FONSECA *et al.*, 2008). Outro polissacarídeo, composto principalmente por galactose e pequenas quantidades de glucose e 13,1% de sulfato, apresentou uma atividade anticoagulante, *in vitro*, na concentração de 15 μ g/ml. Para a obtenção deste material, partiu-se de 4 g e obteve-se 4 mg de polissacarídeo puro, sendo este um rendimento muito baixo. Portanto, a aplicação desta molécula como uma real alternativa ao uso da heparina não é aplicável, uma vez que seriam necessárias grandes quantidades de alga para a obtenção deste

polissacarídeo com ação. Além disso, a posição dos grupos sulfatos não foi determinada e a fração apresentava 7,8% de proteína (MATSUBARA *et al.*, 2001).

Em um estudo publicado por Athukorala e colaboradores (2007), os extratos aquosos de 22 espécies de algas foram avaliados em relação à atividades anticoagulantes. Os extratos de duas espécies, *Colodium fragile* e *Sargassum horneri*, apresentaram maior tempo de coagulação quando avaliados pelo teste de tromboplastina parcial ativada (aPTT). Os extratos foram analisados quanto às suas composições e apresentaram 80% de carboidrato e 19% de proteína para a alga *C. fragile* e 97% de carboidrato e ~2% de proteína para a alga *S. horneri*. Nenhum outro estudo foi realizado, como por exemplo, composição monossacarídica, quantidade de sulfato e homogeneidade. Outro estudo com a alga *Ecklonia cava*, apresentou um polissacarídeo composto, principalmente, por fucose e pequenas quantidades de glucose, porém a estrutura do polissacarídeo também não foi detalhada (ATHUKORALA; LEE; JEON, 2006).

Os estudos citados ilustram a grande variação estrutural dos polissacarídeos obtidos devido diferença entre espécies, coletas em diferentes ambientes ou em diferentes épocas do ano. Esta grande variação estrutural contribui para a grande heterogeneidade e complexidade de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas, indicando a necessidade de uma cuidadosa (da padronização da) análise estrutural e determinação das atividades anticoagulantes.

Na tentativa de se conseguir polissacarídeos com uma menor variação na estrutura e na quantidade de sulfato presente, outras fontes destes polímeros têm sido estudadas. Estes polissacarídeos são, normalmente, moléculas neutras que são sulfatados quimicamente.

Alguns polissacarídeos de líquens foram isolados e quimicamente sulfatados. Stuelp (1997) avaliou a atividade anticoagulante de uma α - e uma β -glucana isolada de *Ramalina celastri*. A α -glucana apresentou uma atividade máxima para os testes de aPTT e TT nas doses de 13 e 18 μ g/ml de plasma, respectivamente. Em outro estudo com polissacarídeos de líquens, uma galactoglucomanana isolada de *Cladonia ibitipocae*, após sulfatação química, apresentou 42,2 % de sulfato e inibiu totalmente a formação de trombo *in vivo*, após administração intravenosa de uma solução à 2 mg/kg do animal (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005b). No mesmo modelo animal de trombose, uma β -glucana

com ligações (1→6) isolada de *Parmotrema mantiqueirense*, contendo 76,8% de sulfato após modificação química, também inibiu a formação do trombo (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005a).

Apesar de polissacarídeos de líquens apresentarem uma boa atividade anticoagulante, seu uso é limitante, uma vez que estes organismos não são encontrados abundantemente na natureza e são de difícil cultivo em laboratório.

Também há relatos na literatura de polissacarídeos de outras fontes que apresentam atividade anticoagulante, como por exemplo, quitina e quitosana isolados de fungos (VIKHOREVA *et al.*, 2005) e exopolissacarídeos produzidos por bactérias (COLLIEC-JOUAULT *et al.*, 2001; HAN *et al.*, 2005). Porém estes estudos também não detalham as estruturas necessárias para a ação.

Na contínua busca por alternativas à heparina, uma pectina cítrica foi parcialmente hidrolisada, os polissacarídeos resultantes de alta e baixa massa foram separados por diálise e foram sulfatados. Os dois polissacarídeos apresentam a mesma cadeia de α -D-ácido galactourônico (1→4)-ligado, sulfatado em OH-2 e OH-3. Os dois polissacarídeos apresentaram atividade *in vitro*, porém a pectina de alta massa foi mais potente *in vivo*, inibindo em 100% a formação de trombo em uma dose de 3,5 mg/kg. Estes polissacarídeos também inibiram diretamente a trombina e o fator Xa por um mecanismo independente de AT ou HCII (CIPRIANI *et al.*, 2009).

Além das atividades anticoagulantes, polissacarídeos sulfatados também podem apresentar atividades anti-arterioesclerótica, antiproliferativa, anti-angiogênica, antiviral, anti-inflamatória e antimetástática (YOSHIDA *et al.*, 1995; ALBAN; SCHAUERTE; FRANZ, 2002).

2.5 POLISSACARÍDEOS DE BASIDIOMICETOS

Os basidiomicetos representam uma fonte alternativa para isolamento de polissacarídeos, pois possuem altos teores de polissacarídeos, apresentam polímeros com uma ampla diversidade estrutural, e são organismos de fácil cultivo (GRACHER, 2005).

Entre os polímeros encontrados pode-se destacar as glucanas, as heterogalactanas e as xilomananas. Estes polissacarídeos podem apresentar as

mais variadas estruturas, por exemplo, estruturas lineares ou ramificadas, grupos metil, entre outras características (BJÖRNDAL; LINDEBERG, 1969; USUI; IWASAKI; MIZUNO, 1981; ROSADO *et al.*, 2003; CARBONERO *et al.*, 2006).

As glucanas que apresentam uma cadeia principal de β -glucose com ligações (1 \rightarrow 3), substituídas em O-6 por terminais não redutores de β -Glc ρ são os polissacarídeos que têm despertado maior interesse devido às suas variadas atividades biológicas. Estas moléculas foram isoladas de *Pleurotus eryngii* (CARBONERO *et al.*, 2006), *Auricularia aurícula* (MISAKI *et al.*, 1981), *Boletus erythroporus* (CHAUVEAU *et al.*, 1996), *Ganoderma applanatum* (USUI *et al.*, 1981), entre outros basidiomicetos (GRACHER, 2005). Um exemplo da diversidade de ação biológica que estes polissacarídeos podem apresentar foi mostrado em um estudo com uma glucana isolada de *P. pulmonarius*, a qual apresentou uma resposta anti-inflamatória dose dependente, reduzindo a migração de leucócitos para os tecidos em 82%, com uma IC₅₀ de 1,19 mg/kg (SMIDERLE *et al.*, 2008a).

Diversas glucanas também foram avaliadas como agentes antitumorais. A atividade de glucanas isoladas de *Ganoderma lucidum* (USUI *et al.*, 1981), *Grifora umbellata* (UENO *et al.*, 1982), *Lentinus edodes* (SASAKI; TAKASURA, 1976) foi avaliada contra Sarcoma 180 implantados em camundongos e apresentaram bons resultados: 100%, 90% e 73% de regressão tumoral respectivamente. Esta ação biológica está amplamente revisada na literatura (SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002; WASSER, 2002; BORCHERS; KEEN; GERSHWIN, 2004).

A maioria das heterogalactanas de basidiomicetos é formada por uma cadeia principal de unidades de α -D-Gal ρ (1 \rightarrow 6) ligadas contendo diferentes substituintes, principalmente fucose ou manose. Estas estruturas já foram isoladas de vários basidiomicetos, como exemplo, pode-se citar os estudos de caracterização estrutural realizados com *Laetiporus sulphureus* (ALQUINI *et al.*, 2004), *Flammulina velutipes* (MUKUMOTO; YAMAGUCHI, 1977), *Pleurotus sajor-caju* (ZHUANG *et al.*, 1993), entre outros (GRACHER, 2005).

Heterogalactanas com a mesma cadeia principal, mas apresentando grupos metil como substituintes, foram isolados de *Pleurotus ostratoroseus* (ROSADO *et al.*, 2003). Este tipo de estrutura não é comumente encontrada em cogumelos e pode exercer uma atividade biológica devido a este grupamento. Uma heterogalactana com a mesma cadeia principal isolada de *P. pulmonaris* apresentou uma atividade

antinociceptiva dose-dependente e inibiu em 93% a resposta à dor com uma dose de 30 mg/kg (SMIDERLE, 2008b). Fucogalactanas com a mesma cadeia principal de α -D-galacotopiranosose isolada de *A. blazei* e *A. bisporus* var *hortensis* foram testadas quanto às suas ações anti-inflamatórias e antinociceptivas. A fucogalactana de *A. bisporus* var *hortensis* apresenta a cadeia principal parcialmente O-metilada e apresentou atividade anti-inflamatória, inibindo em 60% a migração de leucócitos na concentração de 5 mg/kg, enquanto que a fucogalactana não metilada não apresentou atividade (KOMURA *et al.*, *in press*).

Outro grupo de heteropolímeros descritos são as xilomananas. Estas estruturas foram descritas para *Flammulina velutipes* (SMIDERLE *et al.*, 2006), *Tremella fuciformis* (DE BEATS; VANDAMME, 2001), *Armillaria mellea* (BOUVENG; FRASER; LINDBERG, 1967), entre outros basidiomicetos (GRACHER, 2005).

Além das diferentes estruturas de polissacarídeos que podem ser obtidos de basidiomicetos, estes organismos têm potencial de ser uma fonte econômica viável destes polímeros, pois apresentam altos teores de carboidratos em suas variadas estruturas macroscópicas: corpo de frutificação, micélio, esclerócio, além de produzirem exopolissacarídeos em condições de cultura adequada.

Entretanto, no momento, não se sabe realmente o potencial destes polissacarídeos como agentes anticoagulantes e antitrombóticos. Há apenas um estudo sobre a atividade anticoagulante de polissacarídeo isolado de cogumelo. Neste trabalho, foi isolado do cogumelo *Auricularia auricula* um polissacarídeo ácido composto por manose, glucose e xilose, o qual apresentou atividade anticoagulante *in vitro*. Porém não há um detalhamento da extração deste polissacarídeo, nem um estudo da química fina da sua estrutura (YOON *et al.*, 2003). Isto mostra que muitos estudos sobre a ação biológica dos polissacarídeos isolados de cogumelos precisam ser realizados.

Com o objetivo de avaliar outras atividades biológicas de polissacarídeos quimicamente sulfatados de basidiomicetos alguns estudos foram desenvolvidos. Uma glucana quimicamente sulfatada derivada do extrato aquoso de *Grifola frondosa* apresentou ação antitumoral e imunomodulatória *in vitro* e *in vivo* (NIE *et al.*, 2006). β -Glucanas quimicamente sulfatadas obtidas do esclerócio de *Pleurotus tuber-regium* foram avaliadas como um potencial agente antiviral e antitumoral (ZHANG *et al.*, 2004; TAO; ZHANG; CHEUNG, 2006).

Devido ao grande potencial de aplicação biológica dos polissacarídeos de basidiomicetos, a modificação química destes polissacarídeos pode ser uma alternativa no tratamento de doenças trombóticas. Além disso, o estudo químico destas cadeias polissacarídicas é importante para uma avaliação mais criteriosa de quais estruturas são necessárias para uma atividade anticoagulante e antitrombótica.

3 JUSTIFICATIVAS

Doenças trombóticas estão diretamente envolvidas com a coagulação sanguínea. Para controle destas patologias, inúmeros anticoagulantes podem ser utilizados, entre eles a heparina tem grande destaque. Porém, este glicosaminoglicano apresenta inúmeros efeitos adversos, entre eles, hemorragia, trombocitopenia, osteoporose e necrose da pele (via de administração subcutânea). Outro problema é que a heparina é obtida da mucosa intestinal de porco ou pulmão bovino, podendo apresentar contaminação por patógenos.

A busca de moléculas que possam ser uma alternativa ao uso da heparina tem gerado um grande interesse na área científica. Os basidiomicetos podem ser uma valiosa fonte destes compostos, uma vez que apresentam altos teores de polissacarídeos de fontes não-animais e têm uma grande aplicação biológica.

4 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a atividade anticoagulante e/ou antitrombótica de polissacarídeos, avaliando o potencial de ação de polissacarídeos nativos e quimicamente sulfatos de basidiomicetos, bem como sua influência nos componentes envolvidos na hemostasia.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sulfatar quimicamente polissacarídeos de basidiomicetos que foram previamente caracterizados estruturalmente;
- Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos quimicamente sulfatados por técnicas de RMN-C¹³, HPSEC-MALLS e metilação;
- Realizar testes anticoagulantes, *in vitro*, de aPTT e TT com os polissacarídeos nativos e os polissacarídeos sulfatados;
- Avaliar a atividade antitrombótica *in vivo* dos polissacarídeos sulfatados;
- Avaliar *in vivo* a tendência dos polissacarídeos sulfatados em causar hemorragia;
- Avaliar a ação dos polissacarídeos sulfatados sobre a agregação plaquetária;
- Avaliar a influência dos polissacarídeos sulfatados em proteínas da coagulação: fator Xa, antitrombina e cofator II.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E AVALIADOS QUANTO ÀS ATIVIDADES ANTICOAGULANTES E ANTITROMBÓTICAS

Foram estudados quatro polissacarídeos previamente isolados e caracterizados do corpo de frutificação de três basidiomicetos diferentes.

5.1.1 β -D-(1 \rightarrow 6)-Glucana

Uma glucana linear com ligações do tipo β -D-(1 \rightarrow 6) isolada do corpo de frutificação do basidiomiceto *Agaricus blazei* (FIGURA 6A e B) pela Dra. Elaine R. Carbonero e gentilmente cedida, denominada de GAb.

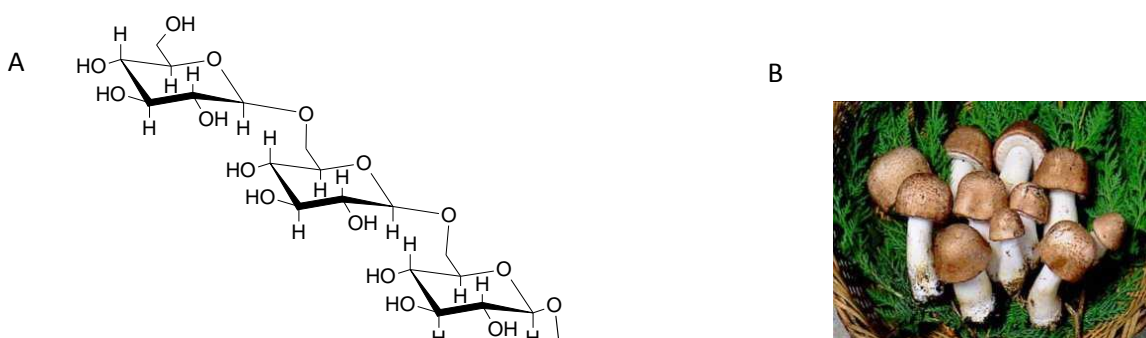


FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DA β -D-(1 \rightarrow 6)-GLUCANA (A) ISOLADA DO BASIDIOMICETO *Agaricus blazei* (B).

5.1.2 β -D-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-Glucana

Uma glucana com cadeia principal contendo ligações do tipo β -D-(1 \rightarrow 3), com substituições em O-6 por terminas não-redutores de glucose a cada quatro

unidades da cadeia principal isolada de *Pleurotus florida* (SANTOS-NEVES *et al.*, 2008), a qual foi denominada de GPf (FIGURA 7A e B).

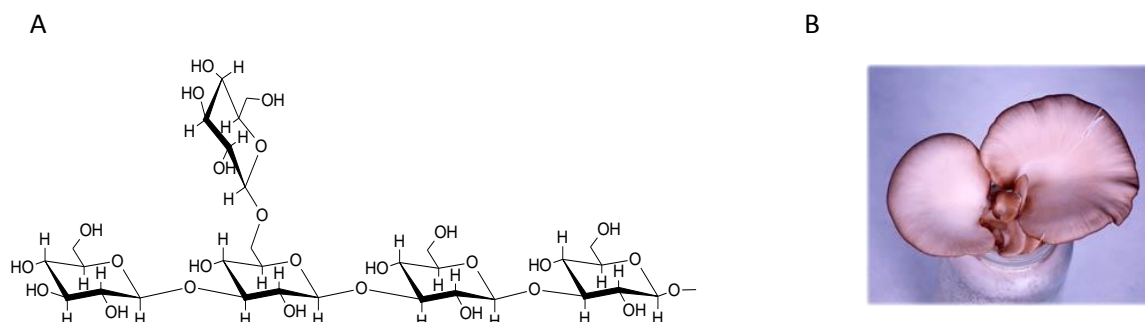


FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DA β -D-(1 \rightarrow 3)-(1 \rightarrow 6)-GLUCANA (A) ISOLADA DO BASIDIOMICETO *Pleurotus florida* (B).

5.1.3 Fucomanogalactana

Uma fucomanogalactana com cadeia principal de unidades de α -galactose ligadas (1 \rightarrow 6), parcialmente substituídas em O-2 por terminais não-redutores de β -D-manose ou α -L-fucose obtida do corpo de frutificação de *Lentinus edodes* (CARBONERO *et al.*, 2008), denominada de FmgLe (FIGURA 8 A e B).

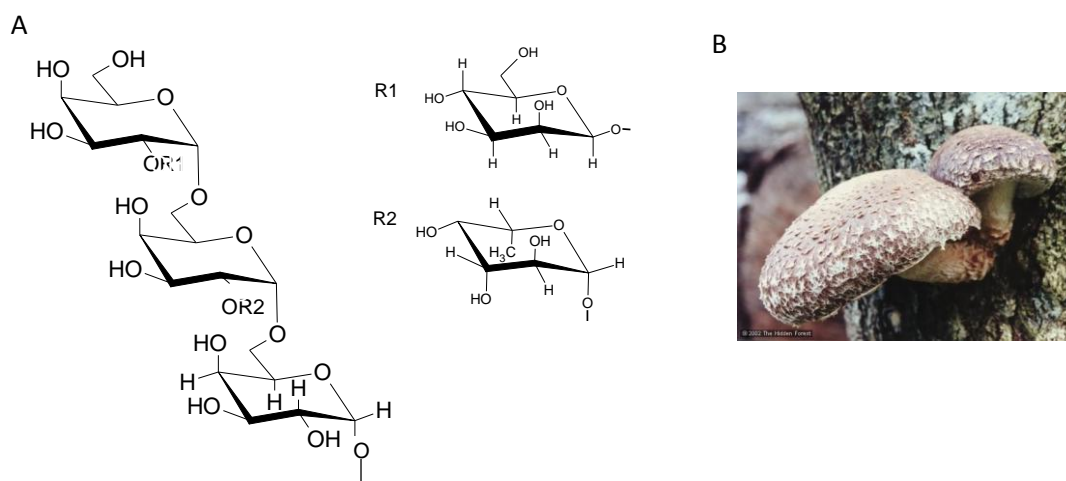


FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DA FUCOMANOGALACTANA (A) ISOLADA DO BASIDIOMICETO *Lentinus edodes* (B).

5.1.4 Manogalactana

Uma manogalactana com cadeia principal de unidades de α -galactose com ligações 1 \rightarrow 6, as quais se apresentam parcialmente 3-O-metiladas, além de algumas unidades serem O-2 substituídas por terminais não redutores de β -manose isolada do corpo de frutificação de *Pleurotus ostreoroseus* (ROSADO *et al.*, 2003), denominada de MgPr (FIGURA 9A e B).

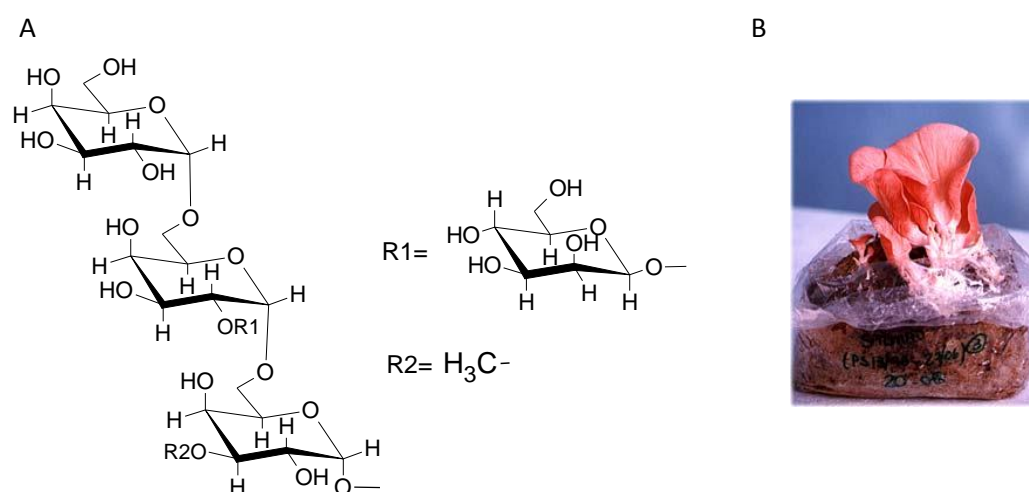


FIGURA 9 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MANOGALACTANA (A) ISOLADA DO BASIDIOMICETO *Pleurotus ostreoroseus* (B).

5.2 DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS

Todos os polissacarídeos foram sulfatados segundo a metodologia descrita por O'NEILL (1955), com algumas modificações.

Para a sulfatação os polissacarídeos foram pesados e solubilizados em formamida, seguida da adição do mesmo volume de piridina e da adição de ácido clorosulfônico, gota a gota, sob agitação a 0 °C, sendo a solução mantida a 4 °C por 12 horas (TABELA 1). Os volumes de reagentes utilizados foram calculados

correspondendo a, aproximadamente, 10 moles de ácido clorosulfônico/ mol de hidroxila livre. O bloqueio da reação foi realizado através da adição de gelo e a solução foi neutralizada com bicarbonato de sódio a 10% (p/v). Esta solução foi dialisada em água corrente e em água destilada.

TABELA 1 - QUANTIDADE DE REAGENTES UTILIZADOS PARA SULFATAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS

Polissacarídeo	Sigla ^a	Peso (mg) ^b	Formamida e piridina (ml) ^c	Ácido clorosulfônico (ml) ^d	Sigla ^e
β -D-(1→6)-Glucana	GAb	1600	50	12,5	GAb-S1
β -D-(1→3)-(1→6)-Glucana	GPf	700	100	10	GPf-S1
β -D-(1→3)-(1→6)-Glucana (S1)*	GPf-S1	780	80	20	GPf-S2
Fucomanogalactana	FmgLe	700	50	8,75	FmgLe-S1
Manogalactana	MgPr	360	26	4,5	MgPr-S1

^a Sigla dos polissacarídeos nativos

^b Quantidade de polissacarídeo utilizado para sulfatação química;

^c Para a sulfatação química foram utilizados os mesmos volumes de formamida e piridina;

^d Volume de ácido clorosulfônico utilizado para sulfatação química;

^e Sigla dos polissacarídeos sulfatados

* A β -D-(1→3)-(1→6)-glucana foi sulfatada duas vezes, sequencialmente.

5.3 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO

O grau de substituição (*DS*) foi determinado pelo método turbidimétrico descrito por DODGSON e PRINCE (1962). Os polissacarídeos (1 mg/ml) foram hidrolisados com HCl 1 M por 5 horas a 100 °C. O hidrolisado (0,2 ml) foi tratado com 3,8 ml de TCA 3% e com 1,0 ml de solução de cloreto de bário-gelatina. Após 15 min a temperatura ambiente a absorbância foi determinada a 360 nm. O teor de

sulfato foi determinado em relação a uma curva padrão de sulfato de sódio (20 a 180 µg/ml).

O grau de substituição dos polissacarídeos após a sulfatação química foi calculado a partir da seguinte fórmula (WHISTLER e SPENCER, 1964):

$$DS = 162 \times S^*/3200 - 102 \times S^* \text{ (para hexoses)}$$

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);

S* representa o teor de enxofre dado em porcentagem

5.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

5.4.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN- C¹³ foram realizadas em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX-400, incorporado a transformador de Fourier, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

Para obtenção dos espectros de RMN- C¹³ as amostras sulfatadas foram solubilizadas em D₂O e as análises realizadas a 70 °C, *overnight*. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm relativos à acetona em δ 30,2.

5.4.2 Análise de Metilação dos Polissacarídeos Sulfatados

A O-metilação parcial dos polissacarídeos sulfatados (5 mg) foi realizada usando NaOH 40% aq. com adição gota à gota de Me₂SO₄ (1 ml) (HAWORTH,

1915). O meio reacional foi neutralizado, dialisado e evaporado. A per-O-metilação completa foi realizada usando NaOH–Me₂SO–MeI (CIUCANU e KEREK, 1984). Os derivados per-O-metilados foram hidrolisados com 1 ml de ácido fórmico (45%, v/v) a 100 °C por 15 horas e após hidrólise o ácido foi evaporado até securo. A mistura resultante de O-metilaldoses foram ressuspensas em água destilada, reduzidas com NaB²H₄ e acetiladas com Ac₂O–piridina 1:1 (200 µl) *overnight* a temperatura ambiente. A mistura de acetatos de alditóis parcialmente O-metilados foi analisada por cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), usando um cromatógrafo Varian 3000 acoplado a um espectrômetro de massa *Ion-Trap* modelo 810 R-12, utilizando coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1 min/min, como gás de arraste. Os acetatos de alditóis foram analisados a uma temperatura de 50 – 220 °C (40 °C/min) (SASSAKI *et al.*, 2005).

5.4.3 Determinação da Homogeneidade e Massa Molar

A determinação da homogeneidade e da massa molar (M_w) dos polissacarídeos foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) Waters equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo Waters 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos Wyatt Technology (MALLS), modelo DAWN DSP-F. Foram utilizadas, em série, 4 colunas de gel permeação Waters com limites de exclusão de 1×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , 5×10^3 , o eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) 0,1 mol/l contendo azida de sódio (NaN₃) 0,5 g/l. As soluções de polissacarídeos (1 mg/ml) foram dissolvidas no mesmo solvente e filtradas em membrana de nitrocelulose (Millipore), com poros de 0,22 ou 0,45 µm. Para o cálculo da massa molar os polissacarídeos tiveram os valores de dn/dc (taxa de variação do índice de refração com relação à concentração) determinados. Para esta análise cada polissacarídeo sulfatado foi diluído em cinco diferentes concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/ml) e analisadas utilizando apenas o detector de índice de refração. O cálculo do dn/dc e da massa molar foi feito através do software ASTRA 4.70.07. Todos os experimentos foram realizados a 25 °C.

5.5 TESTES ANTICOAGULANTES *IN VITRO*

Os testes anticoagulantes foram realizados no coagulômetro COAG-A-MATE XM (Oregon Técnica) utilizando *pools* de plasma humanos normais. Os plasmas foram adquiridos no Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, com autorização de Farmacêutica Bioquímica Lismara Bonfim. Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (CAAE: 0267.0.208.000-7, registro CEP: 1581.246/2007-11).

O tempo máximo de ensaio foi de 300 segundos e os resultados foram expressos em μg de polissacarídeo/ml de plasma e pela relação entre o tempo de coagulação na presença (T_1) e na ausência de polissacarídeo (T_0) na mistura de incubação \pm DP ($n = 3$).

5.5.1 Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (aPTT)

Para as análises de aPTT foram utilizadas as concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μg de polissacarídeo/ml de plasma, tanto para os polissacarídeos nativos, quanto para os polissacarídeos sulfatados. Como controle negativo (valores de coagulação normais) foi utilizada uma solução de salina e como controle positivo heparina (202 UI/mg) nas concentrações de 2, 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de plasma.

Foram incubados 90 μl de plasma com 10 μl de salina, polissacarídeos nativos e sulfatados, ou heparina a 37 °C por 1 min, seguida por adição de 100 μl de cefalina de coelho e re-incubação por 3 min. Decorrido este tempo, foi adicionado 100 μl de cloreto de cálcio 0,25 M e o tempo de coagulação determinado em duplicata para cada concentração.

5.5.2 Tempo de Trombina (TT)

Para as análises de TT foram utilizadas as concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 µg de polissacarídeo/ml de plasma, tanto para os polissacarídeos nativos quanto para os polissacarídeos sulfatados. Como controle negativo (valores de coagulação normais) foi utilizada uma solução de salina e como controle positivo heparina (202 UI/mg) nas concentrações de 2, 5 e 10 µg/ml de plasma.

Foram incubados 90 µl de plasma com 10 µl de salina, polissacarídeos nativos e sulfatados, ou heparina a 37 °C por 2 min. Após este tempo adicionou-se 200 µl de trombina e o tempo para o aparecimento do coágulo de fibrina foi medido. Os testes foram realizados em duplicata para cada concentração.

5.6 TESTES *IN VIVO*

Os experimentos *in vivo* de trombose venosa foram realizados com ratos Wistar fêmeas e machos e os experimentos de tendência hemorrágica em ratos Wistar fêmeas, pesando de 180 a 220 g, obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma mistura de cetamina (100 mg/kg de peso corpóreo) e xilasina (16 mg/kg de peso corpóreo). Todos os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (N° 226) realizados de acordo com *Principles of Laboratory Animal Care* (NIH publicação 85-23, revisada em 1985) adotado pela Universidade Federal do Paraná.

5.6.1 Modelo de Trombose Venosa Estase-Induzida em Ratos

A formação do trombo foi induzida por uma combinação de estase e hipercoagulabilidade (VOGEL *et al.*, 1989; BERRY *et al.*, 1994). Os ratos foram anestesiados e colocados em posição supina sobre a mesa cirúrgica. A artéria

carótida direita foi cuidadosamente exposta, dissecada e canulada para administração de salina, polissacarídeos e tromboplastina. A veia cava abdominal foi cuidadosamente dissecada e suturas frouxas foram colocadas entre a veia renal direita e as veias femorais, e na veia renal esquerda. Veículo (salina), heparina ou polissacarídeos sulfatados foram injetados pela artéria carótida direita e, após uma circulação de 5 min, a formação do trombo foi induzida pela infusão de tromboplastina (5 mg/kg de peso corpóreo) e, após 20 s, foi realizada a estase de um segmento de 0,7 cm da veia cava abdominal, a qual foi mantida por 20 min. Após este tempo, o trombo formado no interior do segmento ocluído foi cuidadosamente removido, lavado com salina, seco por 1 h a 60 °C e pesado. Para cada grupo de animais testados (n = 6), a média do peso do trombo \pm erro-padrão da média (EPM) foi determinada e expressa como uma porcentagem do peso, com 100% representando a ausência de qualquer inibição de trombose (peso do trombo com a administração de salina).

5.6.2. Determinação da Tendência Hemorrágica

Para avaliação do efeito hemorrágico os ratos foram anestesiados e a artéria carótida direita dos animais canulada para a administração da solução-veículo (salina), polissacarídeos sulfatados ou heparina. Após a circulação dos compostos por 5 min, as caudas dos animais foram cortadas a 3 mm da extremidade terminal e imersas em 40 ml de água destilada. A perda de sangue foi determinada, 60 min após, pela medida da quantidade de hemoglobina dissolvida na água, usando um método espectrofotométrico. O volume de sangue foi determinado por comparação com uma curva padrão obtida em 540 nm. Para cada grupo de doses testadas (n = 6), a média do volume de sangue perdido \pm erro-padrão da média (EPM) foi determinada.

5.7 ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA *IN VITRO*

5.7.1 Agregação Plaquetária com ADP

Sangue periférico de voluntários humanos foi coletado em solução de citrato de sódio a 3,8% (9 partes de sangue para 1 parte de citrato de sódio). O sangue foi centrifugado a 110 x g por 15 min a temperatura ambiente, para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP; número de plaquetas ajustado para 100.000/ μ l). Os polissacarídeos sulfatados (200 μ g, concentração final) foram adicionados a 900 μ l de PRP e, após 1 min a 37 °C, a agregação plaquetária foi estimulada com 10 μ M de adenosina difosfato (ADP). A extensão da agregação, em um período de 5 min a 37 °C, foi quantificada por método turbidimétrico em espectrofotômetro Shimadzu UV-2450 como aumento da transmitância a 600 nm. Foi considerado 100% de agregação o aumento de transmitância obtido sem adição de polissacarídeos (BORN, 1962).

5.7.2 Agregação Plaquetária com α -Trombina

Para o ensaio de agregação com α -trombina como agonista, o sangue foi coletado com 5 mM de EDTA como anticoagulante. As plaquetas foram obtidas por centrifugação do PRP a 800 x g por 15 min, seguida pela lavagem (2x) com tampão *Tyrode* sem cálcio, pH, 6,5, contendo 0,1% de glucose, 0,2% de gelatina, 0,14 M de NaCl, 0,3 M de NaHCO₃, 0,4 mM de NaH₂PO₄, 0,4 mM de MgCl₂, 2,7 mM de KCl, e 0,2 mM de EGTA. As plaquetas lavadas foram ressuspensas em tampão *Tyrode* modificado, pH 7,4, com 2 mM de CaCl₂ (100.000 plaquetas/ μ l). Os polissacarídeos sulfatados (200 μ g, concentração final) foram adicionados a 900 μ l da suspensão de plaquetas e, após 1 min de incubação a 37 °C, a agregação plaquetária foi estimulada com 1 μ M de α -trombina. A extensão da agregação, em um período de 5 min a 37 °C, foi quantificada por método turbidimétrico em espectrofotômetro

Shimadzu UV-2450 como aumento da transmitância a 600 nm. Foi considerado 100% de agregação o aumento de transmitância obtido sem adição de polissacarídeos.

5.8 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE α -TROMBINA OU FATOR Xa

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços. A concentração final dos reagentes foi de 6 nM de α -trombina ou 8 nM de fator Xa, 100 nM de AT ou 15 nM de HCII e 0 a 300 μ g/ml de polissacarídeos sulfatados em 75 μ l de tampão TS/PEG (Tris/HCl 0,02 M, contendo 0,15 M de NaCl e 1 mg/ml de polietilenoglicol 8.000, pH 7,4). A α -trombina ou o fator Xa foram adicionados por último no meio reacional. Após um minuto de incubação a 37 °C, foi adicionado 25 μ l de substrato cromógeno específico para α -trombina (S-2238 - *Instrumentation Laboratory*) ou para fator Xa (Sigma-Aldrich) em uma concentração final de 100 μ M e a absorbância foi mensurada a 405 nm por 15 min em um leitor de microplaca (Infinite M200, Tecan Group, Switzerland). A mudança na absorbância foi proporcional a atividade residual da α -trombina ou do fator Xa restante na mistura reacional. A reação sem adição de polissacarídeo sulfato foi considerado 100% de atividade. AT, HCII, trombina e fator Xa foram adquiridos da empresa *Haematologic Technologies Inc.* (Essex Junction, VT, USA).

Foram também realizados ensaios de inibição direta dos polissacarídeos sobre a α -trombina e fator Xa sem a adição de AT ou HCII.

5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA e sequencialmente pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0.05^*$, $< 0.01^{**}$ ou $< 0.001^{***}$ foram considerados significantes.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SULFATAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos foram quimicamente sulfatados utilizando como agente sulfatante o ácido clorossulfônico e a piridina como catalisador (O'NEILL,1955). A metodologia utilizada para sulfatação foi eficiente, gerando diversas estruturas com diferentes graus de substituição (*DS*) e com um aumento do peso (em mg). O *DS* dos polissacarídeos quimicamente sulfatados variou de 0,57 a 2,04, o que corresponde ao número de grupos sulfatos substituintes por unidade monossacarídica (TABELA 2).

TABELA 2 - POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS

Polissacarídeo	Sigla	Polissacarídeo nativo (mg) ^a	Polissacarídeo sulfatado (mg) ^b	Sigla	<i>DS</i> ^c
β-D-(1→6)-Glucana	GAb	1600	2800	GAb-S1	1,38
β-D-(1→3)-(1→6)-Glucana	GPf	700	1000	GPf-S1	0,57
GPf-S1	GPf-S1	780	940	GPf-S2	0,60
Fucomanogalactana	FmgLe	700	1443	FmgLe-S1	2,04
Manogalactana	MgPr	360	720	MgPr-S1	1,31

(a) Quantidade de polissacarídeo utilizado para sulfatação química;

(b) Quantidade de polissacarídeo após o procedimento de sulfatação química;

(c) Grau de substituição determinado pelo método de DODGSON e PRICE (1962) após sulfatação;

(*) A β-D-(1→3)-(1→6)-glucana foi sulfatada duas vezes, sequencialmente.

A glucana isolada de *P. florida* apresentou uma baixa sulfatação, comparado com os outros polissacarídeos estudados, uma vez que foram utilizados 700 mg do polissacarídeo nativo, gerando uma massa de 1000 mg de polissacarídeo sulfatado (GPf-S1), com um *DS* de 0,57. Na tentativa de aumentar a quantidade de sulfato desta amostra, 700 mg de GPf-S1 foram re-sulfatados originando GPf-S2. O peso

obtido foi de 940 mg e *DS* de 0,60. Esta diferença na eficiência da sulfatação deve-se, provavelmente, ao fato de que não foi possível solubilizar totalmente a glucana nativa (GPf) em formamida, pois a mesma formou um gel no solvente, sendo que a solubilidade do polissacarídeo interfere na reação (ALBAN; KRAUS; FRANZ, 1992). Após a primeira sulfatação, GPf-S1 apresentou uma melhor solubilidade no meio reacional e a quantidade de ácido adicionada foi maior, favorecendo uma maior eficiência na modificação química do polissacarídeo, porém esta estratégia não aumentou o *DS* das moléculas.

O polissacarídeo que apresentou um maior *DS* foi FmgLe-S1 (2,04), provavelmente, devido a alta solubilidade da fucomanogalactana no meio reacional. GAb-S1 e MgPr-S1 apresentaram valores intermediários de *DS*, 1,38 e 1,31, respectivamente.

Existem diversos reagentes que podem ser utilizados para a sulfatação química de polissacarídeos, como por exemplo: ácido piperidina-*N*-sulfônico em Me₂SO (MIHAI; MOCANU; CARPOV, 2001), complexos de trióxido de enxofre (SO₃) em piridina (CHAIDEDGUMJORN *et al.*, 2002) e sulfato de metil-sódio e metil-piridínio (TAKANO *et al.*, 2000). Dentre os reagentes mais comumente utilizados para a sulfatação química destacam-se o ácido clorossulfônico e a piridina, pois resultam em um maior rendimento e um maior *DS* (YOSHIDA *et al.*, 1995; WANG; LI; CHEN; 2009).

A determinação do *DS* envolve a hidrólise ácida do polissacarídeo, seguida pela determinação do sulfato inorgânico liberado, o qual é determinado como sulfato de bário. É um método turbidimétrico simples e rápido, e as interferências são minimizadas pela adição de ácido tricloroacético. A gelatina utilizada na metodologia estabiliza a suspensão de sulfato de bário, mantendo a turbidez por um maior tempo (DODGSON, 1961; DODGSON e PRICE, 1962).

O teor de sulfato das moléculas é importante, uma vez que a atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados resulta da interação das cargas negativas destes grupos com sequências peptídicas ricas em aminoácidos básicos de proteínas reguladoras do processo de coagulação sanguínea. Geralmente esta atividade aumenta com um maior *DS* (HUANG *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2005). Entretanto, estudos indicam que o *DS* não é o único parâmetro importante para esta atividade, sendo que a estrutura química destes polímeros também tem grande influência (ALBAN; SCHAUERTE; FRANZ, 2002).

6.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS QUIMICAMENTE SULFATADOS

6.2.1 Análise da Homogeneidade e Cálculo da M_w dos Polissacarídeos Quimicamente Sulfatados

Como a reação de sulfatação envolve o uso de um ácido forte, a temperatura no meio reacional deve ser controlada para evitar a degradação do polissacarídeo. Para verificar a integridade destas cadeias após a reação, bem como para o cálculo da massa molar, o qual deve aumentar com a sulfatação, foram realizadas análises de HPSEC-MALLS.

O perfil de eluição de GAb-S1 indica que houve uma quebra da molécula, uma vez que são observadas duas populações de polissacarídeos, uma com uma maior massa molar que GAb e outra com uma menor massa molar (FIGURA 10A). A M_w desta população de maior tamanho foi de, aproximadamente, $7,1 \times 10^4$ g/mol ($dn/dc = 0,134$).

Os perfis de eluição de GPf-S1 e GPf-S2 não apresentaram diferenças significativas, estando de acordo com a determinação do grau de substituição, os quais foram similares. Para estes polissacarídeos também é possível observar a presença de duas populações de polissacarídeos. Provavelmente a baixa solubilidade de GPf no meio reacional utilizado para a sulfatação influenciou, sendo que algumas moléculas podem ter tido uma menor sulfatação (FIGURA 10B). GPf não foi submetida à análise por HPSEC-MALLS por não ser solúvel em nitrito.

Quando se compara o perfil de eluição de FmgLe e FmgLe-S1 é possível observar que não houve quebra da cadeia polissacarídica pela sulfatação química e que houve um aumento da massa molar da molécula, caracterizado por um deslocamento do perfil de eluição para a esquerda (FIGURA 10C). FmgLe apresentava uma M_w de $1,62 \times 10^4$ g/mol ($dn/dc = 0,167$; CARBONERO *et al.*, 2008) e após a sulfatação passou a ter uma M_w de $4,3 \times 10^4$ g/mol ($dn/dc = 0,164$).

MgPr também apresentou um perfil de eluição homogêneo após a sulfatação e um ganho de M_w , a qual passou de $4,5 \times 10^4$ ($dn/dc = 0,195$; ROSADO *et al.*, 2003) para $6,12 \times 10^4$ g/mol ($dn/dc = 0,195$) (FIGURA 10D).

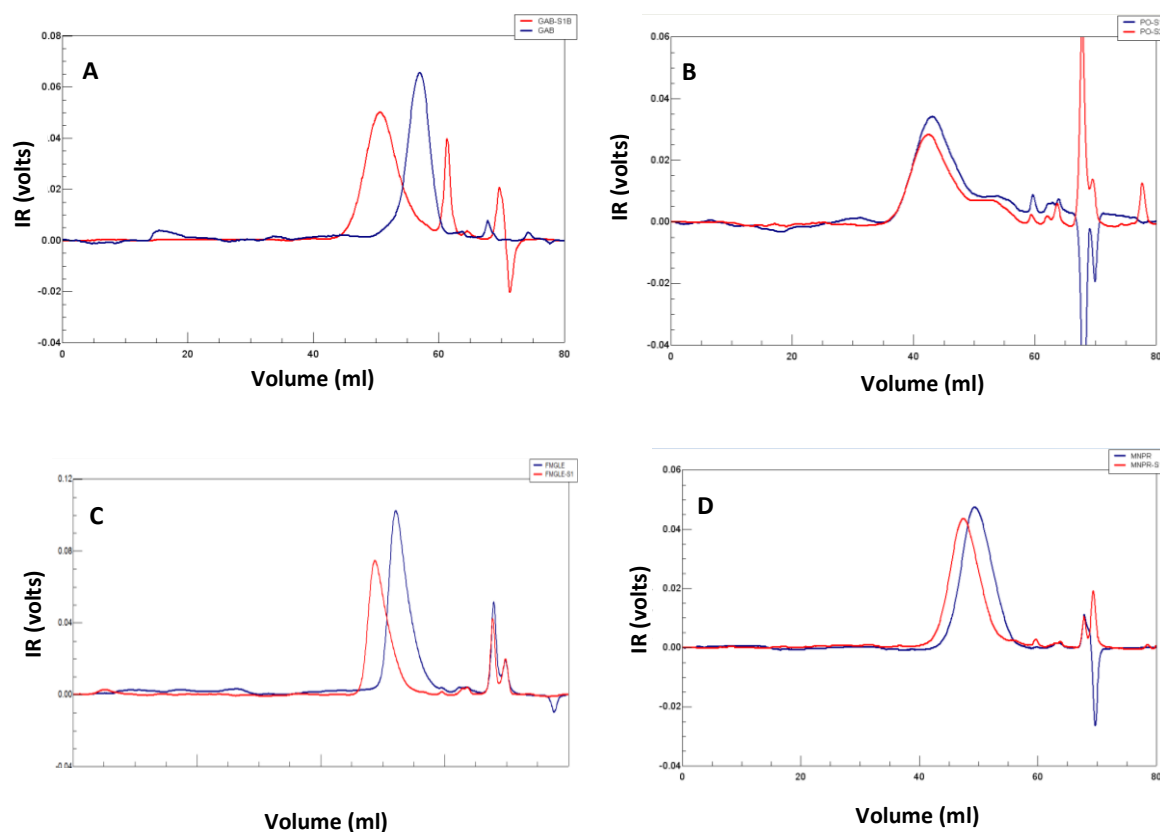


FIGURA 10 - PERFIS DE ELUIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS E SULFATADOS EM HPSEC USANDO O DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO. A) GAb em azul e GAb-S1 em vermelho. B) GPf-S1 em azul e GPf-S2 em vermelho. C) FmgLe em azul e FmgLe-S1 em vermelho. D) MgPr em azul e MgPr-S1 em vermelho.

6.2.2 Análise de RMN-C¹³ e Metilação dos Polissacarídeos Quimicamente Modificados

As amostras quimicamente sulfatadas foram analisadas por RMN-C¹³ e seus espectros comparados com aqueles obtidos dos polissacarídeos nativos. Todos os espectros das amostras quimicamente sulfatadas apresentaram um maior número de sinais, bem como uma maior complexidade, sendo que pode ter ocorrido uma sobreposição de sinais.

O espectro de RMN- C^{13} de GAb (FIGURA 11A) apresenta seis sinais característicos de uma β -glucana (C-1 em δ 103,0) linear com ligações (1 \rightarrow 6), sendo o sinal em δ 68,3 correspondente ao $-CH_2OH$ -6 substituído. Os sinais em δ 73,2, 76,4, 69,9 e 75,3 correspondem aos carbonos C-2, C-3, C-4 e C-5, respectivamente (GORIN, 1981). O espectro de RMN- C^{13} de GAb-S1 apresentou um maior número de sinais, devido à sulfatação, com sinais em δ 84,1 e em 80,2 que sugerem O-substituição em C-3 e C-4, respectivamente. O sinal em δ 101,1 corresponde ao deslocamento para campo mais alto (β -shift) dos sinais de C-1, correspondendo ao carbono anomérico de unidades substituídas em O-2 (FIGURA 11B). Não é possível correlacionar outros sinais devido à possível sobreposição dos mesmos.

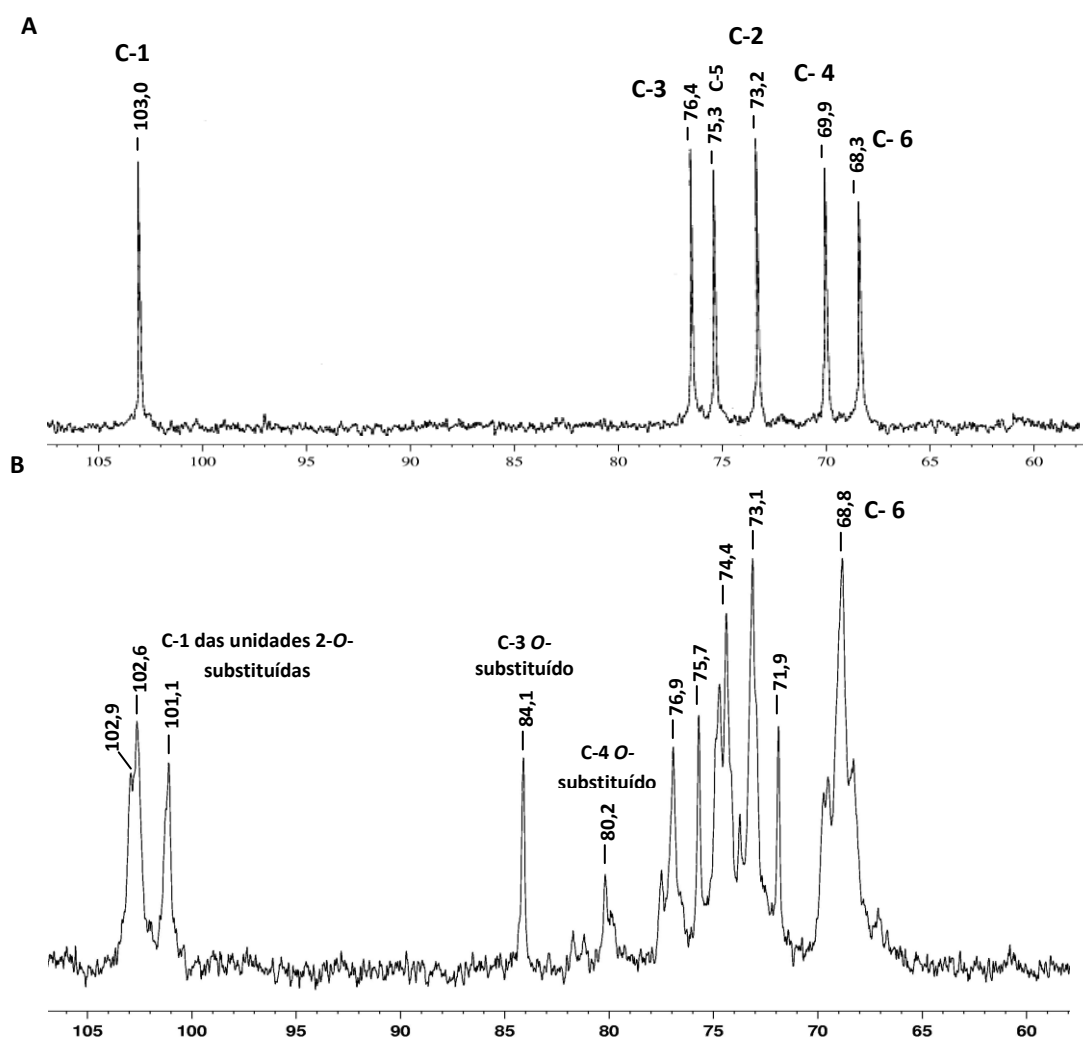


FIGURA 11 - ESPECTROS DE RMN- C^{13} DE GAb (A) EM D_2O OBTIDO A 40 °C E DE GAb-S1 (B), EM D_2O OBTIDO A 70 °C.

Foi observado um aumento de derivados metilados de GAb-S1 (TABELA 3), indicando que a sulfatação foi preferencial nos grupos OH-2 e OH-3 e em menor proporção em OH-4, reforçando os dados de RMN-C¹³. Estes dados estão de acordo com outro estudo com glucanas sulfatadas, onde foi observado que o grupo OH-2 é o grupo mais favorável a sulfatação, seguido por OH-3 (ALBAN; SCHAUERTE; FRANZ, 2002).

TABELA 3 - COMPONENTES ESTRUTURAIS DE GAb E GAb-S1, BASEADOS NA ANÁLISE DE METILAÇÃO

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilado ^a	Tipo de ligação ^b	Mol (%) ^c		Grupos de inserção de SO ₃ ⁻
		GAb	GAb-S1	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	Glc ρ -(1→	0,5		
2,3,4-Me ₃ -Glc	→6)-Glc ρ -(1→	99,5	1,3	
2,4-Me ₂ -Glc	→3,6)-Glc ρ -(1→		23,6	OH-3
3,4-Me ₂ -Glc	→2,6)-Glc ρ -(1→		17,9	OH-2
2,3-Me ₂ -Glc	→4,6)-Glc ρ -(1→		5,9	OH-4
2-Me-Glc	→3,4,6)-Glc ρ -(1→		12,0	OH-3 e OH-4
3-Me-Glc	→2,4,6)-Glc ρ -(1→		4,3	OH-2 e OH-4
4-Me-Glc	→2,3,6)-Glc ρ -(1→		10,7	OH-2 e OH-3
Glc	→2,3,4,6)-Glc ρ -(1→		24,3	OH-2, OH-3 e OH-4

^a Acetatos de alditóis acetatos parcialmente O-metilados obtidos por per-O-metilação seguido por hidrólise, redução com NaB²H₄, e analisados por GC-MS (coluna DB-225).

^b Estrutura baseada nos alditóis acetatos parcialmente O-metilados.

^c Porcentagem da área do pico relativa a área total.

Estudos prévios do isolamento e caracterização química da β -glucana de *P. florida* realizaram o assinalamento de todas as unidades deste polímero. O sinal em δ 103,1 corresponde ao C-1 das unidades de terminais não-redutores, enquanto que o sinal em δ 102,9 corresponde ao C-1 das unidades 3-O- e 3,6-di-O-substituídas. Os sinais em δ 86,6 a 86,0 correspondem ao C-3 O-substituído e o sinal em δ 68,6 ao -CH₂OH-6 substituído (SANTOS-NEVES *et al.*, 2008).

Comparando os espectros de RMN-C¹³ da glucana nativa (FIGURA 12A), da glucana após o primeiro ciclo de sulfatação (FIGURA 12B) e da glucana após o segundo ciclo (FIGURA 12C) é possível observar diferenças entre eles. Apesar dos DS de GPf-S1 e GPf-S2 serem similares, quando determinados pelo método

turbidimétrico, os espectros de RMN-C¹³ indicam que estas moléculas apresentam algumas variações em relação à substituição de suas unidades por grupos sulfatos. Dentre estas, observa-se uma diminuição progressiva dos sinais de C-1 dos terminais não-redutores (δ 103,1), bem como dos sinais de C-3 livre (δ 76,5) e de C-6 livre (δ 61,2 e 61,0). Também é possível observar o aparecimento de sinais na região de δ 81,1 a 77,0, os quais podem ser de substituições de OH-4 e OH-2, respectivamente. Como esperado, a sulfatação química deste polímero ocorreu, preferencialmente, nos terminais não-redutores e em algumas unidades monossacarídicas da cadeia principal, observado pela diminuição dos sinais de -C₆H₂OH-6 (δ 61,2 a 60,9). Para GPf-S2 também houve um deslocamento dos sinais de C-1 para campo mais alto (δ 101,1), indicando substituição em O-2.

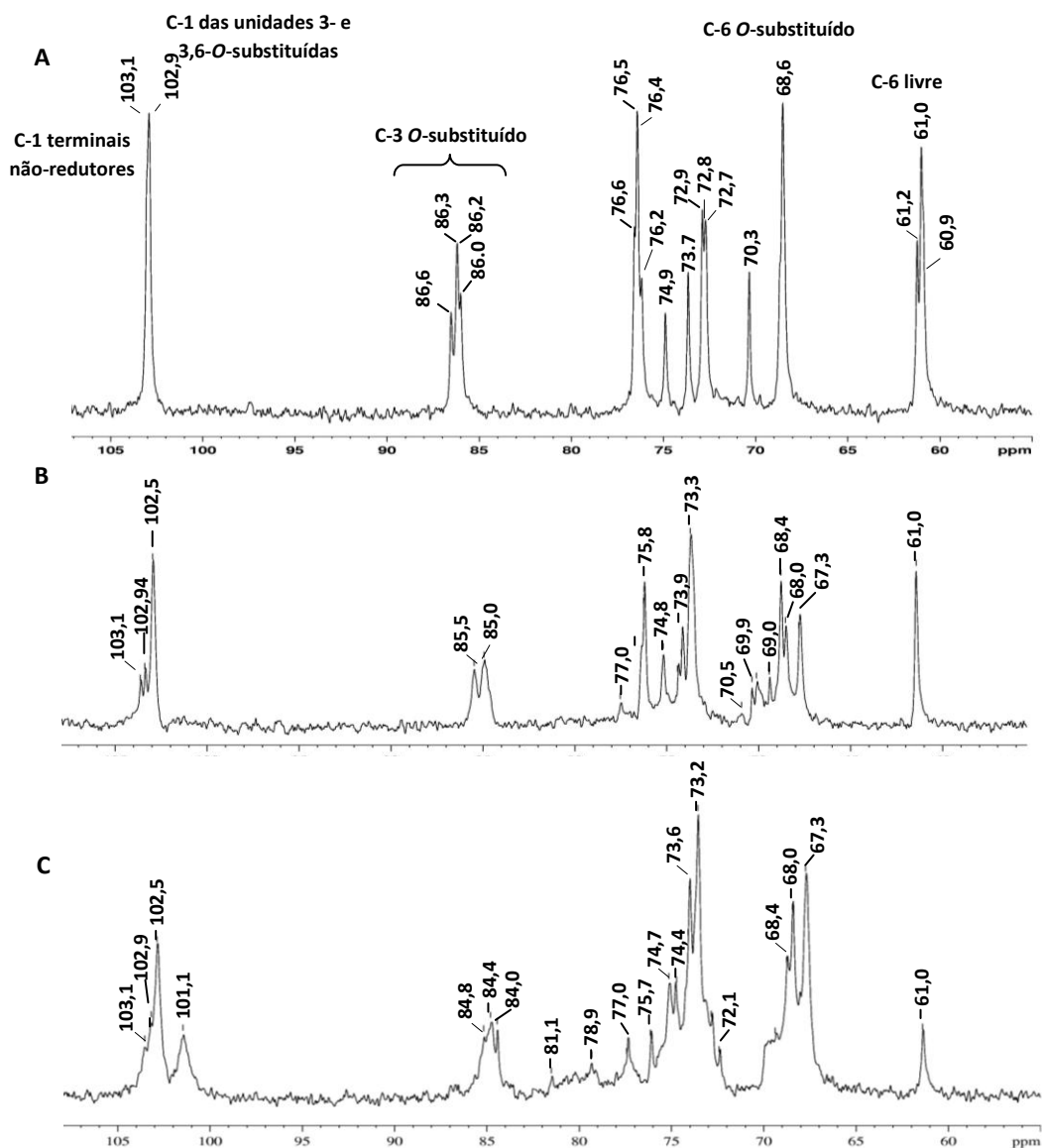


FIGURA 12 - ESPECTROS DE RMN- C^{13} DE GPf (A), EM Me_2SO-d_6 A 70 °C (CARBONERO *et al.*, 2008) E DE GPf-S1 (B) E GPf-S2 (C) OBTIDOS A 70 °C EM D_2O .

As análises de metilação de GPf-S1 e GPf-S2 confirmam as diferenças no padrão de sulfatação destas moléculas (TABELA 4). Como observado nas análises de RMN- C^{13} , os dados de metilação também mostram que houve uma diminuição dos terminais não-redutores de Glcp. A sulfatação dos terminais não-redutores pode ocorrer em todos os grupos OH. Os derivados tri-metilados, 3,4,6- Me_3 -Glcp e 2,3,6- Me_3 -Glcp correspondem a sulfatação dos terminais não-redutores de Glcp em OH-2

e OH-4, respectivamente. Os derivados di-metilados 3,6-, 2,3- e 3,4-Me₂-Glc_p correspondem, respectivamente, a sulfatação em OH-2 e OH-4, OH-4 e OH-6, e OH-2 e OH-6 dos terminais não-redutores. O derivado 3-Me-Glc_p corresponde aos terminais não-redutores sulfatados em OH-2, OH-4 e OH-6.

Pela metodologia de metilação adotada, as unidades de terminais não-redutores, as unidades (1→3)-ligadas e (1→3)-ligadas substituídas em O-6 de GPf, após a sulfatação, podem originar o mesmo derivado metilado. O derivado metilado 2,6-Me₂-Glc_p pode corresponder às unidades de terminais não-redutores sulfatadas em OH-3 e em OH-4, ou às unidades (1→3)-ligadas sulfatadas somente em OH-4. O derivado metilado 2-Me-Glc_p pode corresponder aos terminais não-redutores tri-sulfatados, às unidades (1→3)-ligadas sulfatadas em OH-4 e OH-6 ou às unidades (1→3)-ligadas substituídas em O-6 sulfatadas em OH-4. As unidades não metiladas de Glc_p podem corresponder aos terminais não-redutores tetra-sulfatados, às unidades (1→3)-ligadas sulfatadas em OH-2, OH-4 e OH-6 ou às unidades de Glc_p (1→3)-ligadas substituídas em O-6 sulfatadas em OH-2 e OH-4.

TABELA 4 - COMPONENTES ESTRUTURAIS DE GPf, GPf-S1 E GPf-S2, BASEADOS NA ANÁLISE DE METILAÇÃO

Acetato de alditóis parcialmente O-metilado ^a	Tipo de ligação ^b	Mol (%) ^c			Grupos de inserção de SO ₃ -
		GPf ^d	GPf-S1	GPf-S2	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	Glc β -(1→	20,4	17,2	7,4	
2,4,6-Me ₃ -Glc	→3)-Glc β -(1→	59,5	41,8	48,8	OH-3
3,4,6-Me ₃ -Glc	→2)-Glc β -(1→		2,9		OH-2
2,3,6-Me ₃ -Glc	→4)-Glc β -(1→			2,4	OH-4
2,6-Me ₂ -Glc ¹	→3,4)-Glc β -(1→		1,7	1,6	OH-3 e OH-4
3,6-Me ₂ -Glc	→2,4)-Glc β -(1→		1,5	2,1	OH-2 e OH-4
2,4-Me ₂ -Glc	→3,6)-Glc β -(1→	20,1	17,3	18,0	
2,3-Me ₂ -Glc	→4,6)-Glc β -(1→			2,6	OH-4 e OH-6
3,4-Me ₂ -Glc	→2,6)-Glc β -(1→			2,0	OH-2 e OH-6
2-Me-Glc ²	→3,4,6)-Glc β -(1→		3,9	1,1	OH-3, OH-4 e OH-6
3-Me-Glc	→2,4,6)-Glc β -(1→		1,9		OH-2, OH-4 e OH-6
4-Me-Glc ³	→2,3,6)-Glc β -(1→		1,8		OH-2, OH-3 e OH-6
Glc ⁴	→2,3,4,6)-Glc β -(1→		10,0	14,1	OH-2, OH-3, OH-4 e OH-6

^a Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados obtidos por per-O-metilação seguida por hidrólise, redução com NaB²H₄, e análise por GC-MS (coluna DB-225).

^b Estrutura baseada nos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados.

^c Porcentagem da área do pico relativo a área total.

^d SANTOS-NEVES *et al.*, 2008.

¹ Derivado metilado que pode corresponder aos terminais não-redutores di-sulfatados ou à unidades de Glc β (1→3)-ligadas sulfatadas em OH-4.

² Derivado metilado que pode corresponder aos terminais não-redutores tri-sulfatados, à unidades de Glc β (1→3)-ligadas sulfatadas em OH-4 e OH-6 ou à unidades de Glc β (1→3)-ligadas substituídas em O-6 por terminais não-redutores e sulfatadas em OH-4.

³ Derivado metilado que pode corresponder aos terminais não-redutores tri-sulfatados, à unidades de Glc β (1→3)-ligadas sulfatadas em OH-2 e OH-6 ou à unidades de Glc β (1→3)-ligadas substituídas em O-6 por terminais não-redutores e sulfatadas em OH-2.

⁴ Derivado metilado que pode corresponder aos terminais não-redutores tetra-sulfatados, à unidades de Glc β (1→3)-ligadas sulfatadas em OH-2, OH-4 e OH-6 ou à unidades de Glc β (1→3)-ligadas substituídas em O-6 por terminais não-redutores e sulfatadas em OH-2 e OH-4.

Os sinais obtidos pela análise de RMN-C¹³ de FmgLe-S1 (FIGURA 13B) foram comparados com as análises espectroscópicas de RMN mono- e bi-dimensionais de FmgLe realizadas por CARBONERO *et al.*, 2008 (RMN-C¹³ de FmgLe: FIGURA 13A). É possível observar uma diminuição dos sinais de carbono anomérico dos terminais não-redutores das unidades de β -manopiranosose (δ 104,0) e de α -fucopiranosose (δ 103,9), além de um aumento dos sinais de C-1 das unidades de α -galactopiranosose di-O-substituídas (δ 100,6). O sinal em δ 82,9 sugere C-3 O-

substituído, indicando que pode ter ocorrido sulfatação dos grupos OH-3 de algumas unidades. O sinal em δ 80,3 das unidades de galactose substituídas em O-2 na molécula nativa também foi intensificado nos espectro de FmgLe-S1, sugerindo a sulfatação destes grupos de algumas unidades de galactose. Também é possível observar uma diminuição da intensidade dos sinais em δ 78,6; 75,4; 72,8; e 63,5 correspondentes ao C-2, C-3, C-4 e C-6 das unidades de manose terminais não-redutoras, respectivamente. A sulfatação da fucomanogalactana também ocasionou um deslocamento dos sinais de $-\text{CH}_3-6$ para campo mais baixo (δ 18,1 e 18,5). Estes dados sugerem que a sulfatação ocorreu, principalmente, nas unidades substituintes da cadeia principal (β -Man e α -Fuc) e em algumas unidades de galactose da cadeia principal.

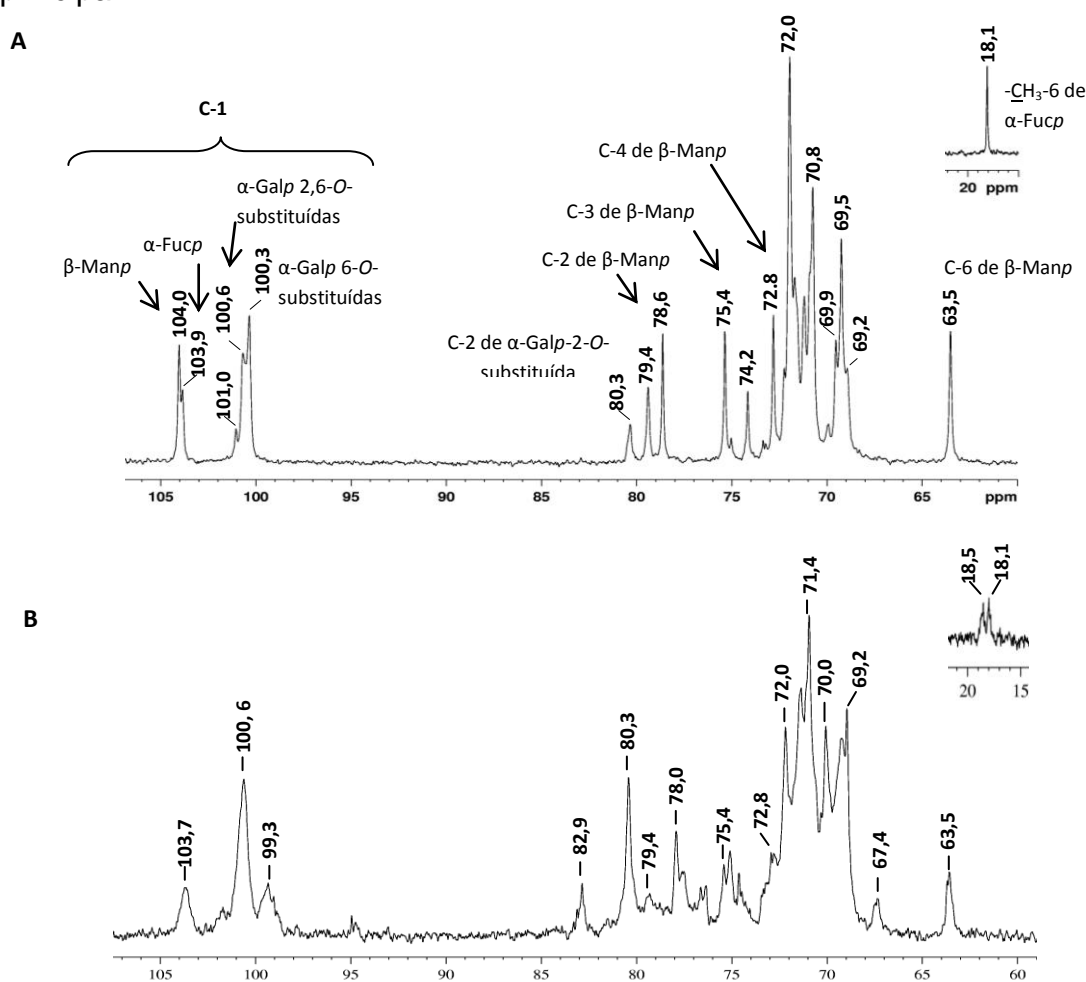


FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN- C^{13} DE FmgLe (A), OBTIDO A 40 °C EM D_2O (CARBONERO *et al.*, 2008) E DE FmgLe-S1 (B), OBTIDO A 70 °C EM D_2O .

Os dados de metilação estão de acordo com os dados de espectroscopia obtidos, pois mostra uma redução dos derivados metilados correspondentes aos terminais não redutores de manose (2,3,4,6-Me₄-Man) com concomitante aparecimento de unidades de Man β mono-, di-, tri- e tetra-substituídas. Os derivados metilados correspondentes aos terminais não-redutores de fucose (2,3,4-Me₃-Fuc), também reduziram gerando derivados correspondentes às unidades de Fuc β mono- e di-substituídas. As unidades de Gal β (1 \rightarrow 6)-ligadas podem ter sido sulfatadas em OH-2 e OH-4 (2,3-Me₂-Gal β) e em OH-3 (2,4-Me₂-Gal β).

As unidades de Gal β (1 \rightarrow 6)-ligadas e (1 \rightarrow 6)-ligadas substituídas em O-2 podem originar o mesmo derivado metilado. O derivado metilado 3-Me-Gal β pode corresponder às unidades (1 \rightarrow 6)-ligadas sulfatadas em OH-2 e OH-4 ou às unidades (1 \rightarrow 6)-ligadas substituídas em O-2 e sulfatadas em OH-4. O derivado metilado 4-Me-Gal β pode corresponder às unidades (1 \rightarrow 6)-ligadas sulfatadas em OH-2 e OH-3 ou às unidades (1 \rightarrow 6)-ligadas substituídas em O-2 e sulfatadas em OH-3. As unidades não metiladas de Gal β podem corresponder às unidades (1 \rightarrow 6)-ligadas sulfatadas em OH-2, OH-3 e OH-4 ou às unidades (1 \rightarrow 6)-ligadas substituídas em O-2 e sulfatadas em OH-3 e OH-4 (TABELA 5).

TABELA 5- COMPONENTES ESTRUTURAIS DE FmgLe E FmgLe-S1, BASEADOS NA ANÁLISE DE METILAÇÃO

Alditóis acetatos parcialmente O-metilados ^a	Tipo de Ligação ^b	Mol (%) ^c		Grupos de inserção de SO ₃ ⁻
		FmgLe ^d	FmgLe-S1	
2,3,4-Me ₃ -Fuc	Fucp-(1→	11	4,7	
2,3,4,6-Me ₄ -Man	Manp-(1→	21	7,2	
2,3-Me ₂ -Fuc	4→)Fucp-(1→		2,9	OH-4
3,4-Me ₂ -Fuc	2→)Fucp-(1→		2,2	OH-2
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Galp-(1→	1		
2-Me-Fuc	3,4→)Fucp-(1→		0,4	OH-3 e OH-4
3-Me-Fuc	2,4→)Fucp-(1→		0,5	OH-2 e OH-4
3,4,6-Me ₃ -Man	2 →)Manp-(1→		5,4	OH-2
2,3,4-Me ₃ -Gal	6→)-Galp-(1→	34	28,7	
4,6-Me ₂ -Man	2,3 →)Manp-(1→		2,3	OH-2 e OH-3
3,6-Me ₂ -Man	2,4→) Manp-(1→		1,1	OH-2 e OH-4
2,3-Me ₂ -Man	4,6→) Manp-(1→		2,3	OH-4 e OH-6
3,4-Me ₂ -Man	2,6→) Manp-(1→		1,1	OH-2 e OH-6
2,4-Me ₂ -Man	3,6→) Manp-(1→		3,5	OH-3 e OH-4
2,3-Me ₂ -Gal	2,4→)-Galp-(1→		5,4	OH-2 e OH-4
2,4-Me ₂ -Gal	3,6→)-Galp-(1→		1,4	OH-3 e OH-6
3,4-Me ₂ -Gal	2,6→)- Galp-(1→	33	5,7	
4-Me-Man	2,3,6→)-Manp-(1→		1,0	OH-2, OH-3 e OH-6
3-Me-Gal ¹	2,4,6→)-Galp-(1→		0,6	OH-2 e OH-4
4-Me-Gal ²	2,3,6→)-Galp-(1→		14,2	OH-3
Man	2,3,4,6→)-Manp-(1→		2,2	OH-2, OH-3, OH-4 e OH-6
Gal ³	2,3,4,6→)-Galp-(1→		4,4	OH-3 e OH-4

^a Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados obtidos por per-O-metilação seguida por hidrólise, redução com NaB²H₄, e análise por GC-MS (coluna DB-225).

^b Estrutura baseada nos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados.

^c Porcentagem da área do pico relativo a área total.

^d CARBONERO *et al.*, 2008.

¹ Derivado metilado que pode corresponder às unidades de Galp (1→6)-ligadas sulfatadas em OH-2 e OH-4 ou às unidades de Galp (1→6)-ligadas substituídas em O-2 e sulfatadas em OH-4.

² Derivado metilado que pode corresponder às unidades de Galp (1→6)-ligadas sulfatadas em OH-3 ou às unidades de Galp (1→6)-ligadas substituídas em O-2 e sulfatadas em OH-3.

³ Derivado metilado que pode corresponder às unidades de Galp (1→6)-ligadas sulfatadas em OH-2, OH-3 e OH-4 ou às unidades de Galp (1→6)-ligadas substituídas em O-2 e sulfatadas em OH-3 e OH4.

Os sinais obtidos pela análise de RMN-C¹³ de MgPr-S1 (FIGURA 14B) também foram comparados com as análises espectroscópicas de RMN-C¹³ de MgPr realizadas por ROSADO *et al.*, 2003 (FIGURA 14A). O espectro de RMN-C¹³ de MgPr apresenta sinais de C-1 em δ 101,9 correspondentes aos terminais não-redutores de β -manopiranosose e os sinais em δ 98,9 e 98,3 são correspondentes ao C-1 das unidades de α -galactopiranosose 6-O- e 2,6-di-O-substituídas, respectivamente. O sinal em δ 77,3 corresponde a O-substituição em C-2 e o sinal em δ 79,4 corresponde ao C-3 das unidades de galactose 3-O-metiladas (ROSADO *et al.*, 2003). O espectro de RMN-C¹³ de MgPr-S1 apresentou algumas diferenças em relação ao espectro de MgPr. Houve um deslocamento dos sinais referentes a O-substituições, com um forte deslocamento para campo mais baixo (α -shift, ppm mais alto) e desaparecimento dos sinais de $\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH-6}$ das unidades de β -D-Manp não substituídas (δ 61,2), devido à completa sulfatação destas unidades. Também houve um deslocamento para campo mais alto (β -shift, ppm mais baixo) dos sinais em δ 101,9 correspondendo a sulfatação de HO-2, correspondendo ao efeito da substituição em OH-2 no carbono anomérico.

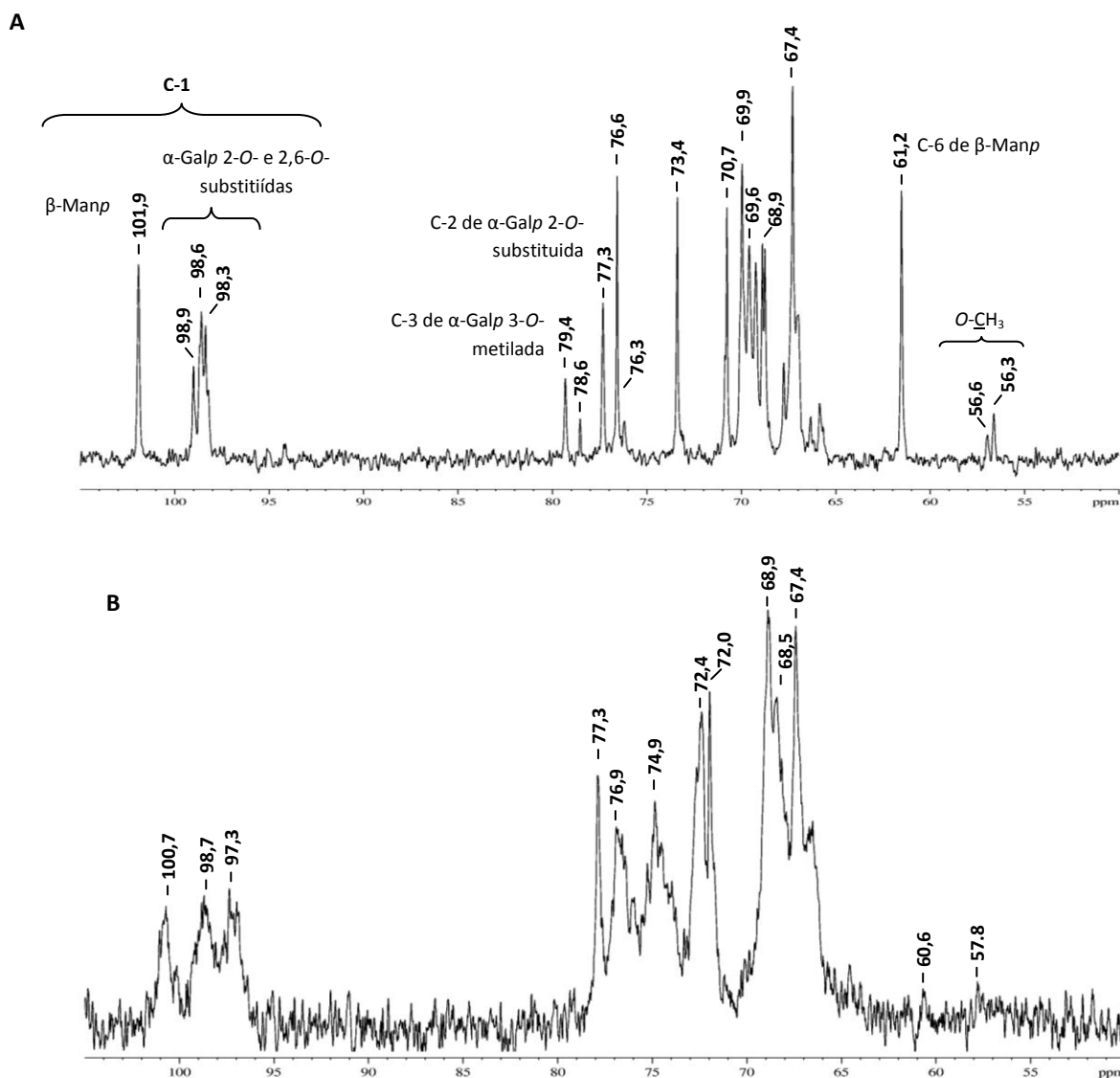


FIGURA 14 - ESPECTROS DE RMN- C^{13} DE MgPr (A), OBTIDO A 40 °C EM D_2O (ROSADO *et al.*, 2003) E DE MgPr-S1 (B), OBTIDO A 70 °C EM D_2O .

As análises de metilação de MgPr-S1 estão de acordo com os dados de RMN- C^{13} , pois foi observada uma total substituição por sulfato nos terminais não redutores de manose, os quais podem conter dois grupos sulfatos por unidade (derivados metilados: 3,4-Me₂-Manp e 2,6-Me₂-Manp) e algumas unidades completamente sulfatadas, pela presença de manose não-metilada.

As unidades de Galp (1→6)-ligadas e (1→6)-ligadas substituídas em O-2 podem originar o mesmo derivado metilado. O derivado metilado 4-Me-Galp pode corresponder às unidades (1→6)-ligadas sulfatadas em OH-2 e OH-3 ou às

unidades (1→6)-ligadas substituídas em O-2 e sulfatadas em OH-3. As unidades não metiladas de Galp podem corresponder às unidades (1→6)-ligadas sulfatadas em OH-2, OH-3 e OH-4 ou às unidades (1→6)-ligadas substituídas em O-2 e sulfatadas em OH-3 e OH-4 (TABELA 6).

TABELA 6- COMPONENTES ESTRUTURAIS DE MgPr E MgPr-S1, BASEADOS NA ANÁLISE DE METILAÇÃO

Alditol acetato parcialmente O-metilado ^a	Tipo de ligação ^b	Mol(%) ^c		Grupos de inserção de SO ₃
		MgPr ^d	MgPr-S1	
2,3,4,6-Me ₄ -Man	Manp-(1→	38		
2,3,4-Me ₃ -Gal	→6)-Galp-(1→	24	7	
2,6-Me ₂ -Man	→3,4)-Manp-(1→		6	OH-3 e OH-4
3,4-Me ₂ -Man	→2,6)-Manp-(1→		7	OH-2 e OH-6
3,4-Me ₂ -Gal	→2,6)- Galp-(1→	38	10	
2-Me-Gal	→3,4,6)-Galp-(1→		19	OH-2, OH-3 e OH-4
4-Me-Gal ¹	→2,3,6)- Galp-(1→		26	OH-2 e OH-3
Man	→2,3,4,6)-Manp-(1→		17	OH-2, OH-3, OH-4 e OH-6
Gal ²	→2,3,4,6)-Galp-(1→		8	OH-2, OH-3 e OH-4

^a Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados obtidos por per-O-metilação seguida por hidrólise, redução com NaB²H₄, e análise por GC-MS (coluna DB-225).

^b Estrutura baseada nos acetatos de alditóis parcialmente O-metilados.

^c Porcentagem da área do pico relativo a área total.

^d ROSADO *et al.*, 2003.

¹ Derivado metilado que pode corresponder às unidades de Galp (1→6)-ligadas sulfatadas em OH-2 e OH-3 ou às unidades de Galp (1→6)-ligadas substituídas em O-2 e sulfatadas em OH-3.

² Derivado metilado que pode corresponder às unidades de Galp (1→6)-ligadas sulfatadas em OH-2, OH-3 e OH-4 ou às unidades de Galp (1→6)-ligadas substituídas em O-2 e sulfatadas em OH-3 e OH-4.

6.3 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO*

O potencial anticoagulante das moléculas sulfatadas, bem como das moléculas nativas foi determinado através dos testes aPTT (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada) e TT (Tempo de Trombina). Estes testes são denominados de testes funcionais, pois monitoram a formação do coágulo de fibrina,

sendo indicados como testes *screening* para hemostasia, incluindo sintomas de hemorragia, monitoramento da terapia anticoagulante e, também, como exame de rotina para pré-operatórios (KAMAL; TEFFERI; PRUTHI, 2007).

Para a avaliação das atividades *in vitro* foram utilizadas a salina como controle negativo (valores normais de coagulação), concentrações crescentes dos polissacarídeos nativos e quimicamente sulfatados (5, 10, 25, 50 e 100 µg/ml de plasma, concentração final), ou como controle positivo a heparina de alta massa molar (220 UI/mg) nas concentrações de 2, 5 e 10 µg/ml de plasma (concentração final) .

6.3.1 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT)

O reagente de aPTT é chamado de tromboplastina parcial ativada, pois o fator tissular não está presente junto com os fosfolípidios (KAMAL; TEFFERI; PRUTHI, 2007). Este teste baseia-se na ativação do sistema intrínseco da coagulação, constituindo uma boa metodologia para avaliação de problemas com os fatores VIII e IX, além dos fatores de contato. A cefalina utilizada no teste atua como substituto plaquetário e o fator de contato necessário para desencadear a coagulação é o caolin ou sílica. A ativação do fator XI é dependente de cálcio, sendo necessária a adição do mesmo para ativação da cascata (HAN *et al.*, 2005, MARTINICHEN *et al.*, 2005). Assim, as deficiências ou inibidores dos fatores de coagulação das vias intrínseca e final comum resultam no prolongamento do teste de aPTT.

A heparina apresentou atividade anticoagulante, sendo que na dose de 2 µg/ml aumentou em 2,2 vezes o tempo de coagulação do plasma e na dose de 5 µg/ml já inibiu completamente a formação do coágulo quando comparado com os valores obtidos para o controle negativo (22 s).

De acordo com os dados obtidos, GAb-S1 foi capaz de prolongar o tempo de coagulação de maneira dose-dependente e na concentração de 5 µg/ml o tempo para coagulação do plasma foi de 33,7s, sendo 1,5 vezes maior que o do grupo controle negativo (22 s) e a ação máxima (>300s) foi com atingida com 50 µg/ml,

sendo que esta atividade se manteve com a concentração de 100 µg/ml. Já o polissacarídeo nativo não foi capaz de prolongar o tempo de coagulação em nenhuma das doses testadas (FIGURA 15A).

GPf-S1 e GPf-S2 também aumentaram o tempo de coagulação do plasma de maneira dose-dependente, porém com uma menor atividade. GPf-S1 prolongou o tempo de coagulação 1,8 vezes, o qual corresponde a um tempo de 36 s, na concentração de 25 µg/ml, enquanto que para esta mesmo efeito foi necessária uma menor dose de GPf-S2 (10 µg/ml). Porém, as atividades de GPf-S1 e GPf-S2 apresentaram, entre si, diferenças significativas somente nas maiores doses testadas (50 e 100 µg/ml). Na dose de 50 µg/ml GPf-S2 foi capaz de aumentar o tempo de coagulação para 124 s, correspondendo a um aumento de 6,2 vezes, enquanto que GPf-S1, na mesma dose, foi capaz de aumentar somente 2,4 vezes (49 s) comparados com os tempos de coagulação normais. Os dados também indicam que nenhuma dose testada de GPf-S1 ou GPf-S2 foi capaz de inibir completamente a formação do coágulo de fibrina (> 300 s). A molécula não sulfatada (GPf) não interferiu na coagulação plasmática (FIGURA 15B).

De acordo com os dados obtidos, FmgLe não foi capaz de prolongar o tempo de coagulação em nenhuma das doses testadas. Entretanto, FmgLe-S1 foi capaz de prolongar o tempo de coagulação de maneira dose-dependente. Com uma concentração de 25 µg/ml o tempo para coagulação do plasma foi de 63 s, aumentando em 2,5 vezes o tempo normal de coagulação e a ação máxima foi alcançada com 100 µg/ml, a qual não permitiu a coagulação (FIGURA 15C).

MgPr-S1 foi capaz de prolongar o tempo de coagulação de maneira dose-dependente nas concentrações testadas, sendo que com a concentração de 5 µg/ml o tempo de ensaio foi de 37 s, aumentando em 1,6 vezes o tempo do grupo controle e a ação máxima foi atingida com 100 µg/ml. Já o polissacarídeo nativo também não apresentou atividade (FIGURA 15D).

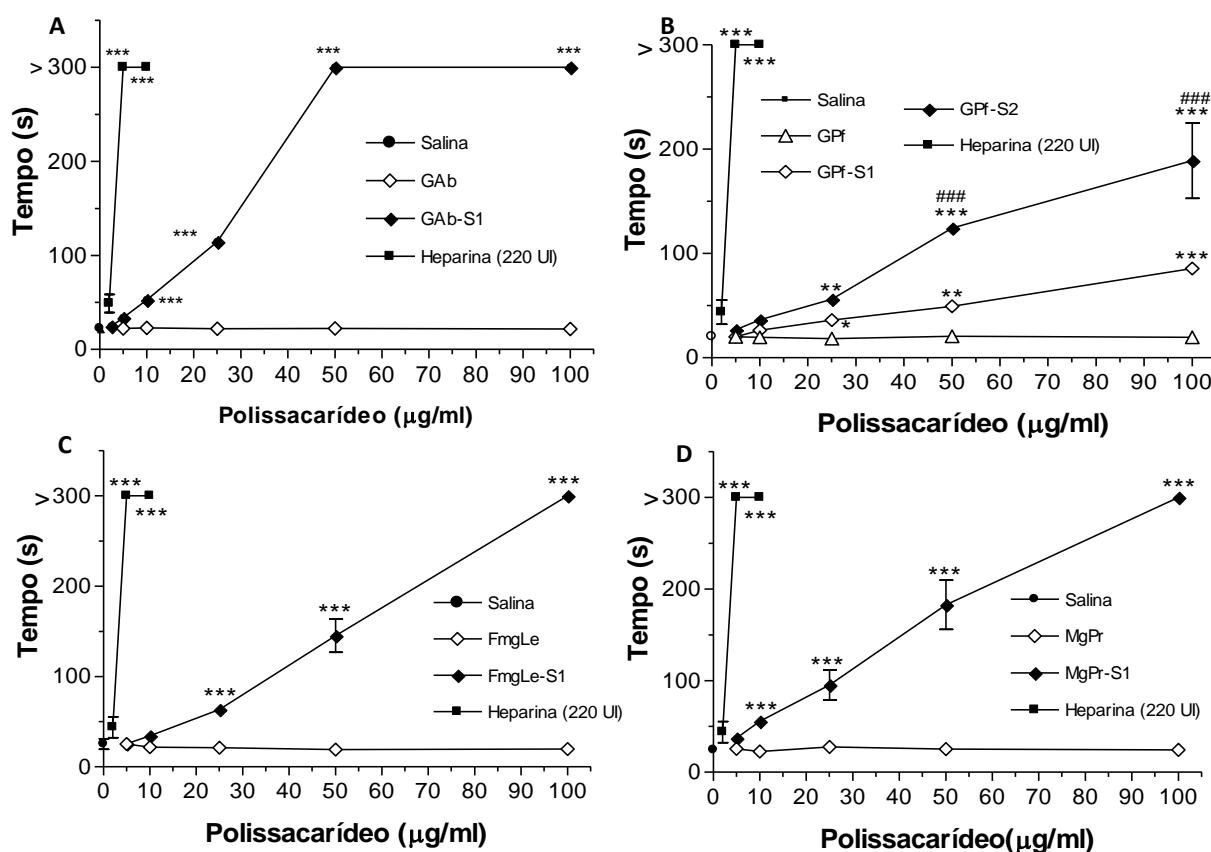


FIGURA 15 - TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (aPTT) para GAb e GAb-S1 (A), GPf, GPf-S1 e GPf-S2 (B), FmgLe e FmgLe-S1 (C) e MgPr e MgPr-S1 (D). Plasma humano com valores normais de aPTT foi incubado com diferentes concentrações de polissacarídeos. Resultados foram expressos em tempo de coagulação (s) \pm DP (n = 3), sendo consideradas diferenças significativas $p < 0,05^*$, $p < 0.01^{**}$ e $p < 0.001^{***}$, quando comparados com o grupo controle negativo (salina). Valores >300 s foram considerados como ausência de coagulação.

Quando se compara a relação entre o tempo de coagulação na presença (T_1) e na ausência (T_0) dos polissacarídeos sulfatados, considerando que valores de $T_1/T_0 > 13$ indicam a ausência de coagulação do plasma no teste de aPTT, todos os polissacarídeos sulfatados foram capazes de prolongar a coagulação de uma maneira dose-dependente, porém esta ação não foi igual para todas as moléculas (FIGURA 16). Este ensaio é, frequentemente, utilizado na clínica para investigar as alterações do mecanismo de coagulação sanguínea, especialmente quando as

deficiências envolvem os fatores que participam do sistema intrínseco da coagulação (YAVIN; WOLOZINSKY; COHEN, 2005).

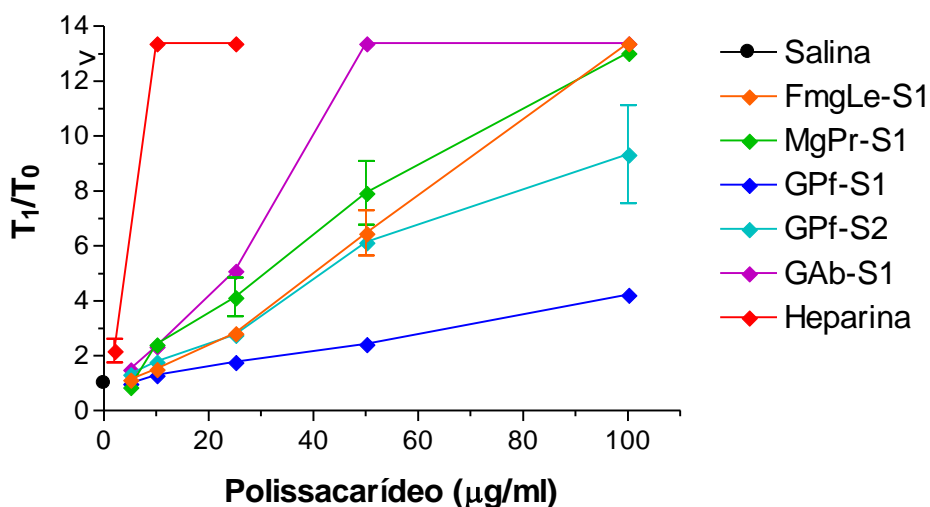


FIGURA 16 - TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (aPTT). Resultados expressos como T_1/T_0 , sendo o tempo de coagulação na presença (T_1) e ausência de polissacarídeo (T_0) na mistura de incubação \pm SD ($n = 3$). Foi considerada uma inibição total da coagulação do plasma $T_1/T_0 > 13$.

Comparando as concentrações necessárias dos polissacarídeos sulfatados para a obtenção de um efeito anticoagulante, observa-se uma potência diferente, pois alguns polissacarídeos em baixas concentrações já são capazes de prolongar o aPTT (TABELA 7). Estes dados sugerem que os polissacarídeos sulfatados estão interagindo com fatores da via intrínseca da coagulação ou com a via final comum, prolongando o tempo necessário para a coagulação, e que as diferenças estruturais entre eles resultam em respostas diferentes.

TABELA 7 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE, AVALIADA POR aPTT, DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Polissacarídeo	Atividade	Concentração ($\mu\text{g/ml}$ plasma) ^a	aPTT (T_1/T_0) ^{b,c}
GAb-S1	Mínima	5	1,5
	Máxima	50	>13
GPf-S1	Mínima	10	1,2
	Máxima	100	4
GPf-S2	Mínima	5	1,1
	Máxima	100	9
FmgLe-S1	Mínima	20	2,5
	Máxima	100	>13
MgPr-S1	Mínima	5	1,6
	Máxima	100	>13

^a Concentrações de polissacarídeos necessárias para a obtenção de um efeito anticoagulante mínimo e máximo pelo teste de aPTT.

^b Relação do aumento do tempo de coagulação pelo teste de aPTT, sendo T_1 valores obtidos na presença do polissacarídeo e T_0 na ausência do polissacarídeo.

^c Foi considerada uma inibição total da coagulação do plasma $T_1/T_0 > 13$.

6.3.2 Tempo de Trombina (TT)

O teste de Tempo de Trombina é utilizado para avaliar o último passo da cascata de coagulação, a formação de fibrina mediada pela trombina (ALBAN; FRANZ, 2001). A heparina já inibiu totalmente a formação do coágulo na menor dose testada (2 $\mu\text{g/ml}$), sendo esta atividade mantida nas outras concentrações testadas. Nenhum polissacarídeo nativo apresentou atividade anticoagulante pelo teste de TT.

O polissacarídeo GAb-S1 prolongou o tempo de coagulação do plasma quando este tempo foi avaliado pelo teste de TT. Na concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ de plasma o aumento do tempo de coagulação foi 46,7 s o que corresponde a um aumento de 4,1 vezes em relação ao tempo de coagulação do controle negativo (11,3 s), sendo a atividade máxima atingida na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ de plasma, com valores de coagulação > 300 s (FIGURA 17A).

Somente GPf e GPf-S1 foram testados quanto ao teste TT. Neste teste GPf-S1 apresentou uma melhor atividade do que no teste de aPTT, sendo que na concentração de 5 µg/ml o polissacarídeo sulfatado prolongou em 1,8 vezes o tempo de coagulação comparado com os tempos normais de coagulação (11,3 s), inibindo completamente a formação do coágulo na concentração de 100 µg/ml (FIGURA 17B). GPf-S2 não foi avaliado quanto sua ação anticoagulante pelo teste de TT, pois GPf-S1 já havia apresentado um bom efeito anticoagulante, sendo que os resultados seriam similares aos obtidos pelo teste de aPTT.

FmgLe-S1 apresentou uma boa atividade anticoagulante quando avaliada pelo TT. Na menor concentração testada (5 µg/ml), o polissacarídeo já foi capaz de aumentar 5 vezes o tempo normal de coagulação do plasma, sendo o tempo nesta concentração de 62 segundos. FmgLe-S1 inibiu completamente a coagulação na dose de 100 µg/ml (FIGURA 17C).

MgPr-S1 também apresentou uma atividade anticoagulante quando avaliado por TT, sendo que na concentração de 5 µg/ml de plasma o tempo de coagulação foi de 42 s, significando um aumento de 3,8 vezes o tempo de coagulação do controle negativo e uma inibição completa da inibição foi alcançada com uma dose de 50 µg/ml de plasma (FIGURA 17D).

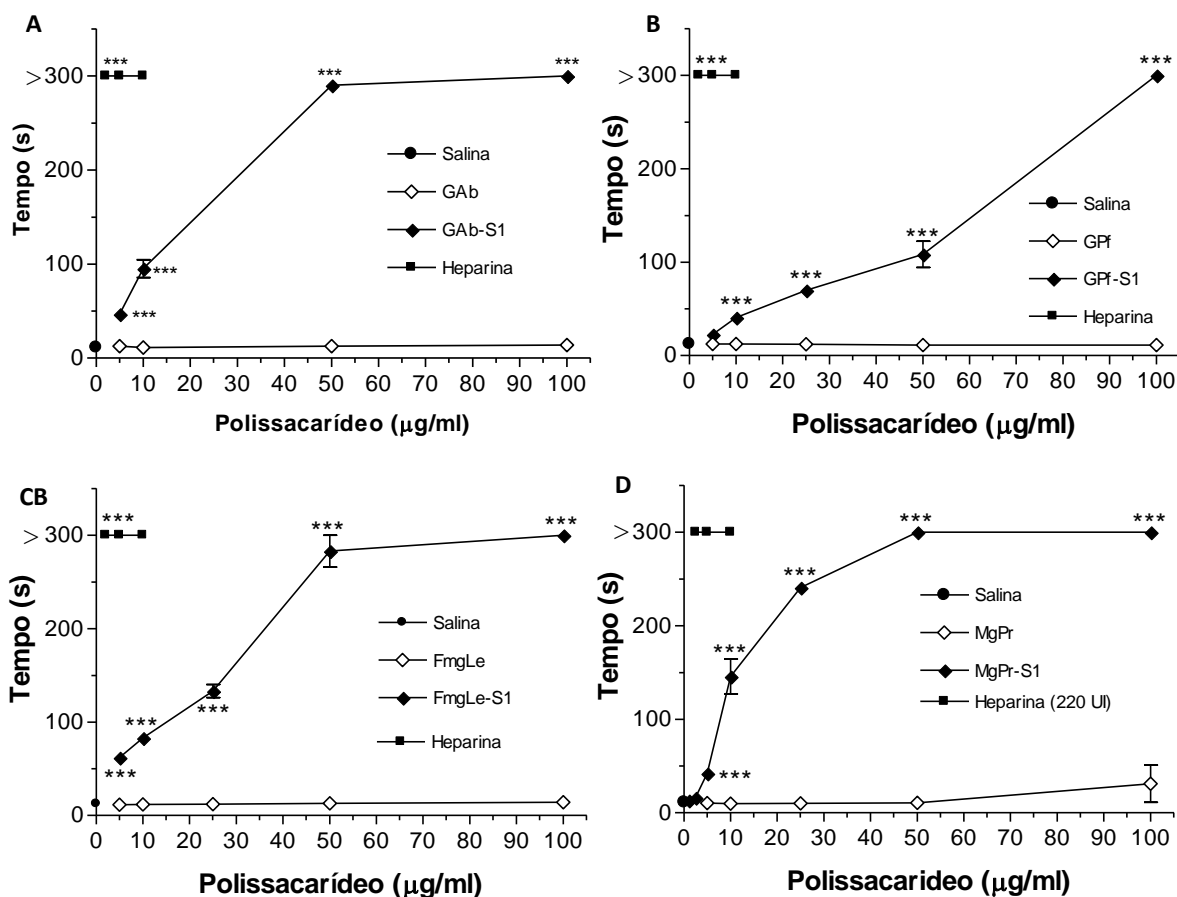


FIGURA 17 - TEMPO DE TROMBINA PARA GAb e GAb-S1 (A), GPf, GPf-S1 e GPf-S2 (B), FmgLe e FmgLe-S1 (C) e MgPr e MgPr-S1 (D) . Plasma humano com valores normais de TT foi incubado com diferentes concentrações de polissacarídeos. Resultados foram expressos em tempo de coagulação (s) \pm DP (n = 3), sendo consideradas diferenças significativas $p < 0.001^{***}$, quando comparados com o grupo controle negativo (salina). Valores >300 s foram considerados como ausência de coagulação.

Fazendo a mesma relação entre o tempo de coagulação na presença (T_1) e na ausência (T_0) dos polissacarídeos sulfatados, considerando que valores de $T_1/T_0 > 30$ indicam a ausência de coagulação do plasma, todos os polissacarídeos sulfatados foram capazes de prolongar a coagulação de uma maneira dose-dependente (FIGURA 18).

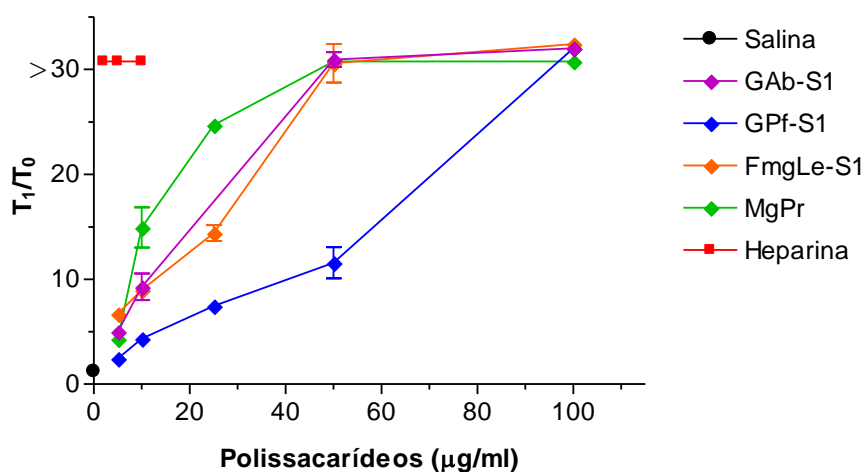


FIGURA 18 - TEMPO DE TROMBINA (TT). Resultados expressos como T_1/T_0 , sendo o tempo de coagulação na presença (T_1) e ausência de polissacarídeo (T_0) na mistura de incubação \pm SD ($n = 3$). Foi considerada uma inibição total da coagulação do plasma $T_1/T_0 > 30$.

Como observado pelo teste de aPTT, os polissacarídeos sulfatados também apresentaram uma atividade anticoagulante quando avaliados pelo teste de TT, sendo que a potência deles foi diferente para cada um dos testes (TABELA 8). No teste de TT, diferente do teste de aPTT, todos os polissacarídeos foram capazes de inibir completamente a coagulação do plasma. Esta maior atividade pelo teste de TT era esperada, uma vez que este teste avalia diretamente a ação da trombina na formação do coágulo, sugerindo que o mecanismo anticoagulante destas amostras deve-se a uma inibição da trombina, impedindo-a de continuar a cascata de coagulação.

TABELA 8 - ATIVIDADE ANTICOAGULANTE, AVALIADA POR TT, DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Polissacarídeo	Atividade Anticoagulante	Concentração ($\mu\text{g/ml}$ plasma) ^a	TT (T_1/T_0) ^{b,c}
GAb-S1	Mínima	5	4,1
	Máxima	100	>30
GPf-S1	Mínima	10	1,8
	Máxima	100	>30
FmgLe-S1	Mínima	5	5
	Máxima	100	>30
MgPr-S1	Mínima	5	3,8
	Máxima	50	>30

^a Concentrações de polissacarídeos necessárias para a obtenção de um efeito anticoagulante mínimo e máximo pelo teste de TT.

^b Relação do aumento do tempo de coagulação pelo teste de TT, sendo T_1 valores obtidos na presença do polissacarídeo e T_0 na ausência do polissacarídeo.

^c Foi considerada uma inibição total da coagulação do plasma $T_1/T_0 > 30$.

Os resultados de aPTT e TT mostram que os polissacarídeos nativos (não sulfatados) não tem efeito sobre a coagulação do plasma (*in vitro*) e que os polissacarídeos sulfatados apresentam atividade anticoagulante. Estes testes também indicam que estes polissacarídeos sulfatados possuem potências diferentes, pois foram necessárias diferentes concentrações para ter-se o efeito anticoagulante. Estas diferenças indicam que a quantidade de cargas negativas (grupos sulfatos) é importante, porém não o único fator determinante para a atividade. A composição monossacarídica, bem como a conformação das moléculas em solução pode favorecer uma maior interação com as proteínas que atuam na cascata de coagulação.

Glucanas quimicamente sulfatadas têm sido estudadas quanto suas atividades anticoagulantes. Uma β -D-glucana linear (1 \rightarrow 6)-ligada isolada do líquen *Parmotrema mantiqueirense* foi submetida a dois ciclos de sulfatação, gerando moléculas com um *DS* de 0,63 após o primeiro ciclo e um *DS* de 1,95 após o segundo ciclo. A molécula com um menor *DS*, na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ de plasma prolongou em 4,8 e 3,5 vezes o tempo de coagulação nos testes de aPTT e TT, respectivamente. Já a molécula com um maior *DS*, em baixas concentrações (14

$\mu\text{g/ml}$), já inibiu completamente a coagulação nos teste de aPTT e TT (MARTINICHEN, 2005). A β -D-glucana linear (1 \rightarrow 6) ligada isolada de *Agaricus blazei* após sulfatação química apresentou um valor intermediário de DS (1,36). Este polissacarídeo sulfatado apresentou uma maior atividade anticoagulante que a glucana de *P. mantiqueirense* com um menor DS (0,63) e uma menor atividade que a glucana com um maior DS (1,95). Estes dados sugerem para β -glucanas lineares (1 \rightarrow 6)-ligadas, quanto maior for a quantidade de grupos sulfatos, maior é o efeito anticoagulante *in vitro*.

β -Glucanas com ligações (1 \rightarrow 3) ramificadas em O-6 por terminais não redutores de glucose com diferentes teores de sulfato foram testadas quanto a suas atividades anticoagulantes (HIRATA *et al.*, 1994). Foi observado que amostras contendo de 10 a 17% de teor de enxofre foram capazes de inibir a coagulação do plasma (teste de aPTT) nas concentrações de 100 $\mu\text{g/ml}$. O teor de enxofre de GPf-S1 e GPf-S2 foi de 8,2 e 8,6%, respectivamente. As glucanas utilizadas no estudo de Hirata e col. (1994) apresentaram uma maior atividade anticoagulante que GPf-S1 e GPf-S2, possivelmente, devido ao maior conteúdo de enxofre.

Em outro estudo, a goma curdlana, uma β -glucana linear com ligações (1 \rightarrow 3), foi sulfatada quimicamente e sua atividade anticoagulante avaliada. Neste estudo, os grupos de OH-6 foram previamente protegidos com cloreto de adamantil, sendo que a sulfatação só poderia ocorrer nos grupos OH-2 e OH-4. O DS determinado foi de 0,83 e este polissacarídeo apresentou uma atividade menor que outras glucanas estudadas, sendo necessária uma concentração superior a 100 $\mu\text{g/ml}$ para ocorrer uma inibição total da formação do coágulo (ALBAN *et al.*, 1995).

Não há na literatura estudos sobre a atividade anticoagulante de polissacarídeos com estruturas semelhantes à fucomanogalactana e a manogalactana descritas neste trabalho. Apesar destes polissacarídeos apresentarem as cadeias principais similares, as atividades *in vitro* não foram iguais. Nas menores concentrações testadas, MgPr-S1 apresentou uma maior atividade anticoagulante que FmgLe-S1, tanto no testes de aPTT como no teste de TT. Galactanas naturalmente sulfatadas isoladas das algas verdes *Codium fragile* e *Codium vermilara* contendo 20% e 30% de sulfato e uma cadeia principal com ligações (1 \rightarrow 3) apresentaram atividades similares a MgPr-S1 nas mesmas doses testadas (CIANCIA *et al.*, 2007). Uma galactofucana com uma cadeia linear de

unidades de α -Galp (1→4)-ligadas, parcialmente 3-O-sulfatadas com ramificações em O-2 por unidades de fucose (1→4)-ligadas e sulfatadas em O-3 isolada da alga marrom *Spatoglossum schroederi* não apresentou atividade anticoagulante (ROCHA *et al.*, 2005). Este estudo mostra que a presença de grupos sulfatos em polissacarídeos não é garantia de que o polímero tenha atividade anticoagulante.

Nos experimentos de aPTT e TT a heparina apresentou uma ação anticoagulante muito alta, pois em baixas concentrações já inibiu completamente a coagulação do plasma. Estes resultados reforçam o grande risco de sangramento que a heparina pode causar, uma vez que o seu intervalo de segurança é muito pequeno.

6.4 TESTES *IN VIVO*

6.4.1 Modelo de Trombose Venosa Estase-Induzida em Ratos

Modelos animais *in vivo* permitem estudos sobre a formação de trombo, bem como de seus inibidores. Estes ensaios também permitem avaliar a interação de inibidores com os elementos de sangue, além de poderem ser realizados por um período maior (HANSON e SAKARIASSEN, 1998).

Uma grande variedade de modelos animais tem sido desenvolvida para testes da eficácia de agentes antitrombóticos. Normalmente, nestes modelos a formação do trombo é desencadeada por hipercoagulabilidade ou por injúria do vaso, combinada com redução do fluxo sanguíneo (FURUGOHRU *et al.*, 2005; PETERNEL *et al.*, 2005). No presente estudo, a hipercoagulabilidade foi induzida pela administração de tromboplastina e redução do fluxo sanguíneo por estase da veia cava em ratos. Este modelo foi escolhido pela facilidade de manuseio dos animais e por ser de mais fácil execução.

Nos experimentos de atividade antitrombótica a média dos pesos dos trombos secos dos animais que receberam apenas veículo (salina), foi de 7,9 mg, e correspondeu a 100% de trombose, sendo o efeito dos polissacarídeos na formação do trombo comparada a este grupo.

GAb-S1 na concentração de 0,250 mg/kg inibiu em 72% a formação do trombo e em 48% com a dose de 0,500 mg/kg. Porém, na concentração de 1 mg/kg o polissacarídeo apresentou um pequeno efeito pró-trombótico, aumentando em 13% o peso do trombo, porém este aumento não foi estatisticamente diferente. Já a heparina apresentou uma dose-resposta, inibindo completamente a formação do trombo com uma concentração de 0,200 mg/kg (FIGURA 19A).

Gab-S1 apresentou uma resposta oposta à β -D-glucana com ligações 1 \rightarrow 6 de *P. mantiqueirensis* quimicamente sulfatada. Esta glucana ($DS = 1,95$) apresentou resposta dose-dependente quando testada *in vivo*, sendo que na concentração de 0,500 mg/kg ela inibiu totalmente a formação do trombo (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005a). Estas respostas opostas podem ser devido às diferenças no DS , padrão de sulfatação e tamanho da molécula. Um estudo com galactanas com estruturas químicas iguais, porém com padrões de sulfatação diferentes, isoladas das algas *G. crinale* e *B. occidentalis*, também apresentou resultados opostos. A galactana de *G. crinale* apresenta menos grupos sulfato, sendo que em baixas doses apresenta um efeito pró-trombótico e em altas doses uma alta atividade antitrombótica. Já a galactana de *B. occidentalis* apresentou atividade antitrombótica em baixas doses e um efeito pró-trombótico em altas doses (FONSECA *et al.*, 2008). Estes resultados reforçam a idéia de que o padrão de substituição e quantidade de grupos sulfatos podem ser cruciais para diferentes atividades antitrombóticas.

Somente GPf-S2 foi testada quanto a sua ação antitrombótica *in vivo*, uma vez que apresentou melhores resultados *in vitro* no teste de aPTT que GPf-S1. Apesar de ter um menor DS que os outros polissacarídeos, GPf-S2 apresentou uma boa atividade antitrombótica. Na menor concentração testada (1 mg/kg), GPf-S2 inibiu em 73,4% a formação de trombo e na dose de 1,5 mg/kg a inibição foi de 87% (FIGURA 19B).

Existem poucos dados na literatura de outras glucanas que tenham sido testadas quanto à atividade antitrombótica *in vivo*. Uma curdlana sulfatada com DS de 0,83, contendo 75% de sulfato em O-2 e O-4 foi testada em um modelo de trombose em coelhos, sendo a dose necessária para uma completa inibição da formação do trombo foi de 1 mg/kg (ALBAN *et al.*, 1995).

MgPr-S1 inibiu a formação do trombo de uma maneira dose-dependente. Na concentração de 1 mg/kg, a manogalactana sulfatada inibiu em 51% a formação do trombo e na dose de 6 mg/kg esta inibição foi completa (FIGURA 19C).

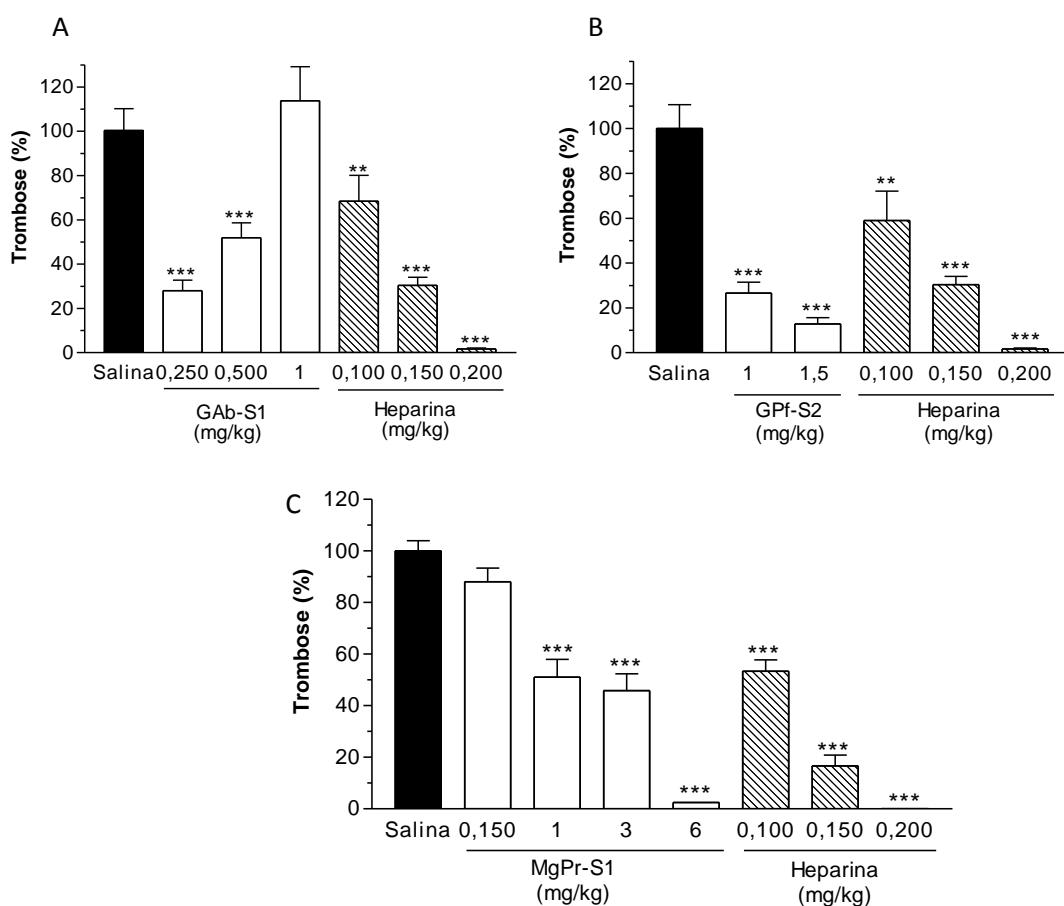


FIGURA 19 – EFEITO ANTITROMBÓTICO VENOSO DE GPf-S2 (A), FmgLe-S1 (B) e MgPr-S1 (C) EM RATOS. A formação do trombo foi induzida pela combinação de estase e hipercoagulabilidade. Salina, polissacarídeos sulfatados ou heparina foram administradas pela artéria carótida e a circulação foi permitida por 5 min. Após este tempo, tromboplastina (5 mg/kg) foi injetada e após 20 s foi feita a estase do segmento de 0,7 mm, isolado da veia cava abdominal. Após 20 min de estase o trombo formado foi removido, seco e pesado. Resultados foram expressos como % do peso do trombo (média \pm EPM, $n = 6$, com $p < 0.001^{***}$ vs. salina), 100% representando ausência de inibição de trombose (peso do trombo na ausência de polissacarídeo)

Na busca por alternativas a heparina, uma galacturonana foi quimicamente sulfatada e testada quanto sua ação antitrombótica (CIPRIANI *et al.*, 2009). Esta molécula, na dose de 3,5 mg/kg, inibiu totalmente a formação do trombo, utilizando o mesmo modelo animal. Este polissacarídeo, além dos grupamentos sulfato, apresenta grupos carboxil, os quais podem ajudar a interação do polissacarídeo com as proteínas envolvidas na cascata de coagulação, inibindo assim a formação do trombo.

Outros polissacarídeos sulfatados também foram estudados quanto suas ações antitrombóticas *in vivo*, utilizando o mesmo modelo animal descrito neste trabalho. Em um estudo com um polissacarídeo similar a heparina de porco isolado da ascídia *Styela plicata*, na dose de 5 mg/kg, reduziu a formação do trombo em 45% (CARDILO-REIS *et al.*, 2006). Já uma glucomanana isolada do líquen *Cladonia ibitipocae*, quimicamente sulfatada ($DS = 1,29$), inibiu totalmente a formação do trombo em uma concentração de 2 mg/kg (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005b).

6.4.2 Determinação da Tendência Hemorrágica

Um dos principais efeitos adversos da heparina é a hemorragia. Para verificar se os polissacarídeos sulfatados também apresentam uma tendência em causar hemorragia, os mesmos foram administrados pela artéria carótida direita e após cinco minutos foi realizado um pequeno corte na cauda, a qual foi colocada em salina. Após 60 minutos foi determinado o volume sanguíneo por método espectrofotométrico.

Dentre as glucanas sulfatadas, somente GPf-S2 foi avaliada na concentração de 1,5 mg/kg, pois nesta concentração a molécula apresentou uma maior atividade antitrombótica. O volume de sangue perdido pelos animais tratados com GPf-S2 foi igual ao volume de sangue perdido dos animais do grupo controle negativo (salina), indicando que GPf-S2 não tem tendência em causar hemorragia (FIGURA 20A).

A manogalactana sulfatada (MgPr-S1) também foi avaliada quanto a sua tendência de causar hemorragia. As concentrações testadas foram de 6 e 3 mg/kg, sendo os valores comparados com o grupo controle negativo e com a heparina nas

concentrações de 0,100, 0,150 e 0,200 mg/kg (FIGURA 20B). Somente na maior dose MgPr-S1 aumentou o volume de sangue perdido, mas este aumento foi menor que o volume de sangue perdido pela administração de heparina na concentração de 0,200 mg/kg.

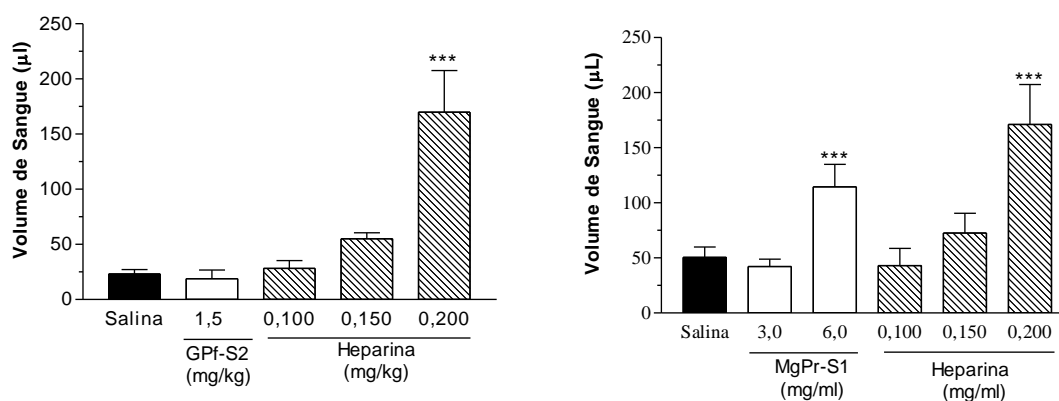


FIGURA 20 – INFLUÊNCIA DE GPf-S2 (A) e MgPr-S1 (B) NA HEMORRAGIA. Salina, polissacarídeos sulfatados ou heparina foram administradas pela artéria carótida e circularam por 5 min, após este tempo foi realizado um corte de 3 mm na extremidade da cauda do animal, a qual foi imersa em 40 ml de água destilada. A perda de sangue foi determinada 60 min após por leitura da absorbância em 540 nm. Resultados foram expressos como volume de sangue perdido \pm EPM (n = 6), com $p < 0,001$ *** vs. salina.

MgPr-S1 apresentou um aumento na perda de sangue comparável com outros polissacarídeos sulfatados. As galactanas sulfatadas isoladas de algas não tiveram efeito na perda de sangue (FONSECA *et al.*, 2008), já a pectina cítrica sulfatada aumentou em 1,6 vezes o tempo de sangramento na dose de 3,5 mg/kg (CIPRIANI *et al.*, 2009), enquanto que a glucana sulfatada de *P. matiqueirensis* aumentou em 2 vezes o tempo de sangramento (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005b). A molécula que causou um maior aumento no tempo de sangramento foi a galactoglucomanana quimicamente sulfatada de *C. ibitipocae*, aproximadamente 4 vezes (MARTINICHEN-HERRERO *et al.*, 2005a). Estes ensaios indicam que os polissacarídeos sulfatados podem atuar como alternativas a heparina com uma menor tendência de causar hemorragia.

6.5 ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA *IN VITRO*

A principal função fisiológica das plaquetas na coagulação sanguínea é preservar a integridade das paredes dos vasos através da formação do tampão de plaquetas (GORBET e SEFTON, 2004). As plaquetas também exercem uma grande influência na trombose arterial, sendo que terapias antiplaquetárias são utilizadas no tratamento e prevenção de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (BAILEY; SCANTLEBURY; SMYTH, 2009). As plaquetas respondem a estímulos mínimos e tornam-se ativadas em contato com superfícies trombogênicas (ex., endotélio lesionado) e superfícies artificiais. Algumas proteínas plasmáticas como trombina, fibrinogênio ou outras substâncias, como ADP são potentes ativadores da agregação plaquetária (GORBET e SEFTON, 2004). Devido a estes fatores e como a heparina pode influenciar na agregação plaquetária (SAVI *et al.*, 2003), foi verificado a ação dos polissacarídeos quimicamente sulfatados na ativação das plaquetas, *in vitro*, sendo esta ativação estimulada por ADP ou por trombina.

6.5.1 Agregação Plaquetária com ADP

A agregação plaquetária foi estimulada com a administração de ADP em um plasma rico em plaquetas (PRP) e a extensão da agregação foi quantificada em espectrofotômetro como o aumento da transmitância em 600 nm, sendo considerada 100% de agregação as plaquetas que não receberam polissacarídeos sulfatados. Para este primeiro ensaio foi adicionado ao PRP os polissacarídeos sulfatados (MgPr-S1, FmLe-S1, GPf-S2) em uma concentração final de 200 µg/ml (FIGURA 21). FmLe-S1 inibiu em aproximadamente 23% a agregação plaquetária, mas esta inibição não foi estatisticamente diferente do grupo salina. Já os polissacarídeos GPf-S1 e MgPr-S1 tiveram uma maior influência na agregação plaquetária, sendo que MgPr-S1 a inibiu em 54%, enquanto que GPf-S2 inibiu totalmente a agregação.

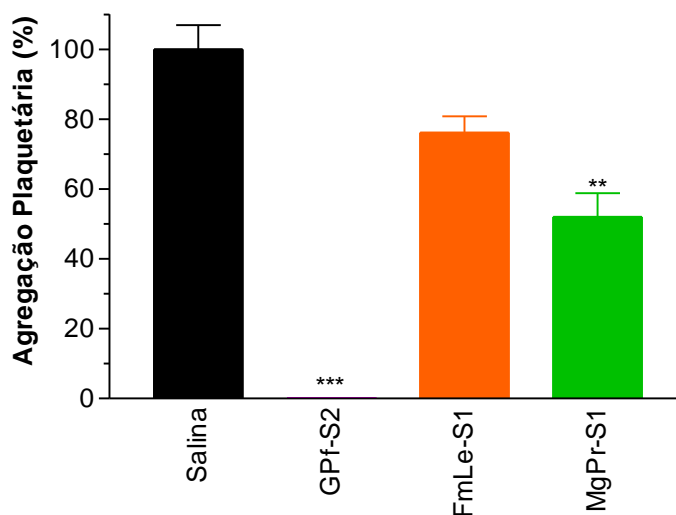


FIGURA 21 – EFEITO DE GPf-S2, FmgLe-S1 E MgPr-S1 NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR ADP. Plasma rico em plaquetas foi incubado a 37 °C com polissacarídeos sulfatados (concentração final de 200 µg/ml) e após 1 min a agregação foi induzida com ADP. A agregação plaquetária foi expressa como aumento da transmitância em 600 nm, por 5 min. Resultados apresentados como % de agregação (100% de agregação PRP incubado com salina e ADP), com $p < 0,01^{**}$ e $p < 0,001^{***}$ vs. salina.

Para verificar se GPf-S2 inibia a agregação plaquetária em baixas concentrações, foram testadas as concentrações de 50 e 100 µg/ml (concentração final). Foi observado que GPf-S2 na concentração de 50 µg/ml inibiu em 60% e em 100 µg/ml já houve uma inibição total da agregação das plaquetas (FIGURA 22).

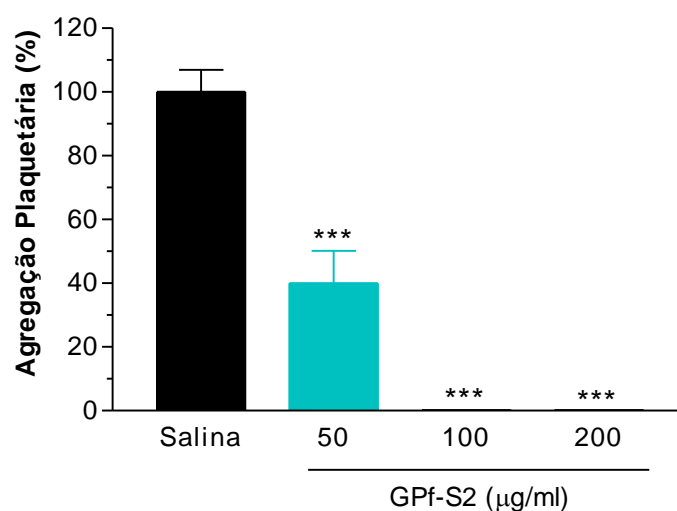


FIGURA 22 - EFEITO DE GPf-S2 NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA

POR ADP. Plasma rico em plaquetas foi incubado a 37 °C com GPf-S2 (concentrações finais de 50, 100 ou 200 µg/ml) e após 1 min a agregação foi induzida com ADP. A agregação plaquetária foi expressa como aumento da transmitância em 600 nm, por 5 min. Resultados apresentados como % de agregação (100% de agregação PRP incubado com salina e ADP), com $p < 0,001$ *** vs. salina.

Para avaliar se GPf-S2 e FmgLe-S1 tinham alguma influência na agregação das plaquetas na ausência de um ativador, estes polissacarídeos foram incubados com PRP. GPf-S2 não influenciou a agregação, porém FmgLe-S1 foi capaz de estimular a agregação plaquetária de PRP na ausência de uma agonista, sendo este estímulo comparado aos estímulo induzido por ADP (100%) (FIGURA 23).

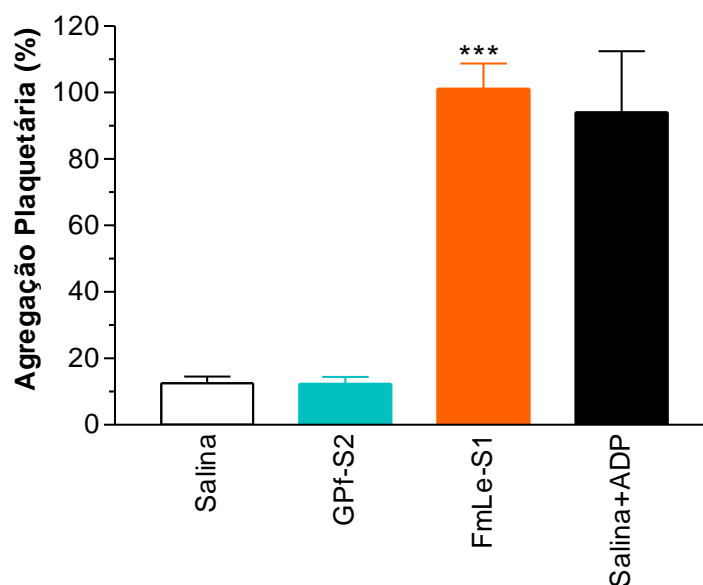


FIGURA 23 - EFEITO DE GPf-S2 e FmLe-S1 NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA NA AUSÊNCIA DE ADP. Plasma rico em plaquetas foi incubado a 37 °C com GPf-S2 e FmLe-S1 (concentrações finais de 200 µg/ml). A agregação plaquetária foi expressa como aumento da transmitância em 600 nm, por 5 min. Resultados apresentados como % de agregação (100% de agregação PRP incubado com salina e ADP), com $p < 0,001^{***}$ vs. salina sem ADP.

6.5.2 Agregação Plaquetária com α -Trombina

As plaquetas também podem ser ativadas pelo estímulo da trombina. O ensaio de agregação plaquetária também foi realizado com este agonista, pois a heparina pode se ligar a trombina inibindo a agregação e aumentando o risco de sangramento. Para este procedimento, plaquetas lavadas foram incubadas com as soluções polissacarídicas ou heparina nas concentrações finais de 200 µg/ml e trombina (concentração final de 1 nM). Neste experimento, deve-se utilizar plaquetas lavadas para que a trombina não cause a coagulação do plasma, dificultando a interpretação dos resultados (MAAROUFI *et al.*, 2007). Todos os polissacarídeos testados foram capazes de inibir a agregação plaquetária ativada por trombina, sugerindo que eles podem se ligar a esta protease (FIGURA 24). A heparina reduziu

em 72%, GPf-S2 em 100%, FmgLe-S1 em 95% e MgPr-S1 em 82% a agregação plaquetária estimulada por trombina.

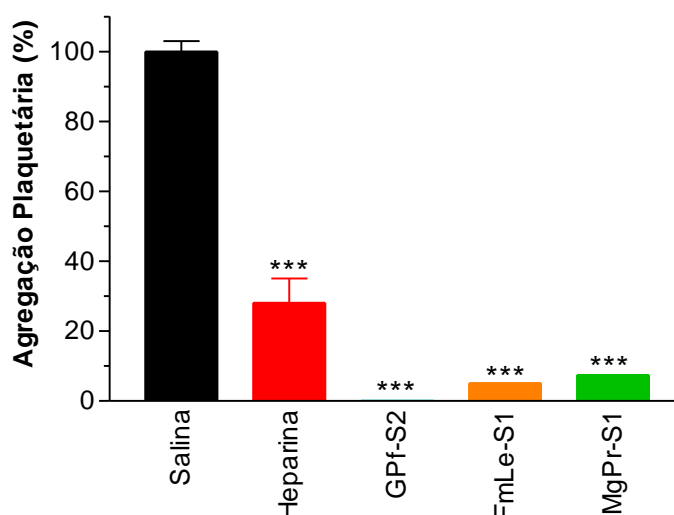


FIGURA 24 - EFEITO DE HEPARINA, GPf-S2, FmgLe-S1 E MgPr-S1 NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR α -TROMBINA.

Plaquetas lavadas foram incubadas a 37 °C com polissacarídeos sulfatados ou heparina (concentração final de 200 μ g/ml) e após 1 min a agregação foi induzida com α -trombina (concentração final de 1 nM). A agregação plaquetária foi expressa como aumento da transmitância em 600 nm, por 5 min. Resultados apresentados como % de agregação (100% de agregação plaquetas incubadas com salina e α -trombina), com $p < 0,001^{***}$ vs. salina.

Polissacarídeos sulfatados podem ter diferentes influências na agregação plaquetária. Em um estudo realizado com fucoidanas isoladas da alga marinha *Fucus vesiculosus* mostrou que estes polissacarídeos são potentes indutores da agregação plaquetária em altas concentrações (AZEVEDO *et al.*, 2009). Já outro estudo realizado com polissacarídeos capsulares de *E. coli* mostrou que estes polissacarídeos inibem a agregação plaquetária estimulada por fator tissular e P-selectina (MADDINENI *et al.*, 2006). Outro estudo realizado com galactanas sulfatadas de *B. occidentalis* também mostrou que diferentes frações estimularam a agregação plaquetária (FARIAS; NAZARETH; MOURÃO, 2001). No estudo realizado, onde é comparando os efeitos de pectina de alta e baixa massa molar quimicamente sulfatadas foi observado uma diferença na ativação de plaquetas, sendo que a pectina de baixa massa molar apresentou uma maior inibição da

agregação (CIPRIANI *et al.*, 2009). Polissacarídeos dos extratos aquosos das algas *C. fragile* e *C. vermilara* induziram a agregação plaquetária, especialmente aqueles que apresentavam um maior teor de sulfato (CIANCIA *et al.*, 2007). Esta observação pode contribuir para a explicação dos diferentes resultados obtidos. FmgLe-S1 foi o polissacarídeo sulfatado com um maior *DS*, o que justificaria este polissacarídeo atuar como uma agonista da agregação quando não há estímulo por outro agonista, α -trombina por exemplo. Já GPf-S2 é um dos polissacarídeos estudados que apresenta um menor grau de substituição, sendo que este não estimulou a agregação e atuou como um antagonista da agregação.

6.6 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA TROMBINA OU FATOR Xa *IN VITRO*

A heparina atua como anticoagulante e antitrombótico por se ligar à antitrombina e ao cofator II da heparina, acelerando a taxa com que estes inibidores de serino proteases formam complexos com enzimas da cascata de coagulação, principalmente trombina e fator Xa, inativando-as.

O estudo do mecanismo de ação dos polissacarídeos sulfatados está baseado no modo de ação da heparina. Para verificar se os polissacarídeos atuam via inibição da trombina e do fator Xa, eles foram incubados com trombina ou fator Xa na presença ou ausência de AT ou HCII e a atividade residual da trombina ou do fator Xa foram determinadas pelo uso de um substrato cromogênico específico para cada uma destas proteases.

O polissacarídeo GAb-S1 apresentou uma maior inibição da trombina mediada pela AT ($IC_{50} = 0,5 \mu\text{g/ml}$, FIGURA 25A), sendo que com a concentração de $100 \mu\text{g/ml}$ houve uma inibição de 94%. Nesta mesma concentração GAb-S1 inibiu em 90% a atividade de trombina mediada pelo HCII, sendo que GAb-S1 apresentou uma maior atividade que a heparina, de acordo com os valores de IC_{50} ($0,2$ e $0,7 \mu\text{g/ml}$, respectivamente) (FIGURA 25B). GAb-S1 apresentou uma fraca inibição do Fator Xa mediada pela AT, sendo que na concentração de $300 \mu\text{g/ml}$ a inibição foi de 60% (FIGURA 25C). GAb-S1 não foi capaz de inibir diretamente a trombina ou o Fator Xa (dados não mostrados).

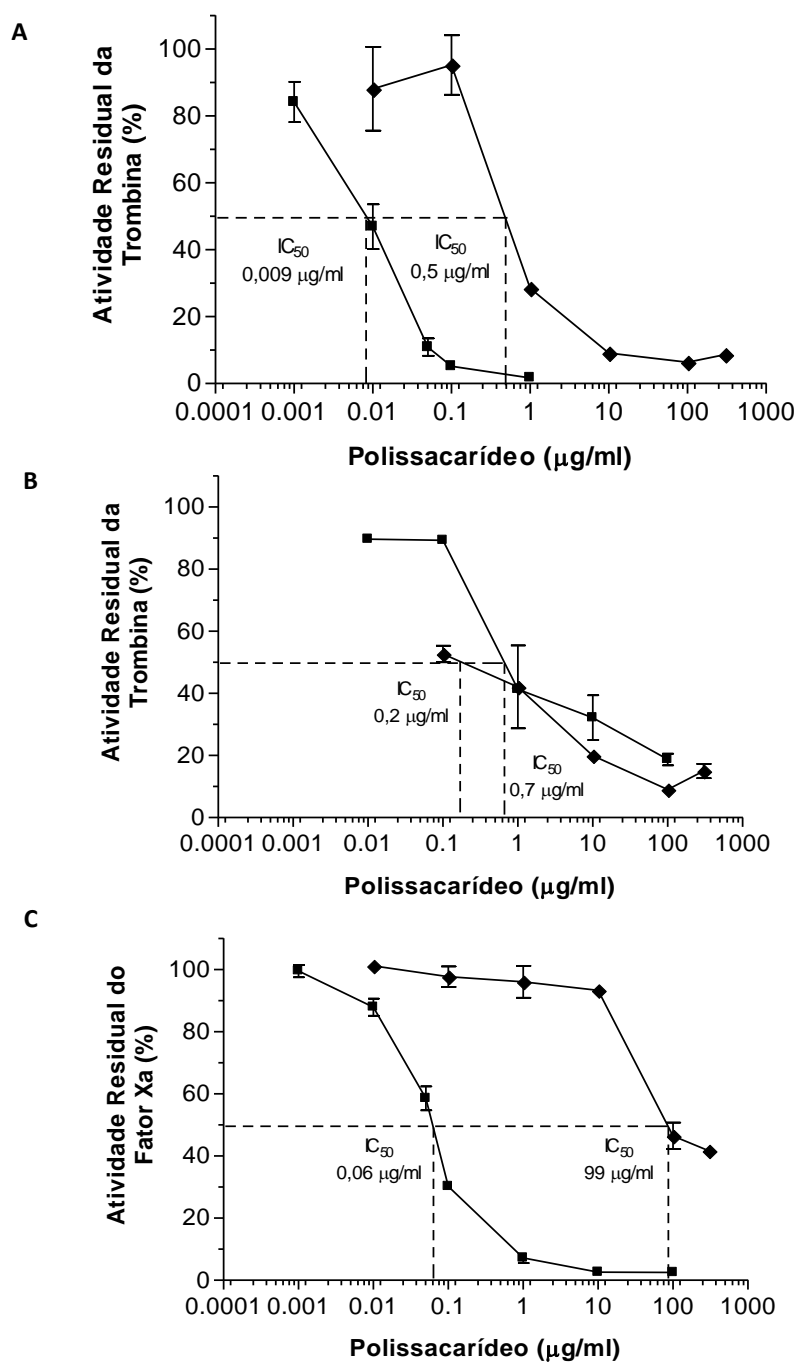


FIGURA 25 – EFEITO DE GAb-S1 NA INIBIÇÃO DE TROMBINA POR AT (A) OU HCII (B) E DO FATOR Xa POR AT (C). Trombina (6 nM), fator Xa (8nM), AT (100 nM) ou HCII (15 nM) foram incubados com diferentes concentrações de GAb-S1 (◆) ou heparina (■). Após 1 min a 37 °C, foram adicionados substratos cromógenos específicos (100 µM), e a atividade da trombina ou fator Xa foram expressas como percentual de absorvância em 405 nm (média ± DP, n = 3), sendo considerado 100% de atividade a absorvância obtida sem adição de polissacarídeo.

As glucanas GPf-S1 e GPf-S2 também foram testadas quanto a capacidade de inibir a trombina e o fator Xa. GPf-S2 apresentou uma maior inibição de trombina mediada por AT, com uma IC_{50} de 0,25 $\mu\text{g/ml}$. GPf-S1 apresentou uma inibição da trombina mediada por AT um pouco menor que GPf-S2, sendo a IC_{50} de 0,4 $\mu\text{g/ml}$ (FIGURA 26A), contudo na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ ambos inibiram em 95% a atividade da trombina mediada por AT. Em relação a inibição da trombina mediada pelo HCII, GPf-S1 e GPf-S2 apresentaram uma atividade muito similar, sendo a IC_{50} para os dois polissacarídeos de 3,3 $\mu\text{g/ml}$. A partir da concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ a inibição da trombina mediada pelo HCII de GPf-S1 e GPf-S2 foi maior que a heparina na mesma concentração (FIGURA 26B). Estes polissacarídeos também apresentaram uma menor atividade inibitória do fator Xa na presença de AT, sendo a IC_{50} de 33 $\mu\text{g/ml}$ para GPf-S1 e de 23 $\mu\text{g/ml}$ para GPf-S2 (FIGURA 26C). Estes polissacarídeos também não inibiram a trombina ou o Fator Xa na ausência das serpinas AT e HCII (dados não mostrados).

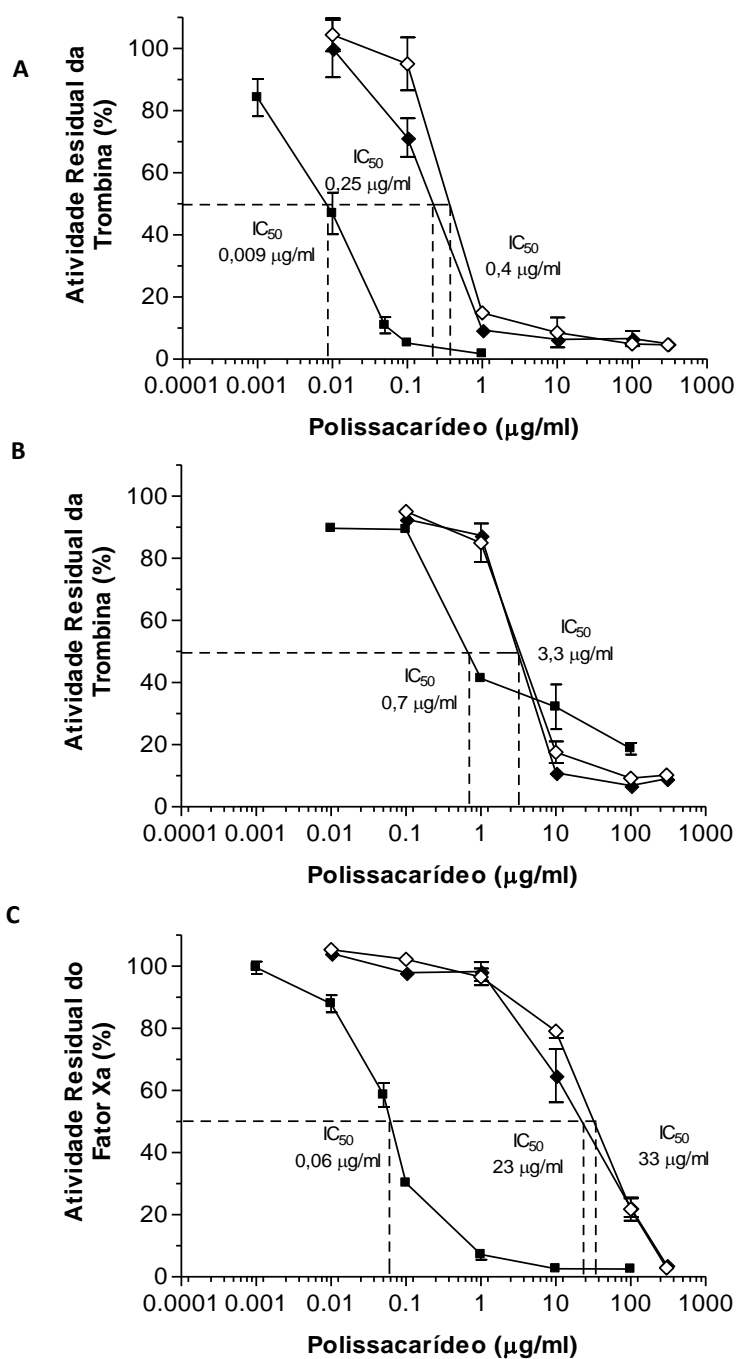


FIGURA 26 – EFEITO DE GPf-S1 e GPf-S2 NA INIBIÇÃO DE TROMBINA POR AT (A) OU HCII (B) E DO FATOR Xa POR AT (C). Trombina (6 nM), fator Xa (8 nM), AT (100 nM) ou HCII (15 nM) foram incubados com diferentes concentrações de GPf-S1(◇), GPf-S2 (◆) ou heparina (■). Após 1 min a 37 °C, foram adicionados substratos cromógenos específicos (100 µM), e a atividade da trombina ou fator Xa foram expressas como percentual de absorbância em 405 nm (média ± DP, n = 3), sendo considerado 100% de atividade a absorbância obtida sem adição de polissacarídeo.

FmgLe-S1 também apresentou uma maior atividade inibitória da trombina mediada por AT ($IC_{50} = 0,7 \mu\text{g/ml}$), sendo que na dose de $100 \mu\text{g/ml}$ houve uma inibição de 90% (FIGURA 27A). A inibição da trombina mediada pelo HCII foi similar a ação da heparina, sendo que a IC_{50} de FmgLe-S1 foi de $1,3 \mu\text{g/ml}$ e da heparina de $0,7 \mu\text{g/ml}$ (FIGURA 27B). Porém, FmgLe-S1 apresentou um baixo efeito inibitório do fator Xa mediado pela AT. Esta inibição só aconteceu com altas concentrações, inibindo em 70% a atividade do fator Xa na concentração de $300 \mu\text{g/ml}$ e a IC_{50} determinada foi de $150 \mu\text{g/ml}$. FmgLe-S1 também não foi capaz de inibir a trombina ou o fator Xa na ausência de AT ou HCII (FIGURA 27C).

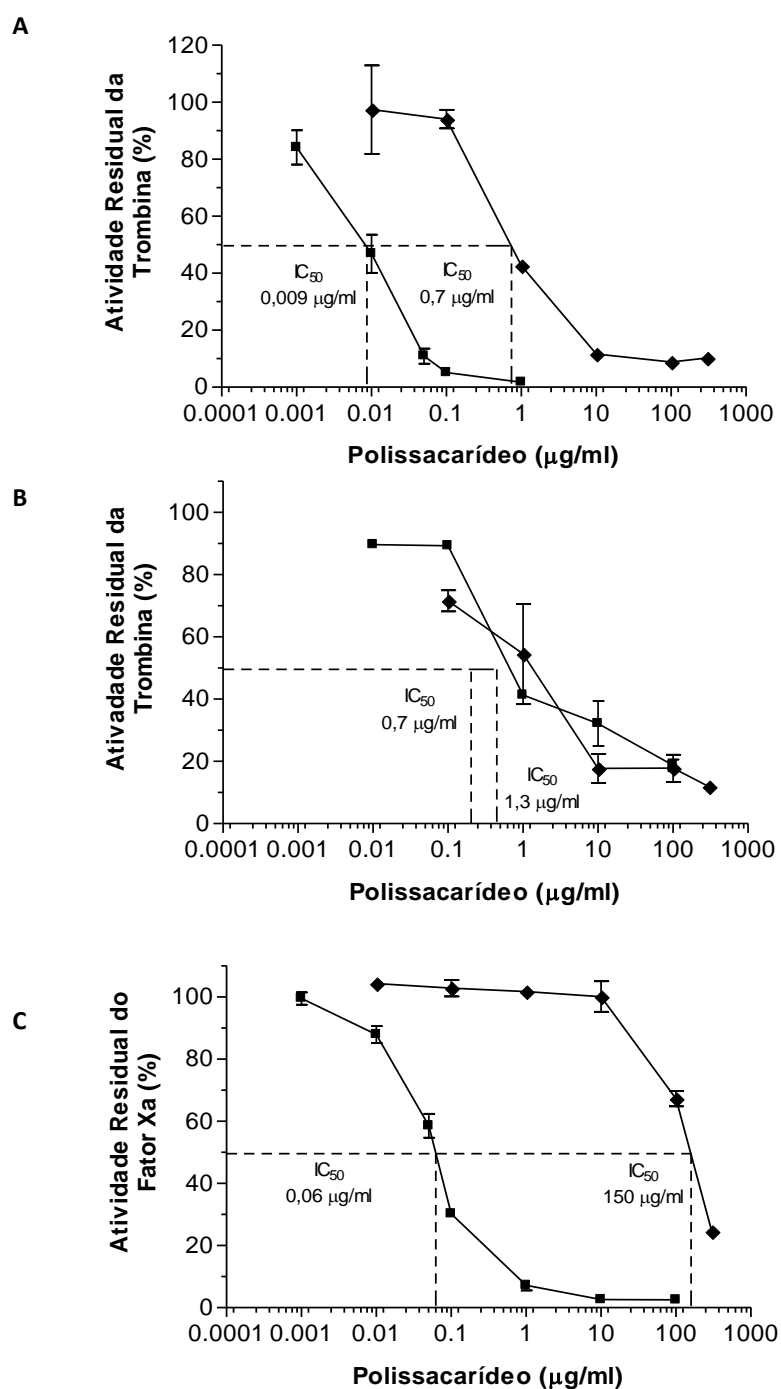


FIGURA 27 – EFEITO DE FmgLe-S1 NA INIBIÇÃO DE α -TROMBINA POR AT (A) OU HCII (B) E DO FATOR Xa POR AT (C). Trombina (6 nM), fator Xa (8 nM), AT (100 nM) ou HCII (15 nM) foram incubados com diferentes concentrações de FmgLe-S1 (◆) ou heparina (■). Após 1 min a 37 °C, foram adicionados substratos cromógenos específicos (100 µM), e a atividade da trombina ou fator Xa foram expressas como percentual de absorbância em 405 nm (média \pm DP, n = 3), sendo considerado 100% de atividade a absorbância obtida sem adição de polissacarídeo.

Como observado para os outros polissacarídeos testados neste trabalho, MgPr-S1 também inibiu a trombina na presença de AT (FIGURA 28A) e a IC₅₀ determinada foi de 0,3 µg/ml (concentração final). Este polissacarídeo sulfatado também inibiu a trombina na presença de HCII (FIGURA 28B) e a IC₅₀ foi de 0,04 µg/ml (concentração final), sendo que a inibição da trombina mediada pelo cofator II da heparina foi maior que a inibição da heparina. Entretanto MgPr-S1 não inibiu o fator Xa na presença de AT (FIGURA 28C), bem como não foi capaz de inibir diretamente a trombina ou o fator Xa (dados não mostrados).

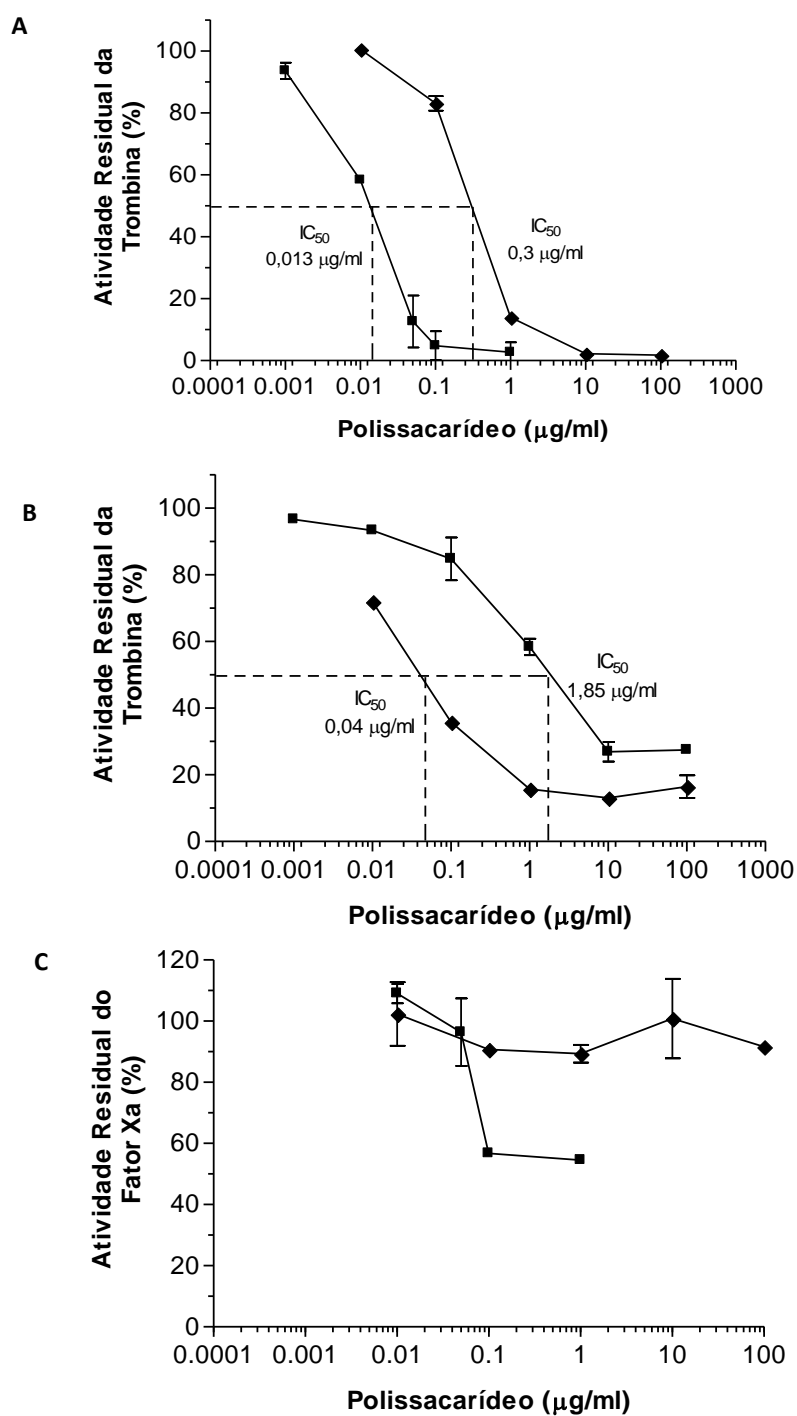


FIGURA 28 – EFEITO DE MgPr-S1 NA INIBIÇÃO DE TROMBINA POR AT (A) OU HCII (B) E DO FATOR Xa POR AT (C). Trombina (6 nM), Fator Xa (8 nM), AT (100 nM) ou HCII (15 nM) foram incubados com diferentes concentrações de MgPr-S1 (◆) ou heparina (■). Após 1 min a 37 °C, foram adicionados substratos cromógenos específicos (100 µM), e a atividade da trombina ou fator Xa foram expressas como percentual de absorbância em 405 nm (média ± DP, n = 3), sendo considerado 100% de atividade a absorbância obtida sem adição de polissacarídeo.

Comparado a capacidade dos polissacarídeos sulfatados em inibir a α -trombina mediada por AT, observa-se que eles apresentaram respostas um pouco distintas. GPf-S1, GPf-S2 e MgPr-S1 na concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ inibiram em mais de 80% a atividade de trombina mediada por AT. Todos os polissacarídeos inibiram mais de 90% a α -trombina nas concentrações de 100 $\mu\text{g/ml}$, porém nenhum polissacarídeo sulfatado apresentou uma atividade melhor que a heparina (FIGURA 29A).

Já a ação dos polissacarídeos sulfatados na inibição da trombina mediada pelo HCII foi variável. MgPr-S1 e GAb-S1 apresentaram atividades similares, inibindo a atividade da enzima em concentrações menores que a heparina. Estes dois polissacarídeos apresentam um valor de *DS* intermediário. Já os polissacarídeos com valor de *DS* menor (GPf-S1 e GPf-S2) apresentaram uma menor atividade que os outros polissacarídeos nas menores concentrações testadas, porém em concentrações maiores a atividade foi similar. FmgLe, o qual tem um maior *DS*, apresentou uma atividade semelhante a atividade da heparina (FIGURA 29B).

Nenhum dos polissacarídeos apresentou uma alta atividade de inibição do fator Xa mediada por AT, sendo que apenas GPf-S1 e GPf-S2, as quais apresentaram um menor *DS*, inibiram completamente a atividade do fator Xa nas maiores concentrações (FIGURA 29C).

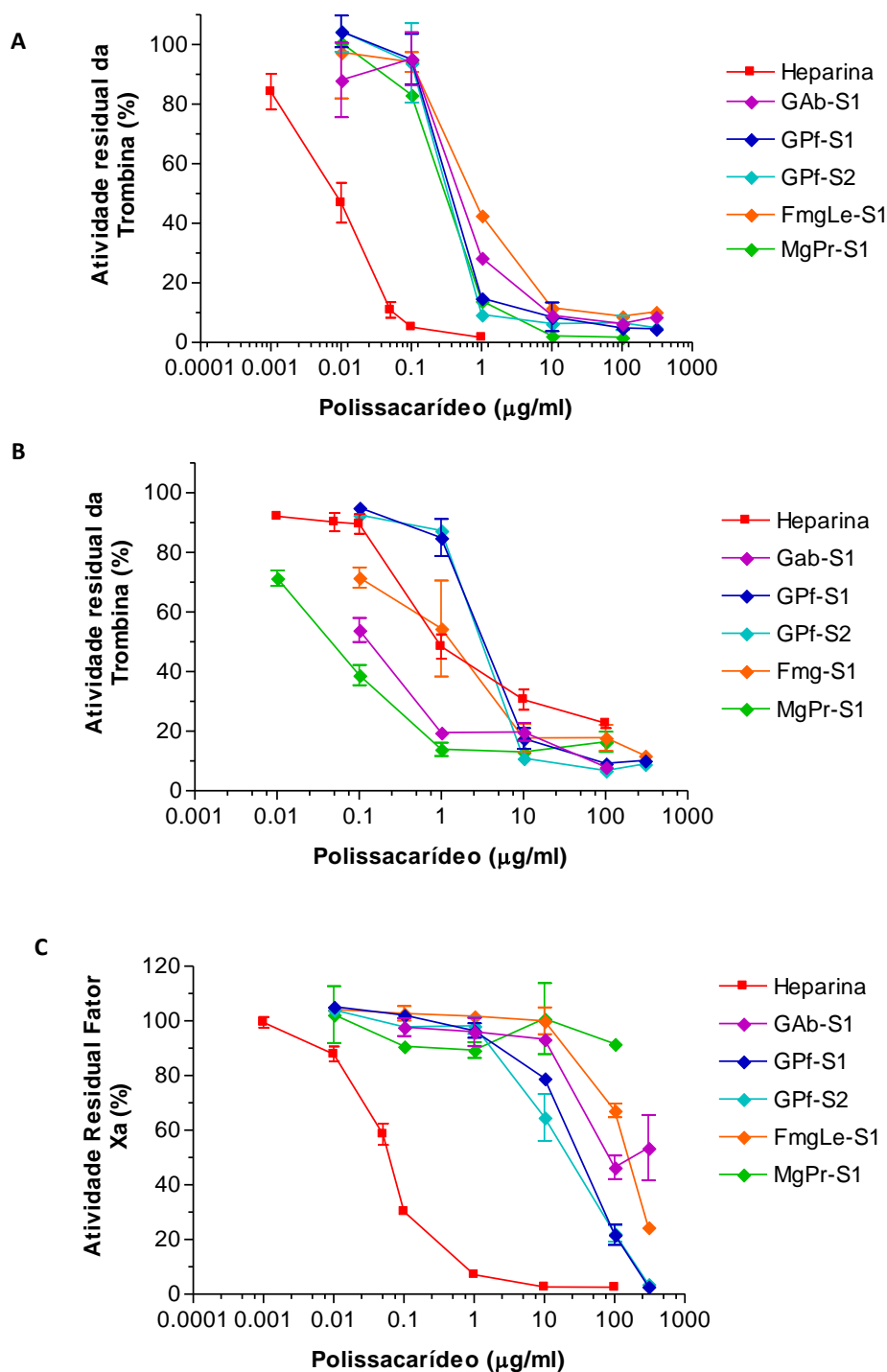


FIGURA 29 – EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS NA INIBIÇÃO DA TROMBINA POR AT (A), POR HCII (B) E DO FATOR Xa POR AT (C). Trombina (6 nM) ou Fator Xa (8 nM) foram incubados com AT (100 nM) ou HCII (15 nM) e diferentes concentrações de polissacarídeos. Após 1 min a 37 °C, foram adicionados substratos cromógenos específicos (100 µM), e a atividade da trombina ou fator Xa foram expressas como percentual de absorbância em 405 nm (média ± DP, n = 3), sendo considerado 100% de atividade a absorbância obtida sem adição de polissacarídeo.

Polissacarídeos podem apresentar diferentes mecanismos anticoagulantes. A atividade anticoagulante da heparina deve-se a uma sequência pentassacarídica específica, a qual se liga a antitrombina, favorecendo a ligação desta enzima com a trombina e ao fator Xa (LINDAHL *et al.*, 1979). Em concentrações maiores, a heparina também favorece a interação da trombina com o cofator II da heparina, sendo que este efeito, aparentemente, não requer sequências oligossacarídica específicas.

Um mecanismo diferente foi observado para a pectina cítrica quimicamente sulfatada. Este polissacarídeo foi capaz de inibir diretamente a trombina e o fator Xa, ou seja, na ausência de serpinas. O dermatan sulfato isolado da pele de *Raja radula* tem a inibição da trombina mediada principalmente pelo HCII (MANSOUR *et al.*, 2009).

Galactanas sulfatadas de *B. occidentalis* e *E. lucunter* inibem o fator Xa, com IC₅₀ de 0,10 e 20 µg/ml, respectivamente, sendo esta ação mediada por antitrombina (MELO *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos indicam que os polissacarídeos isolados de basidiomicetos e quimicamente sulfatados inibem a trombina, principalmente, por AT e pelo cofator II da heparina, impedindo assim que a trombina converta o fibrinogênio à fibrina, impedindo que ocorra a formação do coágulo.

Estes dados suportam a hipótese que o grau de substituição de polissacarídeos sulfatados não é o único fator importante para a atividade anticoagulante, pois nem sempre a resposta é proporcional ao DS. As propriedades anticoagulantes e antitrombóticas dos polissacarídeos são dependentes de vários fatores, como sequências oligossacarídicas específicas, massa molar, estrutura química, conteúdo de sulfato, padrão de substituição, entre outras.

7 CONCLUSÕES

Após as análises dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A sulfatação química da β -D-glucana linear com ligações (1 \rightarrow 6) de *Agaricus blazei* forneceu um polissacarídeo com um *DS* de 1,38, com duas populações de tamanhos diferentes (análises de HPSEC), tendo a população de maior tamanho uma M_w de $7,1 \times 10^4$ g/mol ($dn/dc = 0,134$). As análises estruturais indicaram que ocorreu uma maior substituição em OH-2 e OH-3 e em menor proporção em OH-4.

- A β -D-glucana com cadeia principal com ligações (1 \rightarrow 3), substituídas em O-6 por terminais não-redutores de glucose de *Pleurotus florida* foi submetida a duas sulfatações sucessivas, gerando dois polissacarídeos sulfatados: GPf-S1 e GPf-S2, com um *DS* de 0,57 e 0,60, respectivamente. Apesar do *DS* similar, os polissacarídeos apresentaram diferenças nos espectros de RMN-C¹³ e nas análises de metilação. Houve uma diminuição progressiva dos sinais de C-1 correspondentes aos terminais não redutores e GPf-S2 apresentou uma maior substituição nos grupos OH-6.

- A sulfatação química da fumanogalactana de *Lentinus edodes* foi mais eficiente, gerando um polissacarídeo, FmgLe-S1, com um *DS* de 2,04 e uma M_w de $4,3 \times 10^4$ g/mol ($dn/dc = 0,164$). As análises de RMN-C¹³ e metilação mostram que houve uma substituição preferencial nos grupos OH- dos terminais não redutores de manose e fucose e uma menor substituição nas unidades de galactose da cadeia principal.

- A sulfatação química da manogalactana de *Pleurotus ostreatoroseus* resultou em um polissacarídeo com um *DS* de 1,31 (MgPr-S1) e com uma M_w de $6,12 \times 10^4$ g/mol ($dn/dc = 0,195$). As substituições ocorreram, principalmente, nos terminais não redutores de β -manose e em algumas hidroxilas da cadeia de α -galactose, como indicado pelas análises de RMN-C¹³ e metilação;

Comparando-se a sulfatação dos diferentes polissacarídeos estudados é possível observar uma maior sulfatação nos grupos OH- dos terminais não-redutores das cadeias polissacarídicas e nos grupos OH-6.

- Todos os polissacarídeos sulfatados inibiram a coagulação do plasma, quando avaliados pelo teste de aPTT, porém os efeitos foram diferentes para cada

um dos polissacarídeos. GAb-S1 apresentou uma maior atividade, inibindo completamente a coagulação do plasma com uma concentração de 50 µg/ml. FmgLe-S1 e MgPr-S1 inibiram totalmente a coagulação do plasma na concentração de 100 µg/ml, enquanto que GPf-S1 e GPf-S2 não foram capazes de inibir completamente a coagulação.

- Os polissacarídeos sulfatados apresentaram uma ótima atividade anticoagulante pelo teste de TT, sendo que GAb-S1, FmgLe-S1 e MgPr-S1 inibiram totalmente a coagulação do plasma com uma concentração de 50 µg/ml, enquanto que GPf-S1 só atingiu está atividade com uma concentração de 100 µg/ml.

- No modelo de trombose venosa, GAb-S1 inibiu em 72% a formação do trombo na concentração de 0,250 mg/kg, porém na dose de 1 mg/kg esta molécula apresentou um pequeno efeito pró-trombótico. Já GPf-S2 apresentou um efeito dose-dependente e inibiu em 87% a formação do trombo com uma concentração de 1,5 mg/kg. MgPr-S1 também apresentou em efeito antitrombótico dose-dependente e na dose de 6 mg/kg a inibição foi total.

- GPf-S2 na maior concentração testada *in vivo*, não apresentou uma tendência em causar hemorragia e MgPr-S1, na concentração de 6 mg/kg aumentou em duas vezes o volume de sangue perdido, mas na concentração de 3 mg/kg não apresentou efeito hemorrágico.

- GPf-S1 inibiu completamente a agregação plaquetária estimulada por ADP, *in vitro*, enquanto que MgPr-S1 inibiu em 54% e FmgLe-S1 não causou uma forte inibição. Porém, FmgLe-S1 ativou a agregação plaquetária quando o teste foi realizado na ausência de uma agonista das plaquetas. Todos os polissacarídeos sulfatados testados tiveram uma forte inibição da agregação plaquetária estimulada por trombina.

- Nenhum polissacarídeo sulfatado inibiu diretamente a trombina ou o fator Xa.

- GAb-S1 inibiu em 94% a atividade da trombina na presença de AT, e em 90% na presença de cofator II da heparina com uma concentração de 100 µg/ml. A IC₅₀ determinada para a inibição da trombina mediada por AT foi de 0,5 µg/ml e mediada por HCII foi de 0,2 µg/ml. A inibição do fator Xa na presença de AT foi de 60% na concentração de 300 µg/ml;

- GPf-S1 e GPf-S2 apresentaram uma boa atividade de inibição da trombina mediada por AT, sendo a IC₅₀ determinada de 0,4 e 0,25 µg/ml, respectivamente. A

partir da concentração de 10 µg/ml GPf-S1 e GPf-S2 tiveram um efeito inibitório maior que a heparina em relação a atividade da trombina na presença de cofator II da heparina (90% de inibição). As IC₅₀ para este teste foram de 3,3 µg/ml para os dois polissacarídeos sulfatados. Dentre os polissacarídeo sulfatados GPf-S1 e GPf-S2 apresentaram uma maior inibição do fator Xa na presença de AT, sendo que na maior concentração testada esta inibição foi completa;

- FmgLe-S1 na dose de 100 µg/ml inibiu em 90% a atividade da trombina, sendo esta ação mediado por AT e a IC₅₀ foi de 0,7 µg/ml. Com relação a inibição da trombina na presença do cofator II da heparina, FmgLe-S1 teve uma atividade similar a da heparina, com uma IC₅₀ de 1,3 µg/ml. Este polissacarídeo apresentou uma fraca inibição do fator Xa na presença AT;

- MgPr-S1 teve uma grande influência na atividade da trombina mediada pela AT, inibindo em 100% esta atividade na concentração de 10 µg/ml. Na atividade da trombina mediada pelo HCII, MgPr-S1 foi capaz de inibir a atividade enzimática de uma maneira maior que a heparina, sendo a IC₅₀ de 0,04, mostrando que a principal ação de MgPR-S1 é, principalmente, via HCII. MgPr-S1 não foi capaz de inibir a atividade do fator Xa mediada pela AT.

Os estudos realizados indicam que polissacarídeos com um alto *DS* (*oversulfatados*) apresentam uma maior atividade anticoagulante, enquanto que polissacarídeos com um menor *DS*, como por exemplo, GPf-S2, inibem a formação do trombo venoso em baixas concentrações, além de também serem capazes de inibir a agregação plaquetária (*in vitro*). Estes dados sugerem que estas moléculas com um menor grau de substituição podem apresentar uma inibição da trombose arterial. Além disso, este estudo demonstra que polissacarídeos de fontes não-animais e quimicamente sulfatados podem atuar como alternativas à heparina, pois basidiomicetos são fontes renováveis de moléculas que podem ser biologicamente ativas e de fácil obtenção.

REFERÊNCIAS

- ALBAN, S.; FRANZ, G. Partial synthetic glucan sulfates as potential new antithrombotics: a review. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 354-361, 2001.
- ALBAN, S.; JESKE, W.; WELZEL, D.; FRANZ, G.; FAREED, J. Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic β -1,3-glucan sulfate. **Thrombosis Res.**, v. 78 (3), p. 201-210, 1995.
- ALBAN, S.; KRAUS, J.; FRANZ, G. Synthesis of laminaran sulfates with anticoagulant activity. **Drug Res.**, v. 42, p. 1005-1008, 1992.
- ALBAN, S.; SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydr. Polymers**, v. 47, p. 267-276, 2002.
- ALVING, B. M. How I treat heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. **Blood**, v. 101 (1), p. 31-37, 2003.
- ALQUINI, A.; CARBONERO, E. R.; ROSADO, F. R.; COSENTINO, C.; IACOMINI, M. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, p. 47-52, 2004.
- ATHUKORALA, Y.; KIM, S. K.; JEON, Y. J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44 (7), p. 1065-1074, 2006.
- ATHUKORALA, Y.; LEE, K. W.; KIM, S. K.; JEON, Y. J. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 1711-1716, 2007.
- AZEVEDO, T.C.G.; BEZERRA, M.E.B.; SANTOS, M.G.L.; SOUZA, L. A.; MARQUES, C. T.; BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, E. L. Heparinoids algal and their anticoagulant, hemorrhagic activities and platelet aggregation. **Biomed. Pharmacother.**, v. 63, p. 477-483, 2009.
- BAILEY, A. L.; SCANTLEBURY, D. C.; SMYTH, S. S. Thrombosis and antithrombotic therapy in women. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 29, p. 284-288, 2009.
- 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.

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

BJÖRNDAL, H.; LINDBERG, B. Polysaccharides elaborated by *Polyporus fomentarius* (Fr.) and *Polyporus igniarius* (Fr.). **Carbohydr. Res.**, v. 10, p. 79-85, 1969.

BORCHERS, A.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. **Exp. Biol. Med.**, v. 229 (5), p. 393-406, 2004.

BORN, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature**, v. 194, p. 927-29, 1962.

BOUVENG, H. O.; FRASER, R. N.; LINDBERG, B. Polysaccharides elaborated by *Armillaria mellea* (Tricholomataceae). Water-soluble mycelium polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 4, p. 20-31, 1967.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; KOMURA, D. L.; MARCON, R.; FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; SANTOS, A.R.S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chem.**, v. 111, p. 531-537, 2008.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; SMIDERLE, F. R.; ROSADO, F. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A β -glucan from the fruiting bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. **Carbohydr. Polymers**, v. 66 (2), p. 252-257, 2006.

CARDILO-REIS, L.; CAVALCANTE, M. C. M.; SILVEIRA, C. B. M.; PAVÃO, M. S. G. *In vitro* antithrombotic properties of a heparin from the oocyte test cells of the sea squirt *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, p. 1409-1415, 2006.

CAUGHEY, G. H. Building a better heparin. **Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 28 (2), p. 129-132, 2003.

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

CHAN, A. K.C.; BLACK, L.; ING, C.; BRANDÃO, L. R.; WILLIAMS, S. Utility of aPTT in monitoring unfractionated heparin in children. **Thromb. Res.**, v. 122, p. 135-136, 2008.

CHAUVEAU, C.; TALAGA, P.; WIERUSKESKI, J. M.; STRECKER, G.; CHAVANT, L. A water-soluble β -D-glucan from *Boletus erythropus*. **Phytochemistry**, v. 43 (2), p. 413-415, 1996.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; VIZCARGÜÉNAGA, M. I.; KASULIN, L.; DIOS, A.; ESTEVEZ J. M.; CERESO, A. S. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, p. 641–49, 2007.

CIPRIANI, T. R.; GRACHER, A. H.; DE SOUZA, L. M., FONSECA, R. J.; BELMIRO, C. L.; GORIN, P. A.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Thromb. Haemost.** v. 101 (5), p. 860-866, 2009.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A 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.**, v. 100, p. 131-139, 2000.

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

COLMAN, R. W. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? **J. Exp. Med.**, v. 203 (3), p. 493-495, 2006.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964.

DE BEATS, VANDAMME, E. J. Extracellular Tremella polysaccharides: structure, properties and applications. **Biotechnol. Lett.**, v. 23, p. 1361-1366, 2001.

DE KORT, M.; BUIJSMAN, R. C.; VAN BOECKEL, C. A. A. Synthetic heparin derivatives as new anticoagulant drugs. **Drug Discov. Today**, v. 10 (11), p. 769-779, 2005.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Ed. Blücher, 2007.

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrates and other sulphate esters. **Biochem. J.**, v. 78 (2), p. 312-319, 1961.

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

FARIAS, W. R. L.; NAZARETH, R. A.; MOURÃO, P. A. S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia accidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thromb. Haemost.**, v. 86, p. 1540-1546, 2001.

FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. N. M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M.G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thromb. Haemost.**, v. 99, p. 539-545, 2008.

FRANCHINI, M.; MANNUCCI, P. M. Venous and arterial thrombosis: different sides of the same coin? **Eur. J. Intern. Med.**, v. 19, p. 476-481, 2008.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Simpósio: HEMOSTASIA E TROMBOSE. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 229-237, jul./dez. 2001.

FURUGOHRU, T.; SHIOZAKI, Y.; MURAMATSU, S.; HONDA, Y.; MATSUMOTO, C.; ISOBE, K.; SUGIYAMA, N. Different antithrombotic properties of factor Xa inhibitor and thrombin inhibitor in rat thrombosis models. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 514 (1), p. 35-42, 2005.

GORBET, M. B.; SEFTON, M. V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. **Biomaterials**, v. 25, p. 5681-5703, 2004.

GORIN, P. A. J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 38, p. 13-104, 1981.

GRACHER, A. H. P. **Caracterização estrutural de polissacarídeos obtidos do corpo de frutificação *Ganoderma multiplicatum***. Curitiba, 2005. Dissertação (mestrado em Ciências - Bioquímica)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GREINACHER, A.; WARKENTIN, T. E. Recognition, treatment, and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: review and update. **Thromb. Res.**, v. 118, p. 165-176, 2006.

HAN, F.; YAO, W.; YANG, X.; LIU, X.; GAO, X. Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 36 (4), p. 201-207, 2005.

HANSON, S. R.; SAKARIASSEN, K. S. Blood flow and antithrombotic drug effects. **Amer. Heart. J.**, v. 135, p. S132-S145, 1998.

HAWORTH, W. N. A new method of preparing alkylated sugars. **J. Chem. Soc.**, v. 107, p. 8-16, 1915.

HEIT, J. A. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 28. p. 370-377, 2008.

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

HIRSH, J. Current anticoagulant therapy-unmet clinical needs. **Thromb. Res.**, v. 109, S1-8, 2003.

HOFFAN, M.; MONROE III, D. M. A cell-based model of hemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 85, p. 958-965, 2001.

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

JAY, R. M.; LIU, P. L. How anticoagulants work. **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v. 30, p. 30-39, 2006.

KAKKAR, A. K. Low- and ultra-low-molecular-weight heparins. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, v. 17 (1), p. 77-87, 2004.

KAMAL, A. H.; TEFFERI, A.; PRUTHI, R. K. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. **Mayo Clin. Proc.**, v. 82(7), p. 864-873, 2007.

KOMURA, D. L.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Bioresource Technol.**, *in press*.

LINDAHL, U.; BÄCKSTRÖM, G.; HÖÖK, M.; THUNBERG, L.; FRANSSON, L. A.; LINKER, A. Structure of the antithrombin-binding site in heparin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76(7), p. 3198-3202, 1979.

MAAROUFI, R. M.; GIORDANO, P.; TRIADOU, P.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; DAUTZENBERG, M. D.; FISCHER, A. M. Effect of oversulfated dermatan sulfate derivatives on platelet aggregation. **Thromb. Res.**, v. 120, p. 615-62, 2007.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v., 202, p. 498-499, 1964.

MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**, v. 45 (21), p. 914- 918, 2008.

MADDINENI, J.; JESKE, W. P.; BALTASAR, F.; CORNELLI, U.; MANONI, M.; HOPPENSTEADT, D. A.; FAREED, J. Modulatory effects of *Escherichia coli* capsular-derived sulfaminoheparosans and heparins on tissue factor-mediated activation of platelets: flow cytometric analysis. **Clin. Appl. Thromb.-Hemost.**, v. 12 (3), p. 311-317, 2006.

MANSOUR, M. B; DHAHRI, M; BERTHOLON, I.; OLLIVER, V.; BATAILLE, I.; AJZENBERG, N.; HASSINE, M.; JANDROT-PERRUS, M.; CHAUBET, F.; MAAROUI, R. M. Characterization of a novel dermatan sulfate with antithrombin activity from ray skin (*Raja radula*). **Thromb. Res.**, v. 123, p. 887-94, 2009.

MARTINELLI, I.; BUCCIARELLI, P.; MANNUCCI, P. M. Thrombotic risk factors: basic pathophysiology. **Crit. Care Med.**, v. 38 (2), p. S3-S9, 2010.

MARTINICHEN, J. C. **Propriedades anticoagulantes e antitrombóticas de polissacarídeos quimicamente sulfatados**. Curitiba, 2005. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirensis* Hale. **Carbohydr. Polymers**, v. 60, p. 7-13, 2005a.

MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 35 (1-2), p. 97-102, 2005b.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M. L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 28 (5), p. 395-399, 2001.

MELO, F. R.; PEREIRA, M. S.; MONTEIRO, R. Q.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P. A.S. Sulfated galactan is a catalyst of antithrombin-mediated inactivation of α -thrombin. **BBA-Gen. Subjects**, v.1780, p. 1047-1053, 2008.

MENAJOVSKY, L. B. Heparin-induced thrombocytopenia: clinical manifestations and management strategies. **Amer. J. Med.**, v. 118 (8), p. 21-30, 2005.

MERLI, G. Diagnostic assessment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. **Amer. J. Med.**, v. 118 (8), p. 3-12, 2005.

MIHAI, D.; MOCANU, G.; CARPOV, A. Chemical reactions on polysaccharides. I. Pullulan sulfation. **Eur. Polymer J.**, v. 37, p. 541-546, 2001.

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**, v. 41 (1), p. 78-85, 2002.

MISAKI, A.; KAKUTA, M.; SASAKI, T.; TANAKA, M.; MIYAJI, H. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1→3)-β-D-glucan of *Auricularia auricular-judae*, and other polysaccharide containing (1→3) glycosidic linkages. **Carbohydr. Res.**, v. 92, p. 115-129, 1981.

MUKUMOTO, T.; YAMAGUCHI, H. The chemical structure of a mannofucogalactan from the fruit bodies of *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing. **Carbohydr. Res.**, v. 59, p. 614-621, 1977.

MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **J. Biotech.**, v. 77, p. 123-135, 2000.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: bioquímica ilustrada**. 27 ed. São Paulo: Ed. McGraw-Hill, 2007.

NIE, X.; SHI, B.; DING, Y.; TAO, W. Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 39, (4-5), p. 228-233, 2006.

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

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

PATEL, S.; BERRY, L.R.; CHAN, A. K. C. Covalent antithrombin-heparin complexes. **Thromb. Res.**, v. 120, p. 151-160, 2007.

PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MELO, M. R. S.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 2015-2023, 2005.

PERRINAUD, A.; JACOBI, D.; MACHET, M. C.; GRODET, C.; GRUEL, Y.; MACHET, L. Bullous hemorrhagic dermatosis occurring at sites distant from subcutaneous injections of heparin: Three cases. **J. Amer. Acad. Dermatol.**, v. 54 (2), p. S5-S7, 2006.

PETERNEL, L.; DREVENŠEK, G.; ČERNE, M.; ŠTALC, A.; STEGNAR, M.; BUDIHNA, M. V. Evaluation of two experimental venous thrombosis models in the rat. **Thromb. Res.**, v. 115, p. 527-534, 2005

PETITOU, M.; CASU, B.; LINDAHL, U. 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. **Biochimie**, v. 85, p. 83-89, 2003.

POMIN, V. H. An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**, v. 91(8), p. 601-609, 2009.

ROCHA, H. A. O.; MORAES, F. A.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R. C.; TORQUATO, R. J. S.; VEIGA, S. S.; VALENTE, ANA P.; MOURÃO, P. A. S.; LEITE, E. L.; NADER, H.B.; DIETRICH, C. P. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*: an ideal antithrombotic agent? **J. Biol. Chem.**, v. 280 (50), p. 41278–41288, 2005.

ROMMEY, G.; GLICK, M. An updated concept of coagulation with clinical implications, **J. Amer. Dent. Assoc.**, v. 140, p. 567-574, 2009.

ROSADO, F. R.; CARBONERO, E. R.; CLAUDINO, R. F.; TISCHER, C. A.; KEMMELMEIER, C.; IACOMINI, M. The presence of partially 3-O-methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* 'florida' Berk. and *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 221, p. 119-124, 2003.

SANCHEZ-POLITTA, S.; ANGELILLO-SCHERRER, A.; MASOUYÉ, I.; BORRADORI, L. Widespread skin necrosis associated with unfractionated heparin therapy in patient under chronic coumarin anticoagulant. **JEADV**, v. 20, p. 327-330, 2006.

SANTOS-NEVES, J. C.; PEREIRA, M. I.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A gel-forming β -glucan isolated from the fruit bodies of the edible mushroom *Pleurotus florida*. **Carbohydr. Res.**, v. 343 (9), p. 1456-1462, 2008.

SASAKI, T.; TAKASURA, N. Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. **Carbohydr. Res.**, v. 47, p. 99-104, 1976.

SASSAKI, G. L., GORIN, P. A. J., SOUZA, L. M., CZELUSNIAK, P. A. J., IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SAVI, P.; PFLIEGER, A-M.; HÉRAULT, J-P.; MICHAUX, C.; DUCHAUSSOY, P.; PETITOU, M.; HERBERT, J-M. Comparative effects of two synthetic oligosaccharides on platelet activation induced by plasma from HIT patients. **J. Thromb. Haemost.**, v. 1, p. 2008-213, 2003.

SHANNON, M. S. Anticoagulation. **Surgery**, v. 25 (4), p. 150-154, 2007.

SHERMAN, D. G. Prevention of venous thromboembolism, recurrent stroke, and other vascular events after acute ischemic stroke: the role of low-molecular-weight heparin and antiplatelet therapy. **J. Stroke Cerebrovasc. Dis.**, v. 15 (6), p. 250-259, 2006.

SIÈ, P.; OFUSO, 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. **Brit. J. Haematol.**, v. 64, p. 707-714, 1989.

SMIDERLE, F. R.; CARBONERO, E. R.; MELLINGER, C. G.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural characterization of a polysaccharide and a β -glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**, v. 67 (2), p. 2189-2196, 2006.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 597, p. 86-91, 2008a.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; SANTOS, A. R. S.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonaris*: structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69 (15), p. 2731-2736, 2008b.

SMITH, J. E.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: a rapid developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, p. 1938-1845, 2002.

STRINGER, S. E.; GALLAGHER, J.T. Heparan sulphate. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29(5), p. 709-714, 1997.

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

TAKANO, R.; NAGAI, T.; WU, X.; XU, X.Y.; HUY, N.T.; KAMEI, K.; HARA, S. Sulfation of polysaccharides using monomethyl sulfate. **J. Carbohydr. Chem.**, v. 19 (9), p. 1185-1190, 2000.

TAO, Y.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 2261-2269, 2006.

TOLLEFSEN, D. M. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury, **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 27, p. 454-460, 2007.

UENO, Y.; OKAMOTO, Y.; YAMAUCHI, R.; KATO, K. An antitumor activity of the alkali-soluble polysaccharide (and its derivatives) obtained from the sclerotia of *Grifora umbellata* (Fr.) PILAT. **Carbohydr. Res.**, v. 101, p. 160-167, 1982.

USUI, T.; IWASAKI, Y.; MIZUNO, T. Isolation and characterization of two kinds of heterogalactan from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum* by employing a column of Concanavalin A-Sepharose 4B. **Carbohydr. Res.**, v. 92, p. 103-11, 1981

VIKHOREVA, G.; BANNIKOVA, G.; STOLBUSHKINA, P.; PANOV, A.; DROZD, N.; MAKAROV, V.; GAL'BRAIKH, L. Preparation and anticoagulant activity of a low molecular-weight sulphated chitosan. **Carbohydr. Polymers**, v. 62 (4), p. 327-332, 2005.

VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**, v. 29, p. 1-7, 2009.

VOGEL, G. M. T.; MEULEMAN, D. G.; BOURGONDIËN, F. G. M.; HOBBELEN, P. M. J. Comparison of two experimental thrombosis models in rats: effects of four glycosaminoglycans. **Thromb Res**, v. 54, p. 399-410, 1989.

WANG, L.; LI, X.; CHEN, Z. Sulfated modification of the polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.44, p. 211-214, 2009.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulation polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, p. 258-274, 2002.

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

WINDSTETTER, U.; HUBER, K.; GULBA, D. New antithrombotic agents: an overview. **Fibrinolysis & Proteolysis**, v. 11, p. 85-96, 1994.

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

YAVIN, Y. Y.; WOLOZINSKI, M.; COHEN, A. T. New antithrombotics in the prevention of thromboembolic disease. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 16, p. 257-266, 2005.

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.**, v. 106, p. 51-58, 2002.

YOON, S. J.; YU, M. A.; PYUN, Y. R.; HWANG, J. K.; CHU, D. C.; JUNEJA, L. R.; MOURÃO, P. A. S. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. **Thromb. Res.**, v. 112 (3), p. 151-158, 2003.

YOSHIDA, T.; YASUDA, Y.; MIMURA, T.; KANEKO, Y.; NAKASHIMA, H.; YAMAMOTO, N.; URYU, T. Synthesis of curdulan sulfates having inhibitory effects in vitro against AIDS viruses HIV-1 and HIV-2. **Carbohydr. Res.**, v. 276, p. 425-436, 1995.

ZHANG, M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C.; ZHANG, L. Evaluation of sulfated fungal β -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. **Carbohydr. Res.**, v. 339 (13), p. 2297-2301, 2004.

ZHUANG, C.; MIZUNO, T.; SHIMADA, A.; ITO, H.; SUZUKI, C.; MAYUZUMI, Y.; OKAMOTO, H.; MA, Y.; LI, J. Antitumor protein-containing polysaccharides from a Chinese mushroom *Fengweigu* or *Houbitake*, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. **Biosc. Biotech. Biochem.**, v. 57 (6), p. 901-906, 1993.

ANEXO I



Regular Article

Antithrombin and heparin cofactor II-mediated inactivation of α -thrombin by a synthetic, sulfated mannogalactan

Ana Helena P. Gracher^a, Thales R. Cipriani^a, Elaine R. Carbonero^b, Philip A.J. Gorin^a, Marcello Iacomini^{a,*}

^a Laboratório de Química de Carboidratos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Goiás, Catalão, Goiás, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2009

Received in revised form 14 April 2010

Accepted 20 April 2010

Available online 31 May 2010

Keywords:

Sulfated polysaccharide

Mannogalactan

Pleurotus ostreatoroseus

Antithrombotic

Antithrombin

Heparin cofactor II

ABSTRACT

Introduction: A mannogalactan from *Pleurotus ostreatoroseus* (MgPr) was chemically sulfated to give MgPr-S1, which was evaluated for its anticoagulant and antithrombotic activities, bleeding tendency, and platelet aggregation.

Materials and methods: MgPr-S1 was partially characterized by HPSEC-MALLS, methylation analysis, and ¹³C NMR spectroscopy. Its anticoagulant activity was determined by assays of aPTT, TT, α -thrombin and factor Xa residual activity, heparin cofactor II (HCII)-, or antithrombin (AT)-mediated inhibition. The antithrombotic effect was evaluated in rats using a venous thrombosis model and the bleeding tendency was also tested *in vivo*. Platelet aggregation was investigated by an adaptation of the method of Born [1].

Results: The hydroxyl groups of β -D-Manp units and OH-2 and OH-4 of the (1 \rightarrow 6)-linked α -D-Galp units were preferentially substituted. The anticoagulant activity of MgPr-S1 was mainly by thrombin inhibition with antithrombin and HCII, and had an effect on platelet aggregation induced by ADP and α -thrombin. It almost completely inhibited thrombus formation *in vivo* at a dose of 6 mg/kg and heparin inhibited thrombus formation at a dose of 0.200 mg/kg.

Conclusions: These results suggested that the chemically sulfated mannogalactan could act as an alternative to heparin as anticoagulant.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Thrombotic disorders are one of the major causes of morbidity and mortality, with venous thrombosis being a disease of aging in both males and females [2] and is also related to immobilization, trauma, malignant disease, family history, obesity, estrogen therapy, and other factors [3]. Blood coagulation is a highly regulated process, having thrombin as a central point of regulation and amplification of clot formation [4]. Its contribution to venous thrombosis is evidenced by extensive investigations on the efficacy of thrombin inhibitors in venous thromboembolic prophylaxis and treatment. Both anticoagulant and antiplatelet therapies are effective to treat and prevent arterial thrombosis, although platelet inhibitors are more often used since platelets play an important role in the development of this pathology [5]. Heparin is the most used drug to treat venous and arterial thrombosis, which although effective, heparin has limitations. It must be administered, mainly, parenterally or subcutaneously, requires careful laboratory monitoring, because its anticoagulant response is variable and is obtained from an animal source, which increases concern on contamination by pathogens [6,7].

In an attempt to obtain antithrombotic agents as alternatives to heparin, innumerable polyanionic macromolecules have been examined. Sulfated polysaccharides can be obtained from different sources, such as marine algae, invertebrates [8], or by chemical sulfation [9–11]. Chemically sulfated polysaccharides from mushrooms could be an alternative, because the original macromolecules are readily available, chemically defined, and have several biological activities, such as antiviral and antitumoral [12–14].

Pleurotus ostreatoroseus is an edible mushroom and a ready source of molecules such as polysaccharides with antitumoral and immunomodulatory effects. Polysaccharides isolated from this basidiomycete are homopolymers, such as glucans [15], and heteropolymers, namely mannogalactans [16]. Usually, galactans and heterogalactans from *Pleurotus* spp. are partially O-methylated.

We have been seeking anticoagulants from non-animal sources, as alternatives to heparin, with lower health risks. For this purpose, we now chemically sulfate a mannogalactan isolated from the edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus*, which is composed of a main chain of (1 \rightarrow 6)-linked α -D-galactopyranosyl units, some of which are partially O-methylated at O-3. These were partially substituted at O-2 by β -D-mannopyranose residues [16]. Synthetic polysaccharides derived from naturally occurring ones are of great interest, as therapeutic substitutes of natural products and to increase understanding of mechanisms of their biological reactions [17].

* Corresponding author. Laboratório de Química de Carboidratos, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. CP 19046, CEP 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil. Tel.: +55 41 3361 1655; fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: iacomini@ufpr.br (M. Iacomini).

Materials and Methods

Materials

The mannogalactan was isolated from the fruiting bodies of edible basidiomycete *Pleurotus ostreatoroseus* Sing, via successive aqueous extraction, freeze thawing, and precipitation of the supernatant with Fehling solution [16]. Unfractionated heparin (UFH-202 IU/mg), adenosine diphosphate (ADP), and factor Xa chromogenic substrate were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA), rabbit cephalin and 0.025 M CaCl₂ solution from Dade Behring (Marburg, DE), and α -thrombin, factor Xa, heparin cofactor II (HCII) and antithrombin (AT) from Haematologic Technologies Inc. (Essex Junction, VT, USA). α -Thrombin chromogenic substrate S-2238 and rabbit brain thromboplastin were from Instrumentation Laboratory (Lexington, MA, USA), and pyridine, formamide and chlorosulfonic acid, were from Merck (Darmstadt, Germany). Normal human plasma was obtained by centrifugation (2000 g for 15 min at 22 °C) of a pool of citrated normal human plasma (nine parts of blood to one of 3.8% trisodium citrate) from healthy volunteer donors. Platelet rich plasma (PRP) was obtained from peripheral blood from drug-free human volunteers as described above. The blood was centrifuged at 110 g for 15 min at room temperature. For aggregation assay with α -thrombin as agonist, blood was obtained from drug-free human volunteers and was collected in 5 mM EDTA. Platelets were obtained by centrifugation of the PRP at 800 g for 15 min followed by washing twice with calcium-free Tyrode's buffer, pH 6.5, containing 0.1% glucose, 0.2% gelatin, 0.14 M NaCl, 0.3 M NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 0.4 mM MgCl₂, 2.7 mM KCl, and 0.2 mM EGTA. All other chemicals and reagents were of analytical grade.

Methods

Chemical sulfation

Polysaccharide was sulfated according to the method described by O'Neill [18] with slight modifications: the mannogalactan (360 mg, 3.57×10^{-4} mmol), was solubilized in formamide (26 mL), pyridine (26 mL) then added, and the mixture vigorously stirred for 24 h, followed by dropwise addition of chlorosulfonic acid (6.5 mL, 97.5 mmol) over 1 h at 0 °C. The mixture was maintained at 4 °C for 12 h, ice-water then added, followed by 10% (w/v) aqueous NaHCO₃ until effervescence ceased. The solution was dialyzed against running water using 14 kDa *M_w* cut-off membrane and then freeze dried, providing the sulfated mannogalactan (720 mg), named MgPr-S1.

The degree of substitution (DS) of sulfated derivative was determined after hydrolysis with 1 M HCl for 5 h at 100 °C, the resulting BaSO₄ being measured turbidimetrically [19].

General experimental procedures

Gas-liquid chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was performed using a Varian model 3300 gas chromatograph linked to a Finnigan Ion-Trap model 810 R-12 mass spectrometer, with He as carrier gas. A DB-225 capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d.), held at 50 °C during injection and then programmed at 40 °C min⁻¹ to 220 °C (constant temperature) was used for qualitative and quantitative analysis of alditol acetates. Partially *O*-methylalditol acetate mixtures were similarly analyzed, but with a program from 50 °C to 215 °C at 40 °C/min, then hold.

¹³C NMR spectra were obtained using a 400 MHz Bruker model DRX Avance spectrometer incorporating Fourier transform. Analyses were performed at 70 °C at a frequency of 100.6185 MHz, on samples dissolved in D₂O. Chemical shifts of samples are expressed in δ (ppm) relative to acetone at δ 30.2.

Determination of the homogeneity and molar mass (*M_w*) of the sulfated polysaccharide was performed using a Waters high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) apparatus coupled to

a differential refractometer (RI) and a Wyatt Technology Dawn-F Multi-Angle Laser Light Scattering detector (MALLS). Waters Ultra-hydrogel columns (2000, 500, 250, and 120, corresponding to 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , and 5×10^3 size exclusion limit respectively) were connected in series and coupled with multidetection equipment, using a NaNO₂ solution (0.1 M) as eluent, containing 0.5 g/L NaN₃. The polysaccharide solutions (1 mg/mL) were diluted in the same solvent and filtered through a Millipore nitrocellulose membrane, with pores of 0.22 or 0.45 μ m. HPSEC data were collected and analyzed by the Wyatt Technology ASTRA program. The specific refractive index increment (*dn/dc*) was determined using a Waters 2410 detector. All experiments were carried out at 25 °C.

Methylation analysis

Partial *O*-methylation of sulfated polysaccharide (10 mg) was carried out using 40% aq. NaOH (1 mL) with dropwise addition of Me₂SO₄ (1 mL) [20]. The reaction medium was neutralized, dialyzed, and evaporated. Complete *O*-permethylation was carried out using NaOH-Me₂SO-Mel [21]. Per-*O*-methylated derivatives (5 mg) were hydrolyzed with 45% v/v formic acid (1 mL) at 100 °C for 15 h, and then evaporated to dryness. The resulting mixture of *O*-methylaldoses was successively reduced with NaBD₄ and acetylated with 1:1 Ac₂O-pyridine (200 μ L) overnight at room temperature to give a mixture of partially *O*-methylated alditol acetates, which was analyzed by GC-MS [22].

In vitro anticoagulant activity

The assay was carried out using sulfated polysaccharides, dissolved in saline at various concentrations. Activated partial thromboplastin time (aPTT) was performed using the kit Dade Actin® (Dade Behring, Marburg, DE). Normal human plasma (90 μ L) was incubated with 10 μ L of saline, native polysaccharide (5, 10, 25, 50, and 100 μ g/mL, final concentration), sulfated polysaccharide (5, 10, 25, 50 and 100 μ g/mL, final concentration) or heparin (2, 5 and 10 μ g/mL, final concentration) at 37 °C for 2 min. Rabbit cephalin (100 μ L) was then added and incubated at 37 °C for 3 min. Finally, 0.025 M CaCl₂ solution (100 μ L) pre-warmed to 37 °C, was added to the mixtures, and the clotting time was measured up to 300 s in triplicate using a COAG-A-MATE® XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durham, NC).

For determination of thrombin time (TT), normal human plasma (90 μ L) was incubated with 10 μ L of saline, native polysaccharide (5, 10, 25, 50 and 100 μ g/mL, final concentration), sulfated polysaccharide (5, 10, 25, 50 and 100 μ g/mL, final concentration), or heparin (2, 5 and 10 μ g/mL, final concentration) at 37 °C for 2 min, at which the thrombin time reagent (Behring, Marburg, Germany), 200 μ L, was added. The time for the appearance of a fibrin clot (s) was measured up to 300 s in triplicate using a COAG-A-MATE® XM coagulometer (Organon Teknika Corporation, Durham, NC).

Results are expressed as *T*₁/*T*₀, which is the ratio between the clotting time in the presence (*T*₁) and absence of polysaccharide (*T*₀) in the incubation mixture \pm SD (*n* = 3), whose *T*₁/*T*₀ = 13.39286 for aPTT and *T*₁/*T*₀ = 26.90583 for TT assays were considered to indicate complete inhibition of plasma coagulation.

Animals

Venous thrombosis experiments were conducted on female and male Wistar rats (180–220 g) and tail transection bleeding time experiments were on female Wistar rats (180–220 g) from the colony of the Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil. They were maintained under standard laboratory conditions (12 h light/dark cycle, temperature 22 \pm 2 °C), with standard pellet food and water *ad libitum*. The animals were anesthetized with an intramuscular injection of a mixture of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine (16 mg/kg). The Institutional Ethics Committee of Federal

University of Paraná approved all the procedures adopted in this study (authorization number 226).

Venous thrombosis

Thrombus formation was induced by promoting a combination of stasis and hypercoagulability by a modification of the method of Vogel and co-workers [23]. Rats were anesthetized, and their right carotid artery was cannulated for injection of vehicle (saline), sulfated polysaccharides (0.150, 1.0, 3.0 and 6.0 mg/kg body weight) or heparin (0.100, 0.150, and 0.200 mg/kg body weight), and thromboplastin (5 mg/kg body weight). The abdominal vena cava was carefully dissected, and loose sutures were placed between the right renal vena and femoral veins, and in the left renal vena. Vehicle, sulfated polysaccharide, or heparin were infused into the right carotid artery and allowed to circulate for 5 min. Thrombus formation was then induced by injection of thromboplastin, followed 20 s later by stasis of a 0.7 cm segment of the abdominal vena cava. After stasis of 20 min, the thrombus formed inside the occluded segment was carefully pulled out, washed with saline, dried for 1 h at 60 °C, and weighed. For each group ($n = 6$), the mean thrombus weight \pm SEM was determined and then expressed as percentages of thrombus weight, 100% representing absence of any inhibition of thrombus formation (thrombus weight with vehicle administration).

Tail transection bleeding time

For evaluation of the bleeding effect, rats were anesthetized as described above. The right carotid artery of animals was cannulated for administration of vehicle (saline), sulfated polysaccharides or heparin. After the compounds had circulated for 5 min, the tails were cut 3 mm from the tip and immersed in distilled water (40 mL). After 60 min the blood loss was measured by the hemoglobin dissolved in water, using a spectrophotometric method. The volume of blood was determined by comparison with a standard curve at 540 nm. For each group ($n = 6$), the mean of bleeding time \pm SEM was determined [24].

Platelet aggregation

Platelet aggregation assay was performed by an adaptation of the method of Born [1]. Peripheral blood was collected as previously described in *Materials and Methods*. The resulting platelet-rich plasma (PRP; final platelet count adjusted to 100,000/ μ L with saline) was incubated at 37 °C for 10 min before treatment. Sulfated polysaccharide or heparin (200 μ g/mL final concentration) were added to 900 μ L of PRP and after 1 min incubation at 37 °C, aggregation was stimulated with ADP (10 μ M final concentration). The extent of aggregation was quantified as the gain of light transmittance at 600 nm, over a period of 5 min, at 37 °C, using a Shimadzu UV-2450 spectrophotometer, with 100% of aggregation considered as the gain of light transmittance attained without addition of the polysaccharides. For aggregation assay with α -thrombin as agonist, to the collected blood was added 5 mM EDTA as anticoagulant. Washed platelets were resuspended (final platelet count adjusted to 100,000/ μ L in a modified Tyrode's buffer, pH 7.4, containing 2 mM CaCl_2) and incubated at 37 °C for 10 min before treatment. Sulfated polysaccharides or heparin (200 μ g/mL final concentration) were added to 900 μ L of platelet suspension and after 1 min incubation at 37 °C, aggregation was stimulated with α -thrombin (1 nM final concentration). The extent of aggregation was quantified as described above.

Inhibition of α -thrombin or factor Xa in the presence of sulfated polysaccharides

Incubations were performed in 96-well plates. The final concentrations of the reactants included 6 nM α -thrombin or 8 nM factor Xa

and 0–100 μ g/mL sulfated polysaccharide in 25 μ L of TS/PEG buffer (0.02 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, and 1.0 mg/mL polyethylene glycol 8,000, pH 7.4). The α -thrombin or factor Xa was added last to initiate the reaction. After 1 min of incubation at 37 °C, 25 μ L α -thrombin chromogenic substrate or factor Xa chromogenic substrate was added (100 μ M final concentration), and the absorbance at 405 nm recorded over 15 minutes (Multimode microplate reader Infinite M200, Tecan Group, Switzerland). The change of absorbance was proportional to the α -thrombin or factor Xa activity remaining in the incubation. Activity of 100% was considered to be a control in the absence of sulfated polysaccharides. Assays using 100 nM AT or 15 nM HClI, prior to addition of the chromogenic substrates, were carried out to verify their involvement on the effect of the sulfated polysaccharide.

Statistics

Results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) for *in vitro* and mean \pm standard error of the mean (SEM) for *in vivo* experiments. Statistical significance of the results was determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test. Data were considered different at a significance level of $p < 0.05$.

Results

The mannogalactan (MgPr, 360 mg) was submitted to chemical sulfation which gave a sulfated polysaccharide (MgPr-S1, 720 mg) with a degree of substitution (DS) of 1.31. The sulfated polysaccharide was analyzed by HPSEC-MALLS and had a homogeneous elution profile (Fig. 1), with M_w 6.12×10^4 g/mol ($dn/dc = 0.195$).

Methylation analysis of MgPr-S1 (Table 1) showed a highly substituted polysaccharide, with a complex range of positions, with a preference for HO-6 of Manp units.

^{13}C NMR analysis were carried out and the signals of native (MgPr) and chemically sulfated polysaccharide (MgPr-S1) were compared (Fig. 2A and B). The ^{13}C NMR spectra were different, that of MgPr-S1 containing signals broader than those of MgPr. O-Substitution shifts also occurred, namely a strong downfield α -shift and removal of the nonsubstituted CH_2OH -6 of β -D-Manp signal at δ 61.2, due to its complete sulfation, and an upfield β -shift of the signal at δ 101.9 corresponding to sulfation of HO-2.

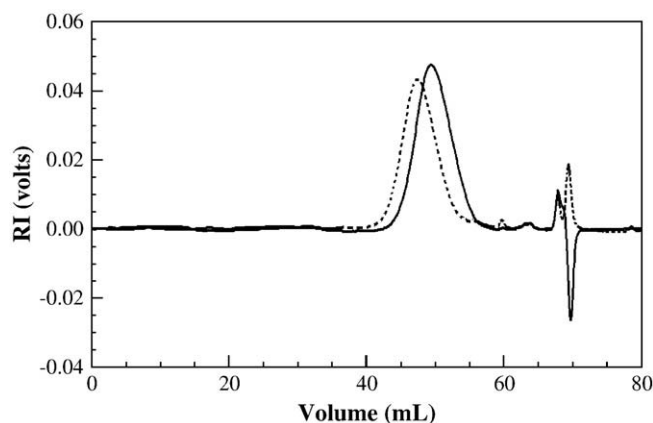


Fig. 1. HPSEC elution profile of MgPr (solid profile) and MgPr-S1 (dotted line). Was used a Waters 510 HPLC pump at 0.6 mL/min with four gel permeation columns in series with exclusion sizes of 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , and 5×10^3 Da, using a refractive index (RI) detector. The eluent was 0.1 mol/L aq. NaNO_3 with 200 ppm aq. NaN_3 . Samples, previously filtered in membrane (0.22 μ m; Millipore), were injected (100 μ L loop) at a 1 mg/mL concentration.

Table 1
Structural components of MgPr and MgPr-S1, based on methylation analysis.

O-Methylalditol acetates ^a	% Area ^b		Substitution profile ^d
	MgPr ^c	MgPr-S1	
2,3,4,6-Me ₄ -Man	38		Manp-(1→
2,3,4-Me ₃ -Gal	24	7	→6)-Galp-(1→
2,6-Me ₂ -Man		6	→3,4)-Manp-(1→
3,4-Me ₂ -Man		7	→2,6)-Manp-(1→
3,4-Me ₂ -Gal	38	10	→2,6)-Galp-(1→
2-Me-Gal		19	→3,4,6)-Galp-(1→
4-Me-Gal		26	→2,3,6)-Galp-(1→
Man		17	→2,3,4,6)-Manp-(1→
Gal		8	→2,3,4,6)-Galp-(1→

^a O-Methylalditol acetate obtained by per-O-methylation, followed by successive hydrolysis, reduction with NaBD₄, and acetylation, then analyzed by GC-MS (DB-225 column).

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

^c Methylation data obtained by Rosado et al. [15].

^d Structure based on O-methylalditol acetate.

In vitro anticoagulant activity of polysaccharides

The anticoagulant activity of the polysaccharides was investigated by the classical coagulation assays, activated partial thromboplastin

time (aPTT) and thrombin time (TT), using heparin (202 IU/mg) as a reference.

MgPr-S1 prolonged aPTT and TT in a dose-dependent manner, while the non-sulfated polysaccharide did not exhibit activity (Fig. 3). The initial concentration of 5 µg/mL of plasma was able to prolong aPTT and TT (1.6 and 3.8 times greater than that of the control, respectively). At concentrations of 50 µg/mL and 100 µg/mL complete inhibition occurred of plasma coagulation in TT and aPTT assay, respectively. At a concentration of 2 µg/mL of plasma, in aPTT, heparin was able to prolong the plasma coagulation 2 times when compared to the control, and at a concentration of 5 µg/mL of plasma the inhibition was complete. As for the TT assay, heparin inhibited completely the plasma coagulation at a concentration of 2 µg/mL of plasma.

In vivo antithrombotic activity of polysaccharides

The antithrombotic effect of MgPr-S1 was evaluated in rats using a venous thrombosis model, in which thrombus formation can be observed. The average dried thrombus weight of vehicle-treated rats corresponded to 100% thrombosis (Fig. 4). MgPr-S1 inhibited thrombus formation in a dose-dependent manner. When used at 1 mg/kg body weight, MgPr-S1 inhibited at 51% thrombus formation and at the dose of 6 mg/kg body weight thrombosis was completely

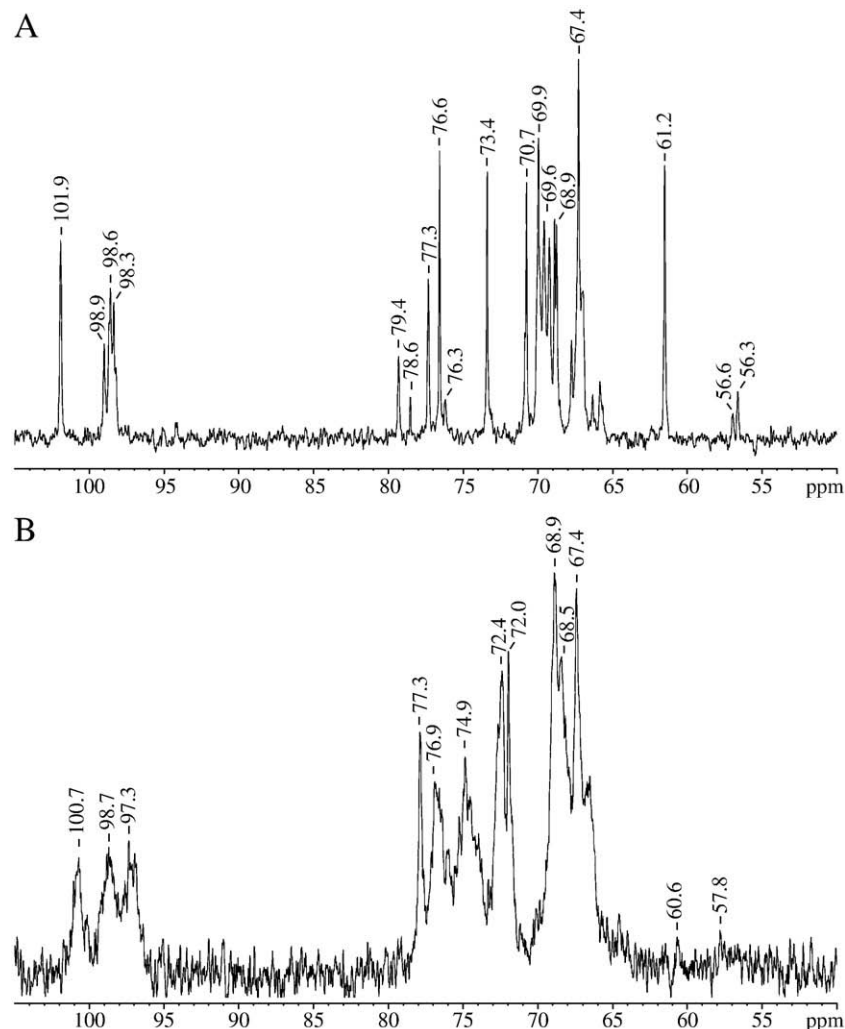


Fig. 2. ¹³C NMR 100 MHz spectra of native (MgPr -A) and sulfated (MgPr-S1 -B) polysaccharides in D₂O at 70 °C (chemical shifts are expressed in ppm).

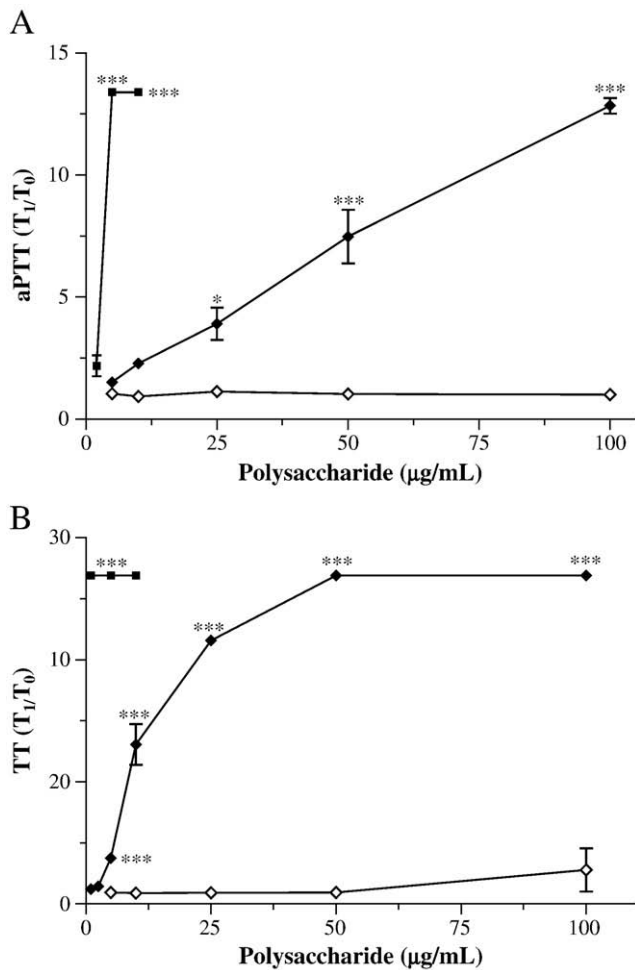


Fig. 3. *In vitro* anticoagulant activity. A) Activated partial thromboplastin time (aPTT). B) Thrombin time (TT). Normal human plasma was incubated with different concentrations of MgPr (◇), MgPr-S1 (◆), or heparin (■). Results are expressed as T_1/T_0 , which is the ratio between the clotting time in the presence (T_1) and in the absence of polysaccharide (T_0) in the incubation mixture \pm SD ($n = 3$), with $p < 0.05^*$ or $< 0.001^{***}$ when compared to the control group. Complete inhibition of plasma coagulation was considered to be $T_1/T_0 = 13.39286$ for aPTT and 26.90583 for TT assays. See Methods for details.

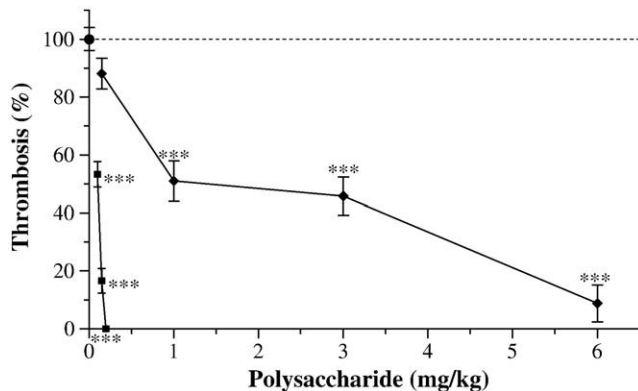


Fig. 4. Venous antithrombotic effect after intravascular administration of sulfated polysaccharides in rats. Thrombus formation was induced by promoting a combination of stasis and hypercoagulability. Saline (●), MgPr-S1 (◆) or heparin (■) at different doses were administered in the right carotid artery and allowed to circulate for 5 min. Thromboplastin (5 mg/kg body weight) was then injected and 20 s later, 0.7 cm of an isolated segment of the abdominal vena cava was tied off. After stasis for 20 min, the thrombus formed on the interior was pulled out, dried and weighed. Results are expressed as % thrombus weight (mean \pm SEM, $n = 6$, with $*** p < 0.001$ vs. saline), 100% representing absence of any thrombosis inhibition (thrombus weight in the absence of polysaccharide administration).

inhibited. Unfractionated heparin gave total inhibition of venous thrombosis at a dose of 0.200 mg/kg.

Tail transection bleeding time

MgPr-S1 caused a slight increase in blood loss at a dose of 6 mg/kg body weight, while at 3 mg/kg the blood loss did not increase in comparison with the control. In contrast, heparin exhibited a dose-dependent increase in the blood loss and at a dose of 0.200 mg/kg, the blood loss was 3.4 times greater than that of the control (Fig. 5).

Platelet Aggregation

At the dose of 200 μ g/mL MgPr-S1 inhibited 52% and 92% ADP- and α -thrombin-induced platelet aggregation (Fig. 6), while heparin, at the same dose, inhibited 70% and 50%, respectively.

Inhibition of α -thrombin or factor Xa in the presence of sulfated polysaccharides

Like heparin, MgPr-S1 inhibited α -thrombin in the presence of AT (Fig. 7A) and the IC_{50} was 0.3 μ g/mL (final concentration). It also inhibited α -thrombin in the presence of HCII (Fig. 7B), and the IC_{50} was 0.04 μ g/mL (final concentration). However, the sulfated polysaccharide did not inhibit the Xa factor in the presence of antithrombin (Fig. 7C). MgPr-S1 did not directly inhibit α -thrombin (data not shown).

Discussion

It is well known that some natural polysaccharides from basidiomycetes possess certain biological activities, such as antiviral and antitumor effects [25]. It is also known that venous thromboembolism is predominantly a disease of old age and has a high incidence [26], being also associated with obesity, paralysis, chronic respiratory failure, and intrinsic and extrinsic factors [3], and that heparins of different molecular size are the most common anticoagulant used for treatment. However, heparin has several adverse effects, such as thrombocytopenia, bleeding and its animal origin [27]. In an attempt to evaluate the anticoagulant and antithrombotic effect of a product from a non-animal source, namely a mannogalactan present in fruiting bodies of an edible basidiomycete *P. ostreatoroseus* was chemically sulfated and its activities tested. The native polymer has a main chain of (1 \rightarrow 6)-linked α -D-galactopyranosyl units, partially methylated at O-3, and substituted at

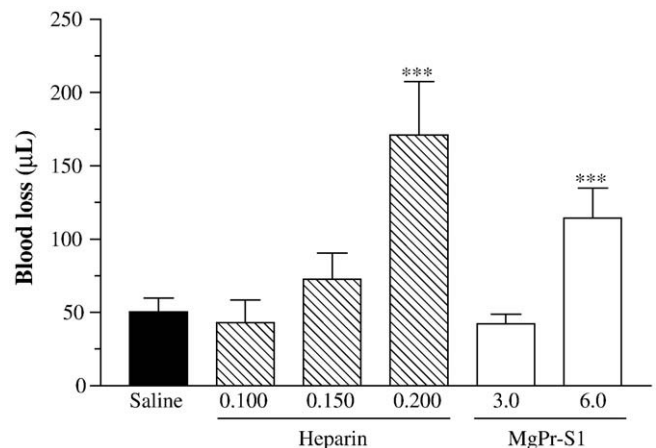


Fig. 5. Bleeding tendency. Different concentrations of MgPr-S1 or heparin were administered in the right carotid artery and allowed to circulate for 5 min and the rat-tail was cut 3 mm from the tip. The tail was immersed in 40 mL of distilled water at room temperature. Blood loss was determined 60 min later by measurement of the haemoglobin in the water. The results were expressed as μ L of blood loss \pm SEM ($n = 6$), with $p < 0.001^{***}$, when compared to the control group (saline).

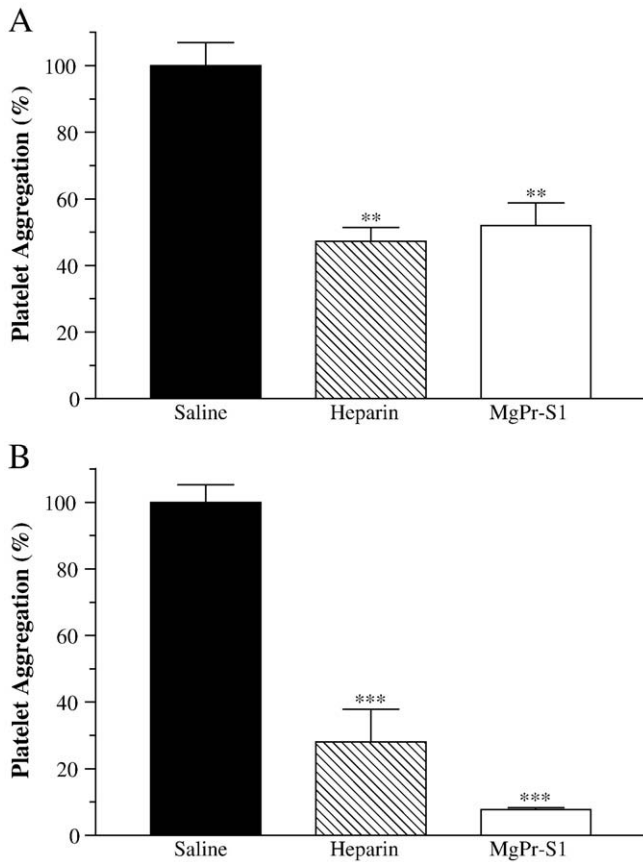


Fig. 6. Effect of sulfated polysaccharides on platelet aggregation induced by ADP (A) and α -thrombin (B). Saline (■), MgPr-S1 (□), or heparin (▨), 200 μ g final concentration, were added to 900 μ L of PRP or a washed platelets suspension (100,000 platelets/ μ L) and after 1 min of incubation at 37 °C, aggregation was stimulated with ADP (10 μ M final concentration) or human α -thrombin (1 nM final concentration), respectively. The extent of aggregation (mean \pm SEM, n = 6, ** p < 0.01 or *** p < 0.001 vs. saline) is expressed as the gain of light transmittance at 600 nm, over a period of 5 min, at 37 °C, 100% representing platelet aggregation without the addition of the polysaccharides (saline group).

O-2 by β -D-mannopyranose residues [16]. This polymer was chosen because it is readily available, inexpensive, and chemically well-defined [10]. The native mannogalactan was subjected to sulfation and the resulting derivative had a degree of substitution (DS) of 1.31, that corresponds, an average, to more than one sulfated substituent group per glycosidic unit. This procedure was carried out, since anticoagulant activity is related to the presence of negative charges, which partly results from the interaction between the negative charge of sulfate groups and some positive charge of peptidic sequences in proteins involved in the coagulation cascade [11,12].

Methylation and 13 C NMR analysis showed that the sulfation occurred preferentially at β -D-Manp units, and that most of them contained two sulfate esters. The main chain was mainly substituted at HO-4 and HO-2 of the (1 \rightarrow 6)-linked β -D-Galp units. Such partial structural analysis is important to improve the knowledge about sulfated polysaccharides with biological activity, since it is influenced by molecular weight, degree of sulfation (DS), sulfation pattern, monosaccharide composition, and linkage structures [28].

There are various coagulation assays which measure different stages of the coagulation cascade. The aPTT provides basic information on the intrinsic coagulation pathway. This test has been chosen as a screen of the anticoagulant activity of the polysaccharides and because the anticoagulant effect of UFH is usually monitored by it. TT is used to measure the final common pathways of the plasma coagulation cascade [29]. The native

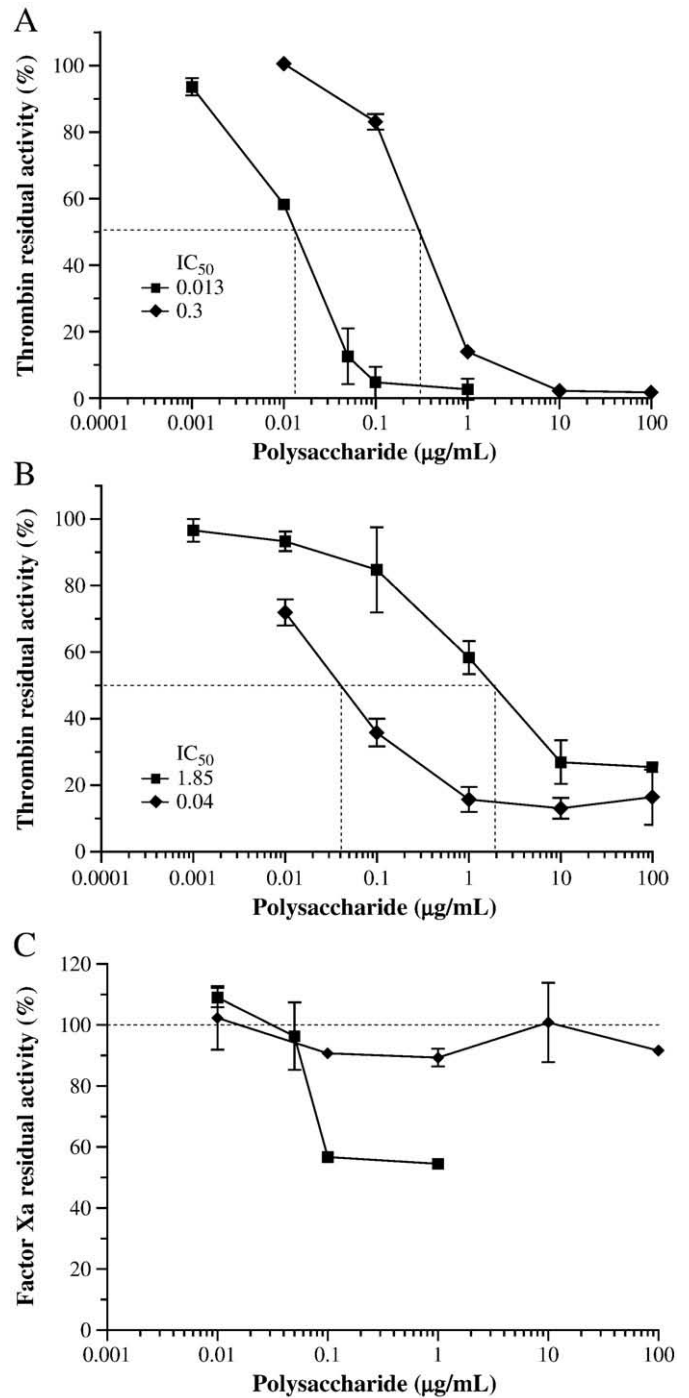


Fig. 7. Effect of sulfated polysaccharides on inhibition of α -thrombin by antithrombin (A) or HClII (B) and inhibition of factor Xa (C). 6 nM of α -thrombin and 8 nM of factor Xa, 10 nM of AT or 15 nM of HClII were incubated with different concentrations of MgPr-S1 (◆) or heparin (■). After 1 min at 37 °C, 100 μ M of specific chromogenic substrate was added, and α -thrombin and factor Xa activities expressed as a proportion of the absorbance at 405 nm (means \pm SEM, n = 3), with 100% of activity considered as the absorbance achieved without the addition of polysaccharide. See Methods for details. Dotted lines are representative of IC₅₀.

mannogalactan did not have any influence on plasma coagulation in aPTT and TT tests, however the sulfated mannogalactan had a dose-dependent activity. MgPr-S1 was able to prolong plasma coagulation >10-fold at a dose of 100 μ g/mL with aPTT and >10-fold at a dose of 50 μ g/mL with the TT test, corresponding to complete coagulation inhibition. Sulfated galactans isolated from green

seaweeds *Codium fragile* and *Codium vermilara* containing 20% and 30% of sulfate and a main chain with (1→3) linkages showed similar activity at the same dose [30]. These results were expected because sulfate esters, are usually necessary to provide anticoagulant effects [10,11].

The antithrombotic property of MgPr-S1 was evaluated using a venous stasis model in rats. It was able to decrease thrombus weight when given intravenously in a dose-dependent manner, and at a dose of 6 mg/kg body weight completely prevented thrombosis after 20 min stasis. Galactans from several sources have been studied as antithrombotic agents. Some sulfated galactans from marine algae have potent anticoagulant and antithrombotic effects, although they have considerable structural differences [31]. Galactans from the marine red algae *Gellidium crinale* and *Botryocladia occidentalis* are composed of repeating disaccharide groups of -4- α -D-Galp-1 \rightarrow 3- β -D-Galp-1 \rightarrow , but with a difference in their sulfation pattern and proportion, giving rise to different activities. At a dose of 3 mg/kg, the galactan from *G. crinale* completely inhibited thrombosis, and at high doses the galactans from *B. occidentalis* had prothrombotic activity [31]. In order to obtain homogeneous galactans, Cipriani and co-workers [8] chemically sulfated a citrus pectin and its polysaccharide, at a dose of 3.5 mg/kg, completely inhibited thrombus generation. In the present investigation, a higher mg/kg dose of the chemically sulfated mannogalactan was necessary to completely inhibit the thrombus formation in comparison with the sulfated pectin and the heparin (0.200 mg/kg). However, when the dose was calculated as a molar concentration, the MgPr-S1 was able to inhibit thrombosis at 9.6×10^{-8} mol/kg, while the sulfated pectin dose at molar concentration was able to inhibit thrombosis at 2.9×10^{-7} mol/kg and heparin at 1×10^{-8} mol/kg. Thus, to achieve *in vivo* activity, fewer MgPr-S1 molecules are necessary than those of pectin. This difference might be due to the higher M_w of MgPr-S1, which favors stronger interaction between the negative polysaccharide and the proteins involved in the thrombus formation.

Arterial thrombosis is directly related to platelet aggregation and is also thrombin dependent. Inhibitors of platelet aggregation have been used to prevent and to treat arterial thrombosis [32,33]. The sulfated mannogalactan was assayed for platelet aggregation, and decreased ADP- and α -thrombin-induced platelet aggregation, although MgPr-S1 had a lower hemorrhagic effect than heparin. These data suggest that MgPr-S1 could be also effective against arterial thrombosis, with an effect less adverse than with heparin since MgPr-S1, *in vitro*, was able to inhibit the platelet aggregation.

Anticoagulant mechanisms of heparin and other polysaccharides are related to α -thrombin and/or factor Xa direct inhibition or it is mediated by AT and/or HCII [34]. The chemically sulfated citrus pectin directly inhibited α -thrombin [8], whereas dermatan sulfate from skin of the ray (*Raja radula*) inhibited α -thrombin primarily mediated by HCII [35]. The mode of action, *in vitro*, of the MgPr-S1 is by AT- and HCII-mediated α -thrombin inhibition, while MgPr did not inhibited the coagulation by factor Xa.

Depending on their structure, molar mass, sulfate content, and the occurrence of specific oligosaccharides, polysaccharides have different anticoagulant and antithrombotic proprieties. Our results suggest that synthetic sulfated polysaccharides, derived from native mushroom polymers, could serve as new non-animal sources of antithrombotic compounds against venous thrombus.

Conflict of interest statement

None of the authors have conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian funding agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

(CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação Araucária.

References

- [1] Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927–9.
- [2] Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol* 2007;44(2):62–9.
- [3] Sherman DG. Prevention of venous thromboembolism, recurrent stroke, and other vascular events after acute ischemic stroke: the role of low-molecular-weight heparin and antiplatelet therapy. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2006;15(6):250–9.
- [4] Marder VJ, Rosove MH, Minning DM. Foundation and sites of action of antithrombotic agents. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004;17(1):3–22.
- [5] Mann KG, Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Butenas S. Models of blood coagulation. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36:108–17.
- [6] Weitz JI, Crowther M. Direct thrombin inhibitors. *Thromb Res* 2002;106:V275–84.
- [7] Groth I, Grünewald N, Alban S. Pharmacological profiles of animal- and nonanimal-derived sulfated polysaccharides—comparison of unfractionated heparin, the semisynthetic glucan sulfate PS3, and the sulfated polysaccharide fraction isolated from *Delesseria sanguinea*. *Glycobiology* 2009;19(4):408–17.
- [8] Pomin VH, Pereira MS, Valente AP, Tollesfsen DM, Pavão MSG, Mourão PAS. Selective cleavage and anticoagulant activity of a sulfated fucan: stereospecific removal of a 2-sulfate ester from the polysaccharide by mild acid hydrolysis, preparation of oligosaccharides, and heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. *Glycobiology* 2005;15(4):369–81.
- [9] Cipriani TR, Gracher AHP, Souza LM, Fonseca RJC, Belmiro CLR, Gorin PAJ, et al. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. *Thromb Haemost* 2009;101:860–6.
- [10] Alban S, Franz G. Partial synthetic glucan sulfates as potential new antithrombotics: a review. *Biomacromolecules* 2001;2:354–61.
- [11] Martinichen-Herrero JC, Carbonero ER, Sasaki GL, Gorin PAJ, Iacomini M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucanmannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. *Int J Biol Macromol* 2005;35:97–102.
- [12] Tao Y, Zhang L, Cheung PCK. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. *Carbohydr Res* 2006;341:2261–9.
- [13] Unursaikhan S, Xu X, Zenf F, Zhang L. Antitumor activities of O-sulfonated derivatives of (1→3)- α -D-glucan from *Lentinus edodes*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70:38–46.
- [14] Nie X, Shi B, Ding Y, Tao W. Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities. *Int J Biol Macromol* 2006;39:228–33.
- [15] Carbonero ER, Gracher AHP, Smiderle FR, Rosado FR, Sasaki GL, Gorin PAJ, et al. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. *Carbohydr Polym* 2006;66:252–7.
- [16] Rosado FR, Carbonero ER, Claudino RF, Tischer CA, Kimmelmeier C, Iacomini M. The presence of partially 3-O-methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* 'florida' Berk. and *Pleurotus ostreatus* Sing. *FEMS Microbiol Lett* 2003;221:119–24.
- [17] Papy-Garcia D, Barbier-Chassefière V, Rouet V, Kerros ME, Klochendler C, Tournaire MC, et al. Nondegradative sulfation of polysaccharides. Synthesis and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics. *Macromolecules* 2005;38:4647–54.
- [18] O'Neill AN. Sulphated derivatives of laminaran. *Can J Chem* 1955;33:1097–101.
- [19] Dodgson KS, Prince RG. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem J* 1962;84(1):106–10.
- [20] Haworth WN. A new method of preparing alkylated sugars. *J Chem Soc* 1915;107:8–16.
- [21] Ciucanu I, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res* 1984;131:209–17.
- [22] Sasaki GL, Gorin PAJ, Souza LM, Czelusniak PA, Iacomini M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. *Carbohydr Res* 2005;340:731–9.
- [23] Vogel GMT, Meuleman DG, Bourgondiën FGM, Hobbelen PMJ. Comparison of two experimental thrombosis models in rats: effects of four glycosaminoglycans. *Thromb Res* 1989;54:399–410.
- [24] Mendes-Silva W, Assafim M, Ruta B, Monteiro RQ, Guimaraes JA, Zingali RB. Antithrombotic effect of Glycyrizin, a plant-derived thrombin inhibitor. *Thromb Res* 2003;112:93–8.
- [25] Moraldi MF, Mostafavi H, Ghods S, Hedjaroude GA. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int Immunopharmacol* 2007;7:701–21.
- [26] Heit JA. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:370–2.
- [27] Kakkar AK. Low- and ultra-low-molecular-weight heparins. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004;17(1):77–87.
- [28] Zou C, Du Y, Li Y, Yang J, Feng T, Zhang L, et al. Preparation of lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity *in vitro*. *Carbohydr Polym* 2008;73:322–31.
- [29] Kamal AH, Tefferi A, Pruthi RK. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clin Proc* 2007;82(7):864–73.

- [30] Ciancia M, Quintana I, Vizcargüénaga MI, Kasulin L, Dios A, Estevez JM, et al. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. *Int J Biol Macromol* 2007;41:641–9.
- [31] Fonseca RJC, Oliveira SNMCG, Melo FR, Pereira MG, Benevides NMB, Mourão PAS. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. *Thromb Haemost* 2008;99:539–45.
- [32] Savi P, Pflieger A-M, Hérault J-P, Michaux C, Duchaussoy P, Petitou M, et al. Comparative effects of two synthetic oligosaccharides on platelet activation induced by plasma from HIT patients. *J Thromb Haemost* 2003;1:2008–213.
- [33] Yoon SJ, Yu MA, Pyun YR, Hwang JK, Chu DC, Juneja LR, et al. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Throm Res* 2003;112:151–8.
- [34] Sasisekharan R, Raman R, Prabhakar V. Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu Rev Biomed Eng* 2006;8:181–231.
- [35] Mansour MB, Dhahri M, Bertholon I, Olliver V, Bataille I, Ajzenberg N, et al. Characterization of a novel dermatan sulfate with antithrombin activity from ray skin (*Raja radula*). *Thromb Res* 2009;123:887–94.

ANEXO II



CEP/HC/UFPR



10 Anos

Curitiba, 29 de novembro de 2007.

Ilmo (a) Sr. (a)
Ana Helena Pereira Gracher
Nesta

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICOAGULANTE E ANTITROMBOTICO DE POLISSACARÍDEOS NATIVOS E QUIMICAMENTE SULFATADOS DE BASIDIOMICETOS", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 27 de novembro de 2007. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0267.0.208.000-07
Registro CEP: 1581.246/2007-11

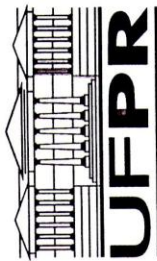
Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Renato Tambara Filho".

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO III



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



CERTIFICADO N.º 226

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA N.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of *Experimental Animals* (Canadian Council on Animal Care)".

APROVADO.

PROCESSO: 23075.025538/2007-33

RO 05/2007 - 21/06/2007

TÍTULO: Avaliação do potencial anticoagulante e antitrombótico de polissacarídeos nativos e quimicamente sulfatados de basidiomicetos

AUTORES: Marcello Iacomini, Maria Consuelo Andrade Marques, Ana Helena Pereira Gracher, Elaine Carbonero, Thales Ricardo Cipriani, Sandra Crestani, Yanna Dantas Rattman

DEPARTAMENTO: Bioquímica

Curitiba, 29 de junho de 2007.

Prof.ª Ana Maria Caliman Filadelfi
Coordenadora do CEEA

