

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO RODRIGUES ROSSI

AVALIAÇÃO DOS REQUISITOS ESTRUTURAIS DA MOLÉCULA DE HEPARINA
QUE SÃO NECESSÁRIOS PARA O ESTÍMULO DA SÍNTESE DE
PROTEOGLICANO DE HEPARAM SULFATO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

CURITIBA

2013

GUSTAVO RODRIGUES ROSSI

AVALIAÇÃO DOS REQUISITOS ESTRUTURAIS DA MOLÉCULA DE HEPARINA
QUE SÃO NECESSÁRIOS PARA O ESTÍMULO DA SÍNTESE DE
PROTEOGLICANO DE HEPARAM SULFATO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Monografia apresentada para a conclusão
do curso de Bacharel em Ciências
Biológicas com ênfase em Processos
Moleculares, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA

2013

RESUMO

Heparina é um polissacarídeo linear, pertencente à família dos glicosaminoglicanos (GAGs). Ela é formada por unidades repetitivas de dissacarídeos compostas por uma D-glucosamina, que pode ser *N*-sulfatada ou acetilada e 6-*O*-sulfatada, ou ainda, raramente 3-*O*-sulfatada, e um ácido urônico, que pode ser ácido D-glucurônico ou L-idurônico, e este pode apresentar um grupamento sulfato 2-*O* ligado. Assim, possui cargas negativas decorrente dos grupamentos sulfato e ainda dos grupamentos carboxílicos, presentes nos ácidos urônicos. A ação farmacológica da heparina está mais relacionada com a sua atividade anticoagulante, descrita desde o início do século passado. A heparina age no sistema de coagulação exercendo seu efeito principalmente por ligar-se à antitrombina, formando um complexo ternário, aumentando sua capacidade em inativar várias enzimas da cascata da coagulação. O heparan sulfato é outro GAG, cuja estrutura química é muito parecida com a molécula de heparina, porém com menor grau de sulfatação. Os dados da literatura mostram que o Proteoglicano de Heparan Sulfato (PGHS), presente na superfície das células endoteliais, é o responsável por manter a compatibilidade destas com o sangue, isto é, age impedindo a formação de coágulos. Desta forma, este PGHS já possui uma característica antitrombótica (impede a formação de trombos). Porém, quando essas células são expostas à heparina, em ensaios “in vitro”, ocorre um aumento da síntese do PGHS, tornando-o mais sulfatados, e conseqüentemente, aumentando a atividade antitrombótica. Assim, o objetivo deste trabalho foi entender quais os requisitos estruturais da heparina que são necessários para causar tal efeito. Para tanto, foram realizadas modificações químicas nestas moléculas: carboxirredução e dessulfatação, pontuais, bem como total. Ainda, um lote desta heparina totalmente dessulfatada foi *N*-acetilada. As modificações foram comprovadas pelo perfil eletroforético em gel de agarose, tampão PDA, dosagem de sulfato e de ácido urônico e por ressonância magnética nuclear (RMN). Para a análise do estímulo da síntese do proteoglicano de heparan sulfato foram utilizadas células endoteliais de aorta de coelho cultivadas na presença, ou não, da heparina e das heparinas modificadas em meio de cultura contendo [³⁵S]-sulfato de sódio. A análise do efeito sobre a síntese do PGHS revelou que a heparina totalmente dessulfatada não estimulou a síntese, porém, quando foi utilizada a heparina totalmente dessulfatada e *N*-acetilada houve um pequeno estímulo na síntese do PGHS. Para avaliar melhor esse resultado, foi utilizada a técnica do dicroísmo circular (DC), que é capaz de revelar alterações na conformação dessas heparinas modificadas. O resultado mostrou que a heparina totalmente dessulfatada, quando *N*-Acetilada, exibe uma conformação diferente, quando comparada com a totalmente dessulfatada. Esse conjunto de resultados nos levam a concluir que o estímulo da síntese do proteoglicano de heparan sulfato é decorrente não somente dos grupamentos sulfatos ou da quantidade de cargas negativas (sulfato ou carboxila), mas também da conformação em que estas estão presentes na molécula de heparina.

Palavras chaves: Heparina, Proteoglicano de Heparan Sulfato, Células endoteliais.

Abstract

Heparin is a linear polysaccharide belonging to the family of glycosaminoglycans (GAGs). Formed by repeating disaccharide units composed by D-glucosamine, which can be *N* sulfated or acetylated and 6-*O*-sulfated or, rarely 3-*O*-sulfated, uronic acid, which can be D-glucuronic, or L- iduronic acid, it can contain a sulfate 2-*O* group linked. Thus, it has negative charges resulting from sulfate groups at various positions and still the carboxylic acid groups present in uronic. The pharmacological action of heparin is more related to anticoagulant activity, described in the beginning of the last century. Heparin acts on the coagulation system exerting its effect mainly bind to antithrombin, forming a ternary complex, thus increasing its ability to inactivate various enzymes of the coagulation cascade. The heparan sulfate is another GAG, whose chemical structure is very similar to the heparin molecule, but with lower degree of sulfation. Literature data show that heparan sulfate proteoglycan (HSPG), present on the endothelial cells surface, is responsible for maintaining the compatibility of the blood, acts by preventing the formation of clots. Thus, this HSPG have an antithrombotic characteristic (prevents the formation of thrombi). However, an increase in the synthesis of HSPG occurs when these cells are exposed to heparin "in vitro" assays, making it more sulfated and consequently increasing the antithrombotic activity. The objective of this study was to understand the structural requirements of heparin that are needed to cause such an effect. To this propose, chemical modifications were performed on these molecules: carboxy reduction and desulfation, specific and total. In addition, a lot this totally desulfated heparin was *N*-acetylated. The changes were confirmed by agarose electrophoresis profile using PDA buffer, dosage of sulfate and uronic acid and nuclear magnetic resonance (NMR). Rabbit aortic endothelial cells was cultured in the presence, or absence, of heparin and modified heparin in a culture medium containing [³⁵S]- sodium-sulfate was used for analysis of stimulation of the synthesis of heparan sulfate proteoglycan. The analysis of the effect on the HSPG synthesis revealed that totally desulfated heparin did not stimulate the synthesis, however, when completely desulfated and *N*-acetylated there was a slight stimulation of the synthesis of PGHS. To better evaluate this result, the technique of circular dichroism (CD) that is capable of revealing changes in the conformation of these modified heparins was used. The result showed that when totally desulfated and *N*- acetylated heparin showed a different conformation compared with the totally desulfated. All these results lead us to conclude that the stimulation of the synthesis of heparan sulfate proteoglycan is a result not only of sulfate groups or the amount of negative charges (carboxyl or sulfate), but the conformation in which they are present in the heparin molecule.

Key words: Heparin, Heparan Sulfate Proteoglycan, endothelial cells.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elisabete e Fernando, por sempre estarem presentes me dando apoio e serem essenciais no meu crescimento.

Aos meus irmãos Vinícius e Leandro, por todo o companheirismo.

À minha namorada Jenifer que sempre está do meu lado em todos os momentos, sendo minha melhor amiga e deixando todos os nossos momentos juntos maravilhosos.

Ao meu chefe, Prof. Edvaldo, por me ajudar a crescer na vida acadêmica, sempre me orientando, discutindo os experimentos e resultados e também por ser um grande amigo!

A Prof. Carolina por sempre ajudar nos experimentos e por ser a minha “desorientadora”, sempre muito “sutil”.

A Prof. Dorly por sempre dar bons conselhos.

A Prof. Helena Nader por abrir as portas do seu laboratório na UNIFESP.

Ao Marcelo, Renan, Leo, Gabriel e Bel, da UNIFESP, por me receberem bem no lab e me auxiliando nos experimentos.

Ao Prof. Guilherme Sasaki, Arquimedes e Popó e ao centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR pela ajuda nas análises.

Ao Prof. Marcelo Mueller por me ajudar com o Dicroísmo Circular.

Aos meus amigos do Curso de Ciências Biológicas: Rafael, Raquel e Bia.

A todo o pessoal do Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados e do Laboratório de Células Neoplásicas e Inflamatórias.

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica.

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro para realização do projeto.

Sumário

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos	8
2.2 Heparina.....	12
2.2.1 Histórico.....	12
2.2.2 Estrutura	13
2.3 Heparan Sulfato	14
2.4 Proteoglicano de Heparan Sulfato Endotelial	16
2.5 Efeito da Heparina nas Células Endoteliais	16
2.6 Interação da Heparina com as Células	17
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Heparina.....	21
4.2 Modificações químicas	21
4.2.1 Preparo do sal de piridíneo	21
4.2.2 Dessulfatação total (<i>N</i> e <i>O</i> -dessulfatação).....	21
4.2.3 Remoção de sulfato 2- <i>O</i> ligado em idurônico.....	22
4.2.4 <i>N</i> -dessulfatação.....	22
4.2.5 Remoção de sulfato 6- <i>O</i> ligado no glucosamina	22
4.2.6 Recuperação das heparinas dessulfatadas e <i>N</i> -acetiladas	23
4.2.6 Carboxirredução	23
4.4 Eletroforese em gel de agarose.....	23
4.5 Dosagem de sulfato	23
4.6 Dosagem de ácido urônico	24

4.7 Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN- ^1H e RMN- ^{13}C).....	24
4.8 Células endoteliais de aorta de coelho	25
4.9 Efeito das heparinas quimicamente modificadas sobre as células endoteliais.....	25
4.9.1 Estímulo da Síntese de Heparan Sulfato pelas células tratadas ou não com heparina quimicamente modificadas ou não	25
4.10 Dicroísmo Circular.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Eletroforese em gel de agarose.....	27
5.2 Dosagem de sulfato	28
5.3 Dosagem de ácido urônico.....	29
5.4.4 Análise das modificações estruturais por RMN.....	29
5.5 Efeito das heparinas quimicamente modificadas sobre a síntese de heparan sulfato nas células endoteliais	37
5.6 Dicroísmo Circular.....	38
5. CONCLUSÕES.....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Trabalhos prévios mostraram que o proteoglicano de heparan sulfato (PGHS), presente na superfície das células endoteliais possui uma característica antitrombótica. No entanto, na presença da heparina ocorre um aumento na sua síntese, bem como uma alteração na sua composição, tornando-o mais sulfatado e, assim, aumentando sua característica antitrombótica (NADER *et al.*, 1989).

Acreditava-se que o sítio de ligação para a heparina fosse receptores presentes na superfície celular. No final da década de 90, alguns grupos de pesquisa, publicaram diversos trabalhos enfocando uma proteína da superfície celular denominada de HIP - proteína que interagem com a heparina e/ou heparan sulfato, - dada sua propriedade de ligar com alta afinidade. Estes dados foram obtidos de extratos bioquímicos, mas o grande desafio era mostrar a ligação ocorrendo *in situ*, o que nenhum grupo conseguiu realizar. Então, foi desenvolvido um *probe* para heparina, conjugando-a com biotina, mas a busca também foi frustrada, pois foi observada apenas a ligação com a matriz extracelular (MEC). A resposta foi obtida pela demonstração de que o sítio de ligação presente na superfície celular *in situ* encontra-se ocupado por ligante endógeno, sendo este o próprio heparan sulfato endotelial. O trabalho foi dividido em duas frentes, uma estudando as vias de sinalização celular, com o uso de anticorpos para proteínas fosforiladas, inibidores de fosforilação, além de modelos celulares molecularmente modificados. Esta parte do trabalho já foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Helena Nader, da UNIFESP e foi recentemente publicado (MEDEIROS *et al.*, 2012). A outra frente consiste em investigar os requisitos estruturais da molécula de heparina que levam ao efeito citado, além de buscar identificar quais os componentes da MEC responsáveis por tal estímulo. Este trabalho, responde a questão da estrutura da heparina e mostra que o efeito não é dependente da quantidade de cargas negativa, nem somente dos grupamento sulfato ou carboxílico, mas da conformação espacial que se encontram.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos

Glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos lineares formados por unidades dissacarídicas constituídas alternadamente por uma hexosamina (D-

glucosamina ou D-galactosamina) unida por ligação glicosídica a um açúcar não nitrogenado, que pode ser um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou um açúcar neutro (D-galactose). A maioria desses compostos apresenta grupamentos sulfatos, que juntamente com as carboxilas dos ácidos urônicos, confere uma alta densidade de cargas negativas a eles (MATHEWS, 1975; DIETRICH, 1984; NADER e DIETRICH, 1989). Dependendo da composição dos dissacarídeos e do tipo de ligação entre eles, os GAGs podem ser classificados como: ácido hialurônico (Figura 1A), condroitim sulfato (Figura 1B), dermatam sulfato (Figura 1C), queratam sulfato (Figura 1D), heparam sulfato (Figura 1E) e heparina (VYNIOS, KARAMANOS e TSIGANOS, 2002). Esses polissacarídeos, com exceção do ácido hialurônico, são sintetizados sob a forma de proteoglicanos, nos quais cadeias sacarídicas estão ligadas covalentemente ao *core* proteico (DIETRICH, 1984; KJELLÉN e LINDAHL, 1991; GANDHI e MACERA, 2008). A ligação dos GAGs ao esqueleto proteico é iniciada por uma unidade tetrassacarídica constituída de ácido β -D-glucurônico- β -D-galactose- β -D-galactose- β -D-xilose, ligada ao *core* proteico através de um resíduo de L-serina, onde se inicia o alongamento da cadeia polissacarídica (LINDAHL *et al.*, 1994). A estrutura fina da cadeia de GAGs depende ultimamente da expressão e da ação regulada de múltiplas glicosiltransferases, sulfotransferases e epimerase (ESKO e LINDAHL, 2001).

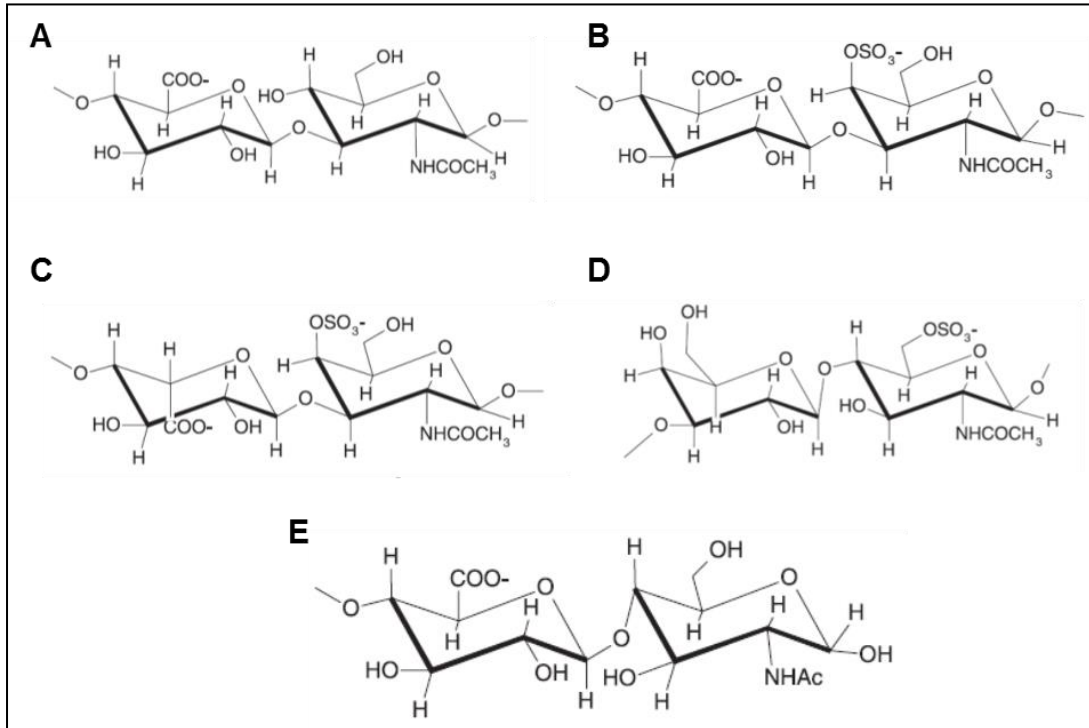


FIGURA 1 - DIFERENTES TIPOS DE GLICOSAMINOGLICANOS ENCONTRADOS NA NATUREZA: Dependendo da composição dos dissacarídeos que formam os GAGs, eles podem ser classificados em: A – ácido hialurônico, composto por ácido D-glucurônico e *N*-acetil-D-glucosamina, sendo o único que não apresenta grupamento sulfato na estrutura. B – Condroitim sulfato, composto por ácido D-glucurônico e *N*-acetil-D-galactosamina, podendo ser sulfatado no carbono 4 ou 6 da galactosamina, sendo denominado de condroitim 4 ou 6-sulfato, respectivamente. C – Dermatom sulfato, composto por ácido L-idurônico e *N*-acetil-D-galactosamina, sulfatada no carbono 4. D - Queratam sulfato, composto por D-Galactose e *N*-acetil-D-glucosamina, podendo ser sulfatada no carbono 6. E – Heparan Sulfato, composto por ácido D-glucurônico ou L-idurônico e *N*-acetil D-glucosamina, podendo apresentar grupos sulfatos, ligados ao carbono 6 ou na amina da glucosamina (N-Sulfato) ou no carbono 2 do ácido urônico (Figura adaptada de GANDHI e MACERA, 2008).

Com exceção de bactérias, fungos e protozoários, os glicosaminoglicanos sulfatados (GAGS) foram detectados em todos os animais estudados, tanto vertebrados quanto invertebrados, estando presentes em todos os tecidos desses organismos (MEDEIROS *et al.*, 2000; CHAVANTE *et al.*, 2000; SANTOS, *et al.*, 2003). Isto sugere que o aparecimento dos GAGS seja concomitante à emergência da organização tissular. A distribuição dos GAGS tanto em vertebrados, quanto em invertebrados mostrou ser tecido-específica, independente da espécie analisada (DIETRICH *et al.*, 1998), exceção feita à heparina (NADER e DIETRICH, 1989).

Proteoglicanos (PGs) são formados por um *core* proteico com uma ou mais cadeias de GAGs ligadas covalentemente. Os PGs podem ser encontrados na face externa das células, ligado à membrana plasmática (Figura 2A), no citosol (em grânulo citoplasmáticos) e até no núcleo das células. Além disto, estão presentes em

virtualmente todas as matrizes extracelulares (Figura 2B). Como os PGs são moléculas abundantes nas células, eles desempenham múltiplas funções, como: controle na atividade de enzimas, interação com receptores de superfície celular, em processos de cicatrização, bem como no controle nos gradientes de concentração de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, além de outras implicações. Algumas doenças, como câncer, diabetes, artrite podem apresentar alterações nos PGs (ESKO, KIMATA, LINDAHL, 2009; COUCHMAN e PATAKI, 2012).

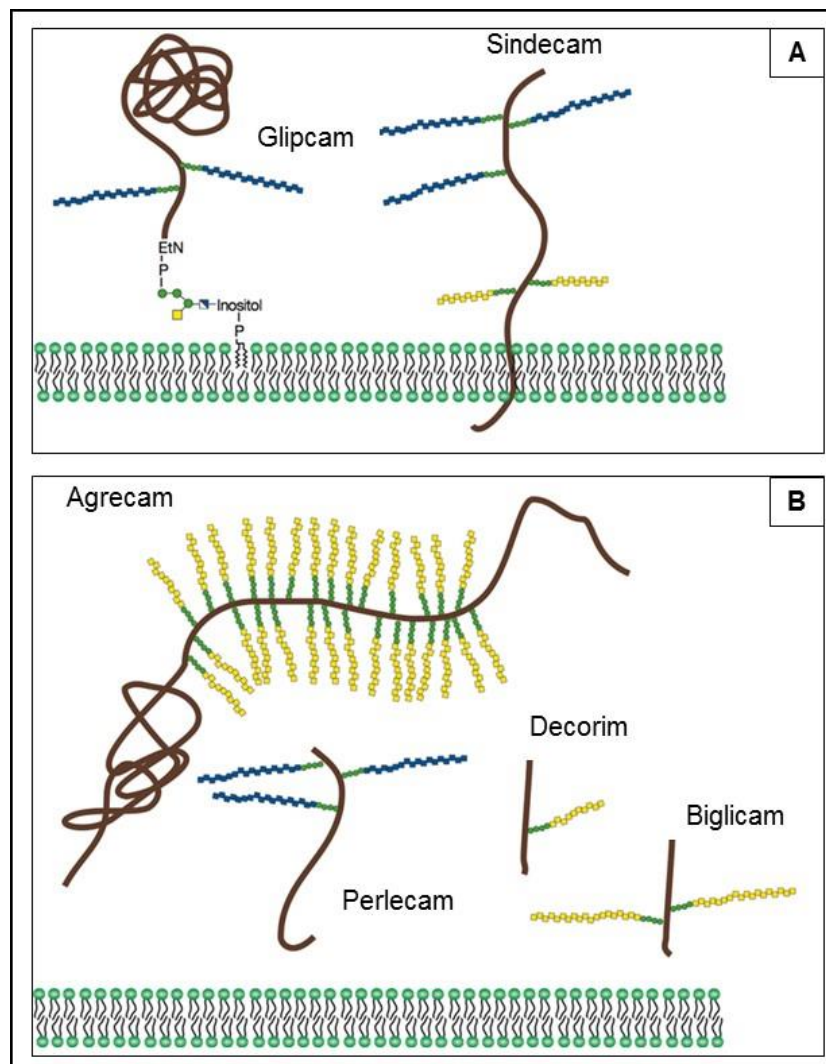


FIGURA 2 - DIVERSIDADE DE PROTEOGLICANOS: os PGs são formados por um *core* proteico (em marrom) ligados covalentemente a diferentes cadeias de GAGs. Em azul estão representadas as cadeias de Heparan Sulfato, em amarelo Condroitim e Dermatan sulfato. **A:** PGs ligados a membrana plasmática, sendo o transmembrânico (Sindecans) ou ancorado à membrana por GPI – Glicosilinositolfosfato (Glipicans); **B:** PGs que compõe a matriz extracelular (Figura adaptada de: ESKO, KIMATA e LINDAHL, 2009).

Como a estrutura da cadeia de GAG do proteoglicano é fundamental para a sua função biológica, ao longo dos anos buscou-se técnicas para caracterizá-las,

através de degradação com enzimas específicas obtidas da bactéria *Flavobacterium heparinum* (heparinase, heparitinases e condroitinases). Essas diferentes enzimas foram purificadas e a especificidade de ação estabelecida (SILVA e DIETRICH, 1975). Utilizando estas enzimas como ferramentas, foi possível estabelecer a estrutura de diversos GAGs (SILVA e DIETRICH, 1975; MICHELACCI e DIETRICH, 1974; 1976; DIETRICH, NADER e STRAUS, 1983; TERSARIOL *et al.*, 1994; DIETRICH *et al.*, 1998).

Dentre os diferentes GAGs, serão discutidos a seguir sobre a heparina e o heparan sulfato, por serem de maior interesse nesse estudo.

2.2 Heparina

2.2.1 Histórico

Em 1916, Jay McLean, estudante de medicina que trabalhava no laboratório de William Howell, isolou um composto do fígado de cão, solúvel em ácidos graxos que apresentava uma atividade anti-coagulante. Dois anos depois, Howell e seu outro aluno, Holt, isolaram outro composto solúvel em lipídeos, também do fígado de cão, que apresentava atividade anticoagulante, diferente do isolado por McLean, e chamou esse composto de heparina, porque foi isolado do fígado, que em latim é “hepar”. Em 1928, ele modificou o protocolo de purificação e isolou um composto, diferente dos outros anteriores, solúvel em água e descobriu que esse composto, na verdade, era um carboidrato composto por ácido glucurônico. Howell se declarou o descobridor da heparina e não deu nenhum crédito a McLean, o que causam grandes discussões na comunidade científica da época, razão pela qual até hoje é gerada discussão sobre a autoria da descoberta da heparina (WARDROP e KEELING, 2008).

Devido ao seu potente efeito anticoagulante ela é amplamente utilizada em medicina desde 1936 (FAREED *et al.*, 1989). Ainda tem sido usada na prevenção e profilaxia de trombose venosa profunda (RAK, 1999). O principal mecanismo anticoagulante da heparina consiste em acelerar em cerca de 2000 vezes, a velocidade normal com que a antitrombina (AT) neutraliza as atividades das serino-

proteases da cascata da coagulação sanguínea, dentre elas a trombina e a forma ativa do fator X (LANE, 1989; NADER *et al.*, 2004). Ainda, a heparina possui vários outros efeitos farmacológicos, como por exemplo: ação antilipêmica (ROBIN, 1956), antiviral (VAHERI, 1964), antibacteriana (CORRIGAN, 1977), promove a inibição de diversas enzimas, dentre elas, a miosina ATPase (CRUZ e DIETRICH, 1967), diminui a inflamação em doenças como artrite, colite e cistite (DAY, LANDIS AND TAYLOR, 2004). A heparina ainda pode modular inflamação no endotélio causada por lipopolissarídeo (LI, 2012).

2.2.2 Estrutura

A heparina é uma molécula linear e rígida, com um giro na cadeia de 180° a cada 2 dissacarídeos. Ela é formada pelo dissacarídeo *N*-acetil-D-glucosamina ligado por ligação α -(1→4) com 90% de ácido L-idurônico e 10% de ácido D-glucurônico (Figura 3). O grupo amina da glucosamina pode estar substituído por um grupo acetil ou sulfato. A glucosamina pode apresentar ainda grupos sulfatos ligados ao oxigênio na posição 6 e raramente na 3. O ácido L-idurônico também pode apresentar 2-O-sulfato (MUÑOZ-GARCÍA, 2012; GANDHI E MACERA, 2008).

Essa presença de vários grupos sulfatos ligados a heparina, conferem a ela a maior densidade de carga aniônica que qualquer outra macromolécula biológica conhecida (JAQUES, 1979). Apresenta em média 3,5 cargas negativas por unidade dissacarídica (NADER e DIETRICH, 1994).

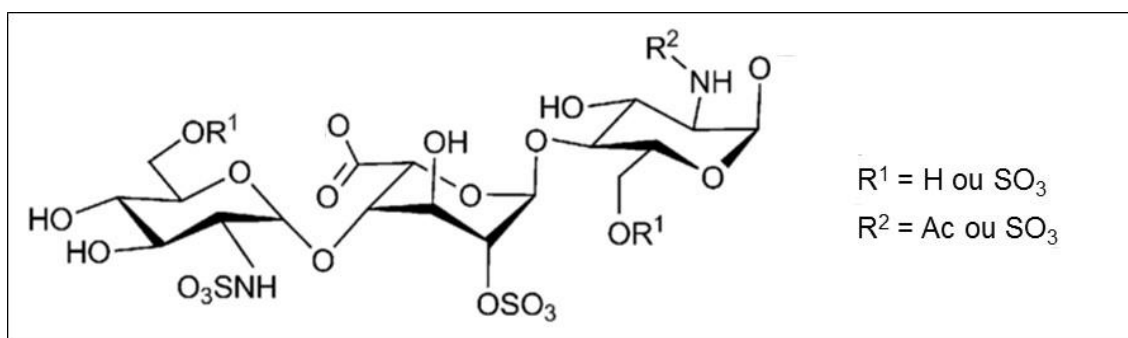


FIGURA 3 - UNIDADE BÁSICA DA HEPARINA: A hexosamina da heparina é a *N*-acetil-D-glucosamina, e o açúcar não nitrogenado é o ácido urônico. A figura acima ilustra a unidade o dissacarídeo básico e suas possíveis variações, onde mostra que a heparina é composta principalmente por acetil-glucosamina, *N*-sulfatada ou *N*-acetilada (Ac) e 6-dissulfatada, unida por ligação α -(1→4) ao ácido α -L-idurônico 2, O-sulfatado (MUÑOZ-GARCÍA *et al.*, 2012)

Os efeitos farmacológicos da heparina parecem não ter relação com sua real função biológica. Nader e Dietrich (1989) mostraram que a heparina é sintetizada exclusivamente como proteoglicano serglicim, o qual está confinado no interior de mastócitos, na forma de grânulos secretórios. Com base em diversos trabalhos, foi proposto que heparina poderia estar relacionada com mecanismos de defesa do organismo (NADER e DIETRICH, 1989; NADER *et al.*, 1999). A presença da heparina em organismos que não apresentam um sistema de coagulação intermediado pela AT e, por outro lado, alguns mamíferos, como o coelho, que não apresenta heparina, reforçam a ideia de que o papel fisiológico da heparina não está associado com o mecanismo de coagulação sanguínea (NADER e DIETRICH, 1989; NADER *et al.*, 1999; MEDEIROS *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2003; SAMPAIO *et al.*, 2006). Recentemente também foi demonstrado que a heparina pode-se ligar a receptores muscarínicos do tipo M3 causando relaxamento na aorta de ratos (PAREDES-GAMERO *et al.*, 2010).

2.3 Heparan Sulfato

O heparan sulfato foi isolado, em 1948, por Jorpes e Gardell como sendo uma heparina de baixa atividade anticoagulante (JORPES e GARDELL, 1948). Os heparan sulfatos exibem maior variedade estrutural, quando comparado com a heparina. Ele é formado pelo dissacarídeo composto por um ácido urônico (sendo o ácido D-glucurônico de 50-70% ou o ácido L-idurônico de 30-50%), que pode apresentar um grupo sulfato 2-O-ligado ligado ao ácido L-idurônico e uma N-acetilglucosamina, que pode ser N-sulfatada e/ou O-sulfatada. Vale salientar que com todas essas variáveis é possível obter 48 tipos diferentes de dissacarídeos, porém somente 23 deles são encontrados na natureza (ESKO e SELLECK, 2002).

Sua distribuição é tecido específica, ocorrendo em proporções constantes para cada tecido, independente da espécie analisada (DIETRICH, NADER e STRAUS, 1983; NADER *et al.*, 1984). O dissacarídeo trissulfatado característico da molécula de heparina está presente em proporções menores no heparan sulfato (DIETRICH, NADER e STRAUS, 1983; TERSARIOL *et al.*, 1994), sendo portanto menos sulfatado que a heparina.

Vários proteoglicanos compostos por heparam sulfato tem sido caracterizados como componentes da matriz extracelular (MEC), como o agrim, o perlecam (IOZZO, 1994; 1998) e o colágeno XVIII (IOZZO e SAN ANTONIO, 2001), bem como de superfície celular, como sindecans e os glipicans (BERNFIELD *et al.*, 1999; IOZZO e SAN ANTONIO, 2001). A Tabela 1 resume as diversas formas que em são encontrados os proteoglicanos de heparam sulfato.

TABELA 1 – DIFERENTES PROTEOGLICANOS FORMADOS POR CADEIAS DE HEPARAM SULFATO

Proteoglicano	Localização
Glipcans	Ancorados a membrana plasmática por GPI
Sindecans	Transmembrânico
Colágeno tipo XVIII	Matriz Extracelular
Perlecam	Matriz Extracelular
Agrim	Transmembrânico/ Matriz Extracelular

A Tabela acima ilustra os diferentes tipos de proteoglicanos de heparam sulfato. GPI, Glicosilinositolfosfato. (Tabela adaptada de COUCHMAN e PATAKI, 2012).

Os heparam sulfatos são componentes ubíquos de tecidos animais (DIETRICH *et al.*, 1998; BERNFIELD *et al.*, 1999). Sua localização na membrana plasmática e na MEC implica que essas moléculas estejam estrategicamente posicionadas para regular as interações entre as células e o seu meio ambiente, que são de importância fundamental para o crescimento e desenvolvimento normal e para a manutenção de funções celulares (LOPES, DIETRICH e NADER, 2006). Diversas evidências sugerem que o heparam sulfato tem um importante papel no reconhecimento celular, adesão celular, controle do crescimento, metabolismo de lipídios, angiogênese, etc (LOPES, DIETRICH e NADER, 2006; LOPES *et al.*, 2006).

Os proteoglicanos de heparam sulfato de superfície celular podem ser liberados por clivagem proteolítica no seu ectodomínio extracelular próximo à membrana plasmática, sendo este fenômeno conhecido como *shedding*. Esta liberação é um importante mecanismo de ativação e secreção, não só de proteoglicanos, mas de proteínas de superfície celular (cerca de 1%). Este mecanismo pode ser regulado em resposta a um sinal próprio, ou pode atuar como um regulador molecular. A liberação destas moléculas presentes na membrana plasmática torna-as efetores solúveis, que podem produzir agonistas ou

antagonistas para regular a atividade de seus ligantes, ou manter as células menos responsivas a estes (BERNFELD *et al.*, 1999).

2.4 Proteoglicano de Heparan Sulfato Endotelial

A presença de heparan sulfato na superfície de células endoteliais em cultura foi primeiramente observada por BUONASSISI (1973). Posteriormente, verificou-se que o heparan sulfato da célula endotelial apresentava um efeito inibitório na coagulação sanguínea (BUONASSISI E COLBURN, 1983; SHWORAK *et al.*, 2010).

De forma pioneira Nader *et al.*, (1987) caracterizaram o heparan sulfato endotelial, sintetizado por células da aorta de coelho. Foi observado que este heparan sulfato contém quantidades significativas do dissacarídeo trissulfatado, característico da molécula de heparina, mostrando que na realidade este composto é um copolímero de heparan sulfato e heparina (NADER *et al.*, 1987).

A sequência *N*-terminal desse proteoglicano foi determinada por Castillo *et al.*, (1987), os quais mostraram que corresponde ao Sindecam-4.

Estudos prévios do nosso laboratório mostram que células endoteliais com deficiência de 60% na produção de heparan sulfato ao serem expostas ao aranha-marrom (*L. intermedia*) morrem em 6 horas por *anoikis* (morte celular programada por desalojamento), enquanto as células endoteliais normais demoram 48 horas para apresentarem o mesmo processo. Mostrando que o heparan sulfato endotelial exerce uma função protetora contra as toxinas presentes no veneno loxoscélico (NOWATZKI, 2009).

2.5 Efeito da Heparina nas Células Endoteliais

Levando-se em consideração que o endotélio vascular é um dos possíveis alvos de ação da heparina, Nader *et al.* investigaram seu efeito sobre as células endoteliais da aorta de coelho mantidas em cultura. Observaram que a heparina estimula de forma específica a síntese do proteoglicano de heparan sulfato (PGHS), e também altera a estrutura das cadeias de heparan sulfato, promovendo um aumento na proporção do dissacarídeo trissulfatado deste composto (NADER *et al.*, 1989). Este efeito não foi observado para células musculares lisas de aorta de coelho, mostrando ser célula específico (NADER *et al.*, 1989; 1991). No entanto, a

propriedade de estimular a síntese de PGHS não é exclusiva da heparina, uma vez que estudos com vários outros compostos antitrombóticos mostraram que aqueles que apresentam atividade antitrombótica *in vivo* induzem um aumento na síntese de PGHS e uma mudança do padrão de sulfatação do HS produzido pela célula endotelial, de forma semelhante à observada para heparina (PINHAL *et al.*, 1994a, 2001a, NADER *et al.*, 2004).

Os aspectos comuns entre os compostos testados e a heparina são: alta densidade aniônica e suas potentes atividades antitrombóticas *in vivo* (PINHAL *et al.*, 1994a; NADER *et al.*, 2004). Essas observações reforçam a proposição de que a atividade antitrombótica da heparina e dos agentes antitrombóticos em geral, esteja relacionada com o aumento da síntese desse PGHS peculiar (PINHAL *et al.*, 2001b; NADER *et al.*, 2004).

2.6 Interação da Heparina com as Células

Diversos trabalhos sugerem que a heparina liga-se a uma grande variedade de tipos celulares como células endoteliais (BARZU *et al.*, 1985), epiteliais (WILSON *et al.*, 1990; RABOUDI *et al.*, 1992), musculares lisas (CASTELLOT *et al.*, 1985), da granulosa (WINER e AX, 1989), hepatócitos (BIENKOWSKI e CONRAD, 1984), melanoma (BISWAS, 1988) e do ovário do hamster chinês (RYSER, MARAD e SHEN, 1983), inclusive sugerindo que esta ligação possa ser mediada por possíveis "receptores" presentes na superfície celular.

Para caracterizar o sítio de interação nas células endoteliais responsáveis pelo aumento da síntese de PGHS, a heparina foi conjugada com biotina. Essa heparina biotinizada foi capaz de estimular a síntese do PGHS de forma semelhante à heparina não modificada (TRINDADE *et al.*, 2008a). A possibilidade da MEC ser responsável, pelo menos em parte, pela ligação, foi investigada. Assim a MEC, obtida após a remoção das células pela incubação com EDTA, apresentou uma maior intensidade de ligação e afinidade, exibindo um K_D aparente de 44 nM e uma ligação de $11,27 \times 10^6$ moléculas/célula. Essa maior capacidade de ligação e afinidade pode ser resultante da remoção das células, liberando os sítios de ligação na MEC, que estavam comprometidos pelas ligações com moléculas da superfície celular (TRINDADE *et al.*, 2008a).

A distribuição da heparina foi visualizada por microscopia confocal. Observou-se heparina ligada somente na MEC e não à superfície da célula (Figura 4). Quando as células foram incubadas concomitantemente com heparina biotinilada e com o anticorpo anti-sindecam 4 (o qual reconhece a porção extracelular deste proteoglicano transmembrânico), foi observado a marcação da superfície celular (pelo anti-Sindecam 4), mas a heparina ligou somente à MEC (Figura 4D).

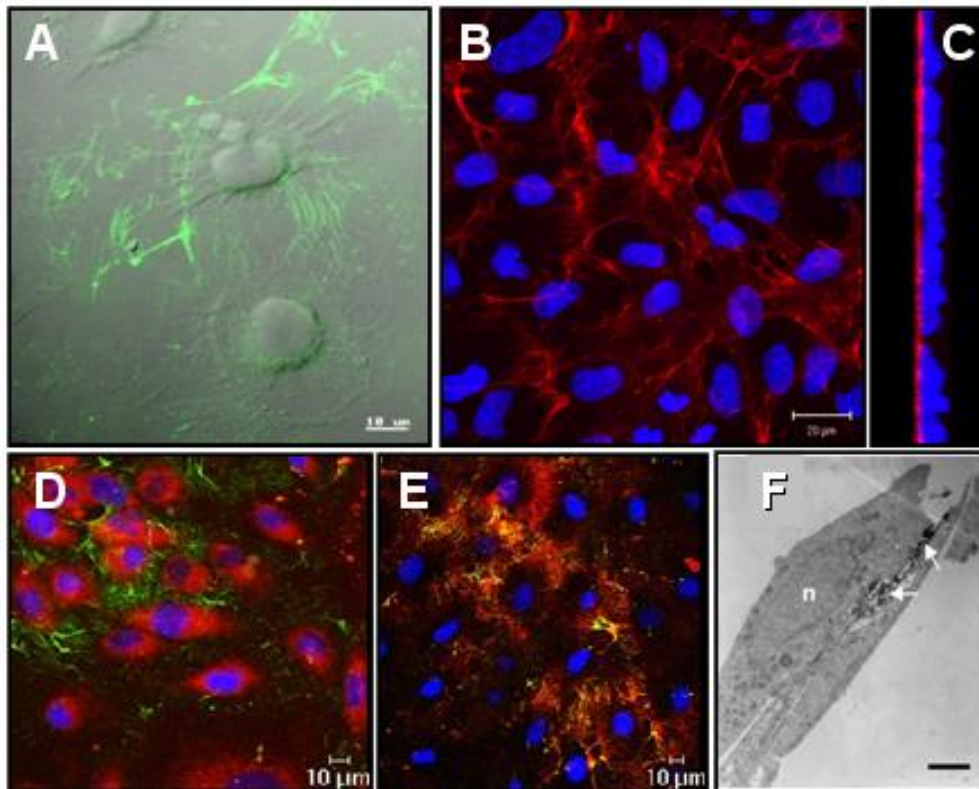


FIGURA 4 - HEPARINA LIGA-SE SOMENTE A COMPONENTES DA MEC As células endoteliais foram expostas a heparina biotinilada por 1 hora a 4 °C. A ligação da heparina foi revelada com estreptavidina conjugada com marcador fluorescente (A, D – FITC; B, C, E – Texas Red) e observado em microscopia confocal (LSM-510 - Carl Zeiss). **A** – Imagem combinada da heparina detectada em verde, com DIC (microscopia de contraste diferencial). **B**- Heparina revelada em vermelho. **C** – Imagem B deslocada a 90 °, mostrando que a região celular é negativa para a heparina. **D** – Imagem composta para a marcação da heparina biotinilada (verde) e para o Sindecam-4, utilizando anticorpo específico (vermelho). Note que não ocorre sobreposição da marcação. **E** – Colocalização da heparina na matriz extracelular, com a marcação da heparina em vermelho e da Fibronectina em verde. Note em amarelo alaranjado a sobreposição das marcações, mostrando uma colocalização. O núcleo foi corado em azul com DAPI. **F** – Após exposição para heparina biotiniladas, as células foram processadas para microscopia eletrônica. A ligação da heparina foi revelada pela incubação com estreptavidina peroxidase + DAB. Observe a ligação da heparina extracelularmente (setas). Barra 1,2 µm.

Além disso, Trindade *et al*, (2008b) demonstraram que, mesmo bloqueando a degradação lisossomal, com cloroquina, o efeito que a heparina causa sobre a síntese do proteoglicano de heparan sulfato é decorrente apenas da ligação na

matriz extracelular, mostrando que ela não precisa ser endocitada para causar o este fenômeno.

Recentemente, utilizando diversas metodologias combinadas, que envolveram citometria de fluxo, microscopia confocal, uso de inibidores de vias de sinalização celular, análise de imunoblotting e marcação com sulfato radioativo, Medeiros *et al.*, (2012) demonstraram que o estímulo da síntese de PGHS eliciada pela heparina, é dependente de integrina, a qual leva para a fosforilação de FAK (quinase de adesão focal), Src e paxilina. Em adição, heparina induz a fosforilação de ERK1/2 e que quando ocorre a inibição da Ras e MEK o estímulo da síntese de PHGS diminui. A Figura 5 mostra, de forma esquemática, como ocorre o processo.

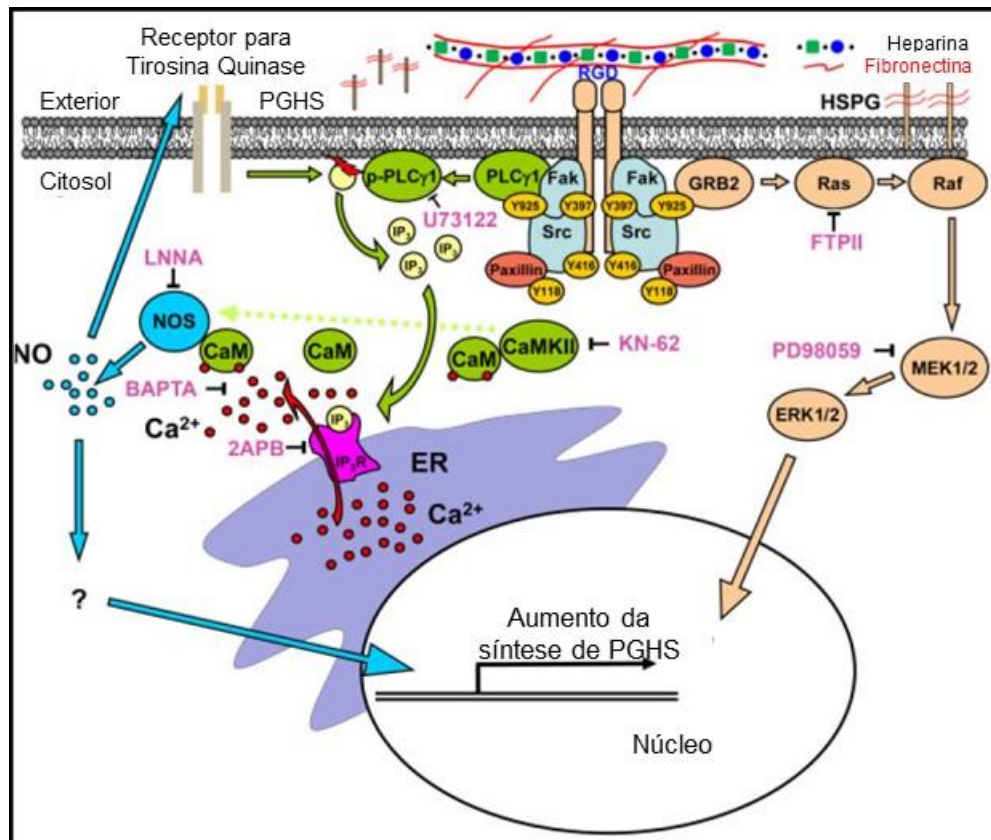


FIGURA 5 - MODELO ESQUEMÁTICO DA PROPOSTA DO MECANISMO ENVOLVIDO NO ESTÍMULO DA SÍNTESE DE PGHS NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS: Heparina liga em moléculas da matriz extracelular, como fibronectina que, por sua vez, interagem com integrinas, levando a fosforilação de proteínas de adesão focal, como FAK (Focal adhesion kinase), SRC e Paxilina. Subsequentemente, ativa proteínas como domínio SH₂, como Grb2 levando para a ativação da via Ras/Raf/MEK/ERKMAP, bem como de fosfolipase C gama (PLC γ 1), a qual estimula a produção de IP₃ pela clivagem de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato. IP₃ liga para seu receptor (IP₃R) liberando cálcio do retículo endoplasmático. O cálcio intracelular liga calmodulina (CaM) e juntos ativam CaMKII, o qual induz a ativação de NOS, promovendo a produção de NO. Finalmente, NO e ERK1/2 podem induzir a transcrição de fatores que regulam a produção de HSPG. ER, retículo endoplasmático; em rosa representa os inibidores de vias de sinalização utilizados, representa a fosforilação de resíduos de tirosina quinase; IP₃, receptor inositol 1,4,5-trisfosfato; RTK – receptor tirosina quinase; CaM - calmodulina; CaMKII – calmodulina quinase II; NO – óxido nítrico; eNOS – óxido nítrico sintase endotelial, PLC γ - fosfolipase C gama. Fonte: MEDEIROS *et al.*, 2012.

Embora seja conhecido que a matriz extracelular é o local de ligação da heparina, ainda não se sabe quais são os requisitos estruturais da molécula de heparina, que são necessários para a ligação e, conseqüentemente, desencadear o mecanismo de estímulo da síntese de PGHS.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os requisitos estruturais de molécula de heparina responsáveis pela síntese do proteoglicano de heparan sulfato em células endoteliais.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter heparinas quimicamente modificadas, como modificações específicas;
- Confirmar as modificações químicas por análises químicas, físico-químicas e estruturais;
- Avaliar se esses compostos modificados alteram o estímulo da síntese do proteoglicano de heparan sulfato, produzido pelas células endoteliais;
- Avaliar possíveis alterações na conformação das heparinas quimicamente modificadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Heparina

Foi utilizada a Heparina não fracionada, obtida de mucosa suína (Biolberia, Barcelona, Espanha), cedida pela Profa. Dra. Helena Bonciani Nader.

4.2 Modificações químicas

Foram realizadas no laboratório da Profa. Helena Nader, na UNIFESP. Consistiu de modificações químicas pontuais na molécula, conforme descrito por YATES *et al.* (1996), como descrito a seguir:

4.2.1 Preparo do sal de piridíneo

Heparina não modificada foi diluída em água e posteriormente foi adicionado a resina catiônica na forma H⁺ (DOWEX), sob agitação magnética a temperatura ambiente, por 30 minutos. O pH do sobrenadante ficou entre 1,0 e 2,0. A heparina com os grupamentos ácidos e sulfatos protonados foi separada da resina por filtração, o material foi, então, neutralizado com piridina até pH 7,0 e liofilizado, obtendo-se a heparina na forma de sal de piridíneo.

4.2.2 Dessulfatação total (N e O-dessulfatação)

Heparina na forma de sal de piridíneo foi aquecida em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) com 10% de metanol à 105°C por 24 horas. A seguir, o pH da solução foi ajustado para 9,0 com adição de hidróxido de sódio (NaOH).

4.2.2.1 N-acetilação

Heparina que foi submetida à dessulfatação total (100 mg), foi dissolvida em 1 mL de solução de bicarbonato de sódio saturada, sendo sequencialmente submetida à etapa de N-Acetilação, pela adição de 1mL de anidrido acético à 0 °C. A solução

ficou sob agitação à 0 °C por 2 horas, sempre mantendo o pH 9,0 ou maior pela adição da solução de bicarbonato de sódio saturada.

4.2.3 Remoção de sulfato 2-O ligado em idurônico

Heparina foi dissolvida em NaOH 0,1M, sendo sequencialmente congelada e liofilizada. Posteriormente, o pó obtido foi ressuspenso em água destilada e o pH ajustado para 7,0.

4.2.4 N-dessulfatação

Heparina na forma de sal de piridíneo foi aquecida em solução de DMSO com 10% de metanol à 55 °C por 2 horas.

4.2.5 Remoção de sulfato 6-O ligado no glucosamina

Heparina na forma de sal de piridíneo foi aquecida em uma solução de DMSO com 10% de metanol à 60 °C por 6 horas para remoção dos sulfatos ligados ao Carbono 6 e Carbono 2 (anima – sulfato *N*-ligado) da hexosamina. Após a reação, o produto da reação foi precipitado com Metanol. O pellet foi então ressuspenso em água, e a solução foi dialisada contra água e liofilizada. A seguir, 200 mg da amostra foram ressuspendidas em 15 mL de água destilada e o pH ajustado para 9,0 com solução de bicarbonato de sódio saturada. A ressulfatação na posição *N*- foi realizada pela incubação com 200 mg de trimetilamina trióxido de enxofre, sempre mantendo em pH 9,0, e a temperado em 55 °C por 6 horas, sendo que após 3 horas de incubação, mais 200 mg trimetilamina trióxido de enxofre foi adicionadas, sempre mantendo o pH 9,0.

4.2.6 Recuperação das heparinas dessulfatadas e N-acetiladas

Após a reação química, as amostras foram precipitadas com Etanol saturado com acetato de sódio por 24 horas à 4 °C e dialisada em membranas com poros de 6 a 8 kDa.

4.2.6 Carboxirredução

Foi realizada conforme descrito por TAYLOR e CONRAD (1966). Brevemente, heparina não fracionada (100mg) foi dissolvida em 15 mL de água com 300 mg de carbodiimida. O pH da solução foi mantido em torno de 4,80 pela adição de ácido clorídrico (HCl) 0,1 N. Após 15 min, boroidreto de sódio foi adicionado lentamente sob agitação e o pH da mistura mantido ao redor de 7,0 pela adição de HCl 4,0 N. A mistura foi incubada por 2h, a 50 °C sob agitação. Em seguida, o material foi resfriado em banho de gelo e a reação interrompida por adição lenta de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 3,0 N até pH 5,0. O material foi dialisado contra cloreto de sódio (NaCl) 0,2 M, depois contra água destilada e liofilizado.

4.4 Eletroforese em gel de agarose

Para identificar que os processos de dessulfatação ocorreram foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão PDA (1,3 – Diaminopropano) em tampão PDA (1,3-diaminopropano) 0,05 M, pH 9,0 (DIETRICH; DIETRICH, 1976). As amostras foram diluídas em água (1 mg/mL) e foi aplicado 5 µL de cada amostra no gel e foi realizada a corrida por 2 horas com corrente elétrica constante de 80 mA à 5 °C. Após a corrida, as amostras foram precipitados com cetavlon 0,1% por 2 horas, os géis foram secos sob ventilação e calor, sendo posteriormente corados com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% e etanol 50%.

4.5 Dosagem de sulfato

O teor de grupamentos sulfato, presentes nos polissacarídeos, foram determinados pelo método da mistura gelatina-bário, como descrito por DOGSON e PRICE (1962). A análise inicia-se com a hidrólise total da molécula (1 M de HCl, por

5 horas, a 105 °C), havendo liberação dos grupamentos sulfato em solução. Em contato com o íon bário, adicionado como cloreto de bário (BaCl_2), forma-se um composto insolúvel, o sulfato de bário (BaSO_4), que se mantém em suspensão devido a presença da gelatina. O método é turbidimétrico, sendo a leitura da absorbância realizada em a 360 nm, apresentando limite de quantificação, mínimo de 20 e, no máximo de 200 μg de sulfato. O padrão de sulfato foi obtido, utilizando uma curva de concentração de solução de sulfato de sódio, de 30 a 200 $\mu\text{g/mL}$.

4.6 Dosagem de ácido urônico

Ácido urônico foi determinado pela reação de carbazol, conforme metodologia descrita por Dishe (1947). Assim, 1 mg de heparina quimicamente modificada ou não, foram diluídas em 1 mL de água. 0,5 mL dessa solução foi transferido para tubos de ensaio e a essa solução foi adicionado, lentamente, 3,0 mL de H_2SO_4 concentrado, em banho de gelo, para evitar o aquecimento. A seguir, os tubos foram tampados e, então, aquecidos a 100 °C, por 15min, sendo logo em seguida colocados em banho de gelo. Após resfriamento, foram adicionados 100 μL de reagente carbazol (0,1% (m/v) em etanol absoluto). Após uma hora, foi realizada a leitura da absorbância a 525nm. A curva padrão foi obtida utilizando-se diferentes concentrações de ácido α -D-glucurônico (0 a 1000 $\mu\text{g/mL}$), realizada nas mesmas condições.

4.7 Ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN- ^1H e RMN- ^{13}C)

Os espectros de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance-DRX-400 MHz. As amostras foram analisadas em sondas para *probes* de 5 mm de diâmetro, a 37 °C, utilizando água deuterada (D_2O) como solvente. Os espectros de RNM- ^{13}C foram calibrados utilizando o grupo acetil localizado em ~24.5 ppm.

4.8 Células endoteliais de aorta de coelho

As células endoteliais utilizadas neste estudo foram estabelecidas a partir da aorta de coelho (BUONASSISI, 1973) (Figura 6) e cedidas pela Prof. Helena Nader. Foram cultivadas em meio Ham-F12 enriquecido com 10% de soro feral bovino (SFB) e penicilina/estreptomicina, respectivamente 10.000 U e 10 mg para cada litro de meio. Para o sub-cultivo foi utilizada a enzima viocase (pancreatina) para a desadesão das células. Estas células foram mantidas em incubadora a 37 °C, sob atmosfera úmida e tensão de 2,5% de CO₂.

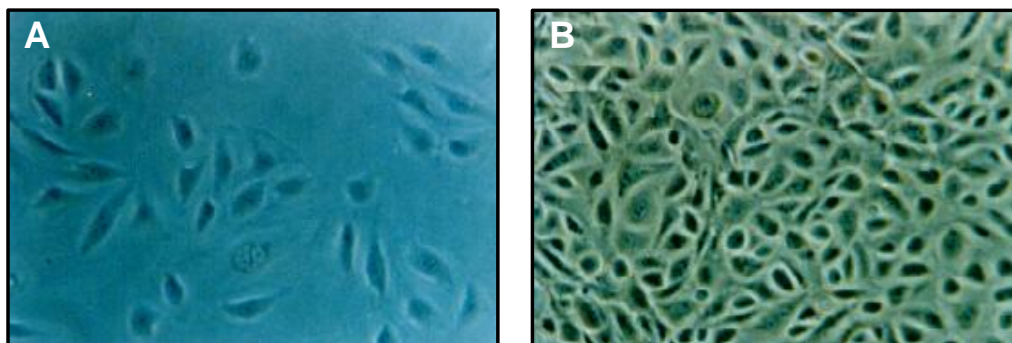


FIGURA 6 – CÉLULAS ENDOTELIAIS DA AORTA DE COELHO: A Figura acima mostra a microfotografia obtida da linhagem celular utilizada no presente estudo, analisada em microscopia de contraste de fase. Esta linhagem celular foi estabelecida a partir da aorta torácica do coelho. Apresenta uma forma oval ou poligonal, com citoplasma escuro ao redor do núcleo central. A – Células com um dia em cultura e B – Células confluentes (15 dias em cultura).

4.9 Efeito das heparinas quimicamente modificadas sobre as células endoteliais

4.9.1 Estímulo da Síntese de Heparan Sulfato pelas células tratadas ou não com heparina quimicamente modificadas ou não

As células foram cultivadas em poços de multiwell (de 24 poços) até atingirem a confluência (4 dias). A seguir, foram lavadas 3 vezes com meio Ham-F12 na ausência de SFB. A síntese dos Glicosaminoglicanos e Proteoglicano foi analisada expondo-se as células à heparina (100 µg/mL) quimicamente modificadas ou não, na presença de 150 µCi/mL de [³⁵S]-sulfato de sódio, sendo os mesmos mantidos por 18 horas em cultura.

Após proteólise (incubação com maxatase 3 mg/ml em tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,0 a 60 °C *overnight*), alíquotas do meio de cultura e das células foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 4.4. Após a eletroforese, as amostras foram analisadas e quantificadas pela exposição do gel

a um filme radiosensível que excita íons de fósforo. A seguir, o filme sensibilizado foi submetido à varredura a laser no aparelho Cyclone, um *fosfoimage*, que faz a leitura do fósforo excitado e quantifica como unidade de luminescência, que varia de acordo com o grau de excitação, gerando imagens das bandas contendo material radioativo incorporado nos GAGs. Com base nas imagens obtidas, as bandas dos géis foram recortadas e transferidas para tubos contendo o líquido de cintilação UltimaGold, os quais foram quantificados no contador de Cintilação. Os valores foram normatizados pela quantidade de proteínas de cada amostra.

As proteínas celulares foram quantificadas utilizando kit para dosagem de proteínas da Pierce (Thermo), conforme recomendação do fabricante.

4.10 Dicroísmo Circular

As heparinas quimicamente modificadas ou não, foram submetidas à leitura do espectro de dicroísmo circular, utilizando um espectropolarímetro JASCO J-850. As medidas foram realizadas na região de ultravioleta distante (190-260 nm) em cubeta de 1 cm de caminho óptico e uma velocidade de varredura de 10 nm/min. Os ensaios foram realizados em água, a 25 °C. As linhas de bases foram determinadas pela correção do espectro da água.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Eletroforese em gel de agarose

Para confirmar se o processo de dessulfatação ocorreu, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, sendo identificadas pela coloração com azul de toluidina. Vale destacar que essa coloração, que é azul, cora os grupamentos sulfatos em roxo, devido à metacromasia. Esse fenômeno químico foi descrito por Lison (1936), que ocorre quando o corante azul de toluidina, ou azul de metileno, interage com uma grande quantidade de ésteres de sulfato. Assim, como os GAGs são sulfatados estes grupamentos químicos são os responsáveis por esta coloração roxa ou púrpura.

Após a coloração com azul de toluidina, na Figura 7 observa-se que as bandas correspondentes às amostras *N*-dessulfatada, 6-*O*-dessulfatada, 2-*O*-dessulfatada e *N*- e 2-*O*-dessulfatada apresentam uma coloração menos intensa, quando comparadas com a heparina não modificada, mostrando que houve dessulfatação. Observa-se também que há uma leve alteração no padrão de migração de cada amostra modificada, quando compara à heparina não modificada. Isto porque, neste tipo de sistema, a migração eletroforética ocorre pela interação com as aminas do tampão. Assim, quanto maior a interação, menor a migração. Como ocorreu alteração na distribuição de cargas negativas (DIETRICH, DIETRICH, 1976), conseqüentemente houve modificação da interação com a diamina, o que resultou em alteração do padrão eletroforético (Figura 7).

Já as heparina totalmente dessulfatada e a totalmente dessulfatada e *N*-acetilada, não apresentam coloração, mostrando que esse processo também foi efetivo. Por outro lado, a heparina que foi carboxirreduzida apresenta uma coloração similar à aquela observada para a heparina não modificada.

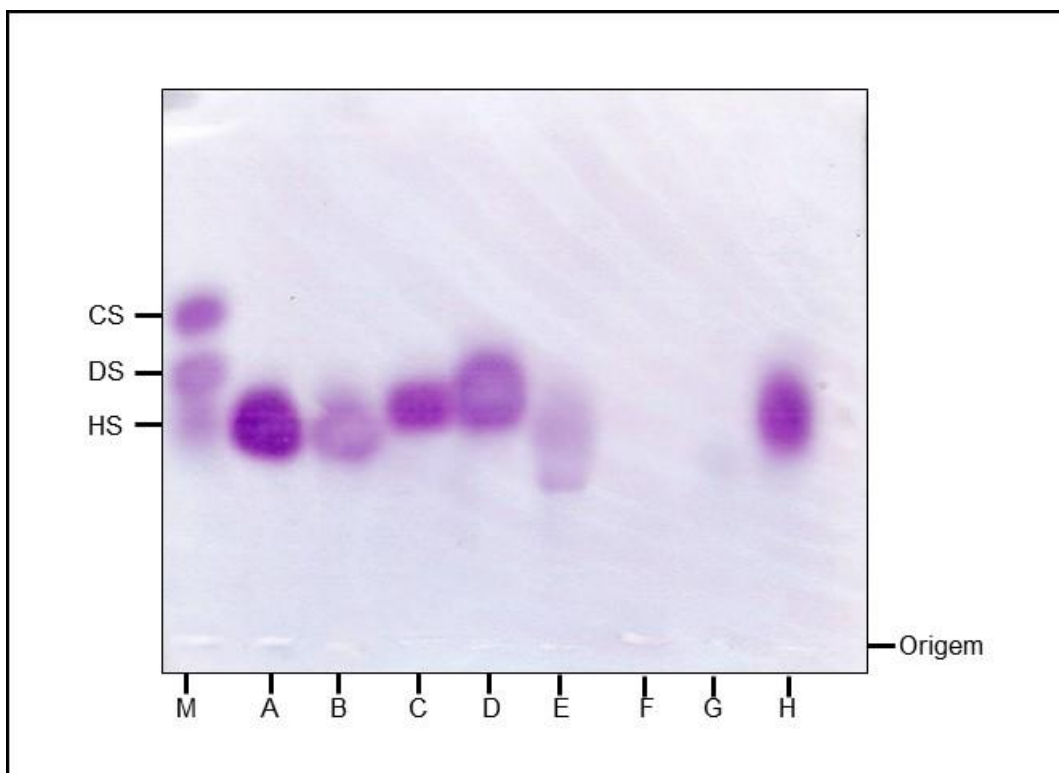


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose: As amostras foram diluídas em água (1mg/mL) e foi aplicado 5 µl de cada, em gel de agarose 0,5% preparado em tampão PDA (1,3 – Diaminopropano acetato) e submetidos a uma corrente elétrica constante de 80 mA. Após a corrida eletroforética as amostras foram precipitadas com cetavlon 0,1%, o gel foi seco e corado com azul de toluidina 0,1%. **M:** Mistura padrão de GAGs contendo 5 µg de CS (condroitim sulfato), DS (dermatam sulfato) e HS (heparam sulfato); **A:** Heparina não modificada; **B:** Heparina *N*-dessulfatada; **C:** Heparina 6*O*-dessulfatada; **D:** Heparina 2*O*-dessulfatada; **E:** Heparina *N*- e 2*O*-dessulfatada; **F:** Heparina totalmente dessulfatada; **G:** Heparina totalmente dessulfatada e *N*-acetilada; **H:** Heparina carboxirreduzida.

5.2 Dosagem de sulfato

Após a separação eletroforética ficou claro que houve dessulfatação. No entanto, as amostras foram submetidas à dosagem de sulfato para avaliar o percentual de dessulfatação em cada uma das heparinas modificadas (Tabela 2) e entender a quantidade absoluta de sulfato em cada amostra. As heparinas dessulfatadas somente na posição *N* ou 2-*O* tiveram 57% e 50%, respectivamente, do teor de sulfato removido. A heparina *N*- e 2-*O*-dessulfatada teve 93% de redução. Por fim, a heparina totalmente dessulfatada, bem como a totalmente dessulfatada *N*-acetilada, tiveram 100% de remoção dos grupamentos sulfato. A heparina 6-*O*-dessulfatada mostrou apenas uma remoção de 17% dos grupamentos sulfato, o que sugere que não teve uma modificação química efetiva.

TABELA 2 – DOSAGEM DO TEOR DE SULFATO

AMOSTRA	μg de sulfato/mg de heparina	Teor de sulfato (%)
Heparina	76,63	100
Heparina <i>N</i> -dessulfatada	32,98	43
Heparina 6- <i>O</i> -dessulfatada	64,21	83
Heparina 2- <i>O</i> -dessulfatada	38,89	50
Heparina <i>N</i> - e 2- <i>O</i> - dessulfatada	0,54	7
Heparina Totalmente dessulfatada	0	0
Heparina Totalmente dessulfatada e <i>N</i> - acetilada	0	0

A Tabela acima ilustra a dosagem de sulfato presente em cada mg de heparina. Ainda, ilustra a porcentagem em comparação ao controle (heparina não modificada).

5.3 Dosagem de ácido urônico

Para avaliar se o procedimento de carboxirredução foi efetivo, considerando que neste procedimento ocorre a diminuição da quantidade de ácido urônico da heparina, foi realizada a dosagem desse monossacarídeo. Os resultados estão expressos na Tabela 3, onde pode-se observar que o teor do ácido urônico foi reduzido em 83%, confirmando que o processo de carboxirredução foi efetivo.

TABELA 3 - DOSAGEM DE ÁCIDO URÔNICO

AMOSTRA	μg de ácido urônico/mg de heparina	Teor ácido urônico (%)
Heparina	733,5	100
Carboxirreduzida	123,6	17

A Tabela acima ilustra a dosagem de ácido urônico presente em cada mg de heparina. Ainda, ilustra a porcentagem em comparação do controle (heparina não modificada).

5.4.4 Análise das modificações estruturais por RMN

Inicialmente as heparinas foram submetidas à análise da composição química por RMN, avaliando o perfil do Hidrogênio (^1H). Como pode ser observado na Figura

8, utilizando essa avaliação não foi possível identificar exatamente onde, e se ocorreram, as modificações químicas realizadas. Por exemplo, quando comparado o espectro obtido para a heparina não modificada, com aquele da heparina totalmente dessulfatada, verifica-se que, apesar de serem diferentes, não é possível identificar regiões características da molécula de heparina, para comprovar se as modificações químicas foram pontuais.

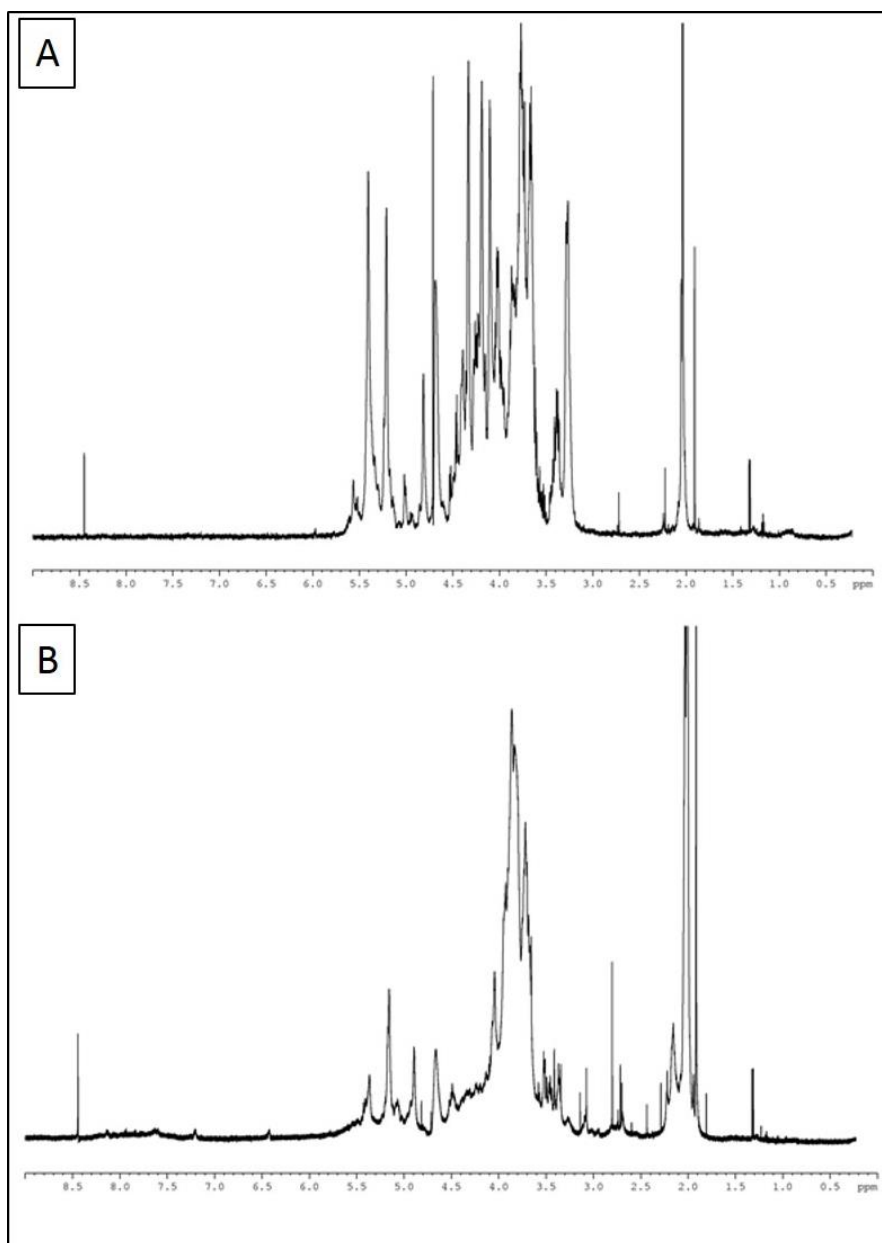


FIGURA 8 – ANÁLISE DAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS POR RMN-¹H – As amostras de heparina não modificada (A) ou totalmente dessulfatada (B) foram diluídas em água deuterada e analisada conforme descrito em Métodos.

Assim, o próximo passo foi submeter às heparinas modificadas à análise de RMN-¹³C, na expectativa de verificar se as moléculas foram realmente modificadas na posição proposta. A Figura 9A, a qual ilustra o espectro coletado para a Heparina não modificada. Nesta, é possível identificar *N*- sulfato, isto é, o grupo sulfato ligado ao nitrogênio da hexosamina em ~100 ppm, bem como em 60 ppm, e foram sinalizado como ANS e o 6-*O* sulfato foi assinalado por A6S (~70 ppm). O grupamento sulfato da posição 2-*O* do ácido urônico corresponde ao sinal I2S (~105 ppm). Também, foi possível observar o sinal corresponde ao grupo acetil ligado à amina da hexosamina, assinalado por CH₃CO (~32 ppm). Após a *N*-dessulfatação, o sinal correspondente foi removido (~100 ppm) ou alterado (~60 ppm), como pode-se observar na Figura 9B. A Figura 10B ilustra o espectro obtido para a heparina que foi submetida a 6-*O*-dessulfatação. No entanto, não foi observada diferença que comprove que essa modificação não foi efetiva. Após a 2-*O*-dessulfatação o sinal correspondente desaparece quando esse grupo sulfato é removido e o sinal I+G (~107 ppm) aumenta (Figura 11B). A Figura 12B mostra que na heparina *N*- e 2-*O*-dessulfatada os sinais correspondentes a esses grupos sumiram e o sinal I+G aumentou. A heparina totalmente dessulfatada apresentou todos os sinal correspondentes aos grupos sulfatos alterados (Figura 13B) e na heparina totalmente dessulfatada e *N*-acetilada o sinal correspondente ao acetil (Figura 14B) teve um aumento comprovando que, além de totalmente dessulfatadas, a inserção do grupamento acetil realmente ocorreu. Os espectros foram assinaladas conforme descrito por YATES *et al*, (1996).

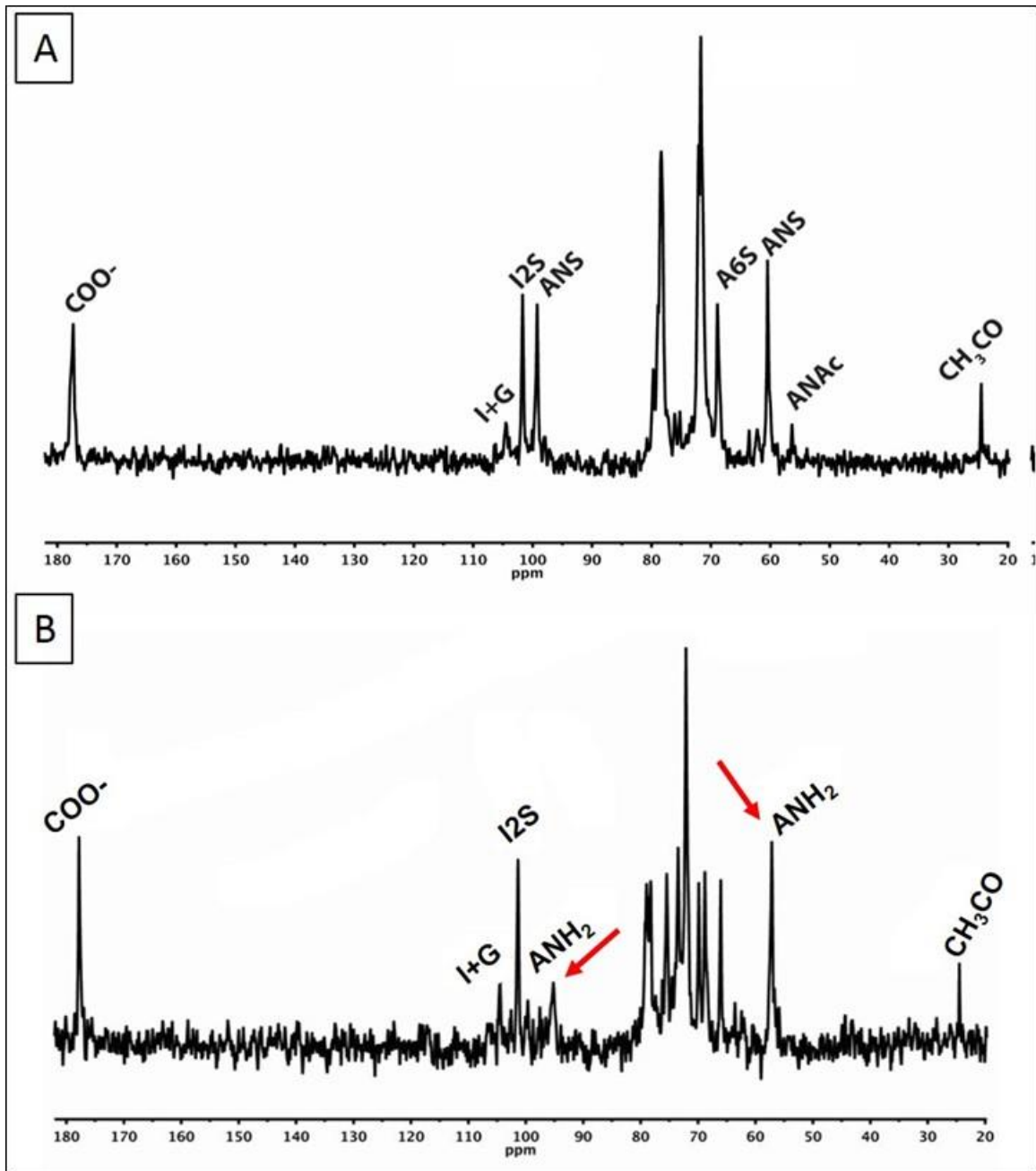


FIGURA 9 – ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS: As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas conforme descrito em Métodos. COO^- - grupo carboxílico do ácido urônico; I+G – soma dos ácidos urônicos; ANS – sulfato ligado ao nitrogênio da glucosamina; ANH₂: amina livre da glucosamina; CH_3CO – grupo acetil ligado ao nitrogênio da glucosamina. **A:** heparina não modificada; **B:** heparina *N*-dessulfatada

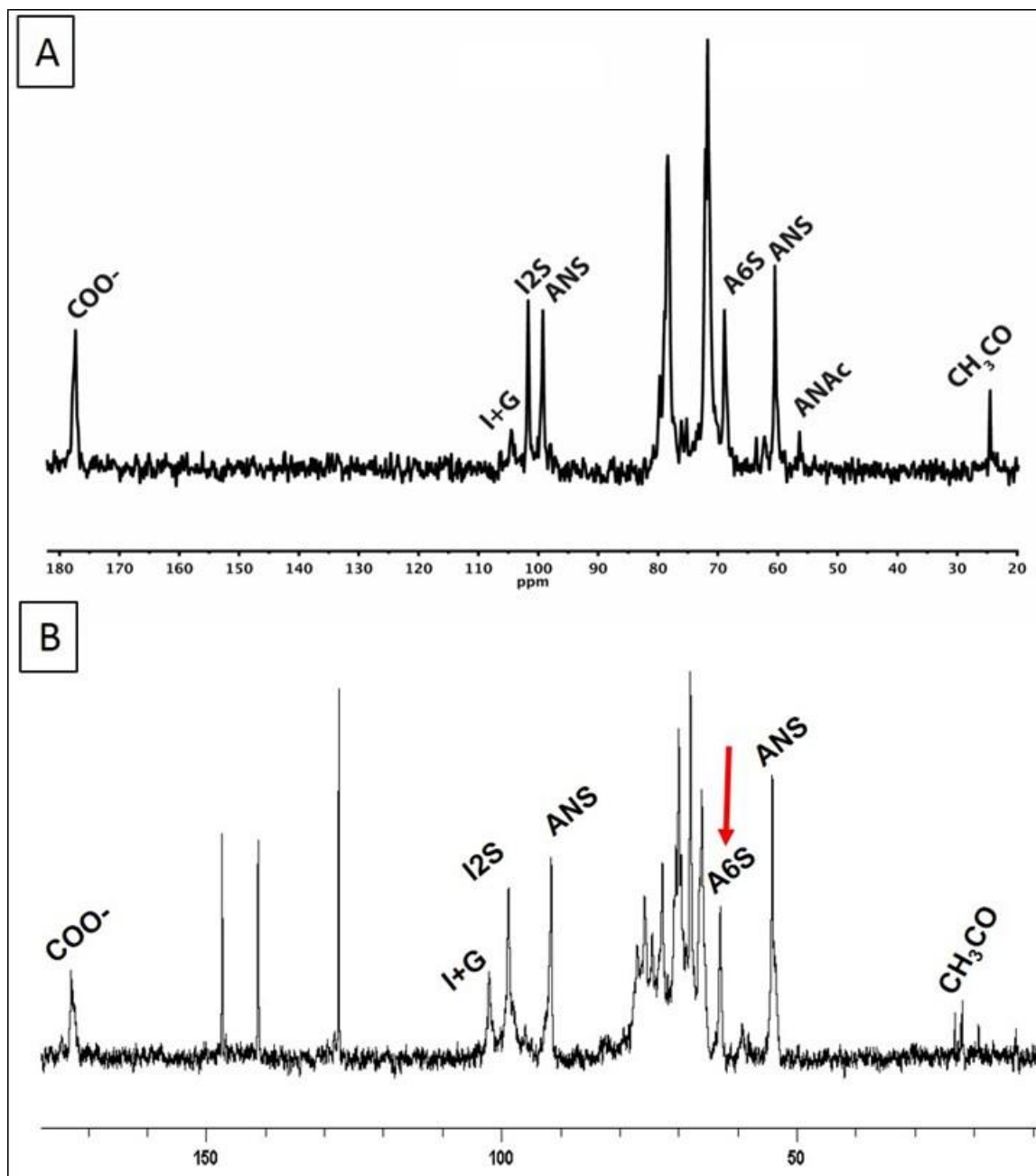


FIGURA 10 – ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS: As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas conforme descrito em Métodos. COO^- - grupo carboxílico do ácido urônico; I+G – soma dos ácidos urônicos; ANS – sulfato ligado ao nitrogênio da glucosamina; A6S – sulfato ligado ao oxigênio do carbono 6 da glucosamina; CH_3CO – grupo acetil ligado ao nitrogênio da glucosamina. **A:** heparina não modificada; **B:** heparina 6-O-dessulfatada.

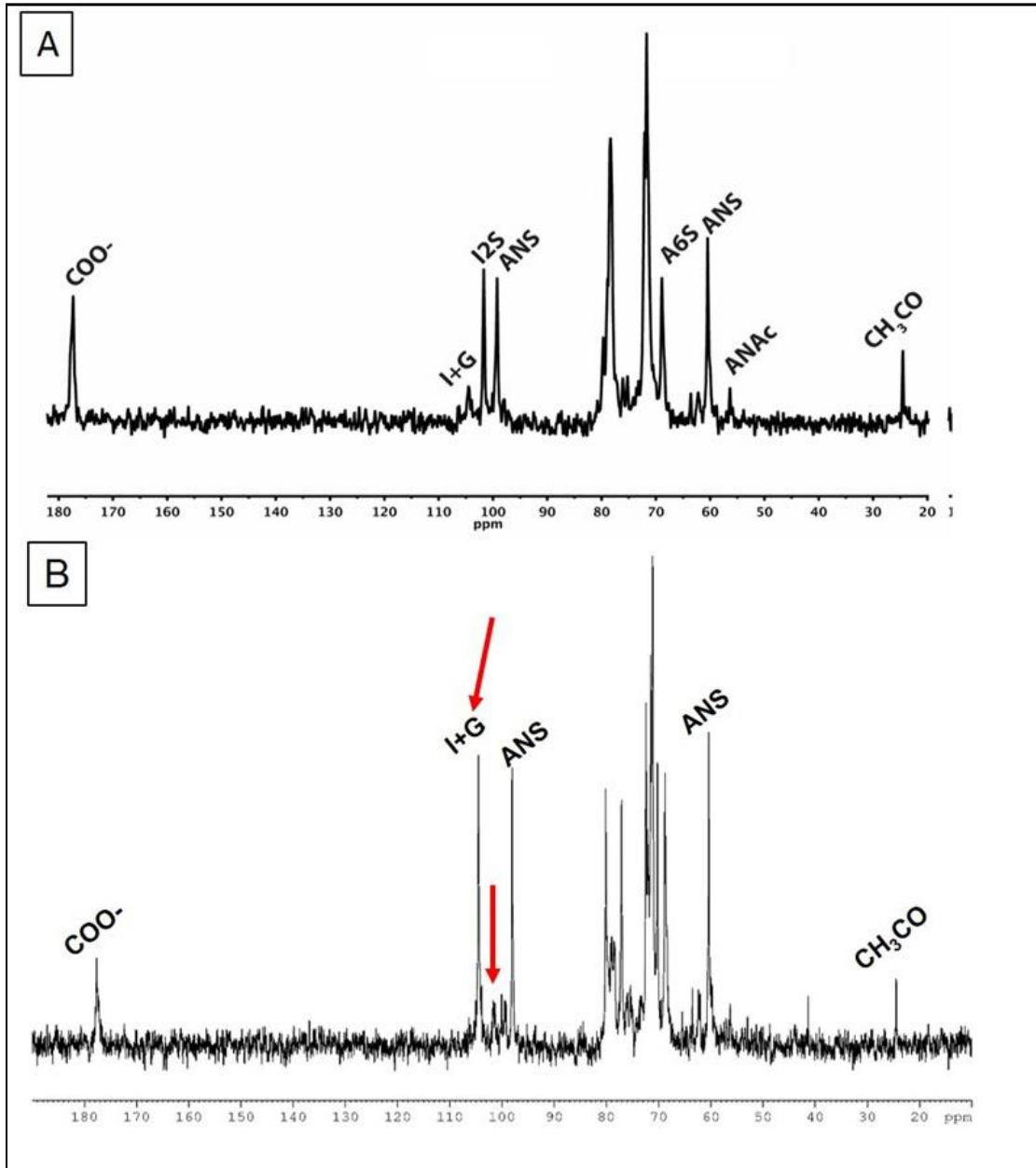


FIGURA 11 – ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS: As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas conforme descrito em Métodos. COO^- - grupo carboxílico do ácido urônico; I+G – soma dos ácidos urônicos; ANS – sulfato ligado ao nitrogênio da glucosamina; CH_3CO – grupo acetil ligado ao nitrogênio da glucosamina. **A:** heparina não modificada; **B:** heparina 2-O-dessulfatada.

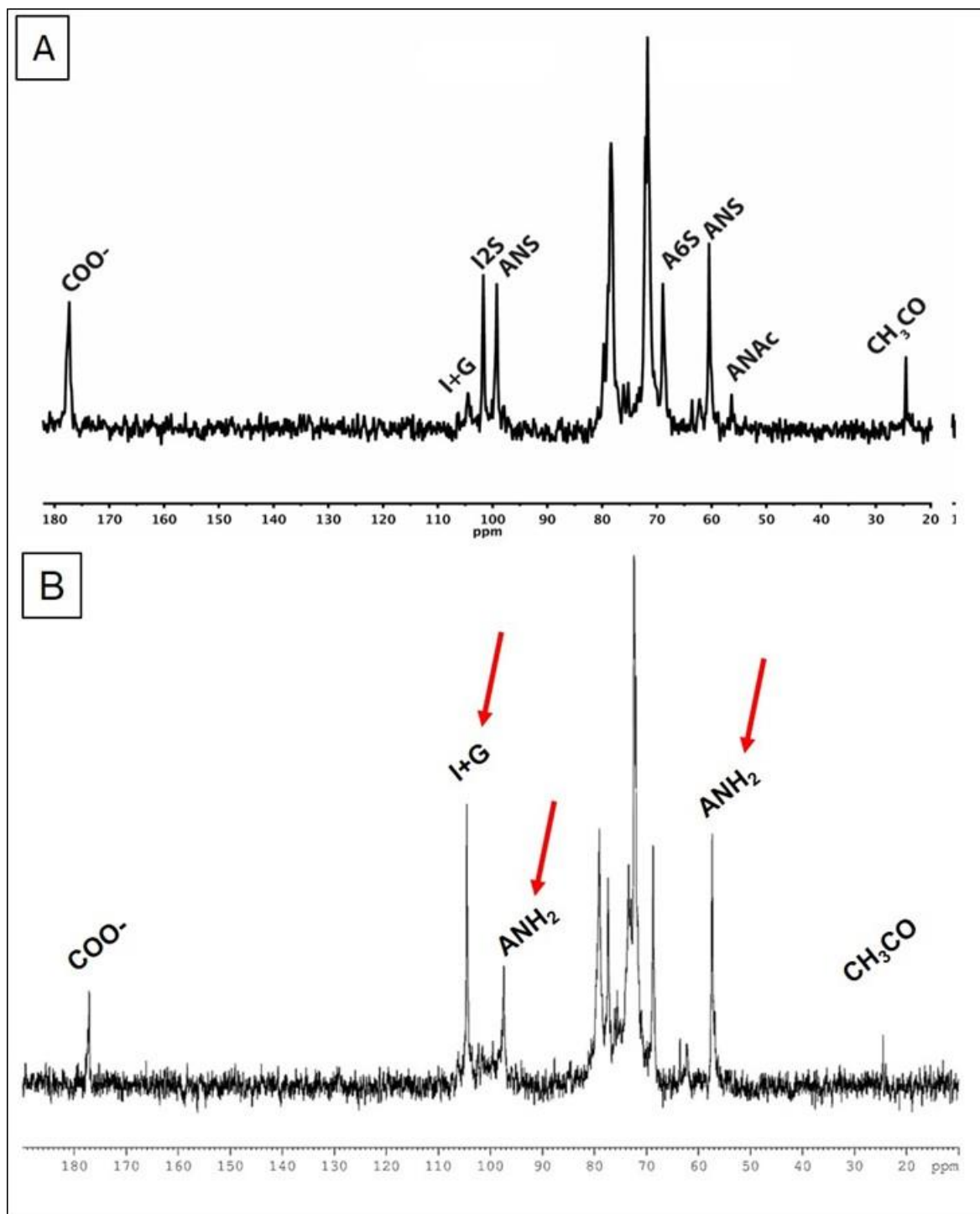


FIGURA 12 – ESPECTROS DE RMN-¹³C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS: As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas conforme descrito em Métodos. COO⁻ - grupo carboxílico do ácido urônico; I+G – soma dos ácidos urônicos; ANH₂ – amina livre ligada ao nitrogênio da glucosamina; ANH₂: amina livre da glucosamina e CH₃CO – grupo acetil ligado ao nitrogênio da glucosamina. **A:** heparina não modificada; **B:** heparina *N*- e 2-*O*-dessulfada.

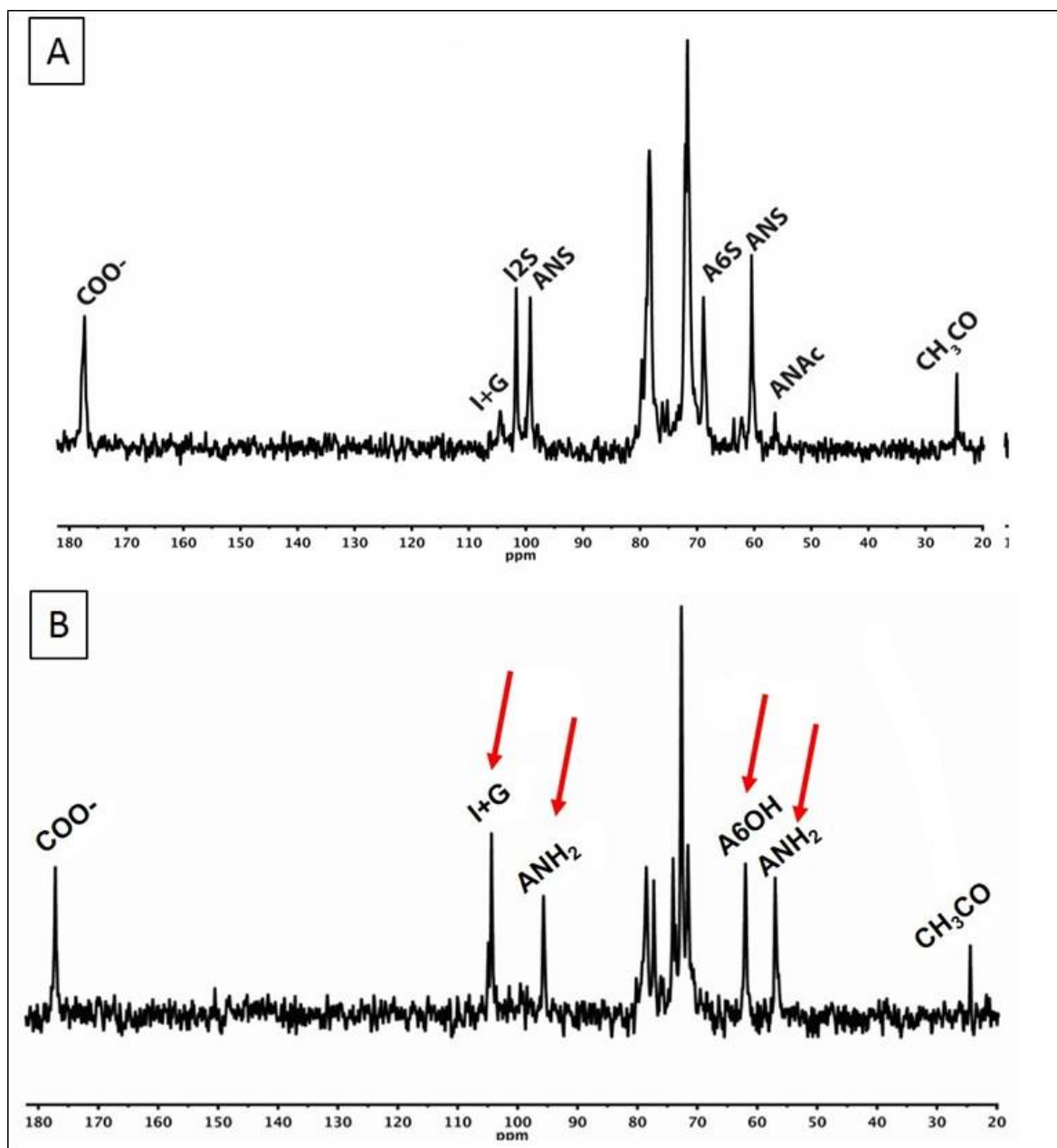


FIGURA 13 – ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS: As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas conforme descrito em Métodos. COO^- - grupo carboxílico do ácido urônico; I+G – soma de ácido urônico e hexosamina; ANH_2 – amina livre ligada ao nitrogênio da glucosamina; A6OH – sulfato removido do oxigênio ligado ao carbono 6 da glucosamina; ANH_2 : amina livre da glucosamina e CH_3CO – grupo acetil ligado ao nitrogênio da glucosamina. **A:** heparina não modificada; **B:** heparina totalmente dessulfatada.

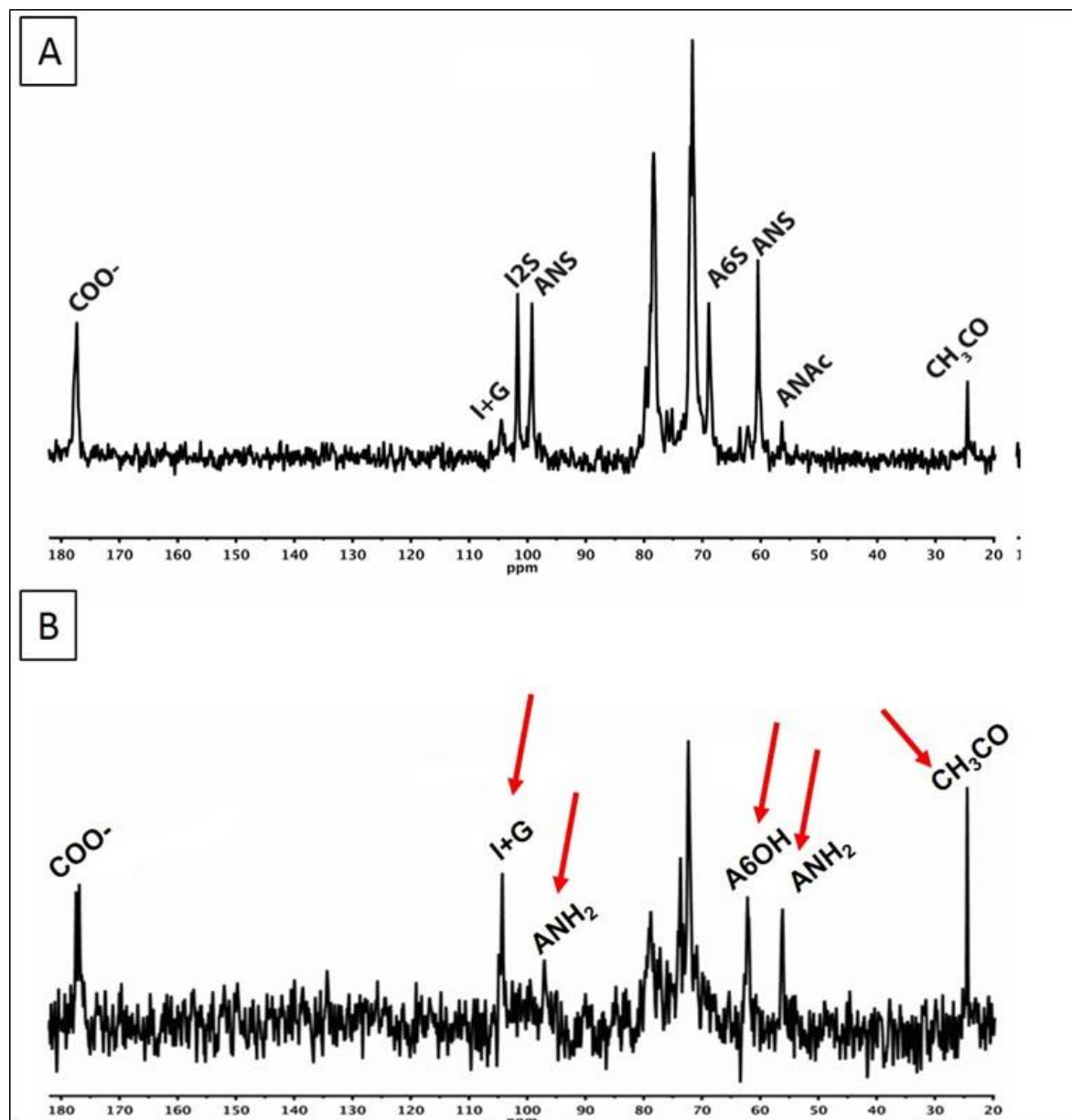


FIGURA 14 – ESPECTROS DE RMN-¹³C DAS HEPARINAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS: As amostras foram diluídas em água deuterada e analisadas conforme descrito em Métodos. COO⁻ - grupo carboxílico do ácido urônico; I+G – soma de ácido urônico e hexosamina; ANH₂ – amina livre ligada ao nitrogênio da glucosamina; A6OH – sulfato removido do oxigênio ligado ao carbono 6 da glucosamina; ANH₂: amina livre da glucosamina e CH₃CO – grupo acetil ligado ao nitrogênio da glucosamina. **A:** heparina não modificada; **B:** heparina totalmente dessulfatada e *N*-acetilada.

5.5 Efeito das heparinas quimicamente modificadas sobre a síntese de heparam sulfato nas células endoteliais

Para verificar se as heparinas modificadas podem exibir menor estímulo da síntese de PGHS nas células endoteliais, foi utilizada marcação metabólica com [³⁵S]-sulfato de sódio. Os resultados estão ilustrados na Figura 15 e mostram que o

estímulo da heparina sobre a síntese de PGHS após a remoção do sulfato na posição *N*-ligado reduz pela metade e quando o 2-*O*- sulfato é removido parece não ocorrer nenhuma alteração do estímulo. O efeito da heparina 2-*O* e *N*-dessulfatada é similar ao da heparina somente *N*-dessulfatada, sugerindo que esse grupamento sulfato seja importante no estímulo da síntese de PGHS.

O aumento da síntese de PGHS só é abolido quando ocorre a dessulfatação total da heparina. No entanto, quando as células são expostas à mesma heparina totalmente dessulfatada, mas *N*-acetilada, mostra que ainda ocorre um pequeno estímulo da síntese de HS.

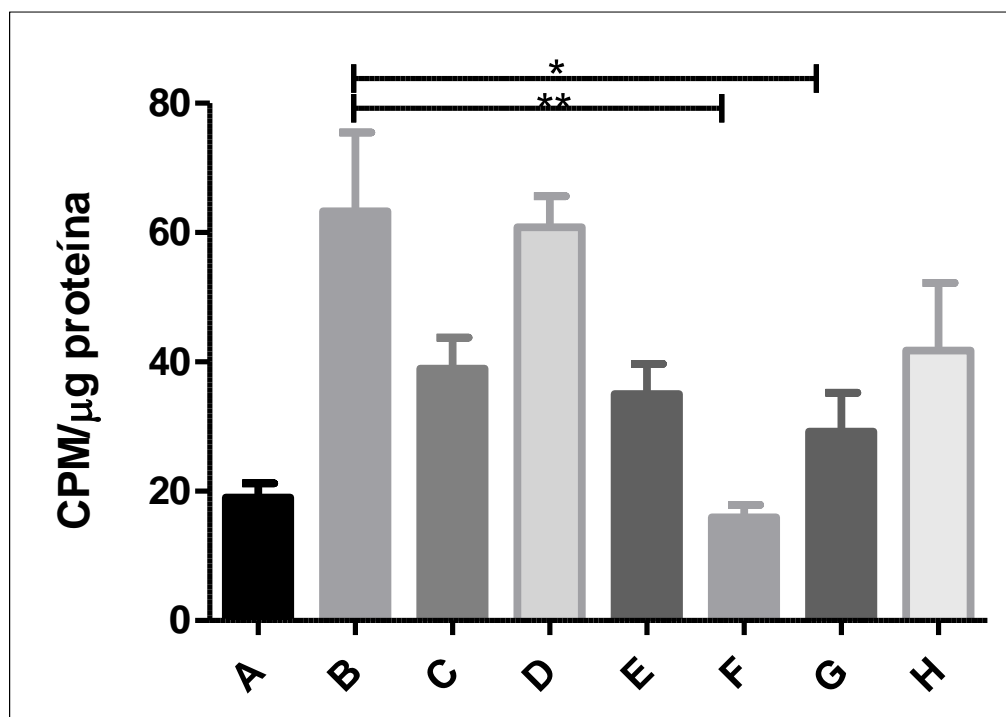


FIGURA 15 – EFEITO DA HEPARINA NÃO MODIFICADA E QUIMICAMENTE MODIFICADAS SOBRE A SÍNTESE DE HS EM CÉLULAS ENDOTELIAIS - As células foram cultivadas em meio de cultura HAM-F12 com 10% SFB por 4 dias e expostas ou não (Controle) a 100μg/ml de heparina não modificada ou quimicamente modificadas, na presença de 150μCi/ml de [³⁵S]-sulfato de sódio por 18 horas. Alíquotas do meio de cultura foram submetidas a proteólise com e, então, foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,50%) em tampão PDA, conforme descrito em Métodos. Análise estatística foi realizada por ANOVA, *p<0.05, **p<0,00.5. As barras correspondem ao erro padrão. **A:** Sem tratamento; **B:** heparina não modificada; **C:** heparina *N*-dessulfatada; **D:** heparina 2-*O*-dessulfatada; **E:** heparina *N*- e 2-*O*-dessulfatada; **F:** heparina totalmente dessulfatada; **G:** heparina totalmente dessulfatada e *N*-acetilada; **H:** heparina carboxirreduzida.

5.6 Dicroísmo Circular

Com o objetivo de avaliar se a *N*-acetilação provocou alterações importantes na conformação da heparina totalmente dessulfatada utilizamos análise por

Dicroísmo Circular (CD). Esta é uma técnica utilizada para determinar a estrutura secundária de diversas moléculas como: proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos. Para obter um espectro de DC é necessário que a molécula tenha algumas regiões específicas na sua composição, como um grupo acetila, amina e carboxila (MCREYNOLDS e GERVAY-HAGUE, 2000). Como a heparina possui todos estes grupamentos na sua composição foi possível obter um espectro de DC da heparina não modificada, totalmente dessulfatada e totalmente dessulfatada e *N*-acetilada (Figura 16).

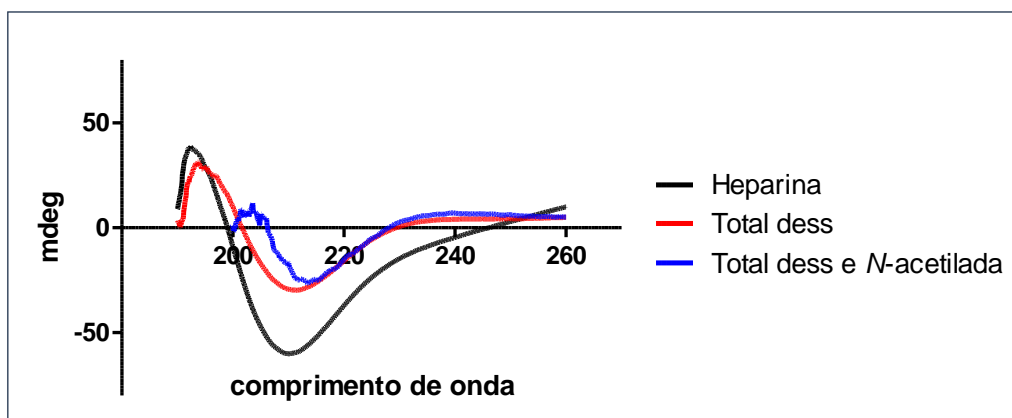


FIGURA 16 – DICROÍSMO CIRCULAR: As amostras foram diluídas em água destilada, e analisadas no espectropolarímetro JASCO J-850. As medidas foram realizadas na região de ultravioleta distante (190-260 nm) em cubeta de 1 cm de caminho óptico e uma velocidade de varredura de 10 nm/min. Os ensaios foram realizados em água, a 25°C.

Nesse espectro, a região de ~209 nm corresponde ao ácido L-idurônico não sulfatado e a região de ~191 nm corresponde a *N*-acetil-glucosamina (STONE, 1984). Foi possível observar nos espectros da heparina totalmente dessulfatada e totalmente dessulfatada e *N*-acetilada que a elipticidade aumentou na região ~210 nm, mostrando que a luz nessa região foi desviada de maneira diferente, devido a uma alteração na posição espacial do ácido L-idurônico.

Isto mostra que a simples inclusão do grupamento acetil alterou a conformação da molécula. Possivelmente levou a exposição dos grupamentos carboxílicos de forma diferente ao que estava no totalmente dessulfatado.

O conjunto de resultados sugere que o efeito do estímulo da síntese de HS é decorrente não somente de grupamento sulfato, mas sim da posição em que a carga negativa, incluindo da carboxila, esteja presente.

5. CONCLUSÕES

- As modificações químicas na molécula de heparina: *N*-dessulfatada, 2*O*-dessulfatada, *N*- e 2*O*-dessulfatada, totalmente dessulfatada e totalmente dessulfatada e *N*-acetilada foram confirmada pela eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, pela dosagem dos grupamentos sulfato e pelo ¹³C-ressonância magnética nuclear:
- A carboxirredução foi comprovada pela dosagem do ácido urônico;
- Foi verificado por RMN-¹³C que a heparina 6*O*-dessulfatada não foi efetiva;
- O ensaio com [³⁵S]-sulfato de sódio mostrou que a heparina totalmente dessulfatada não causou o estímulo na síntese do PGHS. E a heparina totalmente dessulfatada e *N*-acetilada apresentou um pequeno aumento na síntese do PGHS;
- O ensaio do dicroísmo circular mostrou uma modificação na conformação das heparinas totalmente dessulfatada, em relação a não modificada, e ainda a heparina totalmente dessulfatada e *N*-acetilada apresenta uma conformação diferente da totalmente dessulfatada;
- O estímulo da síntese do proteoglicano de heparan sulfato é decorrente não somente dos grupamentos sulfatos ou da quantidade de cargas negativas (sulfato ou carboxila), mas da conformação em que estas estão presentes na molécula da heparina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNFELD, M; Gotte, M; PARK, P W; REIZES O; FITZGERALD M L; LINCECUM, J; ZAKO, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. Annu. Rev. Biochem. 68: 729-77.
- BARZU, T.; LORMEAU J.C; PETITOU. M; MICHELSON. S; CHOAY J. (1985) Binding and endocytosis of heparin by human endothelial cells in culture. Biochim. Biophys. Acta 845: 196-203.
- BISWAS, C. (1988) Heparin and heparan sulfate binding sites on B-16 melanoma cells. J. Cell. Physiol. 136: 147-53.
- BOUÇAS, R; TRINDADE, E; TERSARIOL, I; DIETRICH, C; NADER, H. (2008) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Like Fluorescence Assay to Investigate the Interactions of Glycosaminoglycans to Cells. Analytica chimica acta 618(2): 218–26.
- BUONASSISI, V. (1973) Sulfated mucopolysaccharide synthesis and secretion in endothelial cell cultures. Exp. Cell Res. 76:363 -8.
- BUONASSISI, V. & COLBURN, P. (1983) Antibodies to the heparan sulfate proteoglycans synthesized by endothelial cell cultures. Biochim. Biophys. Acta 760: 1-12.
- CASTELLOT, J.J.; et al., (1985) Binding and internalization of heparin by vascular smooth muscle cells. J. Cell. Physiol. 124: 13-20.
- CASTILLO, C. J.; COLBURN P. & BUONASSISI, V. (1987) Characterization and N-terminal sequence of a heparan sulfate proteoglycan synthesized by endothelial cells in culture Biochem. J. 247: 687-93.
- CHAVANTE, S. F et al., (2000) A novel heparan sulfate with high degree of N-sulfation and high heparin cofactor-II activity from the brine shrimp *Artemia franciscana*. Int. J. Biol. Macromol. 27: 49-57.
- CORRIGAN, J.J. (1977) Heparin therapy in bacterial septicemia. J. Pediatr. 91: 695-99.
- COUCHMAN, J. R.; PATAKI, C. A. (2012) An introduction to proteoglycans and their localization. The journal of histochemistry and cytochemistry v. 60:885-97.
- CRUZ, W. O. & DIETRICH, C. P. (1967) Antihemostatic effect of heparin counteracted by adenosine triphosphate. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 126: 420-6.
- DAY, JONATHAN R.S, R.C LANDIS e K.M TAYLOR. (2004) Heparin Is Much More Than Just an Anticoagulant. Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia 18(1): 93–100.
- DIETRICH, C.P. (1984) A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycan. Braz. J. Med. Biol. Res. 17: 5-15.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. (1976) Electrophoretic Behaviour of Acidic Mucopolysaccharides in Diamine Buffers. Analytical biochemistry, v. 647:645–647.
- DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; PAIVA, J. F.; TERSARIOL, I. L. S.; SANTOS, E. A.; HOLME, K. R. & PERLIN, A.S. (1989) Heparin in molluscs: chemical, enzymatic degradation and ¹³C and ¹H N.M.R. spectroscopical evidence for the maintenance of the structure through evolution. Int. J. Biol. Macromol. 11: 361-6.
- DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. & STRAUS, A. H. (1983) Structural differences of heparan sulfates according to tissue and species of origin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 111: 865-71.
- DIETRICH, C. P.; TERSARIOL, I. L. S.; TOMA, L.; MORAES, C. T; PORCIONATTO, M. A.; OLIVEIRA, F. W. & NADER, H. B. (1998) Sequencing of heparan sulfate: Identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight heparan sulfates from different origins. Cell. Mol. Biol. 44: 417-29.
- DIETRICH, C. P.; PAIVA, J. F.; CASTRO, R. A. B.; CHAVANTE, S. F.; JESKE, W.; FAREED, J.; GORIN, P. A. J.; MENDES, A. & NADER, H. B. (1999) Structural features

- and anticlotting activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. Biochem. Biophys. Acta 1428: 273-83.
- DISCHE, Z. A. (1947) A new specific color reaction of hexuronic acid. J. Biol. Chem. 167: 189-98.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. (1962) A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochem. J. 84: 106-110
- ESKO, J. D. & LINDAHL, U. (2001) Molecular diversity of heparan sulfate. J. Clin. Invest. 108 (2): 169-73.
- ESKO J. D, KIMATA K, LINDAHL U. (2009) Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editors. Essentials of glycobiology. Cold Spring Harbor.
- KJELLÉN, L. & LINDAHL, U. (1991) Proteoglycans: Structures and interactions. Annu. Rev. Biochem. 60: 443-75.
- FAREED, J.; WALENGA, M.; HOPPENSATEADT, D.; HUAN, S & NONN, R. (1989) Biochemical and pharmacologic inequivalence of low molecular weight heparins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 556: 333-53.
- GANDHI, N. S.; MANCERA, R. L. (2008) The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. Chemical biology & drug design, 72: 455-82.
- IOZZO, R. V. (1994) Perlecan: a gem of a proteoglycan. Matriz Biol. 14: 203-8.
- IOZZO, R. V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. Annu Rev Biochem 67: 609-52.
- IOZZO, R. V. & SAN ANTONIO, J. D. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. J. Clin. Invest. 108 (3): 349-55.
- JORPES, J. E. & GARDELL, S. (1948) On heparin monosulfuric acid. J. Biol. Chem. 176: 267.
- LANE, D.A. (1989) Heparin binding and neutralising proteins. In: LANE, D. A. and LINDAHL, U. (Eds) Heparin - Chemical and biological properties, clinical applications. Edward Arnold Publishers, London, p. 363-91.
- LI, XU, ZHEN ZHENG, XIN LI e XIAOCHUN MA. (2012) Unfractionated Heparin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response through Blocking P38 MAPK and NF-κB Activation on Endothelial Cell. Cytokine 60(1): 114-21.
- LINDAHL, U.; KIDHOLT, K.; SPILLMANN, D. & KJELLÉN, L. (1994) More to "heparin" than anticoagulation. Tromb. Res. 75 (1): 1-32.
- LISON, L., (1936), Histochimie Animale, Paris, Gauthier-Villars
- LOPES CC, DIETRICH CP, NADER HB. (2006) Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. Braz J Med Biol Res. 39:157-167.
- MATHEWS, M. B. - Springer, G. K. & Wittman, H. G. (1975) In: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics of Connective Tissue. Macromolecular Structure and Evolution. Springer-Verlag, New York, vol. 19, p. 99, 104, 135, 175 e 213.
- MEDEIROS, G. F.; MENDES, A.; CASTRO, R. A. B.; BAÚ, E. C.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. (2000) Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. Biochim. Biophys. Acta. 1475(3): 287-94.
- MEDEIROS, V. P; PAREDES-GAMERO, E. J; MONTEIRO, H. P; ROCHA, H; TRINDADE, E. S e NADER, H. B (2012). Heparin-Integrin Interaction in Endothelial Cells: Downstream Signaling and Heparan Sulfate Expression. Journal of cellular physiology 227(6): 2740-49.
- MICHELACCI, Y. M. & DIETRICH, C. P. (1974) Isolation and partial characterization of an individual chondroitinase AC from *Flavobacterium heparinum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56: 973-80.

- MUÑOZ-GARCÍA, J. C. et al. (2012) Effect of the substituents of the neighboring ring in the conformational equilibrium of iduronate in heparin-like trisaccharides. Chemistry, 18(51):16319–31, 14.
- NADER, H.B. & DIETRICH, C.P. (1989) Natural occurrence and possible biological role of heparin. Heparin, Chemical and Biological Properties, Clinical Applications. In: Lane, D. A & Lindahl, U. (Eds), Edward Arnold, London, 81-96.
- NADER, H. B. & DIETRICH, C. P. (1994) Anticoagulant, antithrombotic and antihemostatic activities of heparin: Structural requirements, mechanism of action and clinical applications. Ciência e Cultura 46: 297-302.
- NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; BUONASSISI, V. & COLBURN, P. (1987) Heparin sequences in heparan sulfate chain of an endothelial cell proteoglycan. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 3565-9.
- NADER, H. B.; BUONASSISI, V.; COLBURN, P. & DIETRICH, C. P. (1989) Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfatation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. J. Cell. Physiol. 140: 305-10.
- NADER, H.B.; TOMA, L.; PINHAL, M.A.S.; BUONASSISI, V.; COLBURN, C. & DIETRICH, C.P. (1991) Effect of heparin and dextran sulfate on the synthesis and structure of heparan sulfate from cultured endothelial cell. Semin. Thromb. Hemostas. 17: 47-56.
- NADER, H.B.; CHAVANTE, S.F.; SANTOS, E.A.; PAIVA, J.F.; OLIVEIRA, F.W.; JERÔNIMO, S.M.B.; MEDEIROS, G.F.; ABREU, L.R.D.; LEITE, E.L.; CASTRO, R.A.B.; TOMA, L.; TERSARIOL, I.L.S.; PORCIONATTO, M.A. AND DIETRICH, C.P. (1999) Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates. Braz. J. Med. Biol. Res. 32: 529-538.
- NADER HB, LOPES CC, ROCHA HA, SANTOS EA, DIETRICH CP. (2004) Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. Curr. Pharm. Des. 10:951-966.
- NOWATZKI, J. (2009) Células endoteliais expostas ao veneno de *L. intermedia* são induzidas à apoptose pelo desalojamento celular (anoikis) sendo que a ação direta das toxinas é inibida pelo proteoglicano de heparan sulfato. Universidade Federal do Paraná.
- PAREDES-GAMERO, E. J. et al. (2010) Heparin induces rat aorta relaxation via integrin-dependent activation of muscarinic M3 receptors. Hypertension, 56:713–21.
- PINHAL, A. S.; WALENGA, J. M.; JESKE W. HOPPENSTEADT, D.; DIETRICH, C. P.; FAREED, J. & NADER, H. B. (1994a) Antithrombotic agents stimulate the synthesis and modify the sulfatation pattern of a heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. Thromb. Res. 74: 143- 53.
- PINHAL, M. A. S.; TRINDADE, E. S.; FAREED, J.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. (2001a) Heparin and a cyclic octaphenol-octasulfonic acid (GL-522-Y-1) bind with high affinity to a 47kDa protein from vascular endothelial cell surface and stimulate the synthesis and structural changes of heparan sulfate proteoglycan. Tromb. Res. 103: 35-45
- RABOUDI, N.; JULIAN, J.; RAHDE, L. H. & CARSON, D. D. (1992) Identification of cell-surface heparin/heparan sulfate-binding proteins of a human uterine epithelial cell line (RL95). J. Biol. Chem. 267: 11930-9.
- RAK, K. (1999) Heparin therapy: 1998 (current use of the 80-year-old heparin) Orv Hetil 140(2): 59-66.
- RYSER, H.J.; MARAD, N. & SHEN, W.C. (1983) Heparin interaction with cultured cells: Possible role of fibronectin in uncoupling surface binding and endocytosis. Cell Biol. Int. Rep. 7: 923-30.
- ROBIN, D.R. (1956) Further studies on the lipolytic system induced in plasma by heparin injection. Quart. J. Exp. Physiol. 41:195-9.
- SAMPAIO LO, TERSARIOL ILS, LOPES CC, BOUÇAS RI, NASCIMENTO FD, ROCHA HAO, NADER HB. (2006) Heparins and heparan sulfate. Structure, distribution and protein interactions. In: Verli, H. editor. Insights into carbohydrate structure and biological function. Kerala, India: Transworld research network. p1-24.

- SANTOS, E. A.; MENEZES, L. R.; PEREIRA, N. M. L.; ANDRADE, G. P. V.; NADER, H. B. & DIETRICH, C. P. (2003) Mast cells are present in epithelial layers of different tissues of the mollusk *Anomalocardia brasiliensis* "in situ" characterization of heparin and correlation of heparin and histamine concentrations. Histochemical Journal 34: 553-8.
- SHWORAK NW, KOBAYASHI T, DE AGOSTINI A, SMITS NC. (2010) Anticoagulant heparan sulfate to not clot--or not? Prog Mol Biol Transl Sci. 93:153-78.
- STONE, A. (1985) Far-Ultraviolet Circular Dichroism and Uranic Acid Components Octadecasaccharide Heparin Fractions. Archives of Biochemistry and Biophysics 236(1): 342-53.
- TERSARIOL, I. L. S.; FERREIRA, T. M. P. C.; MEDEIROS, M. G. L.; PORCIONATTO, M. A., MORAES, A. C., ABREU, L. R. D. NADER, H. B. & DIETRICH, C. P. (1994) Sequencing of heparan sulfate proteoglycans: Identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight heparan sulfate proteoglycans from different origins. Braz. J. Med. Biol. Res. 27: 2097-102.
- TRINDADE, E. S.; OLIVER, C.; JAMUR, M. C.; ROCHA, H. A. O.; FRANCO, C. R. C.; PINHAL, M. A.; BOUÇAS, R. I.; GOUVEIA, T. C.; TERSARIOL, I. L. S.; DIETRICH, C. P. & NADER, H. B. (2008a) The binding of heparin to the extracellular matrix of endothelial cells up-regulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate proteoglycan. J Cellular Physiology 217:328-337.
- TRINDADE, EDVALDO S, RODRIGO I BOUÇAS, HUGO A O ROCHA, JULIANA A DOMINATO, EDGAR J PAREDES-GAMERO, CÉLIA REGINA C FRANCO, CONSTANCE OLIVER, MARIA C JAMUR, CARL P DIETRICH, AND HELENA B NADER. (2008b). Internalization and Degradation of Heparin Is Not Required for Stimulus of Heparan Sulfate Proteoglycan Synthesis. Journal of Cellular Physiology 217(2): 360-66.
- VAHERI, A. (1964) Heparin and related polyionic substances as virus inhibitors. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. 171: 1-98.
- VYNIOS, D. H.; KARAMANOS, N. K.; TSIKANOS, C. P. (2002) Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues. Journal of Chromatography, 781:21-38.
- WARDROP, D e KEELING, D. (2008) The Story of the Discovery of Heparin and Warfarin. British journal of haematology 141(6): 757-63.
- WILSON, O.; JACOBS, A. L.; STEWART, S. & CARSON, D. D. (1990) Expression of externally-disposed heparin/heparan sulfate binding sites by uterine epithelial cells. J. Cell. Physiol. 143: 60-7.
- WINER, M. A. & AX, R. L. (1989) Properties of heparin binding to purified plasma membranes from bovine granulosa cells. J. Reprod. Fertil. 87: 337-48.
- YATES, E. A. et al. (1996) ¹H and ¹³C NMR spectral assignments of the major sequences of twelve systematically modified heparin derivatives. Carbohydrate Research, 294: 15-27.