

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALEXSANDRO VINÍCIUS NOGUEIRA

**COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA
DE HEPARINAS BOVINA E SUÍNA DE DIFERENTES MASSAS MOLECULARES**

CURITIBA

2013

ALEXSANDRO VINÍCIUS NOGUEIRA

**COMPARAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA
DE HEPARINAS BOVINA E SUÍNA DE DIFERENTES MASSAS MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Coorientadores: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Prof. Dr. Marcello Iacomini

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Nogueira, Alexsandro Vinícius
Comparação das atividades anticoagulante e antitrombótica de
heparinas bovina e suína de diferentes massas moleculares. / Alexsandro
Vinícius Nogueira. – Curitiba, 2014.
52 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Thales Ricardo Cipriani
Co-orientadores: Guilherme Lanzi Sasaki e Marcello Iacomini

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Heparina 2. Anticoagulantes I. Título II. Cipriani, Thales Ricardo III.
Sasaki, Guilherme Lanzi IV. Iacomini, Marcello V. Universidade Federal
do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica.

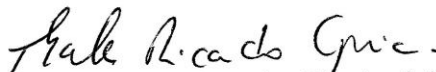
CDD (20. ed.) 615.718

TERMO DE APROVAÇÃO

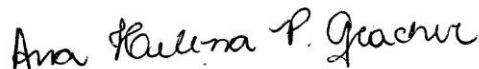
ALEXSANDRO VINÍCIUS NOGUEIRA

Comparação das Atividades Anticoagulante e Antitrombótica de Heparinas Bovina e Suína de Diferentes Massas Moleculares

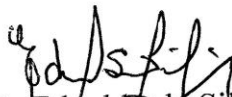
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof Dr Thales Ricardo Cipriani (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr^a Ana Helena P. Gracher
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof Dr Edvaldo da Silva Trindade
Departamento de Biologia Celular – UFPR

Curitiba, 30 de setembro de 2013.

RESUMO

Heparinas comerciais são obtidas de tecidos suíno ou bovino. Contudo, o uso da heparina bovina tem diminuído severamente devido à preocupação de contaminação pelo prion da encefalopatia espongiforme bovina. Assim, poucos estudos têm sido realizados com a heparina bovina e, não existe produção nem estudos relativos à heparinas de baixa massa molecular de origem bovina. Heparinas de baixa massa molecular apresentam vantagens em relação às heparinas não fracionadas, pois elas apresentam maior biodisponibilidade e podem ser administradas por via subcutânea. Neste trabalho é descrito o fracionamento de uma heparina suína e outra bovina (S-UFH, $M_n = 22.016$ Da; B-UFH, $M_n = 23.225$ Da, respectivamente) por ultrafiltração para a obtenção de heparinas com baixa massa molecular (S-LMWH, $M_n = 13.135$ Da; B-LMWH, $M_n = 12.297$ Da) e alta massa molecular (S-HMWH, $M_n = 27.169$ Da; B-HMWH, $M_n = 24.650$ Da). Estas amostras de heparina foram analisadas quanto à atividade anticoagulante e antitrombótica, e comparadas estruturalmente. Os resultados obtidos demonstraram que frações com diferentes massas moleculares das heparinas bovina e suína apresentam diferenças estruturais nativas e diferentes atividades anticoagulante e antitrombótica. Além disso, foi demonstrado que as frações de baixa massa S-LMWH e B-LMWH apresentam efeito anticoagulante quando administrados por via subcutânea, sendo este efeito obtido com uma menor quantidade de droga em relação às heparinas de baixa massa comerciais Clexane e Fragmin.

Palavras-chave: ultrafiltração, atividade anticoagulante, trombose venosa, aPTT *ex vivo* .

ABSTRACT

Commercial heparins are obtained from porcine or bovine tissues. However, the use of bovine heparin decreased severally because contamination by the prion of bovine spongiform encephalopathy has been a serious concern. Thus, few researches have been performed with it, and there is neither production nor studies about the bovine low molecular weight heparins. Low molecular weight heparins present advantages in relation to unfractionated heparins because they have higher bioavailability and can be subcutaneously injected. This study reports the fractionation of porcine and bovine heparin (S-UFH, 22,016 Da; B-UFH, 23,225 Da, respectively) by ultrafiltration to obtain heparins with low molecular weight (S-LMWH, $M_n = 13,135$ Da; B-LMWH, $M_n = 12,297$ Da) and high molecular weight (S-HMWH, $M_n = 27.169$ Da; B-HMWH, $M_n = 24.650$ Da). These heparins were assayed for anticoagulant and antithrombotic activities, and structurally compared. The results demonstrated that fractions with different molecular weights of porcine and bovine heparins have native structural differences and present different anticoagulant and antithrombotic activities. Moreover, the low molecular weight fractions S-LMWH and B-LMWH showed anticoagulant effect when subcutaneously injected. This effect was achieved using a minor amount of drug in relation to the commercial low molecular weight heparins Clexane and Fragmin.

Keywords: ultrafiltration; anticoagulant activity; venous thrombosis, *ex vivo* aPTT.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO DE UMA CADEIA DE HEPARINA	16
FIGURA 2: UNIDADE PENTASSACARÍDICA DE LIGAÇÃO À ANTITROMBINA	17
FIGURA 3: MODELO CLÁSSICO DA COAGULAÇÃO	22
FIGURA 4: MODELO DE COAGULAÇÃO BASEADO NA CÉLULA	23
FIGURA 5: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DAS HEPARINAS.....	30
FIGURA 6: EFEITO DAS HEPARINAS NA INIBIÇÃO DE α -TROMBINA NA PRESENÇA DE AT (T1).....	36
FIGURA 7: EFEITO DAS HEPARINAS NA INIBIÇÃO DE α -TROMBINA NA PRESENÇA DE HCII (T2).....	37
FIGURA 8: EFEITO DAS HEPARINAS NA INIBIÇÃO DE FATOR Xa NA PRESENÇA DE AT (T3)	38
FIGURA 9: EFEITO ANTITROMBÓTICO <i>IN VIVO</i> DAS HEPARINAS.....	39
FIGURA 10: EFEITO DAS HEPARINAS NA COAGULAÇÃO DO PLASMA DE RATOS APÓS INJEÇÃO SUBCUTÂNEA	41
FIGURA 11: REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DE B-UFH.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: NOMENCLATURA E ORIGEM DOS FATORES DE COAGULAÇÃO DO SANGUE.....	21
TABELA 2: MASSA MOLECULAR MÉDIA, ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>IN VITRO</i> E RENDIMENTO DAS HEPARINAS	34
TABELA 3: COMPONENTES PRINCIPAIS DAS HEPARINAS DE ALTA E BAIXA MASSA MOLECULAR OBTIDAS APÓS ULTRAFILTRAÇÃO	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AT	Antitrombina
HCII	Cofator II da Heparina
UFH	Heparina não Fracionada
LMWH	Heparina de Baixa Massa Molecular
HMWH	Heparina de Alta Massa Molecular
B-UFH	Heparina não Fracionada Bovina
B-LMWH	Heparina de Baixa Massa Molecular Bovina
B-HMWH	Heparina de Alta Massa Molecular Bovina
S-UFH	Heparina não Fracionada Suína
S-LMWH	Heparina de Baixa Massa Molecular Suína
S-HMWH	Heparina de Alta Massa Molecular Suína
TF	Fator Tissular
TFPI	Inibidor da Via do Fator Tissular
PC	Proteína C
PS	Proteína S
AVC	Acidente Vascular Cerebral
TSD	Dissacarídeo Trissulfatado
MSD	Dissacarídeo Monossulfatado
NSD	Dissacarídeo não Sulfatado
NS	Domínio N-Sulfatado
NA	Domínio N-Acetilado
NR	Região não Redutora
R	Região Redutora
LR	Link Region
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>M_n</i>	Massa Molecular Média

S _{int}	...Soma das Áreas Anoméricas dos Monossacarídeos Interiores da Cadeia de Heparina
S _{ret}	..Soma das Áreas Anoméricas dos Monossacarídeos Redutores da Cadeia de Heparina
aPTT <i>activated Partial Thromboplastin Time</i>
UI Unidades Internacionais
PBS <i>Phosphate Buffered Saline</i>
EPM Erro Médio Padrão
T1 Inibição de α -trombina na Presença de Antitrombina
T2 Inibição de α -trombina na Presença de Cofator II da Heparina
T3 Inibição de Fator Xa na Presença de Antitrombina
ANS α -red Terminal redutor de α -GlcNSO ₃
ANAc α -red Terminal redutor de α -GlcNAc
ANS β -red Terminal redutor de β -GlcNSO ₃
ANS – I GlcNSO ₃ -IdoA
A*GlcNSO ₃ 3,6SO ₃
ANS – G GlcNSO ₃ -GlcA
ANAc – GGlcNAc-GlcA
ANS – I2S GlcNSO ₃ -IdoA2SO ₃
I2S IdoA2SO ₃
I – A6S IdoA-GlcN6SO ₃
I – A IdoA-GlcN
G – A*GlcA-GlcNSO ₃ 3,6SO ₃
G – ANS GlcA-GlcNSO ₃
G – ANAcGlcA-GlcNAc
G – Gal GlcA-Gal
Gal Galactose
XylXilose
GlcNGlucosamina

IdoA	Ácido idurônico
GlcA	Ácido glucurônico
Ac	Grupo acetil
SO ₃	Grupo sulfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 HEPARINA	15
2.1.1 Estrutura da Heparina	15
2.1.1.1 Resíduos monossacarídicos	15
2.1.1.2 Unidade dissacarídica principal.....	16
2.1.1.3 Sequências parcialmente sulfatadas.....	17
2.1.1.4 Sequência pentassacarídica específica.....	17
2.1.2 Distribuição e Papel Biológico	18
2.1.3 Principais Fontes de Obtenção	18
2.1.4 Limitações do Uso da Heparina.....	18
2.3.5 Heparina de Baixa Massa Molecular (LMWH)	19
2.2 HEMOSTASIA	20
2.2.1 Sistema de Coagulação Sanguínea	20
2.2.1.1 Modelo clássico da coagulação	21
2.2.1.2 Modelo de coagulação baseado na célula.....	22
2.2.2 Sistema Anticoagulante	23
2.2.2.1 Inibidor da via do fator tissular	23
2.2.2.2 Antitrombina III (AT).....	24
2.2.2.3 Cofator II da heparina.....	24
2.2.2.4 Proteína C e proteína S	25
2.3 TROMBOSE	25
2.3.1 Tromboembolismo Venoso	25
2.3.2 Trombose Arterial.....	26
3 JUSTIFICATIVAS.....	27
4 OBJETIVOS	27

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5 MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 MATERIAIS DE ESTUDO	28
5.2 FRACIONAMENTO	28
5.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	28
5.4 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS HEPARINAS.....	29
5.5 INIBIÇÃO DE α -TROMBINA OU FATOR Xa NA PRESENÇA DE HEPARINA.....	30
5.6 TESTES <i>IN VIVO</i>	31
5.6.1 Teste de Atividade Antitrombótica.....	31
5.6.2 aPTT <i>ex vivo</i> Após Injeção Subcutânea de Heparina.....	31
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1 FRACIONAMENTO, MASSA MOLECULAR E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE ..	33
6.2 EFEITO DAS HEPARINAS NA INIBIÇÃO DE α -TROMBINA E FATOR Xa.....	35
6.3 ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DAS HEPARINAS.....	38
6.4 EFEITO ANTICOAGULANTE <i>EX VIVO</i> APÓS INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DAS HEPARINAS.....	40
6.5 COMPARAÇÃO ESTRUTURAL DAS HEPARINAS POR RMN.....	42
7 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A heparina é um glicosaminoglicano formado principalmente por ácido urônico (ácido idurônico ou glucurônico) e glucosamina (*N*-acetilada ou *N*-sulfatada). É altamente substituída com resíduos *O*-sulfato na posição 6 dos resíduos de glucosamina e na posição 2 dos resíduos de ácido idurônico (ROSENFELD *et al.*, 1991). Sua aplicação é baseada em suas propriedades anticoagulante e antitrombótica. Contudo, estes efeitos não são diretos, uma vez que a heparina amplifica a ação de inibidores naturais da via da coagulação, a antitrombina (AT) e o cofator II da heparina (HCII), que agem diretamente na cascata de coagulação (PROST, 1986).

Por outro lado, algumas limitações dificultam a aplicação clínica da heparina, tais como suas características farmacocinéticas e biofísicas. As heparinas não fracionadas (*unfractionated heparin*, UFH) quando administradas por via endovenosa apresentam interação não específica com proteínas circulantes. Por consequência a AT compete com outras proteínas plasmáticas na ligação com a UFH e, desta forma, o efeito anticoagulante torna-se imprevisível, necessitando de monitoramento laboratorial frequente. Um fator complicante do uso de heparina é a hemorragia, que surge após a utilização de altas concentrações. Quanto às propriedades biofísicas, a UFH não tem a capacidade de inibir fatores de coagulação ligados à superfície dos vasos, tais como trombina ligada à fibrina e fator Xa ligado a fosfolipídios (PATEL *et al.*, 2007).

Ao contrário das heparinas não fracionadas, as heparinas de baixa massa molecular (*low molecular weight heparin*, LMWH), derivadas da clivagem enzimática ou química de UFH, ligam-se menos fortemente às proteínas do plasma e dos tecidos, aumentando sua biodisponibilidade. Elas podem ser administradas por via subcutânea sem a necessidade de monitoramento laboratorial frequente, e estão associadas a um menor risco de trombocitopenias e osteoporose, quando comparadas às UFH (COHEN, 2000).

Com relação às frações de heparinas de alta massa molecular (*high molecular weight heparin*, HMWH), obtidas a partir da UFH por cromatografia de gel filtração ou coluna de troca iônica e por precipitação alcoólica, elas apresentam atividade anticoagulante, *in vitro*, superior às heparinas não fracionadas (HENNINK *et al.*, 1984; RADOFF e DANISHEFSKY, 1981; LIBERTI e STIVALA, 1967; LASKER e STIVALA, 1966).

Nos anos 90 a heparina bovina passou a não ser mais utilizada na Europa e nos Estados Unidos, devido à descoberta da encefalopatia espongiforme bovina, popularmente

conhecida como doença da vaca louca, o que representou uma ameaça ao mercado de heparina devido à potencial escassez de matéria prima (KORT *et al.*, 2005).

Apesar de haver uma grande quantidade de trabalhos relacionados à heparina, não há estudos que comparem as atividades anticoagulantes e antitrombóticas de frações de alta e baixa massa molecular de heparinas bovinas e suínas. Além do que, o fracionamento das heparinas por métodos químicos e enzimáticos pode levar a alterações estruturais que podem afetar a atividade das heparinas de baixa massa molecular assim obtidas.

Sendo assim, este trabalho busca fracionar heparinas bovina e suína, para obter frações de alta e baixa massa molecular de forma que não haja alterações estruturais no processo, determinar e comparar a atividade *in vitro* e *in vivo* de cada amostra de heparina e avaliar as diferenças estruturais naturais existentes entre as heparinas bovinas e suínas e entre suas frações, com base em análises de ressonância magnética nuclear.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HEPARINA

O termo heparina foi primeiramente utilizado por Howell do Grego “Hepar”, ou fígado, local de onde ela foi primeiramente isolada. Em 1922 na reunião anual da “*American Physiological Society*” Howell introduziu um protocolo de extração aquosa para isolamento da heparina e em 1926 no “*12th International Physiological Congress*” ele apresentou melhoras para este protocolo e identificou o carboidrato solúvel como ácido glucurônico (WARDROP e KEELING, 2008). Atualmente, a heparina é o principal agente anticoagulante utilizado para a prevenção e tratamento de problemas tromboembólicos.

A heparina é um polissacarídeo sulfatado que pertence à família dos glicosaminoglicanos, que possui efeito anticoagulante indireto, potencializando o efeito da antitrombina e do cofator II da heparina (PATEL *et al.*, 2007; PETITOU *et al.*, 2003).

2.1.1 Estrutura da Heparina

2.1.1.1 Resíduos monossacarídicos

A heparina é um polissacarídeo linear constituído por sequências dissacarídicas alternadas de um ácido urônico e um aminoaçúcar. Como ácidos urônicos pode-se ter o ácido β -D-glucurônico (GlcA) ou o ácido α -L-idurônico (IdoA), e como aminoaçúcar apenas a α -D-glucosamina (GlcN). O GlcA, o IdoA e a GlcN junto com os componentes minoritários, D-galactose (Gal) e D-xilose (Xyl) são os únicos resíduos de monossacarídeos identificados em heparinas purificadas (LINHARDT, 2003; ZHANG *et al.*, 2011) (Figura 1).

GlcN é predominantemente *N*-sulfatada em cadeias longas de heparina e *N*-acetilada em sequências menores (SAMPAIO *et al.*, 2006; TYRRELL *et al.*, 1993). Ambos os ácidos urônicos e a GlcN apresentam grupos *O*-sulfato. O padrão de sulfatação é universalmente distribuído ao longo da cadeia de heparina, sendo a porção menos carregada disposta, principalmente, em direção à região redutora (R) da cadeia e a porção mais carregada em

direção à região não redutora (NR), com domínios misturados entre as duas regiões (SAMPAIO *et al.*, 2006) (Figura 3).

2.1.1.2 Unidade dissacarídica principal

A composição da heparina é comumente expressa em termos de suas unidades dissacarídicas. A principal sequência de dissacarídeo é o dissacarídeo trissulfatado (TSD) IdoA2SO₃-GlcNSO₃6SO₃, o qual está concentrado no domínio *N*-sulfatado (NS) (Figura 1), onde os resíduos de glucosamina são predominantemente *N*-sulfatados. As unidades de TSD representam de 60% a 75% da heparina extraída da mucosa suína e até 85% da heparina obtida do pulmão bovino. Este segmento relativamente longo de unidades dissacarídicas altamente sulfatadas ao longo da cadeia de heparina é muitas vezes referido como constituinte da “região regular” e é o principal contribuinte para a propriedade polieletrólítica da heparina (CASU, 2005; TORRI e GUERRINI, 2008).

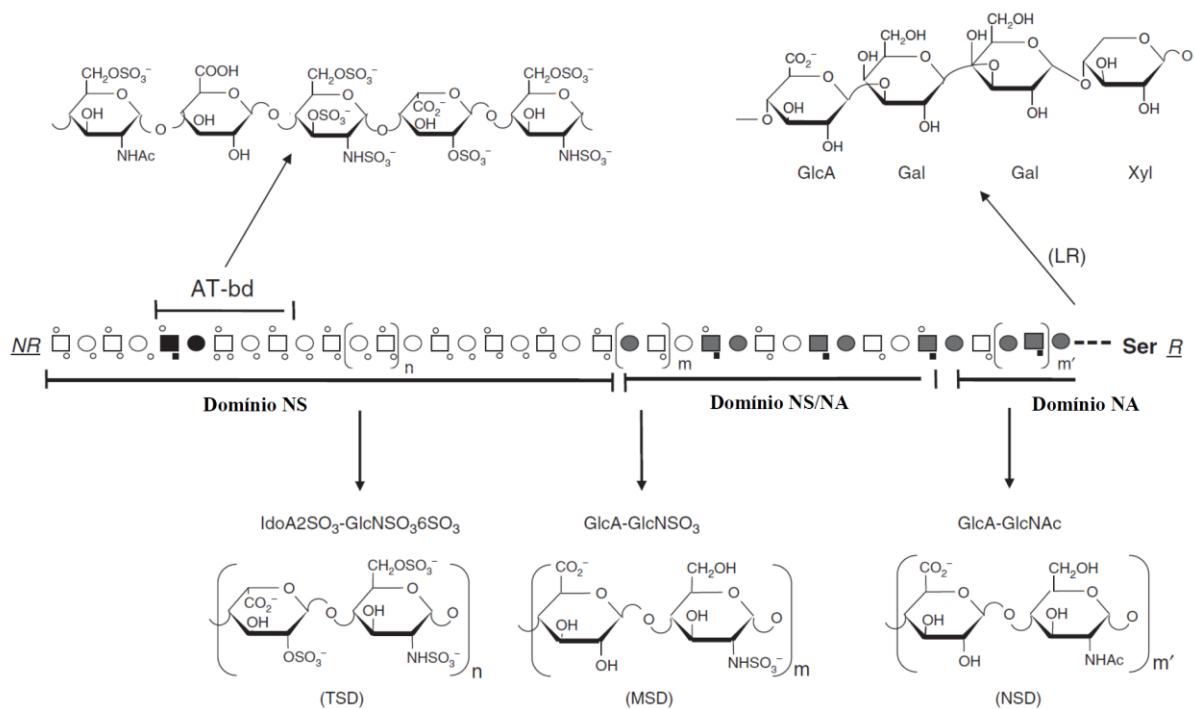


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DE UMA CADEIA DE HEPARINA (Adaptado de TORRI e GUERRINI, 2008)

2.1.1.3 Sequências parcialmente sulfatadas

A principal unidade repetitiva parcialmente sulfatada é parte do domínio *N*-acetilado-*N*-sulfatado (NA/NS), o qual é composto principalmente pela unidade dissacarídica monossulfatada (MSD) GlcA-GlcNSO₃. O domínio NA termina na região de ligação LR e tem como unidade dissacarídica principal o dissacarídeo não sulfatado (NSD) GlcA-GlcNAc (Figura 1). Além disso, a região NA/NS possui resíduos de IdoA 2-*O*-sulfatado e GlcNSO₃/NAc 6-*O*-sulfatado, e apenas alguns resíduos de GlcN 6-*O*-sulfatados estão presentes na região NA (CASU, 2005; TORRI e GUERRINI, 2008).

2.1.1.4 Sequência pentassacarídica específica

Algumas cadeias de heparina possuem uma sequência específica de ligação à antitrombina III, constituída por GlcNAc6SO₃-GlcA-GlcNSO₃3,6SO₃-IdoA2SO₃-GlcNSO₃6SO₃. Análises de RMN feitas no complexo pentassacarídeo da heparina-antitrombina confirmam que tanto o equilíbrio conformacional do resíduo de IdoA2SO₃, quanto a conformação das ligações glicosídicas desempenham papéis importantes na indução da atividade biológica da heparina (HRICOVÍNI *et al.*, 2001; RAGAZZI e FERRO, 1990) (Figura 2). As cadeias de heparina que não possuem o resíduo de glucosamina 3-*O*-sulfatado normalmente tem menor afinidade com a antitrombina, por este ser essencial ao pentassacarídeo, e acabam sendo responsáveis pela ativação do cofator II da heparina (MAIMONE e TOLLEFSEN, 1988; TOLLEFSEN, 2007).

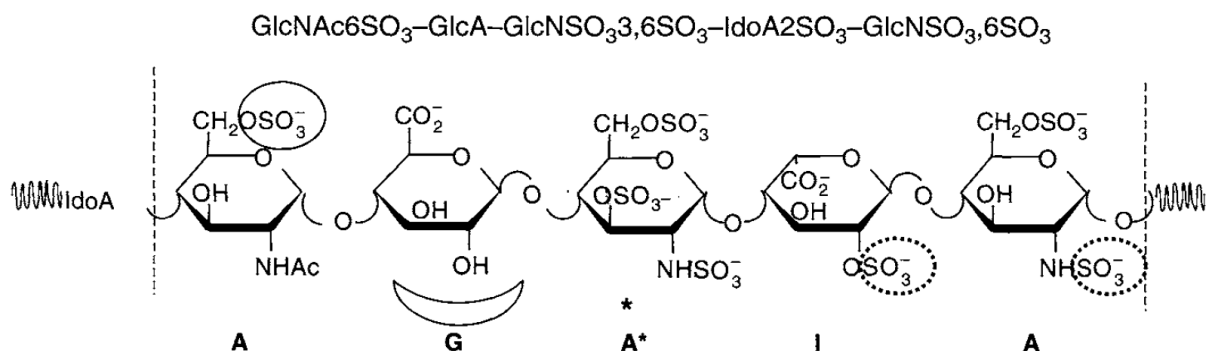


Figura 2: UNIDADE PENTASSACARÍDICA DE LIGAÇÃO À ANTITROMBINA (Adaptado de CASU, 2005) Asterisco (*): marca o resíduo de glucosamina supersulfatado característico desta unidade; Círculo fechado: indica grupo sulfato essencial para a interação à AT; Círculos pontilhados: indicam grupos sulfatos ligeiramente essenciais para a interação à AT; Meia lua: indica que este composto é essencial para a interação à AT.

2.1.2 Distribuição e Papel Biológico

A heparina é produzida nos grânulos dos mastócitos, onde interage com histamina, proteases e mediadores inflamatórios, e é encontrada somente em alguns tecidos de vertebrados e invertebrados, principalmente nas mucosas de pulmões e intestino. Apesar de possuir grande efeito como anticoagulante quando utilizado como fármaco, endogenamente a heparina não é encontrada na corrente sanguínea e até o momento não se sabe exatamente qual sua função endógena (CARLSSON e KJELLÉN, 2012; GUNAY e LINHARDT, 1999; SAMPAIO *et al.*, 2006).

O grau de diversidade da heparina varia de acordo com a espécie e o órgão do qual a heparina é extraída, podendo variar na massa molecular, quantidade de grupos sulfato ao longo da cadeia, proporções das unidades monossacarídicas e dissacarídicas e afinidade de ligação à antitrombina e ao cofator II da Heparina (KOTOKU *et al.*, 1967; WARDA *et al.*, 2003). O método de purificação empregado para a obtenção da heparina de sua matéria prima, também pode causar variações na heparina.

Clinicamente a heparina é utilizada para tratar a trombose venosa profunda, embolia pulmonar, entre outros problemas relacionados à trombose (HIRSH *et al.*, 1976; MULLOY e GRAY, 2010). Além disso, a heparina está sendo estudada para determinar sua relação com outros tipos de desordens, tais como, doenças inflamatórias e doenças infecciosas (MULLOY e GRAY, 2010).

2.1.3 Principais Fontes de Obtenção

A heparina comercial é obtida do tecido de animais utilizados no consumo humano, principalmente, do intestino suíno e pulmão bovino (LINHARDT, 2003). Porém, nos anos 90 a heparina bovina passou a não ser mais utilizada na Europa e nos Estados Unidos, devido ao medo de contaminação com o prion responsável pela encefalopatia espongiforme bovina, popularmente conhecida como doença da vaca louca, o que representou uma ameaça ao mercado de heparina devido à potencial escassez da matéria prima (KORT *et al.*, 2005).

2.1.4 Limitações do Uso da Heparina

Apesar de sua ampla utilização, a heparina possui algumas limitações que dificultam sua aplicação clínica. Devido ao seu comportamento dose-resposta acentuado, um pequeno erro na dose pode levar a casos de hemorragia grave, derrame e até a morte (KRISHNASWAMY *et al.*, 2010). Além disso, o uso prolongado de heparina pode levar ao desenvolvimento de trombocitopenia, a qual pode ser do tipo I – que é uma resposta não imunogênica à terapia, causando uma leve diminuição no nível de plaquetas livres no sangue e apenas a interrupção do tratamento com heparina é o suficiente para que o número de plaquetas no sangue volte ao normal; ou pode ser do tipo II – a qual é uma resposta imune causada pela presença idiopática de anticorpos relacionados à heparina, caracterizada por uma trombocitopenia relativa ou absoluta com um paradoxal aumento na incidência de trombose que resulta em complicações que ameaçam os membros e a vida do paciente (BRIEGER *et al.*, 1998; MENAJOVSKY, 2005; THONG e KAM, 2005).

2.1.5 Heparina de Baixa Massa Molecular (LMWH)

Ao contrário das heparinas não fracionadas (UFH), as heparinas de baixa massa molecular (*low molecular weight heparin*, LMWH), derivadas da clivagem enzimática ou química de UFH, ligam-se menos fortemente às proteínas do plasma e dos tecidos, aumentando sua biodisponibilidade à antitrombina (COHEN, 2000). Além disso, quando LMWH são utilizadas é observada uma menor propensão a hemorragias, quando comparadas a UFH, utilizando-se a mesma atividade anticoagulante específica (CALABRESE *et al.*, 2002).

Em meados de 1990 foram feitos testes em pacientes com trombose venosa profunda. Um grupo de pacientes foi tratado com UFH intravenosa e outro grupo com LMWH subcutânea, sendo ambas heparinas de origem suína. Os pacientes tratados com UFH tiveram que permanecer no hospital de 7 a 10 dias para monitoramento de possíveis efeitos colaterais, contudo os pacientes tratados com LMWH receberam as primeiras doses no hospital, e puderam continuar com o tratamento em casa. Estes estudos forneceram a base para a alteração do plano de tratamento desta enfermidade em hospitais (BRATT *et al.*, 1986; KAKKAR, 2004).

2.2 HEMOSTASIA

Hemostasia é um mecanismo fisiológico fundamental para todos os vertebrados, que envolve dois processos complementares, a formação do coágulo ou trombo, que serve para bloquear o dano no vaso e parar o sangramento, e o processo de dissolução do trombo, ou fibrinólise, que elimina os elementos formadores de coágulo assim que o reparo do endotélio vascular tenha sido concluído. Estes processos envolvem os vasos, as plaquetas, as proteínas da coagulação e da fibrinólise e os anticoagulantes naturais. Desta forma a hemostasia tem como objetivo minimizar a perda de sangue, restaurar a integridade vascular e preservar a vida (BROOKS *et al.*, 2011; COLMAN, 2006; EYRE e GAMLIN, 2010; GENTRY, 2004; REIS *et al.*, 2003).

2.2.1 Sistema de Coagulação Sanguínea

A formação do coágulo envolve um grande número de interação entre proteases plasmáticas e seus cofatores, estas interações geram a enzima trombina, que por sua vez converte o fibrinogênio, solúvel, em fibrina, insolúvel (FRANCO, 2001). A Tabela 1 apresenta a nomenclatura e a origem dos fatores envolvidos na coagulação.

TABELA 1: NOMENCLATURA E ORIGEM DOS FATORES DE COAGULAÇÃO DO SANGUE

Fator de coagulação	Nome comum	Local de síntese
I	Fibrinogênio	Fígado
II	Protrombina	Fígado
III	Fator tecidual	Tecidos em geral
IV	Íons cálcio	Tecidos em geral
V	Pró-acelerina	Fígado
VII	Pró-convertina	Fígado
VIII	Anti-hemofílico	Endotélio
IX	Fator Christmas	Fígado
X	Fator de Stuart	Fígado
XI	Pró-transglutaminase	Fígado
XII	Antecedente da tromboplastina	Fígado
XIII	Fator de Hageman	Fígado
Proteína C		Endotélio
Proteína S		Endotélio

Adaptado de Murray *et al.* (2007).

2.2.1.1 Modelo clássico da coagulação

Este modelo foi descrito em 1964 por Macfarlane e também por Davie e Ratnoff, onde a coagulação é dividida em uma via extrínseca (ativada por um fator externo ao sangue, quando o vaso é lesado) e uma via intrínseca (ativada diretamente por exposição do sangue a uma superfície negativamente carregada, como o vidro). Ambas as vias tem como objetivo a ativação do fator X (FRANCO, 2001) (Figura 3).

Na via extrínseca o fator tissular (TF) é exposto ao plasma e o fator VII é ativado a fator VIIa que por sua vez ativa o fator X diretamente. Já a via intrínseca ativa o fator XII a fator XIIa devido ao estímulo provocado pelo contato do plasma com uma superfície carregada negativamente (ativação por contato). Contudo, para que o fator XII seja ativado também se fazem necessárias a presença da pré-caliceína (uma serino-protease) e do cininogênio de alta massa molecular (um cofator não enzimático). Em seguida o fator XIIa ativa o fator XI a XIa que por sua vez ativa o fator IX. O fator IXa na presença do fator VIIIa ativa o fator X. O fator Xa desencadeia a formação de trombina a partir da protrombina, e esta desencadeia a formação de fibrina a partir de fibrinogênio (HOFFMAN e MONROE, 2001; VOGLER e SIEDLECKI, 2009).

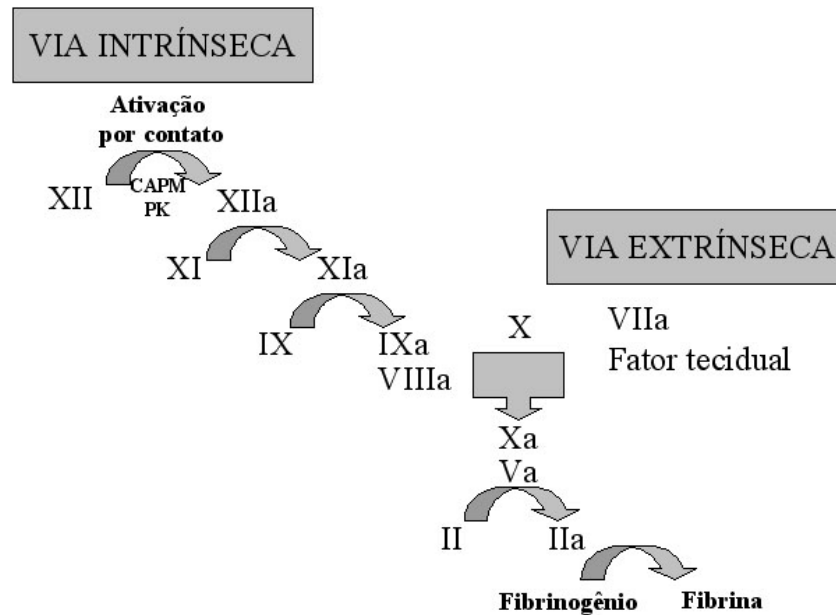


FIGURA 3: MODELO CLÁSSICO DA COAGULAÇÃO (Adaptado de FRANCO, 2001)

2.2.1.2 Modelo de coagulação baseado na célula

Devido a algumas descobertas, o modelo de coagulação baseado na célula foi proposto em 2001 por Hoffman e Monroe. Neste modelo o processo de coagulação é descrito em três fases sobrepostas: iniciação, amplificação e propagação (Figura 4).

Ao decorrer da iniciação o fator tissular (TF), exposto pelo endotélio vascular danificado, liga-se ao fator VIIa circulante, formando um complexo TF/VIIa. Este complexo converte o fator IX em IXa e o fator X em Xa. O fator IXa amplifica a ativação do fator X e ajuda na ativação das plaquetas. O fator Xa liga-se e ativa o fator V, formando o complexo Xa/Va, que por sua vez forma a trombina a partir da protrombina (EYRE e GAMLIN, 2010; HOFFMAN e MONROE, 2001; VINE, 2009).

Na amplificação ocorre a ativação das plaquetas. Elas primeiramente se ligam às proteínas do meio extravascular que se encontram no plasma, devido à lesão vascular, sendo desta forma, parcialmente ativadas. Além disso, a trombina, formada na fase de iniciação, amplifica o sinal anticoagulante e aumenta a adesão das plaquetas, ativando-as completamente. A trombina também ativa o fator V, VIII e XI e o fator XIa ativa o fator IX. Por fim os fatores ativados Va, VIIIa e IXa ligam-se a superfície das plaquetas ativadas (GENTRY, 2004; HOFFMAN e MONROE, 2001).

Durante o processo de propagação, ocorre a formação do complexo tenase, que é a interação dos fatores VIIIa e IXa. Este complexo amplifica a ativação do fator X, que complexa-se com o fator Va, convertendo uma grande quantidade de protrombina em trombina, sendo a trombina responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina. Além disso, altas concentrações de trombina ativam o fator XIII, que é um estabilizador das redes de fibrina, por meio da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de fibrina, formando um coágulo estável (CURRY e PIERCE, 2007; HOFFMAN e MONROE, 2001).

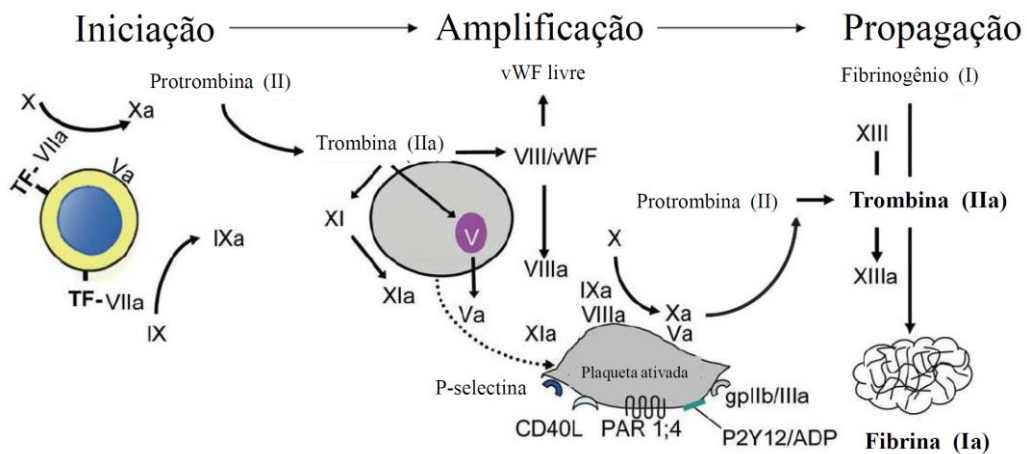


FIGURA 4: MODELO DE COAGULAÇÃO BASEADO NA CÉLULA (Adaptado de CATERINA *et al.*, 2013)

2.2.2 Sistema Anticoagulante

Após a coagulação cumprir seu papel, ela deve ser controlada para que o coágulo não se estenda para áreas não lesionadas. Para isso existe o mecanismo de anticoagulação natural, que tem como objetivo reestabelecer o equilíbrio hemostático atuando em múltiplos níveis, indo da inibição enzimática à modulação da atividade dos fatores de coagulação. Os principais componentes do mecanismo de anticoagulação são a antitrombina III, o cofator II da heparina, o complexo proteína C-proteína S, e o inibidor da via do fator tissular (CATERINA *et al.*, 2013; SAGRIPANTI e CARPI, 1998; SOARES *et al.*, 2006).

2.2.2.1 Inibidor da via do fator tissular

A inibição do início da coagulação se dá pela inibição do complexo TF/VIIa, que é feita pelo inibidor da via do fator tissular (TFPI). TFPI, uma protease com massa molecular variando de 34-41 kDa, apresenta três domínios moleculares denominados domínios tipo Kunitz (K-1; K-2; K-3). Em um primeiro momento ocorre a inibição reversível do fator Xa, a partir da interação deste fator ao domínio K-2. Esta interação aumenta a afinidade do domínio K-1 pelo complexo TF/VIIa e desta forma, o complexo é inibido. Já o domínio K-3 não possui uma ligação direta com a inibição do complexo TF/VIIa, mas serve como sítio de ligação para heparina e outros glicosaminoglicanos e está envolvido na ligação do TFPI à lipoproteínas e à superfície celular (CATERINE *et al.*, 2013; CRAWLEY e LANE, 2008; MINE *et al.*, 2002).

2.2.2.2 Antitrombina III (AT)

A AT é uma glicoproteína de 58 kDa de massa molecular, presente no plasma em concentrações de 150 µg/mL. A AT é uma serpina, ou seja, uma proteína inibidora de serino-proteases. Ela inibe a ação da trombina e dos fatores IXa, Xa, XI e XIIa. Sua ação ocorre de forma muito lenta, contudo sua atividade é potencializada na presença de heparina, (PROST, 1986; ROSENBERG e ROSENBERG, 1984).

2.2.2.3 Cofator II da heparina (HCII)

O HCII é uma glicoproteína de aproximadamente 66 kDa, homóloga à antitrombina, sendo também membro da família das serpinas. Sua ação é direcionada exclusivamente à inibição da trombina, sem exercer atividade inibitória nas outras proteases envolvidas na cascata de coagulação. A atividade de inibição da trombina pelo HCII é muito lenta, demorando cerca de 5 minutos para reduzir em 50% a atividade da trombina quando o HCII está presente numa concentração de 1 µmol/L. Porém, na presença de heparina, heparam sulfato ou dermatam sulfato, a atividade do HCII é potencializada incrivelmente, sendo que na mesma condição anterior, mas com o acréscimo de heparina, o HCII demora cerca de 50 milissegundo para reduzir a atividade da trombina em 50% (RAGG, 1986; TOLLEFSEN, 2007; TOLLEFSEN e PESTKA, 1985).

2.2.2.4 Proteína C e proteína S

A proteína C (PC) é uma glicoproteína com 62 kDa de massa molecular, circulante no plasma humano em concentração de aproximadamente 4 µg/mL. A proteína C é ativada pela ação da trombina, e exerce sua função anticoagulante inibindo dois fatores da coagulação, o fator VIIIa e o Va (CATARINE *et al.*, 2013; ROSENBERG e ROSENBERG, 1984).

A proteína S (PS), com 69 kDa de massa molecular, age como um cofator da proteína C, potencializando sua atividade, a partir da formação do complexo PC-PS (SOARES *et al.*, 2006; WALKER, 1980).

2.3 TROMBOSE

Quando ocorre um desequilíbrio na hemostasia o principal efeito desta desordem é a trombose, que é caracterizada pela formação de coágulos no sistema circulatório, podendo ocorrer tanto nas veias quanto nas artérias. Trombose arterial aguda é a principal causa dos casos de infarto do miocárdio (ataque do coração), e o tromboembolismo venoso é o terceiro maior responsável por morte associada a problemas cardiovasculares (MACKMAN, 2008).

2.3.1 Tromboembolismo Venoso

É o caso mais comum de morte evitável entre pacientes hospitalizados. Inclui duas manifestações clínicas, a trombose venosa profunda e a embolia pulmonar. São estimadas cerca de 100 mil mortes por ano por causa de tromboembolismo venoso nos Estados Unidos (AGNELLI e SONAGLIA, 2000; HEIT, 2008).

O trombo responsável pela trombose venosa profunda comumente inicia-se nas veias das panturrilhas, de onde se estende para as veias mais próximas ou pode se desprender da parede do vaso e ser carregado até os pulmões, onde irá bloquear a passagem de sangue, causando embolia pulmonar (KEARON, 2003).

Alguns dos fatores de risco clínico para tromboembolismo venoso podem ser a idade (acima de 40 anos), obesidade, varizes, imobilização prolongada e desidratação além do uso

de medicamentos como contraceptivos orais e para terapia de reposição hormonal. Também existem alguns fatores inerentes, tais como a resistência à proteína C ativada, deficiência da antitrombina, deficiência nas proteínas C e S, e fatores adquiridos, como a síndrome do anticorpo antifosfolípido e níveis de fator VIII elevados, que podem induzir o tromboembolismo venoso (BOMBELI e SPAHN, 2004; PIAZZA e GOLDHABER, 2006).

2.3.2 Trombose Arterial

Comumente ocorre após a erosão ou a ruptura de uma placa aterosclerótica e através de trombos mediados por plaquetas. A trombose arterial pode causar injúria isquêmica em tecidos com um leito terminal vascular, como pulmões. Sendo, isquemia cardíaca e acidente vascular cerebral (AVC) as mais severas manifestações clínicas da trombose arterial. Os fatores de risco para trombose arterial são basicamente os mesmos que para tromboembolismo venoso (PREVITALI *et al.*, 2011).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar de haver uma grande quantidade de trabalhos relacionados à heparina, não foram encontrados registros de estudos que comparem as atividades anticoagulante e antitrombótica de frações de alta e baixa massa molecular de heparinas bovinas e suínas. Além disso, com a diminuição da utilização de heparina bovina, poucas pesquisas têm sido realizadas com ela, e também não existe a comercialização de heparinas bovinas de baixa massa molecular ou estudos que mostrem a possibilidade de sua aplicação (HOPPENSTEADT *et al.*, 2003). E, considerando que o fracionamento de heparinas por métodos químicos e enzimáticos, para a obtenção de frações de baixa massa molecular, pode levar a alterações estruturais, afetando a atividade anticoagulante e antitrombótica, é interessante o desenvolvimento de técnicas de fracionamento que não afetem a estrutura química das heparinas.

4 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral fracionar heparinas bovina e suína, utilizando uma metodologia que afeta a estrutura das moléculas e possibilite a obtenção de duas frações, uma de alta massa molecular e outra de baixa massa molecular.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um método de fracionamento eficiente, com bom rendimento final, que gere frações de alta e baixa massa molecular e que não cause alterações na estrutura química das heparinas bovina e suína;
- Determinar e comparar as atividades anticoagulantes *in vitro* e *in vivo* das amostras de heparina não fracionada bovina e suína, e suas frações;
- Determinar e comparar a atividade antitrombótica *in vivo* das amostras de heparina não fracionada bovina e suína, e suas frações;
- Avaliar diferenças naturais existentes entre populações de heparinas com massa molecular distinta, a partir de análise de Resonância Magnética Nuclear.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS DE ESTUDO

Heparina bovina não fracionada (B-UFH; lote 11101411) e heparina suína não fracionada (S-UFH; lote 11099610) gentilmente cedidas pela empresa Extrasul - *Extracting Quality*. Padrão internacional de heparina suína não fracionada com 200,47 UI/mg (*6th International Standard 2009 – Unfractionated Heparin*). Heparinas comerciais de baixa massa molecular (Clexane e Fragmin). α -Trombina e fator Xa, adquiridos da empresa Haematologic Technologies Inc. (Essex Junction, VT, USA) e os substratos cromogênicos (S-2238 e S-2222, para α -trombina e fator Xa, respectivamente) da empresa Chromogenix AB (Molndal, Suécia).

5.2 FRACIONAMENTO

Para o fracionamento, 1 g de heparina bovina ou suína não fracionada, foi diluído em 50 mL de água destilada e submetido à ultrafiltração através de membrana de 10 kDa de limite de exclusão (*regenerated cellulose membrane*, Millipore), por 4 dias. Desta forma foram obtidas as frações de baixa massa molecular (fração eluída) e de alta massa molecular (fração retida), tanto para heparina bovina (B-LMWH e B-HMWH, respectivamente), quanto para a heparina suína (S-LMWH e S-HMWH, respectivamente).

5.3 RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA (RMN)

As análises de RMN foram feitas em um espectrômetro Bruker 600 MHz Avance III, equipado com uma sonda inversa QXI de 5 mm. As amostras foram dissolvidas em D₂O e analisadas a 30 °C. Os deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C foram referenciados em relação a 0,001% de TMSP-*d*₄ (2,2,3,3- *tetradeuterium-3-trimethylsilylpropionate*) como padrão interno ($\delta = 0$). Análises de RMN-¹H de 1D foram feitas após pulso de 90° de calibração (p1),

para obter um espectro de 10 ppm de largura, utilizando 16 experimentos para gerar uma relação sinal/ruído (S/N) de no mínimo 1000:1 para a região anomérica. A integração das áreas de H-1 foi realizada sem rotação e respeitando um sinal de HDO com largura de linha média variando de 1,0-1,2 Hz e TMSP 0,8-1,0 Hz. As análises de RMN 2D, de HSQC, foram realizadas como descrito por Torri e Guerrini (2008). A largura espectral para Q-HSQC foi de 12 ppm (^1H) e 80 ppm (^{13}C). O experimento foi registrado para detecção quadratura na dimensão indireta, utilizando 24 experimentos por séries de 1 K x 320 W pontos de dados, com preenchimento de zero em F1 (2 K) antes da transformação de Fourier.

A massa molecular média (Mn) das amostras foi determinada a partir de uma adaptação do método de Desai e Linhardt (1995), empregando-se a fórmula descrita abaixo, onde: Mn foi obtido a partir da integração da área dos picos da região anomérica de HSQC quantitativo. S_{red} é a soma das áreas das correlações de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ da região anomérica dos terminais redutores, e S_{int} é a soma das áreas das correlações de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ da região anomérica das unidades internas.

$$Mn = [\{ (S_{\text{int}} \times 1,15) / S_{\text{red}} + 1 \} / 2] \times [\text{massa média do dissacarídeo}]$$

5.4 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS HEPARINAS

A atividade anticoagulante das heparinas foi determinada *in vitro* por comparação das suas capacidades de aumentar o aPTT (*activated partial thromboplastin time*) de um plasma ovino, com um padrão de referência ajustado em Unidades Internacionais (UI). Uma curva de calibração (log de aPTT x UI de heparina) foi obtida, utilizando concentrações variadas de um padrão internacional de heparina suína de 200,47 UI/mg.

Para a análise foi utilizando um coagulômetro COAG-A-MATE[®] XM (Organon Teknika Corporation, Durhan, NC) e o kit HemosiL[®] (Instrumentation Laboratory) para aPTT. Plasma ovino (100 μL) foi incubado a 37 °C com salina ou heparina (100 μL) por 1 minuto. Em seguida, cefalina de coelho foi adicionada (100 μL). Após 2,5 minutos CaCl_2 a 0,025 M (100 μL) foi adicionado e o tempo de coagulação foi determinado (tempo limite de detecção do equipamento = 300 s).

A partir desta análise com diferentes concentrações do padrão internacional, uma curva de calibração foi montada e a equação da reta foi utilizada para determinar as potências das amostras (Figura 5).

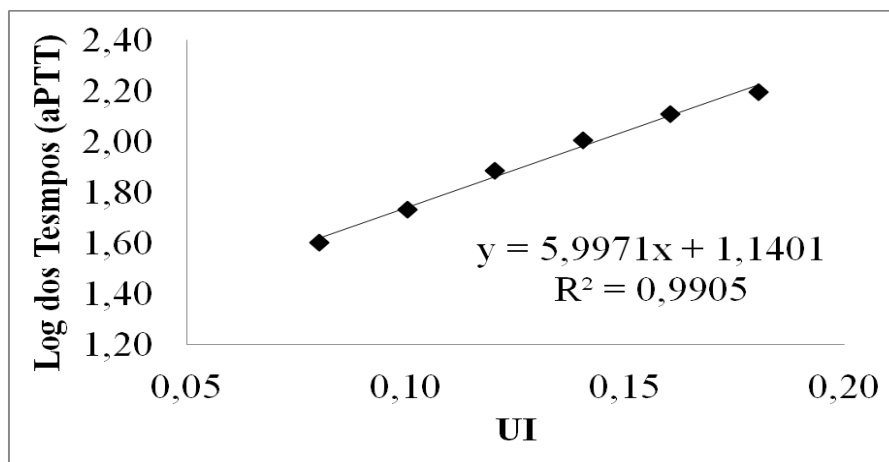


FIGURA 5: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA DAS HEPARINAS

5.5 INIBIÇÃO DE α -TROMBINA OU FATOR Xa NA PRESENÇA DE HEPARINA

O ensaio foi realizado em placa com 96 poços. A concentração final para a reação foi de 100 nM de antitrombina (AT) ou 15 nM do cofator II da heparina (HCII), 6 nM de α -trombina ou 8 nM de fator Xa e uma concentração variando de 1×10^{-6} a 1 UI de heparina em 75 μ L de tampão TS/PEG pH 7,4 (Tris/HCl 0,15 M, NaCl 0,15 M e polietileno glicol 8000 1 mg/mL, pH 7,4 ajustado com HCl). A α -trombina e o fator Xa foram adicionados por último na solução de reação. Após 1 minuto de incubação a 37 °C, as atividades residuais da α -trombina e do fator Xa foram determinadas pela leitura das absorvâncias em 405 nm, por 5 min após a adição de 100 μ M dos substratos cromogênicos específicos (S-2238 para α -trombina e S-2222 para fator Xa). O volume final da reação foi de 100 μ L. Na ausência de heparina, a atividade da α -trombina ou fator Xa foi considerado como 100%.

5.6 TESTES *IN VIVO*

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar, machos ou fêmeas, obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Foram utilizados animais com massa variando de 180 a 220 g para o teste de atividade antitrombótica e de 220 a 250 para a determinação do aPTT *ex vivo*. Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de uma mistura de cetamina (100 mg/kg de massa corpórea) e xilasina (16 mg/kg de massa corpórea). Todos os protocolos experimentais com animais foram encaminhados para apreciação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (autorização número 428).

5.6.1 Teste de Atividade Antitrombótica

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 do veículo (*phosphate buffered saline*, PBS – NaCl 0,136 M, KCl 0,0268 M, Na₂HPO₄ 0,0081 M, KH₂PO₄ 0,00147 M, pH ajustado para 7,2 com HCl 1 M) ou das amostras, e da 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. PBS ou heparina 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 massa corpórea). 20 segundos após a administração da tromboplastina foi realizada a estase de um segmento de 0,7 cm da veia cava abdominal. Após 20 min, o trombo formado no interior do segmento ocluído foi cuidadosamente removido, lavado com salina, liofilizado e pesado. Para cada grupo ($n \geq 6$) a média da massa do trombo \pm erro-padrão da média (EPM) foi determinada e expressa como uma porcentagem da massa do trombo, com 100% representando a ausência de qualquer inibição da formação do trombo (massa do trombo com a administração de PBS).

5.6.2 aPTT *ex vivo* Após Injeção Subcutânea de Heparina

Veículo (PBS) ou heparina (500 $\mu\text{L}/\text{kg}$; 750 UI/kg para as amostras e 300 UI/kg para o Clexane e o Fragmin) foi injetado em ratos subcutaneamente na região dorsal. Após 1,5 h os ratos foram anestesiados e a artéria carótida foi exposta, cuidadosamente dissecada e canulada para coletar 0,5 mL de sangue com 50 μL de citrato de sódio 3,8%. O sangue foi coletado 2 e 3 horas após a injeção do veículo ou da heparina. Posteriormente o sangue foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos e o plasma foi utilizado para o teste de aPTT. Plasma (50 μL) foi incubado a 37 °C por 1 min. Cefalina de coelho (50 μL) foi adicionada e, após 2,5 min, CaCl_2 0,025 M (50 μL) foi adicionado e o tempo de coagulação determinado. Os resultados foram expressos como T_1/T_0 , que é a razão entre o tempo de coagulação na presença (T_1) e na ausência (T_0) de heparina na mistura de incubação \pm erro médio padrão (EPM) (n=2).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão das médias (EPM). A significância estatística foi determinada usando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Os dados foram considerados diferentes na significância de $p < 0,05$. Os valores de IC_{50} (concentração inibitória 50%) e ED_{50} (dose efetiva 50%) foram determinados por regressão não linear utilizando o *software* Graph-Pad Prism versão 3.02 para Windows (GraphPad *Software*, San Diego, CA, USA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 FRACIONAMENTO, MASSA MOLECULAR E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

A ultrafiltração em membrana com limite exclusão de 10 kDa gerou duas frações para cada amostra de heparina não fracionada. A partir da B-UFH (heparina bovina não fracionada; $Mn = 23.225$ Da) foram obtidas as frações B-LMWH (heparina bovina de baixa massa molecular; $Mn = 12.297$ Da) e B-HMWH (heparina bovina de alta massa molecular; $Mn = 24.650$ Da). E, a partir da S-UFH (heparina suína não fracionada; $Mn = 22.016$ Da) foram obtidas as frações S-LMWH (heparina suína de baixa massa molecular; $Mn = 13.135$ Da) e S-HMWH (heparina suína de alta massa molecular; $Mn = 27.169$ Da) (Tabela 2).

Na literatura não existe um sistema de classificação para heparinas de baixa massa molecular (LMWH), que determine exatamente a partir de qual massa é considerado baixa massa. Hirsh (1998) mostra que LMWH comerciais, obtidas por degradação química ou enzimática, possuem massa molecular média variando de 4.000 a 6.000 Da. Contudo, para facilitar as comparações feitas em nosso trabalho, resolvemos denominar as amostras eluídas pela membrana como LMWH, uma vez que a massa molecular destas frações foi cerca de 40% menor quando comparada com a massa molecular da respectiva amostra não fracionadas.

Tanto para a heparina bovina quanto para a suína, o rendimento da ultrafiltração foi de aproximadamente 30% para a fração de baixa massa molecular e de 70% para a fração de alta massa molecular.

A atividade anticoagulante das heparinas (Tabela 2) foi determinada a partir do tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) em Unidades Internacionais (UI) por miligrama, sendo 1 UI equivalente à quantidade de heparina necessária para evitar a coagulação de plasma ovino por 1 hora. As heparinas de baixa massa molecular B-LMWH (103,85 UI/mg) e S-LMWH (134,60 UI/mg) apresentaram atividade anticoagulante menor que as respectivas heparinas não fracionadas B-UFH (142,26 UI/mg) e S-UFH (171,78 UI/mg), enquanto que as heparinas de alta massa molecular B-HMWH (154,67 UI/mg) e S-HMWH (175,66 UI/mg), apresentaram atividade anticoagulante superior às respectivas heparinas não fracionadas.

As atividades das heparinas de baixa massa molecular B-LMWH e S-LMWH foram consideravelmente maiores do que as atividades das heparinas de baixa massa molecular

comerciais, Clexane ($Mn = 5.191$ Da) e Fragmin ($Mn = 6.000^*$ Da), as quais apresentaram atividade anticoagulante de 14,64 UI/mg e 27,66 UI/mg, respectivamente (Tabela 2).

TABELA 2 - MASSA MOLECULAR MÉDIA, ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO* E RENDIMENTO DAS HEPARINAS

Amostras	Mn (Da) ^(a)	Atividade (UI/mg) ^(b)	Rendimento (%) ^(c)
S-UFH	22.016	171,78	-
S-LMWH	13.135	134,60	28,31
S-HMWH	27.169	175,66	71,69
B-UFH	23.225	142,26	-
B-LMWH	12.297	103,85	32,65
B-HMWH	24.650	154,67	67,35
Clexane	5.191	14,64	-
Fragmin	6.000*	27,66	-

a) Massa molecular média determinada por RMN.

b) 1 UI equivale à quantidade de heparina necessária para evitar a coagulação de plasma ovino durante 1 hora.

c) Proporção das frações obtidas após a ultrafiltração.

* Massa molar média estimada na literatura (DESAI e LINHARDT, 1994; SOMMERS *et al.*, 2011).

S-UFH – heparina suína não fracionada; S-LMWH – heparina suína de baixa massa molecular; S-HMWH – heparina suína de alta massa molecular; B-UFH – heparina bovina não fracionada; B-LMWH – heparina bovina de baixa massa molecular; B-HMWH – heparina bovina de alta massa molecular.

A ultrafiltração demonstrou ser eficiente na separação física das heparinas bovina e suína. Além disso, os resultados obtidos mostram que a atividade anticoagulante da heparina é dependente da massa molecular, ou seja, quanto maior a massa molecular, maior a atividade anticoagulante da heparina. Outros estudos, mas com métodos de fracionamento diferentes, gel filtração (LANE *et al.*, 1979) e coluna de troca iônica (ROSENFELD *et al.*, 1991), mostram esta mesma relação entre a massa molecular e atividade anticoagulante da heparina.

Com estes resultados também foi possível notar diferença entre as atividades anticoagulantes das heparinas bovinas e suínas. As heparinas suínas são mais ativas que as heparinas bovinas de massas moleculares semelhantes, fato também já esperado uma vez que é de conhecimento geral que as heparinas bovinas não fracionadas apresentam, de modo geral, atividade média de 150 UI/mg, enquanto heparinas não fracionadas suínas apresentam, no geral, atividade média de 180 UI/mg (GOTTI, *et al.*, 2013; KOTOKU *et al.*, 1967; LASKER e STIVALA, 1966; LIBERTI e STIVALA, 1967; ROSENFELD *et al.*, 1991; RADOFF e DANISHEFSKY, 1981; TEIEN *et al.*, 1977; ZHANG *et al.*, 2011).

Resumidamente, pôde-se concluir que a ultrafiltração foi eficiente em separar heparinas com massas moleculares e com atividades anticoagulantes diferentes. Todos os

experimentos a seguir foram realizados levando-se em consideração quantidades de heparinas em UI.

6.2 EFEITO DAS HEPARINAS NA INIBIÇÃO DE α -TROMBINA E FATOR Xa

O efeito das heparinas não fracionadas S-UFH e B-UFH e de suas respectivas frações (S-LMWH, S-HMWH, B-LMWH, B-HMWH) sobre a atividade da α -trombina e do fator Xa foram avaliados. As heparinas foram incubadas com trombina na presença de AT (T1), trombina na presença de HCII (T2) e fator Xa na presença de AT (T3). Os resultados estão expressos na forma de IC_{50} , que equivale à quantidade de heparina necessária para inibir a atividade enzimática em 50%. São considerados como 100% os resultados das reações quando na ausência de heparina.

Em T1 (inibição de α -trombina na presença de AT), S-UFH ($IC_{50}=0,00051$ UI/mL) não apresentou diferença estatística de S-LMWH ($IC_{50}=0,00034$ UI/mL) e ambos tiveram atividade significativamente superior a S-HMWH ($IC_{50}=0,00073$) (Figura 6A). B-UFH ($IC_{50}=0,00128$ UI/mL) e B-LMWH ($IC_{50}=0,00187$ UI/mL) tiveram atividades significativamente iguais e ambos foram significativamente inferiores a B-HMWH ($IC_{50}=0,00071$ UI/mL) (Figura 6B).

Com estes resultados pôde-se observar que heparinas bovinas e suínas apresentaram comportamentos diferentes após a ultrafiltração. Para heparinas suínas a fração S-HMWH apresentou a menor atividade, enquanto que para as heparinas bovinas, a fração B-HMWH foi a que apresentou a maior atividade. De modo geral, as heparinas suínas são mais ativas que as heparinas bovinas na inibição da α -trombina na presença de AT, com exceção das frações B-HMWH e S-HMWH, que apresentaram atividades semelhantes entre si.

Quando comparadas às atividades das heparinas de baixa massa molecular comerciais, Clexane ($IC_{50}=0,00042$ UI/mL) e Fragmin ($IC_{50}=0,00024$ UI/mL), pôde-se observar que S-LMWH apresentou atividade semelhante às das amostras comerciais, enquanto que B-LMWH apresentou menor atividade (Figura 6).

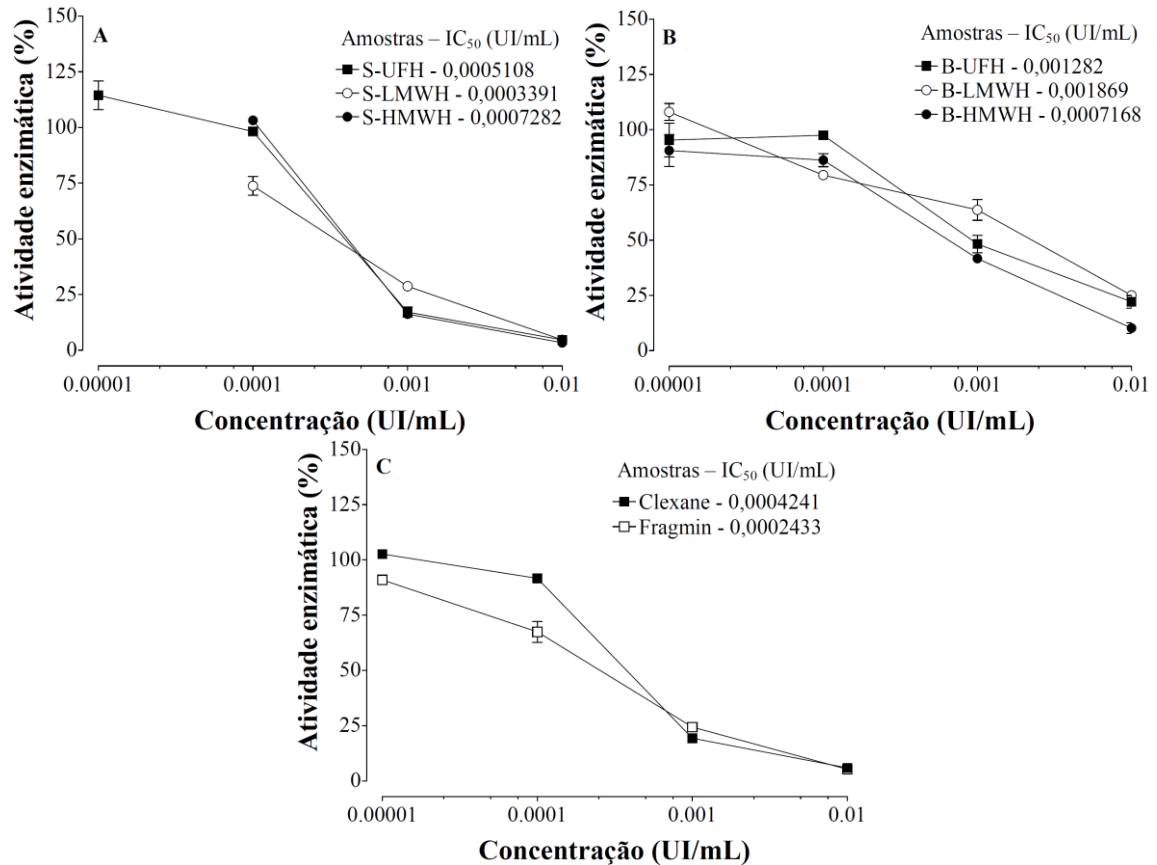


FIGURA 6 – EFEITO DAS HEPARINAS NA INIBIÇÃO DE α -TROMBINA NA PRESENÇA DE AT (T1)
 A – Heparinas Suínas; B – Heparinas Bovinas; C – Padrões de baixa massa molecular.

Para T1, apesar de haver diferença estatística entre os efeitos das frações de alta e baixa massa molecular em relação à respectiva heparina não fracionada, estas diferenças são pequenas. Porém, a diferença entre as heparinas suínas e bovinas pode ser claramente observada, com exceção para a fração B-HMWH.

Em T2 (inibição de α -trombina na presença de HCII) não foi observada diferença significativa entre os efeitos das frações e das respectivas heparinas não fracionadas. Também não houve diferença entre as heparinas bovinas e suínas (Figura 7A e 7B). Por outro lado, quando avaliadas as heparinas de baixa massa molecular, foi observado que tanto S-LMWH (IC₅₀=0,0139 UI/mL) quanto B-LMWH (IC₅₀=0,0159 UI/mL) tiveram atividade significativamente superior às amostras comerciais, Clexane (IC₅₀=0,154 UI/mL) e Fragmin (IC₅₀=0,0411UI/mL) (Figura 7).

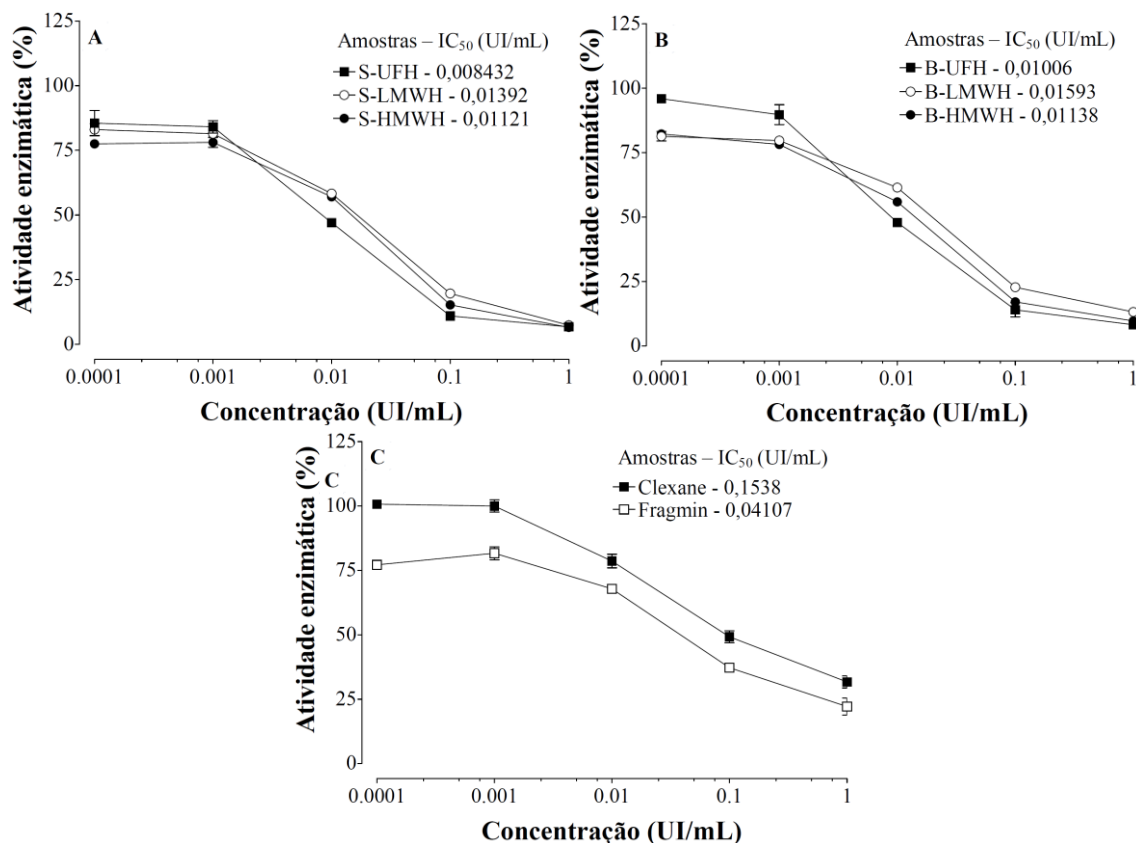


FIGURA 7 – EFEITO DAS HEPARINAS NA INIBIÇÃO DE α -TROMBINA NA PRESENÇA DE HCII (T2)
 A – Heparinas Suínas; B – Heparinas Bovinas; C – Padrões de baixa massa molecular.

Em comparação com T1, em T2 os valores de IC₅₀ foram consideravelmente maiores. Isto é justificado uma vez que a heparina apresenta uma menor afinidade com o HCII quando comparado com a AT e, portanto, uma maior quantidade de heparina é necessária para potencializar a ação inibitória de HCII sobre a α -trombina (TOLLEFSEN, 2007; TOLLEFSEN e PESTKA, 1985).

Em T3 (inibição de fator Xa na presença de AT), tanto S-LMWH (IC₅₀=0,00001361 UI/mL) quanto S-HMWH (IC₅₀=0,00005373 UI/mL) apresentaram atividades significativamente maiores que S-UFH (IC₅₀=0,001104 UI/mL), 81 e 20 vezes, respectivamente (Figura 8A). E, tanto B-LMWH (IC₅₀=0,003572 UI/mL) quanto B-HMWH (IC₅₀=0,006270 UI/mL) apresentaram menor atividade que B-UFH (IC₅₀=0,002376 UI/mL) (Figura 8B). Além disso, pôde-se observar que B-LMWH (IC₅₀ = 0,003572 UI/mL) teve atividade semelhante às amostras comerciais Clexane (IC₅₀=0,002256 UI/mL) e Fragmin (IC₅₀=0,003212 UI/mL), enquanto S-LMWH (IC₅₀=0,00001361 UI/mL) teve uma atividade muitas vezes superior (Figura 8).

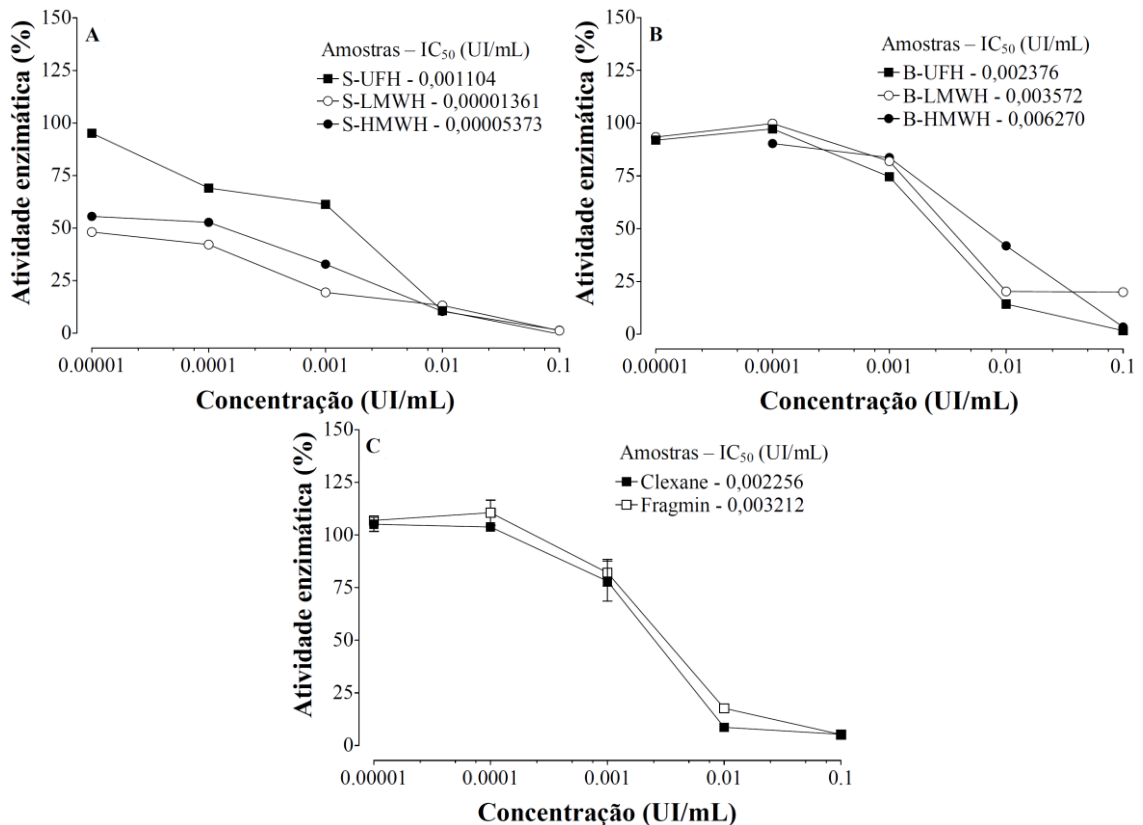


FIGURA 8 – EFEITO DAS HEPARINAS NA INIBIÇÃO DE FATOR Xa NA PRESENÇA DE AT (T3)
A – Heparinas Suínas; B – Heparinas Bovinas; C – Padrões de baixa massa molecular.

Os resultados apresentados em T3 não eram esperados e são, até o momento, inexplicáveis. Após a heparina ser submetida à ultrafiltração e separada em massas diferentes, era esperado que uma das frações apresentasse atividade maior ou igual e a outra menor ou igual à respectiva heparina não fracionada, assim como observado em T1. Ou, como os testes foram padronizados em UI, que houvesse pouca ou nenhuma variação entre as heparinas, como em T2.

6.3 ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DAS HEPARINAS

A atividade antitrombótica das heparinas foi investigada pelo modelo de trombose venosa induzida em ratos. No grupo controle, que recebeu PBS ao invés de heparina, a massa do trombo liofilizado foi de $5,03 \text{ mg} \pm 0,813$ (média \pm EPM), correspondendo a 100% de

trombose. Os resultados são expressos em ED_{50} , que corresponda à quantidade de heparina necessária para reduzir o tamanho do trombo em 50%.

As heparinas suínas, S-UFH, S-LMWH e S-HMWH inibiram a formação do trombo com ED_{50} de 0,01375, 0,7278 e 31,41 UI/kg respectivamente. S-LMWH foi aproximadamente 43 vezes mais potente que S-HMWH e ambos, S-LMWH e S-HMWH, foram menos potentes que S-UFH, 53 e 2.284 vezes respectivamente, considerando o ED_{50} (Figura 9A).

As heparinas bovinas, B-UFH, B-LMWH e B-HMWH inibiram a formação de trombo com ED_{50} de 4,534, 0,1668 e 0,05614 UI/kg respectivamente. Sendo B-HMWH aproximadamente 3 vezes mais potente que B-LMWH e ambos, B-LMWH e B-HMWH foram mais potentes que B-UFH, 27 e 81 vezes respectivamente, considerando o ED_{50} (Figura 9B).

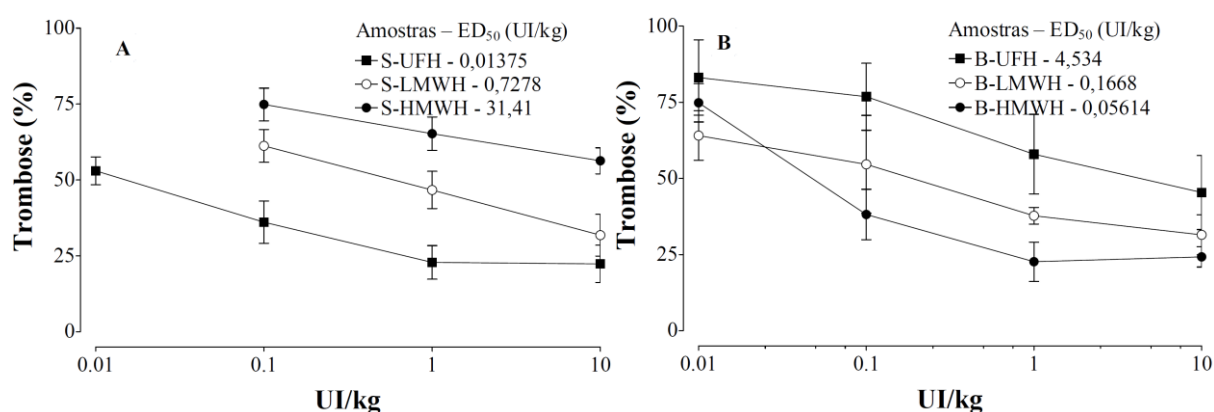


FIGURA 9 – EFEITO ANTITROMBÓTICO *IN VIVO* DAS HEPARINAS
A – Heparinas Suínas; B – Heparinas Bovinas.

Estes resultados foram inesperados, pois quando as amostras de heparina bovina e suína foram fracionadas, esperava-se que fosse obtida uma fração com atividade antitrombótica menor ou igual à amostra não fracionada e outra fração com atividade antitrombótica maior ou igual à amostra não fracionada.

Em estudo com heparina suína, Doutremepuich *et al.* (1986) observaram que frações com menor massa molecular ($M_w < 5000$ Da) apresentaram maior atividade antitrombótica que as heparinas não fracionadas. Contudo, Ockelford *et al.* (1982) não observaram diferenças significativas entre as atividades antitrombóticas de uma heparina não fracionada ($M_w = 16.000$ Da), uma heparina com massa intermediária ($M_w = 7.600$ Da) e outra com baixa massa molecular ($M_w = 4.600$ Da). E, Bianchini *et al.* (1985) relataram que a atividade

antitrombótica não está diretamente relacionada com a massa molecular e também não tem uma relação direta com a atividade anticoagulante *in vitro*.

Em nossos resultados não existe uma correlação direta entre a massa molecular, o efeito antitrombótico da amostra e sua atividade anticoagulante *in vitro*, uma vez que entre as heparinas bovinas, a que apresentou melhor efeito antitrombótico foi a fração de alta massa molecular (B-HMWH), e entre as heparinas suínas foi a heparina não fracionada (S-UFH).

Baseando-se nos resultados apresentados, a atividade antitrombótica possivelmente é dependente, principalmente, da estrutura química fina da heparina, o que pode variar significativamente conforme a fonte de obtenção, métodos de extração, purificação e fracionamento. E, talvez heparinas extraídas de uma mesma fonte sejam constituídas por famílias de moléculas que divergem tanto na massa molecular, quanto na estrutura ou disposição de seus monossacarídeos.

6.4 EFEITO ANTICOAGULANTE, *EX VIVO*, APÓS INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DAS HEPARINAS

Normalmente, heparinas de baixa massa molecular mostram efeitos quando administradas subcutaneamente. Neste teste nós avaliamos se as frações de baixa massa molecular geradas pela ultrafiltração também podem ser absorvidas por esta via de administração em ratos. Os resultados são expressos pela razão de T_1/T_0 , onde T_1 equivale ao tempo de aPTT na presença de heparina e T_0 equivale ao tempo de aPTT na ausência de heparina (18,75 s).

Para a heparina suína S-LMWH (750 UI/kg), o aumento do aPTT em relação ao grupo controle foi de 3,9 e 1,9 vezes, 2 e 3 h após sua administração subcutânea. Contudo, neste caso, o resultado obtido com a fração S-LMWH foi muito semelhante ao da amostra não fracionada S-UFH, como pode ser observado na Figura 10A.

Em relação às amostras bovinas, após 2 h da administração subcutânea de B-LMWH (750 UI/kg), o aPTT do plasma dos animais aumentou 6,8 vezes, quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas PBS. E, após 3 h o aPTT ainda foi 4,5 vezes maior que o controle (Figura 10B). Portanto, é possível concluir que a absorção e a biodisponibilidade da heparina bovina de baixa massa molecular B-LMWH é maior do que a da heparina suína de baixa massa molecular S-LMWH, quando administradas por via subcutânea.

As heparinas comerciais de baixa massa molecular Clexane e Fragmin foram submetidas ao mesmo teste, porém na concentração de 300 UI/kg, pois na concentração de 750 UI/kg elas inibiram completamente a coagulação, ou seja, o tempo de coagulação foi superior a 300 s, que representa o tempo máximo de detecção registrado no coagulômetro utilizado no teste. O Clexane (300 UI/kg) aumentou 3,5 e 3,3 vezes o aPTT, 2 e 3 h após sua administração subcutânea. E, o Fragmin (300 UI/kg) aumentou 4,4 e 5,2 vezes o aPTT, 2 e 3 h após sua administração (Figura 10).

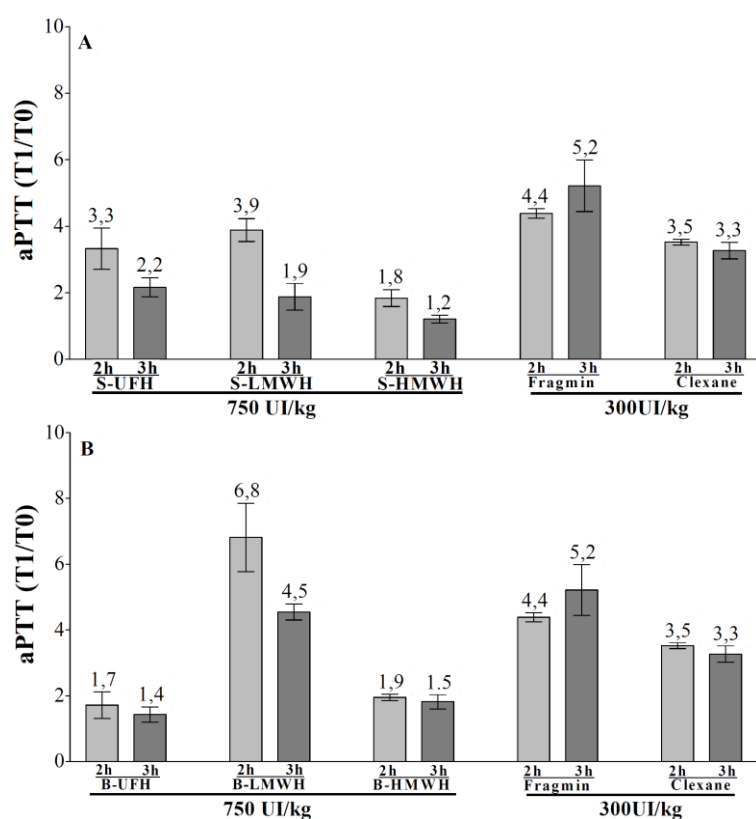


FIGURA 10 – EFEITO NA COAGULAÇÃO DO PLASMA DE RATOS, 2 E 3 h APÓS INJEÇÃO SUBCUTÂNEA DE HEPARINA

A – Heparinas Suínas e Padões de baixa massa molecular; B – Heparinas Bovinas e Padões de baixa massa molecular; T₁ – tempo de aPTT na presença de heparina; T₀ – tempo de aPTT na ausência de heparina (18,75 s).

Neste experimento também foi observado que a atividade de B-LMWH e S-LMWH diminuíram ao decorrer do tempo, de 2 para 3 h após suas administrações, o que sugere que as amostras estão sendo gradativamente biodegradadas e/ou excretadas. Isso não foi observado para os padrões de baixa massa molecular (Clexane e Fragmin).

Com este teste pôde-se comprovar que com a simples separação física da heparina não fracionada, por ultrafiltração, é possível obter uma fração com potencial atividade clínica

quando administrada por via subcutânea. Também é importante ressaltar que para as amostras testadas, com exceção das amostras comerciais, todas reduziram sua atividade com o decorrer do tempo. Além disso, o teste foi padronizado em UI, o que faz com que seja necessária uma menor quantidade (mg) das frações de baixa massa molecular S-LMWH (5,57 mg) e B-LMWH (7,22 mg) (quantidade necessária para se ter 750 UI) para que exerçam atividade semelhante ou superior às amostras comerciais Clexane (20,49 mg) e Fragmin (10,85 mg) (quantidade necessária para se ter 300 UI).

6.5 COMPARAÇÃO ESTRUTURAL DAS HEPARINAS POR RMN

A partir das áreas dos sinais obtidos no espectro de HSQC, referentes à região anomérica das heparinas (Figura 11), foi realizada a correlação dos componentes principais referente às unidades de Glucosamina e Ácido Urônico, e à *Linkage Region*.

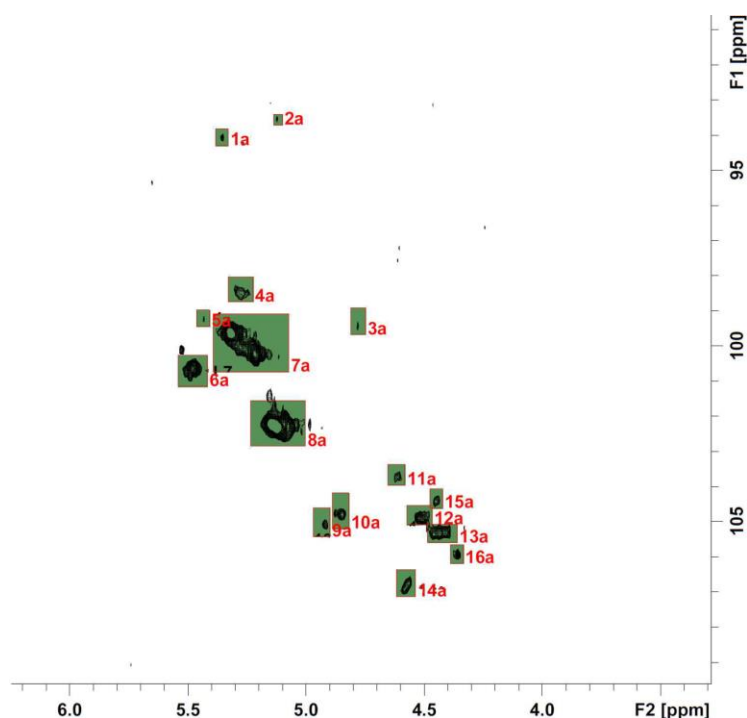


FIGURA 11: REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DE B-UFH

(1) ANS $_{\alpha\text{-red}}$ – Unidade terminal redutora α -GlcNSO $_3$; (2) ANAc $_{\alpha\text{-red}}$ – Unidade terminal redutora α -GlcNAc; (3) ANS $_{\beta\text{-red}}$ – Unidade terminal redutora β -GlcNSO $_3$; (4) ANS-I – GlcNSO $_3$ -IdoA; (5) A* – GlcNSO $_3$ 3,6SO $_3$; (6) ANS-G – GlcNSO $_3$ -GlcA; (7) ANAc-G – GlcNAc-GlcA e ANS-I2S – GlcNSO $_3$ -IdoA2SO $_3$; (8) I2S – IdoA2SO $_3$; (9) I-A6S – IdoA-GlcN6SO $_3$; (10) I-A – IdoA-GlcN; (11) G-A* – GlcA-GlcNSO $_3$ 3,6SO $_3$; (12) G-ANS – GlcA-GlcNSO $_3$; (13) G-ANAc – GlcA-GlcNAc; (14) G-Gal – GlcA-Gal; (15) Gal – galactose; (16) Xyl – xylose.

A tabela 3 mostra a proporção dos componentes principais nas amostras não fracionadas (B-UFH e S-UFH). Foram considerados como 100% os 3 principais grupos de componentes (Glucosaminas¹, Ácidos Urônicos² e *Linkage Region*³). Para determinar quantas vezes as frações são diferentes em relação à respectiva heparina não fracionada, foi calculada a razão entre a área dos componentes principais de cada fração (B-LMWH, B-HMWH, S-LMWH e S-HMWH) (LWMH ou HMWH) em relação à área dos componentes principais da amostra não fracionada (UFH). Quanto mais próximo de 1 menor é a variação da proporção do respectivo componente quando comparado à heparina não fracionada.

A partir disso, pôde-se observar alterações significativas para a fração B-LMWH em relação a B-UFH (Tabela 3). Por exemplo, na região das Glucosaminas a quantidade dos componentes $ANS_{\alpha\text{-red}}$ e $ANAc_{\alpha\text{-red}}$ de B-LMWH correspondem a 2,81 e 1,96 vezes àquela de B-UFH, respectivamente. Além disso, na região de Ácidos Urônicos a quantidade dos componentes I-A6S e I-A de B-LMWH correspondem a 0,86 e 0,70 vezes àquela de B-UFH, respectivamente. Por outro lado, a quantidade dos componentes G-A* e G-ANS correspondem a 1,73 e 1,53 vezes àquela de B-UFH, respectivamente. Com relação à fração B-HMWH, foi observado que ela manteve-se mais parecida com B-UFH (Tabela 3).

Para as heparinas de origem suína, ambas as frações S-LMWH e S-HMWH tiveram grandes variações em relação a S-UFH (Tabela 3). Por exemplo, para a fração S-LMWH, na região de Glucosaminas, a quantidade dos componentes $ANS_{\alpha\text{-red}}$ e $ANAc_{\alpha\text{-red}}$ representam 3,11 e 4,40 vezes àquela de S-UFH, respectivamente e, a quantidade de $ANS_{\beta\text{-red}}$ e A*, apenas 0,35 e 0,70 vezes, respectivamente. Na região de Ácidos urônicos praticamente todos os compostos variaram em relação à S-UFH. Para a fração S-HMWH, na região de Glucosaminas, a quantidade do componente $ANAc_{\alpha\text{-red}}$ corresponde a 2,59 vezes àquela de S-UFH, e a quantidade de $ANS_{\beta\text{-red}}$, apenas 0,50 vezes.

TABELA 3: COMPONENTES PRINCIPAIS DAS HEPARINAS DE ALTA E BAIXA MASSA MOLECULAR OBTIDAS APÓS ULTRAFILTRAÇÃO

		Razão Fração/B-UFH ^(b)			Razão Fração/S-UFH ^(b)		
		% B-UFH ^(a)	B-LMWH	B-HMWH	% S-UFH ^(a)	S-LMWH	S-HMWH
Glucosaminas ¹	ANS _{α-red}	1,18	↑ 2,81	↓ 0,82	1,05	↑ 3,11	= 1,00
	ANAc _{α-red}	0,52	↑ 1,96	= 1,05	0,22	↑ 4,40	↑ 2,59
	ANS _{β-red}	1,50	↓ 0,65	= 1,00	2,27	↓ 0,35	↓ 0,50
	ANS-I	4,28	↑ 1,08	= 1,04	6,66	= 1,01	↑ 1,17
	A*	1,09	↑ 1,20	↑ 1,26	5,84	↓ 0,70	↓ 0,89
	ANS-G	14,15	↓ 0,90	= 0,95	9,08	= 0,99	↑ 1,15
	ANAc-G	77,28	= 0,98	= 1,01	74,88	= 1,00	= 0,99
	ANS - I2S						
Ácidos Urônicos ²	I2S	78,90	↓ 0,94	= 0,99	80,36	= 0,97	= 1,00
	I-A6S	2,37	↓ 0,86	↓ 0,69	4,29	↑ 1,21	↑ 1,13
	I-A	4,15	↓ 0,70	= 1,03	2,54	↓ 0,73	↓ 0,90
	G-A*	1,76	↑ 1,73	= 1,03	2,31	↓ 0,80	↑ 1,42
	G-ANS	4,62	↑ 1,53	= 1,04	5,96	↑ 1,30	↓ 0,91
	G-ANAc	8,19	↑ 1,30	↑ 1,10	4,55	↑ 1,25	↓ 0,92
LR ³	G-Gal	53,14	= 1,03	= 1,03	60,73	↓ 0,79	↓ 0,86
	Gal	22,07	↑ 1,18	↑ 1,19	30,40	↑ 1,12	↓ 0,77
	Xyl	24,79	↓ 0,77	↓ 0,76	8,87	↑ 2,00	↑ 2,74

a) Proporção dos principais componentes nas heparinas não fracionadas, 100% equivale ao total de 1 – Glucosamina, 2 – Ácidos Urônicos e 3 – LR (*Linkage Region*); b) Número de vezes que as frações aumentaram ↑ ou diminuíram ↓ em relação ao respectivo não fracionado; ANS_{α-red} – reducing end-unit of α-GlcNSO₃; ANAc_{α-red} – reducing end-units of α-GlcNAc; ANS_{β-red} – reducing end-unit of β-GlcNSO₃; ANS-I – GlcNSO₃-IdoA; A* – GlcNSO₃3,6SO₃; ANS-G – GlcNSO₃-GlcA; ANAc-G – GlcNAc-GlcA; ANS-I2S – GlcNSO₃-IdoA2SO₃; I2S – IdoA2SO₃; I-A6S – IdoA-GlcN6SO₃; I-A – IdoA-GlcN; G-A* – GlcA-GlcNSO₃3,6SO₃; G-ANS – GlcA-GlcNSO₃; G-ANAc – GlcA-GlcNAc; G-Gal – GlcA-Gal; Gal – galactose; Xyl – xylose.

Para os dados que se referem aos componentes dos terminais redutores (ANS_{α-red}, ANAc_{α-red} e ANS_{β-red}), os resultados das heparinas bovinas foram como o esperado, uma vez que em heparinas de menor massa molecular (B-LMWH) se esperava encontrar uma quantidade maior de terminais redutores do que em heparinas de massas maiores (B-UFH e B-HMWH). Já para as heparinas suínas esses dados não foram exatamente como esperados, uma vez que a fração S-HMWH teve um aumento na quantidade de um dos componentes dos terminais redutores (ANAc_{α-red}) em relação à S-UFH. Deste modo uma investigação mais detalhada destes dados se faz necessária para explicar esse resultado.

Diversos estudos mostram a importância da presença do dissacarídeo GlcA-GlcNSO₄3,6SO₄ (G-A*) em amostras de heparina, pois este é um indicativo da presença do pentassacarídeo relacionado ao sítio de ligação da heparina à antitrombina (pentassacarídeo

específico – AGAIA). Sendo assim, a presença deste dissacarídeo pode estar relacionada à afinidade da heparina à antitrombina (BISIO *et al.*, 2009; KUSCHE *et al.*; 1990).

Para as amostras suínas pôde-se observar que este fato é refletido diretamente na atividade anticoagulante da amostra, uma vez que S-UFH possui atividade de 171,78 UI/mg e o dissacarídeo G-A* representa 2,31 % do total de ácidos urônicos e a fração S-HMWH, com 175,66 UI/mg de atividade, apresenta um aumento na proporção do mesmo dissacarídeo, sendo de 1,42 vezes àquela da amostra não fracionada (S-UFH). Por outro lado, a fração S-LMWH, com atividade de 134,60 UI/mg, teve diminuição da proporção deste dissacarídeo, cuja quantidade foi equivalente a 0,80 vezes àquela de S-UFH. Estes dados mostram que entre as heparinas suínas, as famílias com massas molares diferentes apresentam diferente afinidade à antitrombina, que pode ser resultante da variação na proporção do pentassacarídeo responsável pela ligação da heparina à antitrombina.

Por outro lado, ao analisarmos os dados referentes às heparinas bovinas, esta relação direta entre aumento na proporção do dissacarídeo e aumento da atividade anticoagulante não é observada, uma vez que a quantidade do dissacarídeo G-A* em B-LMWH (103,85 UI/mg) é 1,73 vezes àquela observada em B-UFH (142,26 UI/mg) e, para B-HMWH (154,67 UI/mg) não é observada uma variação significativa na proporção de G-A* em relação à B-UFH. Estes resultados sugerem que as famílias de heparinas bovinas com massas molares diferentes não possuem relação direta do dissacarídeo G-A* com a unidade pentassacarídica, responsável pela ligação da heparina à antitrombina, diferindo das heparinas suínas.

A partir destes resultados, pôde-se observar que as diferentes heparinas geradas pela ultrafiltração não diferem apenas na atividade anticoagulante e na massa molecular, mas também diferem na proporção relativa dos tipos de suas unidades monossacarídicas. Essas variações naturais (massa molar e proporção dos monossacarídeos) existentes entre as heparinas são, provavelmente, responsáveis pela variação da atividade e comportamento apresentados por elas neste trabalho.

7 CONCLUSÕES

A análise das atividades anticoagulante e antitrombótica das heparinas bovina e suína com diferentes massas moleculares, associada à comparação estrutural por RMN, revelou que:

- Frações com diferentes massas moleculares das heparinas bovina e suína, obtidas por ultrafiltração, apresentam diferenças estruturais quando comparadas com as respectivas heparinas não fracionadas.
- A ultrafiltração pode produzir uma fração com maior atividade anticoagulante (B-HMWH ou S-HMWH) quando comparada com a respectiva heparina não fracionada e outra que apresenta efeito anticoagulante quando subcutaneamente administrada (B-LMWH);
- O efeito anticoagulante obtido pela administração subcutânea das frações de baixa massa molecular, B-LMWH e S-LMWH, é obtido usando-se uma menor quantidade em peso de droga quando comparado às heparinas de baixa massa molecular comerciais (Clexane e Fragmin), em virtude da menor potência destas últimas.
- Não apenas a diferença de massa molecular, mas também as diferenças estruturais nativas inerentes à heparina devem estar relacionadas aos diferentes efeitos anticoagulante e antitrombótico de B-UFH, B-LMWH, B-HMWH e S-UFH, S-LMWH, S-HMWH.

REFERÊNCIAS

- AGNELLI, G.; SONAGLIA, F. Prevention of venous thromboembolism. **Thrombosis Research**, v. 97, p. V49-V62, 2000.
- 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. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, p. 1209-1214, 1994.
- BIANCHINI, P.; OSIMA, B.; PARMA, B.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* antithrombotic activity of heparin fractions and related compounds. Heparan sulfate as an antithrombotic agent *in vivo*. **Thrombosis Research**, v. 40, p. 597-607, 1985.
- BISIO, A.; VECCHIETTI, D.; CITTERIO, L.; GUERRINI, M.; RAMAN, R.; BERTINI, S.; EISELE, G.; NAGGI, A.; SASISEKHARAN, R.; TORRI, G. Structural features of low-molecular-weight heparins affecting their affinity to antithrombin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, p. 865-873, 2009.
- BOMBELLI, T.; SPAHN, D. R. Updates in perioperative coagulation; physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. **British Journal of Anaesthesia**, v. 93, p. 275-287, 2004.
- BRATT, G.; TORNEBOHM, E.; WIDLUND, L.; LOCKNER, D. Low molecular weight heparin (KABI 2165, fragmin): pharmacokinetics after intravenous and subcutaneous administration in human volunteers. **Thrombosis Research**, v. 42, p. 613-620, 1986.
- BRIEGER, D. B.; MAK, K.; KOTTKE-MARCHANT, K.; TOPOL, E. J. Heparin-induced thrombocytopenia. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 31, p. 1449-1459, 1998.
- BROOKS, M. B.; STOKOL, T.; CATALFAMO, J. L. Comparative Hemostasis: Animal Models and New Hemostasis Tests. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, p. 139-159, 2011.
- CALABRESE, G. C.; RECONDO, E. F.; RECONDO, M. E. F. D. Antithrombin and first complement protein recognize the same active heparin fraction. **Thrombosis Research**, v. 105, p. 537-541, 2002.
- CARLSSON, P.; KJELLÉN, L. Heparin Biosynthesis. In: LEVER, R.; MULLOY, B.; PAGE, C. P. **Heparin – A Century of Progress**, Springer, 2012, p. 23-42.
- CASU, B. Structure and Active Domains of Heparin. In: GARG, H. G.; LINHARDT, R. J.; HALES C. A. **Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate**, Elsevier, 2005, p. 1-28.
- CATERINA, R. D.; HUSTED, S.; WALLENTIN, L.; ANDREOTTI, F.; ARNESEN, H.; BACHMANN, F.; BAIGENT, C.; HUBER, K.; JESPERSEN, J.; KRISTENSEN, S. D.; LIP, G. Y. H.; MORAIS, J.; RASMUSSEN, L. H.; SIEGBAHN, A.; VERHEUGT, F. W. A.;

WEITZ, J. I. General mechanisms of coagulation and targets of anticoagulation (Section I): Position paper of the ESC working group on thrombosis - task force on anticoagulants in heart disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 109, p.569-579, 2013.

COHEN, M. The role of low-molecular-weight heparins in arterial diseases: optimizing antithrombotic therapy. **Thrombosis Research**, v. 100, p. V131-V139, 2000.

COLMAN, R. W. Are hemostasis and thrombosis two sides of same coin?. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 493-495, 2006.

CRAWLEY, J. T. B.; LANE, D. A. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, p. 233-242, 2008.

CURRY, A. N. G.; PIERCE, J. M. T. Conventional and near-patient tests of coagulation. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 7, p. 45-50, 2007.

DESAI, U. R.; LINHARDT, R. Molecular weight of low molecular weight heparins by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 255, p. 193-212, 1994.

DESAI, U. R.; LINHARDT, R. Molecular weight of heparin using ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 212-215, 1995.

DOUTREMEPUICH, C.; BOUSQUET, F.; TOULEMONDE, F. Are molecular weight and anti-Xa activity sufficient to predict the antithrombotic power of heparin fractions. **Thrombosis Research**, v. 44, p. 709-712, 1986.

EYRE, L.; GAMLIN, F. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 11, p. 144-146, 2010.

FRANCO, R. F. Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 229-237, 2001.

GENTRY, P. A. Comparative aspects of blood coagulation. **The Veterinary Journal**, v. 168, p. 238-251, 2004.

GOTTI, R.; PARMA, B.; SPELTA, F.; LIVERANI, L. Affinity capillary electrophoresis in blinding study of antithrombin to heparin from different sources. **Talanta**, v. 105, p. 366-371, 2013.

GUNAY, N. S.; LINHARDT, R. J. Heparinoids: structure, biological activities and therapeutic applications. **Planta Medica**, v. 65, p. 301-306, 1999.

HEIT, J. A. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, p. 370-372, 2008.

HENNINK, W. E.; KLERX, J. P. A. M.; DIJK, H.; FEIJEN, J. Complement inhibitory and coagulant activities of fractionated heparin. **Thrombosis Research**, v. 36, p. 281-292, 1984.

HIRSH, J. Low-molecular-weight heparin: a review of the results of recent studies of the treatment of venous thromboembolism and unstable angina. **Circulation**, v. 98, p. 1575-1582, 1998.

HIRSH, J.; AKEN, W. G.; GALLUS, A. S.; DOLLERY, C. T.; CADE, J. F.; YUNG, W. L. Heparin kinetics in venous thrombosis and pulmonary embolism. **Circulation**, v. 53, p. 691-695, 1976.

HOFFMAN, M.; MONROE III, D. M. A cell-based model of hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.85, p. 958-965, 2001.

HOPPENSTEADT, D.; WALENGA, J. M.; FAREED, J. BICK, R. L. Heparin, low-molecular-weight heparins, and heparin pentasaccharide: Basic and clinical differentiation. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 17, p. 313-341, 2003.

HRICOVÍNI, M.; GUERRINI, M.; BISIO, A.; TORRI, G.; PETITOU, M.; CASU, B. Conformation of heparin pentasaccharide bound to antithrombin III. **Biochemical Journal**, v.359, p. 265-272, 2001.

KAKKAR, A. K. Low- and ultra-low-molecular-weight heparins. **Best Practice & Research Clinical Hematology**, v. 17, p. 77-87, 2004.

KEARON, C. Natural history of venous thromboembolism. **Circulation**, v. 107, p. I22-I30, 2003

KORT, M.; BUIJSMAN, R. C.; BOECHEL, C. A. A. Synthetic heparin derivatives as new anticoagulant drugs. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 769-779, 2005.

KOTOKU, T.; YOSIZAWA, Z.; YAMAUCHI, F. Comparison of heparin specimens isolated from bovine, porcine and whale organs. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 120, p. 553-562, 1967.

KRISHNASWAMY, A.; LINCOFF, A. M.; CANNON, C. P. The use and limitations of unfractionated heparin. **Critical Pathways in Cardiology**, v. 9, n. 1p. 35-40, 2010.

KUSCHE, M.; TORRI, G.; CASU B.; LINDAHL U. Biosynthesis of heparin. Availability of glucosaminyl 3-O-sulfation sites. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 7292-7300, 1990.

LANE, D. A.; MACGREGOR, I. R.; VANROSS, M.; CELLA, G.; KAKKAR, V. V. Molecular weight dependence of the anticoagulant properties of heparin: intravenous and subcutaneous administration of fractionated heparins to man. **Thrombosis Research**, v. 16, p. 651-662, 1979.

LASKER, S. E.; STIVALA, S. S. Physicochemical studies of fractionated bovine heparin: I. Some dilute solution properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 115, p. 360-372, 1966.

LIBERTI, P. A.; STIVALA, S. S. Physicochemical studies of fractionated bovine heparin: II. Viscosity as a function ionic strength. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 119, p. 510-518, 1967.

LINHARDT, R. J. Heparin: structure and activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2551-2564, 2003.

MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**, v. 451, p. 914-918, 2008.

MAIMONE, M. M.; TOLLEFSEN, D. M. Activation of heparin cofactor II by heparin oligosaccharides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 152, p. 1056-1061, 1988.

MENAJOVSKY, L. B. Heparin-induced thrombocytopenia: clinical manifestations and management strategies. **The American Journal of Medicine**, v. 118, p. 21S-30S, 2005.

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. 42, p. 78-85, 2002.

MULLOY, B.; GRAY, J. H. E. Assays and reference materials for current and future applications of heparin. **Biologicals**, v. 38, p. 459-466, 2010.

MURRAY, R. K.; GRANNEER, D. K.; RODWELL, V. W. **Harper: bioquímica ilustrada**. MxGraw-Hill, 2007, 27. ed.

OCKELFORD, P. A.; CASTER, C. J.; MITCHELL, L.; HIRSH, J. Discordance between the anti-Xa activity and the antithrombotic activity of an ultra-low molecular weight heparin fraction. **Thrombosis Research**, v. 28, p. 401-409, 1982.

PATEL, S.; BERRY, L. R.; CHAN, A. K. C. Covalent antithrombin-heparin complexes. **Thrombosis Research**, v. 120, p. 150-160, 2007.

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.

PIAZZA, G.; GOLDHABER, S. Z. Acute pulmonary embolism: Part I: Epidemiology and diagnosis. **Circulation**, v. 114, p. e28-e32, 2006.

PREVITALI, E.; BUCCIARELLI, P.; PASSAMONTI, S. M.; MATINELLI, I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. **Blood Transfusion**, v.9, p. 120-138, 2011.

PROST, D. Heparin fractions and analogues: a new therapeutic possibility for thrombosis. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 7, p. 496-500, 1986.

RADOFF, S.; DANISHEFSKY, I. Isolation and properties of high molecular weight heparin. **Thrombosis Research**, v. 22, p. 353-365, 1981.

RAGAZZI, M.; FERRO, D. R.; PERLY, B.; SINAY, P.; PETITOU, M.; CHOAY, J. Conformation of the pentasaccharide corresponding to the binding site of heparin for antithrombin III. **Carbohydrate Research**, v. 195, p. 169-185, 1990.

RAGG, H. A new member of the plasma protease inhibitor gene family. **Nucleic Acids Research**, v. 14, p. 1073-1088, 1986.

REIS, C. V.; VIEIRA, L. M.; DUSSE, L. M. S.; COELHO, E. F.; FREITAS, M. L.; DINIZ, M. R.; COSTA, C. C.; CARVALHO, M. G. Evaluation of coagulation, fibrinolysis and protein C in risk patients and presenting coronarian diseases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p.7-13, 2003.

ROSENBERG, R. D.; ROSENBERG, J. S. Natural anticoagulant mechanism. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 74, p.1-6, 1984.

ROSENFELD, L.; PRIOR, M. T.; GIRARDI, L. M. Comparison of the separation of bovine heparin by strong anion exchange and by gel filtration chromatography. **Thrombosis Research**, v. 64, p. 203-211, 1991.

SAGRIPANTI, A.; CARPI, A. Natural anticoagulants, aging, and thromboembolism. **Experimental Gerontology**, v.33, p. 891-896, 1998

SAMPAIO, L. O.; TERSARIOL, I. L. S.; LOPES, C. C.; BOUÇAS, R. I.; NASCIMENTO, F. D.; ROCHA, H. A.; NADER, H. B. Heparins and heparan sulfates. Structure, distribution and protein interaction. In: VERLI H (Ed), INSIGHTS INTO CARBOHYDRATE STRUCTURE AND BIOLOGICAL FUNCTION. **Transworld Research Network**, Kerala, p. 1-24, 2006.

SOARES, A. L.; LASMAR, M. C.; GARCIA, M. L.; NOVELLI, B. A.; LAGES, G. F. L.; DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; FERNANDES, A. P. S. M.; SOUSA, M. O.; CARVALHO, M. G. Natural anticoagulation evaluation in type 2 diabetes. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 67-75, 2006.

SOMMERS, C. A.; YE, H.; KOLINSKI, R. E.; NASR, M.; BUHSE, L. F.; AL-HAKIM, A.; KEIRE, D. A. Characterization of currently marketed heparin products: analysis of molecular weight and heparinase-I digest patterns. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 2445-2454, 2011.

TEIEN, A. N.; ABILDGAARD, U.; HÖÖK, M.; LINDABL, U. Anticoagulant activity of heparin: assay of bovine, human and porcine preparations by amidolytic and clotting methods. **Thrombosis Research**, v. 11, p. 107-117, 1977.

THONG, C. L.; KAM, P. C. A. Heparin-induced thrombocytopenia. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 16, p.143-150, 2005.

TOLLEFSEN, D. M. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 454-460, 2007.

TOLLEFSEN, D. M.; PESTKA, C. A. Heparin cofactor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure. **Blood**, v. 66, p. 769-774, 1985.

TORRI, G.; GUERRINI, M. Quantitative 2D NMR analysis of glycosaminoglycans. In: Holzgrabe, U.; Wawer, I.; Diehl, B. **NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis**. Elsevier, 2008, p. 407-428.

TYRRELL, D. J.; ISHIHARA, M.; RAO, N.; HORNE, A.; KIEFER, M. C.; STAUBER, G. B.; LAM, L. H.; STACK, R. J. Structural and biological activities of a heparin-derivad hexasaccharide with high affinity for basic fibroblast growth factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 4684-4689, 1993.

VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina: The Journal of Retinal and Vitreous Diseases**, 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. **Thrombosis Research**, v. 54, p. 399-410, 1989.

VOGLER, E. A.; SIEDLECKI, C. A. Contact activation of blood-plasma coagulation. **Biomaterials**, v. 30, p. 1857-1869, 2009.

WALKER, F. J. Regulation of activated protein C by a new protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p. 5521-5524, 1980.

WARDA, M.; GOUDA, E. M.; TOIDA, T. CHI, L.; LINHARDT, R. J. Isolation and characterization of raw heparin from dromedary intestine: evaluations of a new source of pharmacological heparin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 136, p. 357-365, 2003.

WARDROP, D.; KEELING, D. The story of the discovery of heparin and warfarin. **British Journal of Haematology**, v. 141, p. 757-763, 2008

ZHANG, F.; YANG, B.; LY, M. SOLAKYILDIRIM, K.; XIAO, Z.; WANG, Z.; BEAUDET, J. M.; TORELLI, A. Y.; DORDICK, J. S.; LINHARDT, R. J. Structural characterization of heparins from different commercial sources. **Anal Bioanal Chemistry**, v. 401, p. 2793-2803, 2011.