



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

BRUNO PEDROSA FONTES

GALACTANA SULFATADA DA ALGA VERMELHA *Acanthophora muscoides*:
POTENCIAL ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICO

FORTALEZA

2012

BRUNO PEDROSA FONTES

GALACTANA SULFATADA DA ALGA VERMELHA *Acanthophora muscoides*:
POTENCIAL ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª Dra. Norma Maria Barros Benevides

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Antonio de Sousa Mourão

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

F764g Fontes, Bruno Pedrosa.
Galactana sulfatada da alga vermelha *Acanthophora muscoides* potencial anticoagulante e antitrombótico / Bruno Pedrosa Fontes – 2012.
87 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Antonio de Souza Mourão.

1. Atividades biológicas. 2. Polissacarídeos sulfatados. 3. Rodófitas. I. Título.

CDD 574.192

BRUNO PEDROSA FONTES

GALACTANA SULFATADA DA ALGA VERMELHA *Acanthophora muscoides*:
POTENCIAL ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

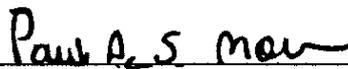
Aprovada em: 23/03/2012

BANCA EXAMINADORA



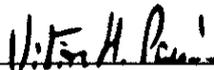
Prof. Dra. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Paulo Antonio de Sousa Mourão (Coorientador)

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Prof. Dr. Vitor Hugo Pomin

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À Profa. Norma M. B. Benevides, por esses cinco anos de convivência, aprendizagem, pelos incentivos, elogios que me fizeram ser sempre otimista e pelos puxões de orelha que tanto me fizeram crescer.

Ao Prof. Paulo A. S. Mourão por ter me recebido tão bem em seu laboratório, sempre disposto a ajudar com seus conselhos sempre valiosos.

Ao Prof. Vitor H. Pomin por ter me ajudado na caracterização da molécula e por ter me mostrando uma nova linha de pesquisa.

A todos do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) com quem tenho o prazer de conviver: Ana Luíza G. Quinderé, Antonio Neto, Antonio Wilame S. Alves, Chistiane O. Coura, Edfranck S. O. Vanderlei, Felipe B. Teles, Gabriela P. Almeida, Gabriele F. Maciel, Gardênia Prado, Ianna W. F. de Araújo, Ismael N. L. Queiroz, Jane F. T. Silva, Joana Trycia M. Alexandre, José Ariévilo G. Rodrigues, José G. Carneiro, Luana M. C. M. Silva, Natássia A. Ribeiro, Ticiania B. Lima, Ticiania M. Abreu e Ygor R. G. Eloy.

A todos do Laboratório de Tecido Conjuntivo (LABTEC), em especial aos alunos Gustavo R. C. Santos, Stephan Nicollas M. C. G. de Oliveira e Bruno C. Vairo, por terem abraçado o projeto com tanto entusiasmo e afinco.

Aos meus pais, Maria Angélica Pedrosa e João Fontes Neto, por sempre estarem ao meu lado, sempre me apoiarem em tudo e pelo seu amor incondicional.

À minha namorada Ana Luíza, por sempre estar ao meu lado, sempre me incentivando, pela paciência e por tudo que você representa hoje na minha vida.

RESUMO

Anticoagulantes atualmente disponíveis apresentam limitações significativas, o que demonstra a necessidade de agentes alternativos. Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante e/ou antitrombótica abrem novas perspectivas no tratamento de distúrbios tromboembólicos. No presente estudo, analisamos a atividade anticoagulante e antitrombótica da galactana sulfatada alga marinha vermelha *Acanthophora muscoides* (AmII). A atividade anticoagulante foi analisada através dos ensaios de TTPa, TTPa *ex vivo* e do tempo de recalcificação. Além disso, as proteases (IIa ou Xa) e inibidores da coagulação (AT ou HCII) foram utilizados para melhor avaliar a atividade anticoagulante. Modelos experimentais de trombose venosa e arterial foram utilizados para investigar o potencial antitrombótico da galactana sulfatada. O teste de ativação do fator XII também foi realizado. A investigação da interação AmII-antitrombina foi realizada através da medida de emissão de fluorescência. Além disso, AmII foi utilizada em ensaios de agregação plaquetária induzida por ADP ou por colágeno. A galactana sulfatada de *A. muscoides* apresentou baixo potencial anticoagulante no TTPa, TTPa *ex vivo* e no tempo de recalcificação quando comparada à heparina. A galactana sulfatada, somente em altas concentrações, apresentou um aumento na inibição da trombina mediada por AT ou HCII. Em contraste, quando o fator Xa foi utilizado como a protease alvo, a galactana apresentou efeito anticoagulante semelhante à heparina. Além disso, a galactana sulfatada mostrou-se um antitrombótico potente em doses baixas (até 0,5 mg/kg de peso corporal), em modelo trombose venosa, no entanto em doses elevadas, seu efeito antitrombótico foi reduzido. Na avaliação da trombose arterial, a galactana sulfatada apresentou efeito antitrombótico semelhante à heparina em todas as doses testadas. Em contraste com a heparina, a galactana sulfatada ativou fator XII e não apresentou tendência hemorrágica. Além disso, AmII não apresentou nenhum efeito sobre a agregação plaquetária e, em associação com antitrombina, não alterou a emissão de fluorescência, indicando que esta interação pode ocorrer por um mecanismo diferente da interação heparina-antitrombina. A galactana sulfatada da alga *A. muscoides* apresentou baixo potencial anticoagulante e elevado potencial antitrombótico. Esses resultados sugerem que esta galactana abre novas perspectivas para um possível desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

Palavras-chave: atividades biológicas, polissacarídeos sulfatados, rodófitas.

ABSTRACT

Currently available anticoagulants have significant limitations, which demonstrate the necessity of alternative agents. Sulfated polysaccharides from marine algae with anticoagulant and/or antithrombotic activities open new perspectives in the treatment of thromboembolic disorders. In the present study, we analyzed the anticoagulant and the antithrombotic activities of a sulfated galactan from the marine red alga *Acanthophora muscoides* (AmII). The anticoagulant activity was analyzed using the aPTT, the aPTT *ex vivo* and the recalcification time assays. In addition, specific proteases (IIa or Xa) and coagulation inhibitors (AT or HCII) were used to further investigate the anticoagulant activity. Experimental models of venous and arterial thrombosis were used to investigate the antithrombotic potential of the sulfated galactan. The factor XII activation assay was also performed. The AmII-antithrombin interaction was analyzed by measures of fluorescence emissions. Furthermore, AmII was used in ADP or collagen-induced platelet aggregation assays. The sulfated galactan from *A. muscoides* presented a lower anticoagulant activity on aPTT, the aPTT *ex vivo* and the recalcification time assays when compared with heparin. The sulfated galactan only enhanced the thrombin inhibition mediated by AT or HCII at high concentrations. In contrast, when factor Xa was used as the target protease, the sulfated galactan from *A. muscoides* presented a potent anticoagulant effect, similar to heparin. In addition, the sulfated galactan was shown to be a very potent antithrombotic agent in low doses (up to 0.5 mg/kg body weight), on venous thrombosis model, but these effects were reduced in higher doses. In the arterial experimental thrombosis, the sulfated galactan had antithrombotic effect similar to heparin at all doses tested. In contrast with heparin, the sulfated galactan activated factor XII, but the sulfated galactan did not present hemorrhagic effect in rats. In addition, AmII had no effect on platelet aggregation, and AmII together with antithrombin did not alter the fluorescence emission, indicating that this interaction might occur by a different mechanism than heparin-antithrombin interaction. The sulfated galactan from alga *Acanthophora muscoides* presented low anticoagulant potential and potent antithrombotic effect. These results suggest that this sulfated galactan opens new perspectives for a possible development of new antithrombotic drugs.

Keywords: biological activities, rhodophyta, sulfated polysaccharides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Processo de adesão e agregação plaquetária	17
Tabela 1	Fatores da coagulação plasmática	19
Figura 2	Formação dos complexos dependentes de vitamina K e seus zimogênios.	21
Figura 3	Sistema de coagulação e alguns de seus inibidores	23
Figura 4	Representação esquemática da ativação na via de contato e sua ligação nos processos inflamatório	26
Figura 5	Representação esquemática da inibição do complexo TF-FVIIa pelo TFP	27
Figura 6	Ativação da proteína C na superfície de células endoteliais	29
Figura 7	Mecanismo de regulação da coagulação pela proteína C ativada	29
Figura 8	Estruturas de antitrombina sozinha e formando complexo com a região pentassacarída da heparina.	31
Figura 9	Modelo esquemático para a ativação de HCII	32
Figura 10	Sequência pentassacarídica da heparina	34
Figura 11	Estrutura do condroitim sulfato oversulfatado	36
Figura 12	Fotografia de um espécime da alga marinha <i>Acanthophora muscoides</i> (Linnaeus) Bory de Saint-Vincent.	45
Figura 13	Esquema ilustrativo do modelo experimental de trombose venosa	48
Figura 14	Esquema ilustrativo do modelo do efeito hemorrágico	52
Figura 15	Atividade anticoagulante pelo teste de TTPa	55
Tabela 2	Potenciais anticoagulantes de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas vermelhas	
Figura 16	Teste do TTPa <i>ex vivo</i>	56
Figura 17	Efeitos antitrombóticos na trombose venosa	58
Tabela 3	Potenciais antitrombótico de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas vermelhas	58

Figura 18	Ensaio do tempo de recalcificação	01
Figura 19	Efeito dos polissacarídeos sulfatados na ativação do fator XII	62
Figura 20	Curva de inativação da trombina pela antitrombina	64
Figura 21	Curva de inativação da trombina pelo cofator II da heparina	64
Figura 22	Curva de inativação do fator Xa pela antitrombina	65
Figura 23	Modificações na fluorescência da antitrombina induzida por heparina ou AmII	67
Figura 24	Efeitos antitrombóticos na trombose arterial	69
Figura 25	Efeito hemorrágico	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmII	Fração polissacarídica sulfatada eluída com 0,75 M de NaCl da alga <i>Acanthophora muscoides</i>
ADP	Adenosina difosfato
APC	Proteína C ativada
AT	Antitrombina
CSOS	Condroitim sulfato oversulfatado
EPCR	Receptor endotelial de proteína C
F	Fibrinogênio
FVac	FV exercendo função anticoagulante
fucCS	Condroitim Sulfato Fucosilado
FpA e FpB	Fibrinopeptídeos A e B
GTP	Guanosina trifosfato
GAG	Glicosaminoglicano
HCII	Cofator II da heparina
HEP	Heparina não fracionada
I.V.	Via Intravenosa
LMWH	Cinogênio de alto peso molecular
OSCS	Condroitim oversulfatado
PG	Proteoglicano
RCL	Centro reativo em forma de laço da AT
TF	Fator Tecidual

TIH	Trombocitopenia induzida por heparina
TM	Trombomodulina
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
vWF	Fator de Von-Willebrand

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Algas marinhas	14
1.2 Hemostasia	15
<i>1.2.1 Agregação Plaquetária</i>	16
<i>1.2.1.1 Adesão</i>	16
<i>1.2.1.2 Ativação</i>	17
<i>1.2.1.3 Secreção</i>	18
<i>1.2.1.4 Agregação</i>	18
<i>1.2.2 Sistema de coagulação</i>	18
<i>1.2.2.1 Via de Contato</i>	24
<i>1.2.2.2 Inibidores da sistema de coagulação</i>	27
<i>1.2.2.2.1 Inibidor da via do fator tecidual</i>	27
<i>1.2.2.2.2 Proteína C</i>	27
<i>1.2.2.2.3 Antitrombina</i>	30
<i>1.2.2.2.4 Cofator II da heparina</i>	31
1.3 Polissacarídeos sulfatados	33
<i>1.3.1. Heparina</i>	33
<i>1.3.1.1 Heparina de baixo peso molecular</i>	34
<i>1.3.1.2 Efeitos adversos da heparina</i>	34
<i>1.3.1.3 Problemas apresentados pela heparina comercial</i>	35
<i>1.3.2 Galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas</i>	37
<i>1.3.1.1 Características estruturais</i>	37
<i>1.3.1.2 Atividades anticoagulante e antitrombóticas</i>	38

<i>1.3.1.3 Outras atividades biológicas</i>	41
2. OBJETIVOS	44
2.1. Geral	44
2.2 Objetivos específicos	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Materiais	45
<i>3.1.1 Alga marinha</i>	45
<i>3.1.2 Animais</i>	46
3.2 Métodos	46
<i>3.2.1 Obtenção da fração polissacarídica sulfatada</i>	46
<i>3.2.2 Atividade anticoagulante in vitro</i>	46
<i>3.2.3 Ação anticoagulante ex vivo</i>	47
<i>3.2.4 Atividade antitrombótica in vivo em modelos venoso</i>	47
<i>3.2.5 Tempo de recalcificação</i>	49
<i>3.2.6 Ativação do fator XII na presença de polissacarídeos sulfatados</i>	49
<i>3.2.7 Inibição da trombina ou fator Xa por AT ou HCII na presença de polissacarídeos sulfatados</i>	50
<i>3.2.8 Modificação da fluorescência intrínseca da antitrombina induzida por heparina e AmII</i>	50
<i>3.2.9 Ensaio da atividade antitrombótica no modelo de injúria do endotélio arterial induzido pelo FeCl₃</i>	51
<i>3.2.10 Efeito hemorrágico</i>	51
<i>3.2.11 Ensaio de agregação plaquetária</i>	52

<i>3.2.12 Análise estatística</i>	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados	54
<i>4.1.1 Teste do TTPa</i>	54
<i>4.1.2 Teste do TTPa ex vivo</i>	56
4.2 Atividade antitrombótica in vivo em modelo venoso	57
4.3 Tempo de recalcificação	60
4.4 Ativação do fator XII na presença de polissacarídeos sulfatados	61
4.5 Inibição da trombina ou fator Xa por AT ou HCII na presença de polissacarídeos sulfatados	63
4.6 Avaliação das mudanças da fluorescência intrínseca da antitrombina induzida por heparinas e galactana sulfatada	66
4.7 Atividade antitrombótica in vivo em modelo arterial	68
4.8 Efeito hemorrágico	70
4.9 Ensaio de agregação plaquetária	71
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
6. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Algas marinhas

O termo alga não está intimamente relacionado à um grupo filogenético, mas a uma diversidade de organismos fotossintéticos, portanto a sua definição é difícil. Os organismos deste taxon compartilham apenas algumas características: o sistema de fotossíntese baseado em clorofila a; a não formação de embriões; a ausência de raízes, caules, folhas e tecidos vasculares; e ausência de células estéreis com função de proteção e ausência de preenchimento nas estruturas reprodutivas, sendo estas compostas por células que são potencialmente férteis (BRUNSWICK; JOHN, 2009).

Durante muito tempo, as algas foram agrupadas em um grupo natural, que agora, especialmente, com o progresso em técnicas moleculares, tem-se mostrado como não apresentando nenhuma coesão real, mas possuindo representantes em quatro dos cinco reinos (Monera, Protista, Fungi, Plantae). Durante sua evolução, as algas se tornaram um grupo muito diverso de fotoorganismos, cujas origens variadas refletiram-se na grande diversidade de tamanho, estrutura celular, níveis de organização e de morfologia, ciclo de vida, pigmentos fotossintetizantes, polissacarídeos de reserva e estruturais, ecologia e habitats (BRUNSWICK; JOHN, 2009).

Atualmente, existem cerca de 36000 espécies de algas taxonomicamente classificadas, representando apenas cerca de 17% das espécies de algas existentes, o que dá uma medida de nosso conhecimento rudimentar sobre este grupo de organismos. (CHOPIN, SAWHNEY 2009). Dentre as nove principais divisões de algas, as três mais estudadas são: Rhodophyta (algas vermelhas), Chlorophyta (algas verdes) e Phaeophyta (algas pardas), sendo as duas primeiras agrupadas no supergrupo Archaeplastida e esta no supergrupo Alveolata (PARFREY *et al*, 2006).

O filo Rhodophyta é formado quase que exclusivamente por organismos pluricelulares e marinhos, que vivem fixados em um substrato e que apresentam maior distribuição em mares quentes. A principal característica deste filo é a presença do pigmento ficoeritrina em suas células, responsável pela coloração avermelhada destes

organismos. As algas vermelhas possuem clorofilas a, d e carotenóides, e armazenam amido como material de reserva (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

O filo Phaeophyta é formado por organismos pluricelulares predominantemente marinhos e com maior distribuição em regiões temperadas e nos polos, vivendo fixados em um substrato ou flutuando. Em algumas regiões, as algas pardas podem atingir mais de 25 m, formando imensas florestas submersas conhecidas como *kelps*. Seus pigmentos fotossintetizantes são principalmente as clorofilas a, b, carotenoides e fucoxantina, e como substâncias de reserva possuem óleos e o polissacarídeo laminarina (DAVIS; VOLESKY; MUCCI, 2003; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

O filo Chlorophyta é um dos mais importantes componentes do fitoplâncton e extremamente importante na produção de oxigênio. Seu habitat inclui águas doces e salgadas, solos úmidos e troncos, e podem também estabelecer relações de mutualismo com outros seres vivos, como os fungos, formando os líquens. Seu carboidrato de reserva é o amido, que é armazenado no interior de suas células, e seus pigmentos fotossintetizantes são principalmente as clorofilas a, b, carotenos e xantofilas. Devido à presença de clorofilas a e b e utilização o amido como carboidrato de reserva, existe uma hipótese de que as algas verdes tenham sido as ancestrais das plantas (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

A importância ecológica das algas vai muito além de servir como produtor primário nos ecossistemas marinhos. Na verdade, aproximadamente 50% da fotossíntese global é realizada pelas algas. Assim, uma em cada duas moléculas de oxigênio que inalamos, é produzida fotossinteticamente pelas algas, e uma em cada duas moléculas de dióxido de carbono que exalamos será absorvida pelas algas (BRUNSWICK; JOHN, 2009).

1.2 Hemostasia

A hemostasia é descrita como o processo fisiológico para a cessação do sangramento ocasionado por uma lesão em um vaso sanguíneo. Após uma ruptura do tecido epitelial vascular, uma rápida e complexa reação é disparada, levando a

transformação do sangue da forma líquida a um tampão hemostático insolúvel, i.e., ocorre a formação de um trombo no local de injúria do tecido e à medida que ocorre a cicatrização da lesão, o agregado plaquetário e o coágulo de fibrina são degradados. A hemostasia é, portanto, designada para minimizar a perda de sangue, restaurar a integridade vascular e, por fim, preservar a vida (EYRE; GRAMLIN, 2010).

O processo hemostático inicia-se após a lesão do vaso. As plaquetas aderem a macromoléculas em tecidos subendoteliais e agregam para formar um tampão hemostático. Em seguida, as plaquetas estimulam a ativação local de fatores de coagulação plasmáticos, levando à geração de um coágulo de fibrina que reforça a agregação plaquetária. Uma vez completo o processo de cicatrização, tanto o tampão hemostático, como o coágulo de fibrina são degradados (SCHOENMAKERS; REITSMA; SPEK, 2005).

1.2.1 Agregação Plaquetária

Plaquetas são fragmentos de células anucleadas, em forma de disco, derivadas dos megacariócitos e de tamanho que varia de 2 à 4 μ m de diâmetro. Seu tempo de vida gira entorno de 8 a 14 dias. Em circunstâncias normais, elas circulam livremente, sem interação. No entanto, na presença de uma lesão endotelial, é desencadeada uma cadeia de eventos, levando a formação de um coágulo rico em plaquetas. Didaticamente o papel das plaquetas na hemostasia é dividido em quatro etapas: adesão, ativação, secreção e agregação (EYRE; GAMLIN, 2010).

1.2.1.1 Adesão

É a etapa inicial no processo hemostático. Nesta etapa, as plaquetas aderem avidamente ao endotélio, quando este está danificado ou quando são expostas a componentes subendoteliais como o colágeno. Essa aderência é mediada através de sítios de ligação modificados da parede dos vasos a glicoproteínas específicas da

membrana das plaquetas. O colágeno liga-se às plaquetas através da glicoproteína VI ou através de uma ligação mediada pelo fator de von Willebrand (vWF) e a glicoproteína GPIb/IX/V, formando um ponte entre o colágeno e as plaquetas (colágeno - vWF - GPIb/IX/V- plaquetas). As plaquetas ligam-se a uma rede de fibrinogênio através da glicoproteína IIb/IIIa (Figura 1). O fator de von Willebrand é uma glicoproteína multimérica presente no plasma e produzida constitutivamente no endotélio, megacariócitos e células sub-endoteliais do tecido conjuntivo (EYRE; GAMLIN, 2010).

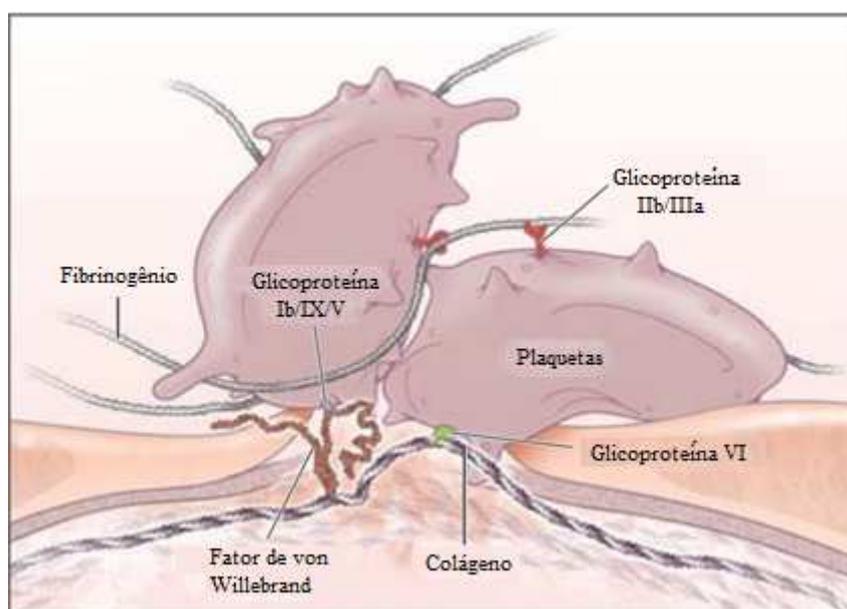


Figura 1 - Processo de adesão e agregação plaquetária. Ligação do colágeno com as plaquetas através da glicoproteína VI ou através de uma ligação mediada pelo fator de von Willebrand (vWF) e a glicoproteína GPIb/IX/V. Ligação entre plaquetas e a rede de fibrinogênio através da glicoproteína IIb/IIIa. Fonte: Borissoff, Spronk e Cate, (2011).

1.2.1.2 Ativação

Após a adesão, uma série de agonistas bioquímicos, como colágeno, trombina, e outros produzidos pelas próprias plaquetas como a adenosina difosfato (ADP), ligam-se a receptores glicoprotéicos e iniciam o sinal de transdução através da membrana das plaquetas por mensageiros secundários. Um dos principais eventos resultantes da etapa de ativação é a mudança conformacional nas plaquetas, que passam da forma de disco

para esférica, com a formação de pseudópodes, permitindo um maior contato com outras plaquetas. Esse processo pode ser facilitado por um aumento do cálcio intracelular. Finalmente, como resultado da ativação, ocorre um aumento na secreção de grânulos e na agregação plaquetária (EYRE; GAMLIN, 2010).

1.2.1.3 Secreção

As plaquetas contêm dois tipos de grânulos de armazenamento, os grânulos α e os corpos densos. Os grânulos α contêm proteínas plaquetárias específicas como o fator de crescimento derivado de plaquetas, glicoproteínas como a trombospondina e uma série de fatores da cascata de coagulação, incluindo as proteínas do fator V e da proteína S (EYRE; GAMLIN, 2010).

Os corpos densos contêm adeninas não-metabólicas como o ADP e a guanosina trifosfato (GTP), cátions divalentes Mg^{2+} , Ca^{2+} e serotonina. A secreção dos corpos densos promove a formação de um tampão plaquetário, aumentando o número de plaquetas adicionais para aderir, secretar e agregar (EYRE; GAMLIN, 2010).

1.2.1.4 Agregação

Após a ativação plaquetária, os receptores glicoprotéicos IIb/IIIa sofrem uma mudança conformacional, tornando-os capaz de ligar-se ao fibrinogênio, o que permite a formação de múltiplas ligações cruzadas estáveis com outras plaquetas adjacentes. Além disso, outros estímulos pró-agregatórios como o ADP e a fosfolipase A_2 também estão envolvidos na ativação das plaquetas (EYRE; GAMLIN, 2010).

1.2.2 Sistema de coagulação

O sistema de coagulação ocorre através de uma série de clivagens proteolíticas de zimogênios em enzimas. Esses zimogênios circulam livremente e em baixas concentrações na corrente sanguínea (Tabela 1). Uma vez disparado o estímulo pró-coagulatório, eles são ativados por seus predecessores. Os fatores são denominados por algarismos romanos e, uma vez ativados, são denominados pelos algarismos seguido da letra “a”. (FURIE; FURIE, 2005).

Tabela 1- Fatores da Coagulação Plasmática

Fator	Nomes Usuais	Peso Molecular (kDa)	Concentração Plasmática (mg/dl)
FI	Fibrinogênio	340	200-400
FII	Protrombina	72	12
FIII	Tromboplastina tecidual	-	-
FIV	Ion de cálcio divalente	-	2,2-2,5 mEq/l
FV	Proacelerin ou fator labile	330	0,4-1,4
FVII	Proconvertin ou fator estável	48	0,05-0,06
FVIII	Fator anti-hemofílico	1000-12000	0,5-1
FIX	Fator Christmas	57	0,4-0,5
FX	Fator Stuart prower	59	0,7-1,2
FXI	Antecedente Tromboplastina Plasmática	160	0,4-0,6
FXII	Fator Hageman	80	1,5-4,5
FXIII	Fator estabilizante da trombina	320	1-2
Pré-caliceína plasmática	Fator Fletcher	88	3,5-4,5
Cininogênio de alto peso molecular	Fitzgerald, Williams ou Fator Flaujeac	120	8-9
Plasminogênio	-	92	20

Fonte: Vogler e Siedlecki (2009)

Ideias atuais sobre os mecanismos de coagulação do sangue baseiam-se no modelo da cachoeira ou cascata introduzido na década de 1960. Tradicionalmente, a

coagulação foi dividida em vias: intrínseca, extrínseca e comum. Pensava-se que a via intrínseca era iniciada pela ativação de fatores de contato e envolvia a ativação subsequente de calicreína, FXII, FXI, FIX e, levando à ativação de FX. Enquanto, a via extrínseca é iniciada pela expressão do fator tecidual (TF) sobre a lesão tecidual e, após a formação do complexo de TF com FVII, também resulta na ativação de FX. Na via comum, FX ativado ativa protrombina levando a formação de fibrina (SCHOENMAKERS; REITSMA; SPEK, 2005).

No início de 1990, foi demonstrado que a trombina ativa diretamente FXI. Além disso, pacientes com deficiência severa de FVII podem sangrar, embora a via intrínseca esteja intacta. Da mesma forma, as complicações hemorrágicas graves associadas a deficiência de FVIII ou FIX não seria esperada se a via extrínseca sozinha fosse suficiente para alcançar a hemostase normal (SCHOENMAKERS; REITSMA; SPEK, 2005).

Embora o conceito de vias intrínseca e extrínseca distintas tenha servido por muitos anos como um modelo útil para a coagulação, as vias não são, de fato, redundante, mas estão interligadas (SCHOENMAKERS; REITSMA; SPEK, 2005). A hipótese atual sobre a iniciação da coagulação sanguínea após um lesão vascular, é tida portanto como a exposição TF do sangue levando a formação de um complexo com FVII circulante ou de sua forma ativa, FVIIa, para formar o complexo TF-FVIIa (Figura 2). Este complexo tem como duas das principais funções converter FX em sua forma ativada, FXa, e ativar o FIX (Figura 2) (MANN, 1997; DAHLBÄCK, 2000; SCHOENMAKERS; REITSMA; SPEK, 2005).

O TF é uma glicoproteína não-enzimática de 47kDa ligada à membrana, constitutivamente expressa na superfície de células que não estão normalmente em contato com o sangue, como fibroblastos, células musculares lisas e queratinócitos. Desta forma, o TF é exposto ao fluxo sanguíneo quando a vasculatura normal é rompida (SCHOENMAKERS; REITSMA; SPEK, 2005; SCHOUSBOE, 2008).

O FVII é um glicoproteína plasmática de 50 kDa gama-carboxilada dependente de vitamina K. O FVIIa sozinho apresenta pouca atividade proteolítica e sua plena atividade enzimática ocorre quando ligado a TF. Embora FVII seja ativado por FXa e trombina, quantidades vestigiais de FVIIa estão presentes no plasma continuamente

(SCHOENMAKERS; REITSMA; SPEK, 2005).

Além disso, as plaquetas que se tornaram ativadas pela ligação ao colágeno no subendotélio expõem fosfolípidos com carga negativa sobre as suas superfícies. Como consequência, a ativação de FVII é aumentada (SCHOUSBOE, 2008).

Os fatores FXa e o FIXa podem permanecer associados com o TF e rolar pelas células ou podem difundir-se no sangue e ligar-se aos fosfolípidos carregados negativamente expostos na superfície de células endoteliais ativadas ou na proximidade das plaquetas ativadas que foram atraídas ao local do dano vascular (MONROE *et al.*, 2002). A principal função do FXa formado nessa reação é a ativação de protrombina (FII) em trombina (FIIa), o que exige a formação do complexo protrombinase, constituído por FXa, cálcio e fosfolídeos (Figura 4 A). (BOUCHARD *et al.* 2007)

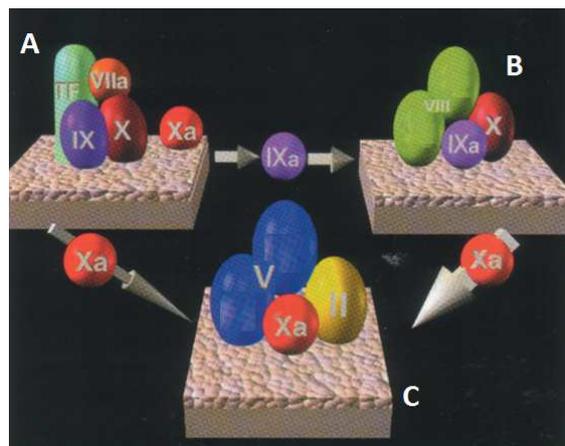


Figura 2 - Formação dos complexos dependentes de vitamina K e seus zimogênios. O início da coagulação sanguínea ocorre quando o FVIIa se liga ao TF exposto. A formação do complexo FVIIa - FT (tenase extrínseco, 3A) inicia a coagulação ativando o fator X e o fator IX. O complexo fator IXa - fator VIIIa (tenase intrínseco, 3B) ativa fator X em fator Xa com uma eficiência 50 vezes maior do que o complexo FVIIa - FT. O Fator Xa formado pelos complexos tenase se liga ao fator Va, formando o complexo protrombinase (3C), que converte protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). Fonte: Bouchard *et al.* (2007).

Uma fração das primeiras poucas moléculas de trombina geradas por este complexo protrombinase iniciam, por retroalimentação positiva, a ativação de vários fatores da cascata como FXIa, FVIIIa e FVa, que sustentam a sua própria formação e

facilitam o rápido crescimento do coágulo ou trombo em torno da área de dano vascular (Figura 2). A ativação do FXI à FXIa mediado pela trombina atua na ativação de mais FXa tendo como cofator o FVIIIa (MINNEMA *et al.*, 2000).

O FVIII, que normalmente circula em um complexo com o Fator de von Willebrand (vWF) por apresentar uma maior estabilidade e uma maior proteção contra a degradação proteolítica, dissocia-se do complexo FVIII-vWF e é ativado, convertendo-se em um cofator que acelera intensamente a ativação de mais fator FXa pelo FIXa. O complexo tenase é formado pelo FIXa, FVIIIa, FX, cálcio e fosfolípídeos (FURIE; FURIE, 2008).

Tanto o complexo TF-FVIIa como o FIX-FVIII clivam FX no mesmo local e, portanto, produzem o mesmo FXa (FURIE; FURIE, 2008). Para diferenciar a origem do FXa, alguns autores utilizam os termos tenase extrínseca, que se refere ao complexo FVIIa-FT, e tenase intrínseca, que se refere ao complexo FX-FIXa, sendo a tenase intrínseca mais eficaz na formação do FXa em cerca de cinquenta vezes que a tenase extrínseca (FURIE; FURIE, 2008).

A trombina cliva o fibrinogênio em monômeros de fibrina instáveis e por último o FXIII é ativado pela trombina em FXIIIa, que forma ligações estáveis cruzadas entre os fios de fibrina para gerar polímeros de fibrina insolúveis, que formam a base de um coágulo sanguíneo ou trombo (Figura 3) (GENTRY, 2004).

Evidências bioquímicas sugerem que o fibrinogênio é um dímero covalentemente ligado, que cada metade do dímero é formada por três cadeias, $A\alpha$ e $B\beta$ e γ . Todas as subunidades do dímero ($A\alpha$, $B\beta$, γ)₂ são ligadas por ligações dissulfeto. A trombina hidrolisa ligações Arg-Gly específicas perto das extremidades N-terminais das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ para produzir fibrinopeptídeos A e B (FpA e FpB), deixando o resto das cadeias (α e β) intacto. Assim, a remoção de FpA e FpB revela sítios de polimerização das cadeias α e β que reagem com as porções C-terminais das cadeias γ (SCHERAGA, 2004).

A conversão do fibrinogênio em fibrina (F) catalisada por trombina consiste em três etapas reversíveis, em que a trombina está envolvida apenas no primeiro passo, que consiste na proteólise limitada para liberar os fibrinopeptídeos (FpA e FpB) a partir do

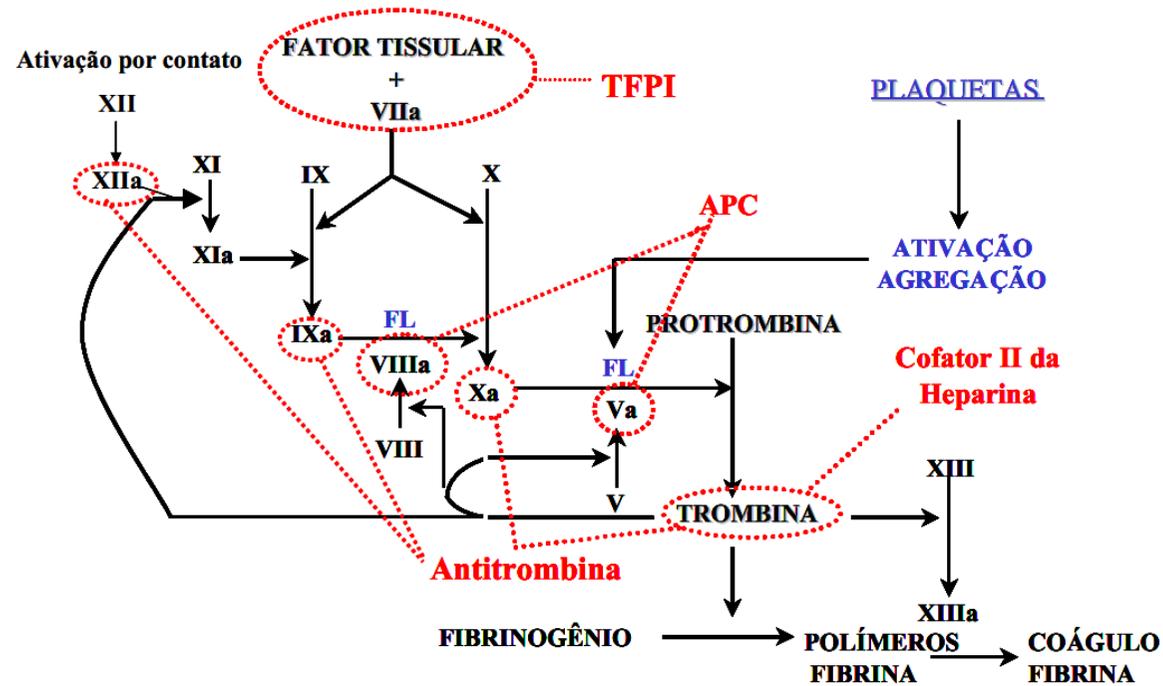


Figura 3 - Sistema de coagulação e alguns de seus inibidores (em vermelho). A fase de iniciação da coagulação ocorre após uma injúria vascular e exposição do fator tissular ao sangue. A fase de propagação (lado esquerdo) pode ser disparada quando a trombina é gerada, ativando assim o fator XI. As duas vias convergem na formação do fator Xa. TFPI (inibidor da via do fator tissular), APC (proteína C ativada). FL (fosfolípídeos). Fonte: Fonseca (2009).

fibrinogênio produzindo monômeros de fibrinas. No segundo passo, os monômeros de fibrina formam polímeros intermediários através de interações não covalentes. No terceiro passo, os polímeros intermediários agregam para formar o coágulo de fibrina (SCHERAGA, 2004).

1.2.2.1 Via de Contato

A via de contato, também chamada de via da cinina-caliceína, foi descrita nos anos 70 por Oscar Ratnoff investigando amostras de sangue oriundas de um exame pré-operatório do paciente John Hageman que, inesperadamente não coagulou em tubos de ensaio. Ratnoff reportou que a ausência da coagulação está relacionada a uma deficiência de um fator da coagulação sanguínea que foi denominado de fator de Hageman ou FXII (RATNOFF *et al.*, 1993).

Pouco tempo depois, Ratnoff e colaboradores reportaram que o fator de Hageman era ativado quando colocado em contato com vidro ou outras superfícies com cargas negativas, que explicaria o porquê da coagulação sanguínea ocorrer mais rapidamente em tubos de vidro que em tubos de plástico, fato observado pelo cirurgião inglês Joseph Lister no século XIX (RATNOFF *et al.*, 1993).

A via de contato é composta por três serinoproteases (FXII, FXI e a pré-caliceína (PK) e uma proteína da classe dos cininogênios, o cininogênio de alto peso molecular. Essa via inicia-se quando o FXII é ativado em presença de polifosfatos plaquetários e superfícies aniônicas, por auto-ativação proteolítica ou por caliceína. O FXIIa cliva a pré-caliceína em caliceína. A caliceína ativada, por retroalimentação positiva, atua na ativação de mais FXIIa e a clivagem do cininogênio de alto peso molecular, resulta em bradicinina e cininogênio de alto peso molecular ativado (Figura 4) (SCHOUSBOE, 2008).

A bradicinina, um nonapeptídeo de curta meia-vida, é um potente mediador inflamatório que age de forma parácrina ativando receptores acoplados à proteína G do tipo B2 induzindo a vasodilatação, extravasamento vascular e sensações de dor (KALATSKAYA *et al.*, 2004). Na via bradicinina, o fator XII também atua induzindo a ativação dos sistemas complemento e fibrinolítico, ativando os componentes C3 e C5,

facilitando a síntese do ativador de plasminogênio tecidual de células endoteliais, enquanto a calicreína ativa o ativador de plasminogênio tipo uroquinase. (KALATSKAYA *et al.*, 2004).

O significado (pato)/fisiológico da ativação do FXII vem sendo questionado por mais de 50 anos. A razão para isto é que a deficiência hereditária de FXII nunca foi associada a um sangramento anormal ou a outros estados patológicos em observações clínicas. No entanto, embora a ativação do FXII não inicie a coagulação sanguínea, descobertas recentes indicam fortemente que a ativação de FXII desempenha um papel na estabilização da formação de coágulo via ativação de FXI mediada por FXIIa. Esta ativação pode ser promovida *in vivo* pelas plaquetas agregadas e por ácidos nucléicos derivados de células danificadas (SCHOUSBOE, 2008).

Em estudos realizados *in vivo* com camundongos deficientes em fator XII foi demonstrado que estes mostraram-se incapazes de sustentar o crescimento de trombos no lúmen da artéria em modelos de trombose arterial, indicando que o FXII tem papel significativo na formação de trombos (GAILANI; RENNE, 2007). Alguns autores tem postulado que a deficiência de FXII seria um fator de risco para as trombooses venosa e arterial, sugerindo que FXII é uma proteína antitrombótica. No entanto, em outros estudos foi sugerido que a trombose arterial ocasional observada em pacientes com grave deficiência de FXII é provavelmente devido a fatores de risco associados, tais como hipercolesterolemia (SCHOUSBOE, 2008).

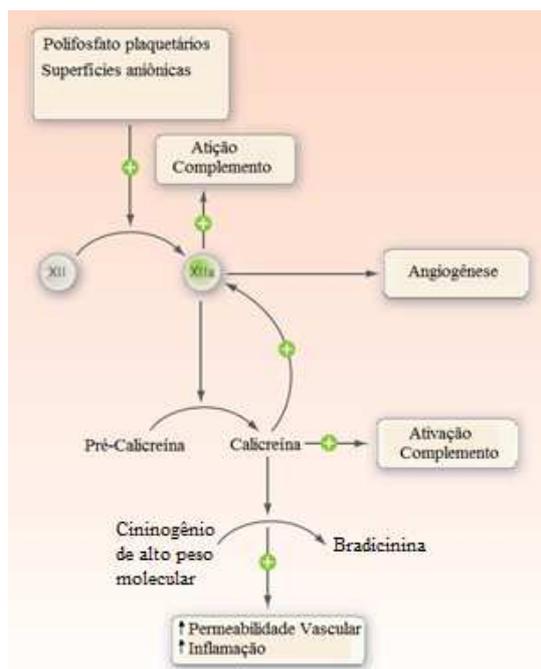


Figura 4 - Representação esquemática da ativação na via de contato e sua ligação nos processos inflamatório (liberação de bradicinina), angiogênico e coagulatoriovia (o FXII atua na ativação do FXI não mostrado na figura). A via de contato é constituída pelo, factor XII, pré-caliceína e o cinínogênio de alto peso molecular. A ativação desse sistema é iniciado quando, em presença de polifosfatos plaquetários e superfícies aniônicas, ocorre a clivagem proteolítica do factor XII (auto-ativação) em FXIIa. Uma vez na presença do FXIIa esse, ativa o FXI e a pre-caliceína em caliceína que atua na ativação de mais FXII. Enquanto a Caliceína além e ativar o FXII, cliva o Cinínogênio de alto peso molecular em Bradicinina. Fonte: Borissoff, Spronk e Cate (2011).

1.2.2.2 Inibidores do sistema de coagulação

1.2.2.2.1 Inibidor da via do fator tecidual

O inibidor da via do fator tecidual (TFPI), principal inibidor da via de iniciação do sistema de coagulação (Figura 4), liga-se e inibe o TF-VIIa de forma FXa-dependente, além de inibir o FXa associado ao complexo TF-VIIa-Xa-TFPI. Pelo fato de o TFPI necessitar do FXa para apresentar atividade, é necessário uma certa quantidade de FXa antes do TFPI ser capaz de ligar-se ao TF-FVIIa (ØSTERUD, 2012).

Como mencionado anteriormente, a tenase extrínseca atua apenas como uma via de iniciação na geração de trombina, sendo muito menos eficiente que a tenase intrínseca que atua na formação do FXa. Portanto, o uso e inativação de parte do FXa pelo TFPI não representa um problema na ativação da trombina mediada pelo FXa, por utilizar apenas uma pequena porcentagem do FXa formado, sendo portanto capaz de inativar a via de iniciação de maneira eficaz (Figura 5) (ØSTERUD, 2012).

1.2.2.2.2 Proteína C

A proteína C atua inibindo os FVIIIa e FVa, que são dois importantes cofatores dos complexos tenase e protrombinase, respectivamente. A proteína C, é considerada um zimogênio dependente de vitamina K, é ativada pela trombina quando está ligada à proteína de membrana trombomodulina (TM) na superfície das células endoteliais intactas (Figura 6) (CASTELLINO; PLOPLIS, 2009).

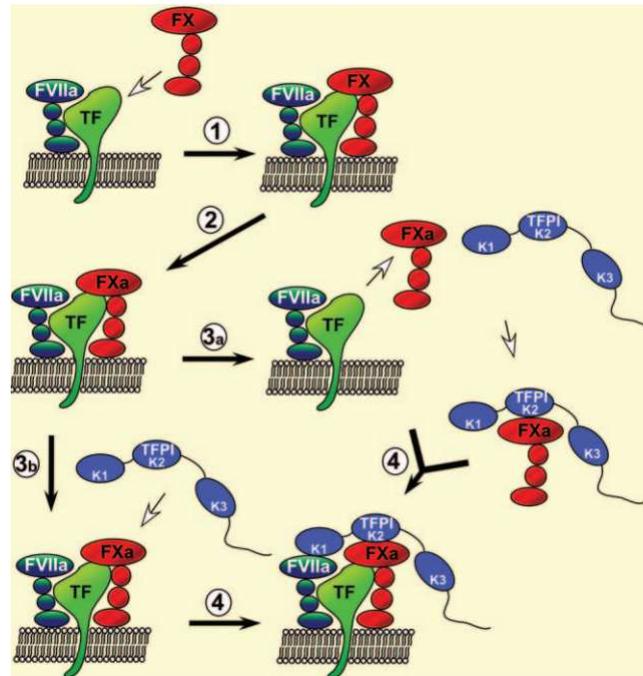


Figura 5 - Representação esquemática da inibição do complexo TF-FVIIa pelo TFPI. Após a formação do complexo TF-FVIIa, o zimogênio FX liga-se ao complexo (1) onde através de clivagem proteolítica é ativado (tenase extrínseca) (2). Uma vez ativado, o FXa pode dissociar do complexo e desencadear sua função pró-coagulante (3a) ou ainda ficar ligado ao complexo (3b). Outra possibilidade para o FXa é ligar-se ao domínio K2 do TFPI plasmático (tornando-se inativo em seu efeito pró-coagulante). Uma vez formado o complexo TFPI-FXa, este complexo pode reassociar ao complexo TF-FVIIa no caso (3a). A ligação do FXa com o TFPI também pode ocorrer antes que o FXa seja liberado do complexo TF-FVIIa-FXa (3b). Em ambos os casos, ocorre a formação do complexo TF-FVIIa-FXa-TFPI que inativa o complexo TF-FVIIa (4). Fonte: Crawley e Lane (2008).

A ativação da proteína C mediada por trombina demonstra que a trombina tem a capacidade de expressar ambas as funções pró e anticoagulante, dependendo de sua localização. Os efeitos pró-coagulante da trombina são expressos em locais onde há uma descontinuidade no endotélio vascular, enquanto sua função anticoagulante ocorre em vasos intactos, através de sua ligação ao TM e ativação a proteína C. A proteína C ativada (APC) liga-se ao seu cofator, a proteína S, uma outra proteína plasmática dependente de vitamina K, e forma um complexo juntamente com os fatores FVIIIa e FVa, inibindo-os através da clivagem de algumas ligações peptídicas (Figura 7) (DAHLBÄCK; VILLOUTREIX, 2005).

O receptor endotelial de proteína C (EPCR) é uma outra proteína ligante ao endotélio que estimula a ativação da proteína C, calcio dependente, através de ligação a resíduos de gama-carboxiglutamato dentro do seu domínio aminoterminal. Esse

domínio ajuda a orientar a proteína C para o complexo de ativação trombina-TM. A proteína C ativada (APC) é transportada no fluxo sanguíneo desempenhando uma função anticoagulante em todo o sistema vascular (DAHLBÄCK; VILLOUTREIX, 2005).

A APC e seu cofator, a proteína S, formam um complexo em membranas fosfolípídicas carregadas negativamente que agem de maneira anticoagulante, inativando os fatores FVa e FVIIIa, que são fatores de extrema importância na ativação do FX e do FII. Na inativação do FVa, a APC em complexo com a proteína S liga-se ao FVa, clivando-o e inativando-o. Na inativação do FVIIIa, além da APC e da proteína S, o zimogênio FV atua formando um complexo FV-S-APC-FVIIIa, que, uma vez formado, o FVIIIa é degradado. Assim, neste contexto, o FV pode atuar de duas maneiras: sendo ativado pela trombina em FVa e exercendo sua função pró-coagulante ou ligando-se ao complexo APC-S-FVIIIa, inativando o FVIIIa e exercendo função anticoagulante (FVac) DAHLBÄCK; VILLOUTREIX, 2005).

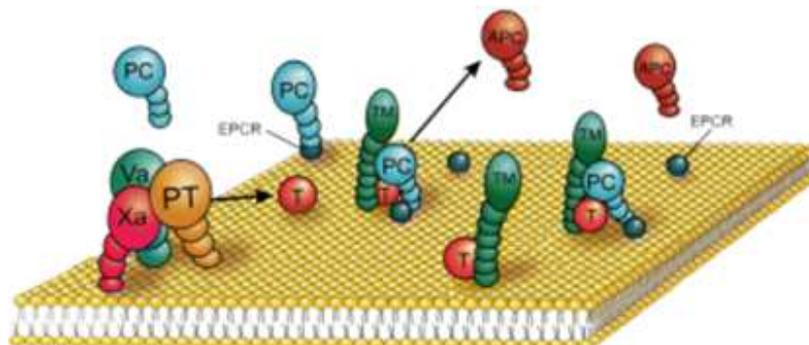


Figura 6 - Ativação da proteína C na superfície de células endoteliais. A trombina (T) gerada nas células endoteliais intactas funciona como anticoagulante, ligando-se a trombomodulina (TM) e ativando a proteína C. O receptor endotelial de proteína C (EPCR, em verde escuro) auxilia a orientação da proteína C para o complexo de ativação T-TM. A proteína C ativada (APC) é transportada com o fluxo sanguíneo e desempenha uma função anticoagulante em todo o sistema vascular. Fonte: Dahlbäck e Villoutreix (2005).

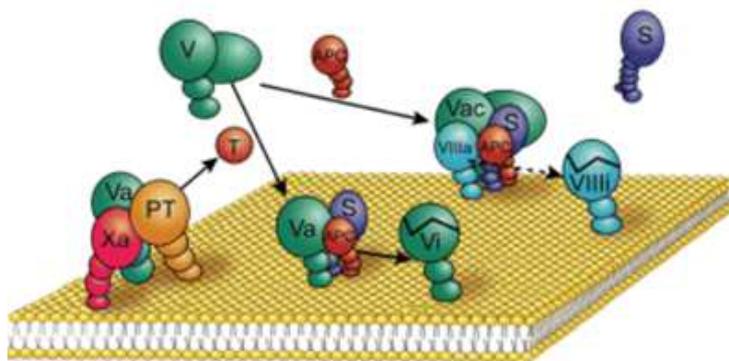


Figura 7 - Mecanismo de regulação da coagulação pela proteína C ativada (APC). A APC em complexo com seu cofator, a proteína S, podem inativar os fatores FVa, clivando-o e podem inativar o FVIIIa através da formação do complexo FV-S-APC-FVIIIa. Fonte: Dahlbäck e Villoutreix (2005).

1.2.2.2.3 Antitrombina

A antitrombina (AT) é o anticoagulante mais importante do sistema fisiológico. Trata-se de uma glicoproteína de 58 kDa e de concentração plasmática de aproximadamente 2,6 μ M. A AT é produzida no fígado e apresenta uma meia-vida de aproximadamente três dias, sendo degradada pelas células hepáticas (QUINSEY *et al*, 2004).

Um dos principais sítios de ação da AT é um centro reativo em forma de laço (RCL) que se projeta acima do núcleo da molécula. Este centro reativo apresenta uma alta afinidade pelos sítios ativos das serinoproteases alvo (XIIa, IXa, Xa, IIa), as serpinas. Em condições fisiológicas normais, a AT é ativada por moléculas heparinóides, como o heparan sulfato (HS), que está localizado no revestimento da camada endotelial dos grânulos de mastócitos associados ao endotélio (QUINSEY *et al*, 2004).

Essa ligação ocorre na região D-hélice (Figura 8) devido a uma especificidade com uma região pentassacarídica específica presente nas moléculas heparinóides chamada região pentassacarídica da heparina (figura 10). Uma vez, a AT ligada ao HS ocorre a inativação das serinoproteases pelo complexo AT-HS que é aumentada em cerca de 100 vezes (OSLO;BJÖRK, 1992). Em condições clínicas, a heparina é

utilizada, acelerando a interação com as serinoprotease em até 17.000 vezes (OSLO *et al.*, 1992).

Uma vez o pentassacarídeo ligado à região D-hélice da AT, o RCL da AT sofre uma mudança conformacional, culminando na adoção de uma conformação mais favorável à sua ligação as serinoproteases alvo. No caso da heparina, além de ocasionar essa mudança conformacional, as cadeias longas da heparina são capazes de ligar-se simultaneamente à AT e às serinoproteases, facilitando a ligação da AT com as serinoproteases, um processo conhecido como mecanismo de aproximação (OSLO *et al.*, 1992).

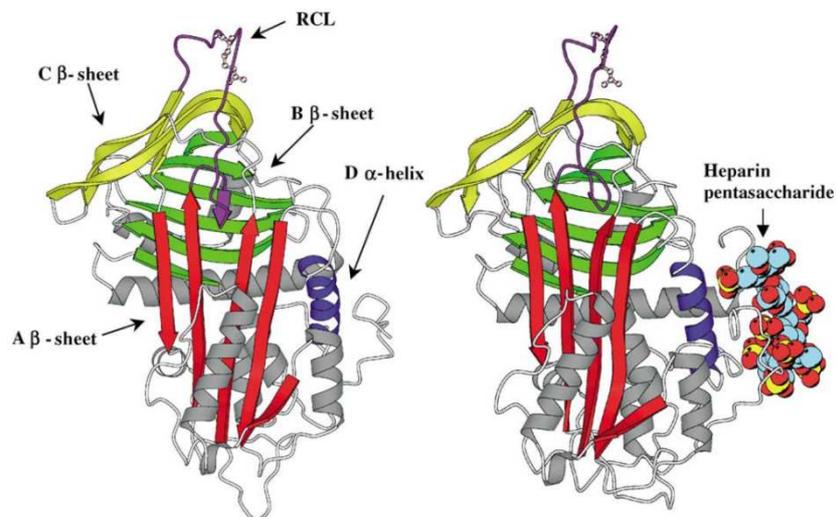


Figura 8 - Estruturas de antitrombina sozinha e formando complexo com a região pentassacarída da heparina. A figura da esquerda mostra as regiões da antitrombina: três folhas betas em verde, amarelo e vermelho O centro reativo (RCL) é mostrado em magenta e a região de D-hélice é mostrada em roxo em ambas as figuras. A figura da direita mostra a antitrombina complexada com a região pentassacarída da heparina. Fonte: Quinsey *et al.* (2004).

1.2.2.2.4 Cofator II da heparina

O cofator II da heparina (HCII) é uma glicoproteína de 66 kDa e de concentração plasmática de $1\mu\text{M}$. O HCII é produzido principalmente no fígado e apresenta uma meia vida de 2-3 dias, sendo degradado pelas células hepáticas (KAMP; STRATHMANN; RAGG, 2001).

O HCII atua de maneira semelhante a AT, porém com uma especificidade pela trombina. O mecanismo de inibição da trombina por HCII é através da clivagem proteolítica no sítio de reação da trombina (Leu444-Ser445). Essa clivagem faz com que a trombina mude sua estrutura tridimensional e, através de uma ligação do tipo ester é formado o complexo HCII-FIIa causando a inativação definitiva da trombina. O HCII apresenta uma taxa de inibição muito lenta da trombina levando cerca de 5 minutos para inativar 50% da trombina presente em uma concentração de $1\mu\text{M}$, mas na presença de um glicosaminoglicano (GAG) como heparina, heparan sulfato e dermatan sulfato esta velocidade aumenta drasticamente, passando a levar aproximadamente 50 ms para inativar os mesmos 50% na mesma concentração (TOLLEFSEN; RESTKA; MONAFO, 1983).

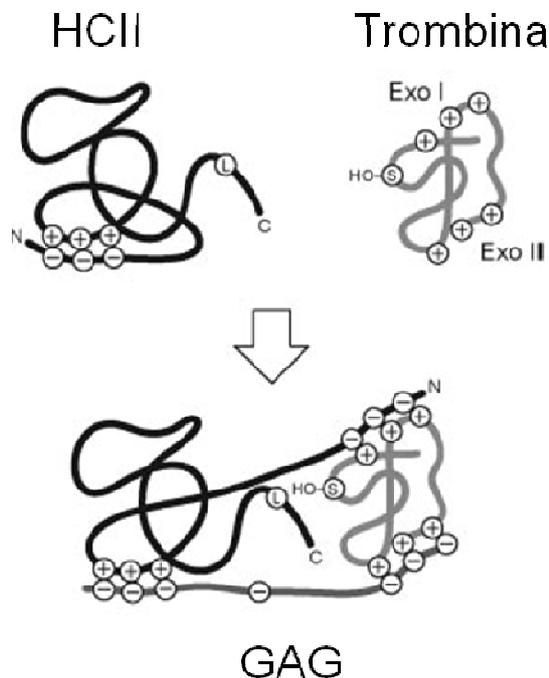


Figura 9. Modelo esquemático para a ativação de HCII. O glicosaminoglicano (GAG) desloca o domínio N-terminal ácido do HCII, permitindo a interação com a região EXO I da trombina. Caso a cadeia do GAG seja grande o suficiente, o GAG pode também se ligar a região Exo II da trombina, formando uma ponte entre as duas proteínas. Essas interações fazem com que a serina do sítio ativo da trombina (HO-S) aproxime-se do centro reativo do HCII que apresenta uma leucina (L), levando a rápida formação do complexo trombina-HCII. Fonte: Tollefsen (2007).

1.3 Polissacarídeos sulfatados

Polissacarídeos são polímeros naturais que apresentam em sua estrutura química básica poli-hidroxialdeído ou poli-hidroxicetona. Podem ser constituídos de um único ou de diferentes tipos de monossacarídeos (CUNHA *et al.*, 2009).

Os polissacarídeos sulfatados são macromoléculas complexas e carregadas negativamente, largamente distribuídos entre os seres vivos. Estes polímeros aniônicos são encontrados em invertebrados, vertebrados e algas marinhas (MATHEWS, 1975) e estão envolvidos na execução de várias funções biológicas como proteção, preenchimento, interação celular, adesão, entre outras. Eles são encontrados principalmente nos espaços intercelular dos organismos (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

1.3.1. Heparina

A heparina é um polissacarídeo que apresenta um peso molecular entre 3.000 a 30.000 Da, formada a partir de unidades dissacarídicas de α -D-glucosamina, alternando com um ácido urônico, seja α -L-ácido idurônico, ou seu precursor biossintético β -D-ácido glucurônico. Contudo, sua estrutura apresenta variações no padrão com *N*- e *O*-sulfato, e grupos *N*-acetil (MULLOY; MOURÃO; GRAY, 2000). Sua obtenção é principalmente através da mucosa intestinal suína ou de pulmão bovino.

Aquino *et al.* (2010) mostraram que as heparinas de origem suína e bovina apresentam diferenças tanto químicas como em atividades biológicas. A heparina suína é composta principalmente de unidades dissacarídicas trissulfatadas $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-IdoA2S-1} \rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-1-GlcNS6S} \rightarrow$ enquanto a heparina de intestino bovino é composta por 2-sulfato no ácido α -idurônico, mas com uma maior variação na sulfatação das unidades de α -glucosamina. Quando avaliadas em modelos *in vivo* e *in vitro*, foi demonstrado que a heparina bovina atuou, principalmente, através de fator Xa, e apresentou metade da atividade em relação a heparina suína nos ensaios anticoagulantes e antitrombóticos, mas com semelhante tempo de sangramento em doses iguais.

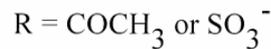
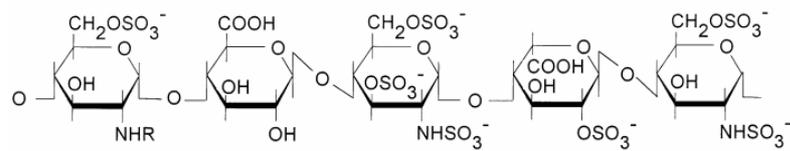


Figura 10. Sequência pentassacarídica da heparina. Fonte: Mulloy, Mourão e Gray, 2000).

1.3.1.1 Heparina de baixo peso molecular

A heparina de baixo peso molecular (LWMH) é obtida através da quebra da ligação glicosídica seja por reação enzimática, seja por reação química em determinados pontos da cadeia da heparina. Essa quebra produz cadeias polissacarídicas com peso molecular variando de 4000 a 6500 Da (ROQUE *et al.*, 2000).

As grandes vantagens da LMWH em relação heparina não fracionada são: boa biodisponibilidade após a administração subcutânea, uma maior meia-vida, menor ligação a proteínas não alvo, menor interação com as plaquetas e com o fator plaquetário 4, reduzindo assim a incidência da trombocitopenia (WEITZ, 1997).

1.3.1.2 Efeitos adversos da heparina

Apesar de a heparina ser uma droga amplamente utilizada, os seus efeitos adversos justificam a procura de um substituto. Dentre os principais efeitos adversos causado pelo uso da heparina, pode-se destacar a hemorragia e a trombocitopenia induzida por heparina (TIH).

A TIH é uma resposta imunológica ao uso contínuo de heparina por um período maior, geralmente entre 5 e 14 dias. Essa resposta é mediada por anticorpos que reconhecem a formação de aglomerados multimoleculares oriundos da ligação da heparina com o fator plaquetário 4. A ligação dos anticorpos antifator plaquetário

4/heparina a este complexo leva à formação de lesões imunológicas nas paredes dos vasos, trombose e coagulação intravascular disseminada (GREINACHER, 2009).

Além disso, outros efeitos adversos decorrente do tratamento a base de heparina são relatados na literatura como hipercalcemia (THOMAS; SMEETON; LEATHERDALE, 2008), osteoporose, reações cutâneas tais como urticária, pápulas eritematosas, necrose da pele, testes da função hepática anormais, eosinofilia, hipoaldosteronismo, priapismo e alopecia (WALENGA; FRENKEL; BICK, 2003).

1.3.1.3 Problemas apresentados pela heparina comercial

Em 7 de janeiro de 2008 uma notificação emitida pelo Departamento de Saúde do Missouri relatou uma série de reações alérgicas em pacientes submetidos a hemodiálise que ocorreram a partir de 19 de novembro de 2007, em um hospital pediátrico. As reações haviam ocorrido poucos minutos após o início das seções de diálise e os principais sintomas foram: edema facial, taquicardia, hipotensão, urticária e náuseas, levando a suspeitas iniciais de reação anafilática. Após uma série de investigações, foi observado que a maioria das reações havia ocorrido em pacientes que receberam heparina intravenosa produzidas pela Baxter Healthcare Corporation, levando a retirada do mercado de nove lotes de heparina. Um total de 101 casos confirmados ou suspeitos foram observados em 12 estados americanos no período de 19 de novembro de 2007 à 21 janeiro de 2008 (KISHIMOTO *et al.*, 2008).

Em março de 2008, ressurgiram outros casos relacionados à contaminação de lotes de heparina, com sintomas que incluíam reações alérgicas, hipersensibilidade, hipotensão, angioedema, falta de ar, náuseas, vômitos, diarréias e dores abdominais, causando 81 mortes nos Estados Unidos e afetando outros 11 países (HARRIS, 2008).

Guerrini *et al.* (2008) analisando a estrutura detalhada dos lotes de heparina contaminada encontraram unidades dissacarídicas de ácido glucurônico ligadas por $\beta 1 \rightarrow 3$ a uma β -N-acetilgalactosamina. As unidades dissacarídicas apresentavam um padrão de sulfatação incomum com a presença de sulfatados nas posições 2-O e 3-O do ácido glucurônico e nas posições 4-O e 6-O do galactosamina (Figura 11) sendo denominado de condroitim oversulfatado (OSCS). A presença de sulfatos nessas

posições não são encontradas em nenhuma fonte natural de condroitim sulfato, mas podem ser obtidas através de sua sulfatação química. Além disso, os testes de triagem tradicionais não são capazes de diferenciar os lotes afetados e não afetados.

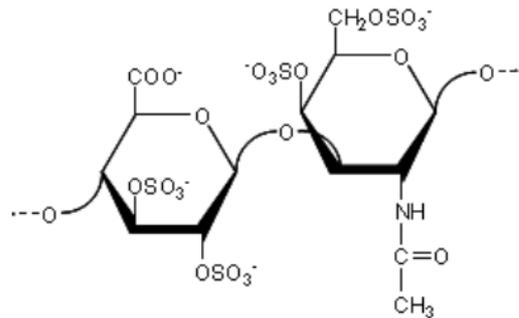


Figura 11 - Estrutura do condroitim sulfato oversulfatado, o contaminante encontrado em alguns lotes de heparina. Fonte: Fonseca (2009).

Posteriormente, foi relatado que o OSCS é capaz de ativar a via de contato plasma humano, levando a geração de bradicinina, um potente mediador vasoativo. Além disso, OSCS induz a geração de C3a e C5a, que são potentes anafilatoxinas derivadas de proteínas do complemento. A ativação desses dois fatores foi inesperadamente ligada e dependente da fase fluida na ativação do FXII. Foram analisados plasmas de várias espécies e apenas os de origem suína e humana mostraram-se sensíveis aos efeitos de OSCS (KISHIMOTO *et al.*, 2008).

Melo, E. I. *et al.* (2008) em estudo comparativo de quatro preparações de heparinas comercializadas no Brasil com a heparina padrão e a heparina anteriormente mais utilizada (Liquemine), observou que nenhuma das quatro preparações utilizadas apresentaram resultados semelhantes na atividade anticoagulante quando comparadas ao padrão ou a Liquemine podendo chegar a 70% da atividade declarada. Além disso, foram observadas contaminação por dermatan sulfato, alterações do peso molecular e degradação química.

1.3.2 Galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas

1.3.1.1 Características estruturais

As galactanas sulfatadas encontradas nas algas marinhas vermelhas são formadas por galactoses (ou derivados desse monossacarídeo) dispostas em uma cadeia linear composta por unidades dissacarídicas repetitivas de β -D-galactose ligada através dos carbonos C-1 e C-3 (unidade A) e α -galactose através dos carbonos C-1 e C-4 (unidades B), sendo que algumas unidades de α -galactose podem ser encontradas na forma de 3,6-anidrogalactose. As galactanas formam um arranjo alternado de unidades A e B, ou seja, (AB)_n (PAINTER, 1983).

As carragenanas e as agaranas são as galactanas sulfatadas mais estudadas e diferem na configuração enantiométrica da α -galactose (unidade B), sendo da série L para agaranas e D para carragenanas. A unidade A sempre pertence à série D (USOV, 1984). Estudos estruturais mais detalhados demonstram um terceiro grupo de galactanas, os híbridos D/L, em que as unidades B apresentam configuração D e L na mesma molécula (ESTEVEZ; CIANCIA; CERZO, 2004). As agaranas e as carragenanas são bastante utilizadas nas indústrias farmacêutica, cosmética e de alimentícia. Suas propriedades físico-químicas distintas confere-lhes aplicações principalmente como agentes gelificantes e espessantes (CARDOZO *et al.*, 2007).

As carragenanas são classificadas em 4 famílias, de acordo com a posição dos grupos sulfato nas unidades A e B e ciclização (presença de 3,6-anidrogalactose) da unidade B. A família Kappa (κ), apresenta grupos sulfato no C-4 da unidade A e, de acordo com a posição dos grupos sulfatos na unidade B e da ciclização, divide-se em carragenanas com estruturas ideais denominadas: κ -, ι -, μ - e ν -carragenanas. A família Lambda (λ) possui grupos sulfato no C-2 de ambas as unidades, e divide-se em λ -, ξ - e π -carragenanas (estruturas naturais) e θ -carragenana (oriunda do tratamento alcalino da λ -carragenana). A família Beta (β) compreende polissacarídeos em que a unidade A não é sulfatada. Incluindo β - e α -carragenanas e seus precursores biológicos γ - e δ -

carragenanas. A família Omega (ω) compreende galactanas que apresentam grupos sulfato no C-6 da unidade A. Nesta família está a carragenana natural ω - e seu precursor biológico ψ -carragenana (STORTZ; CERREZO, 2000).

A classificação das agaranas não é tão específica quanto a das carragenanas (STORTZ; CERREZO, 2000). As agaranas podem ter quantidades variáveis de diferentes grupos O-ligados, principalmente éter metílico, éster sulfato, acetal de ácido pirúvico ou resíduos β -D-xilopiranosil. A proporção e distribuição dos substituintes mencionados na cadeia do esqueleto do galactano modificam as propriedades físico-químicas dos polissacarídeos (LAHAYE; ROCHAS, 1991; RODRÍGUEZ M. et al., 2009).

Variação estrutural considerável ocorre nas galactanas sulfatadas de algas vermelhas de diferentes espécies e em amostras coletadas em diferentes ambientes ou em diferentes estações do ano. Vários grupos hidroxilados podem ser substituídos por um éster de sulfato, um grupo metil ou ácido pirúvico. A principal variação estrutural nestes polissacarídeos é o padrão de sulfatação. A distribuição do sulfato ao longo da estrutura é muito heterogênea, como em glicosaminoglicanos de origem animal (POMIN; MOURÃO, 2008; POMIN, 2010).

1.3.1.2 Atividades anticoagulante e antitrombóticas

A primeira descrição da atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas foi feita por Chargaff, Bancroft e Stanley-Brown (1936), relatando o efeito anticoagulante de uma galactana sulfatada extraída da espécie *Iridaea laminarioides*. Estudos recentes tem confirmado que as algas vermelhas são fontes de vários polissacarídeos sulfatados com potencial anticoagulante. Rodrigues *et al.* (2009), estudando uma galactana da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*, mostraram que essa galactana apresentou atividade anticoagulante de 464,2 UI/mg, superior a heparina utilizada como controle (100 UI/mg).

Rodrigues *et al.* (2010a), reportaram a baixa atividade anticoagulante da galactana *Solieria filiformis* (2,31 UI/mg) e a ausência do prolongamento do tempo de

coagulação sanguínea por galactanas das espécies de algas *Gracilaria birdiae*, *G. cornea* e *Pterocladia capillacea*.

Lee *et al.* (2008) avaliaram galactanas obtidas por extração aquosa à quente de 22 espécies de algas vermelhas quanto a suas potenciais atividades anticoagulantes. Os extratos de oito espécies (*Grateloupia elliptica*, *Sinkoraena lancifolia*, *Halymenia dilatata*, *Grateloupia lanceolata*, *Lomentaria catenata*, *Martensia denticulata*, *Schizymenia dubyi*, *Chondrus crispus*) prolongaram o tempo de coagulação no teste do tempo de tromboplastina parcial activada (TTPa). Dentre estas oito espécies, os extratos totais de *L. catenata* e *S. dubyi* apresentaram a maior atividade.

O prolongamento do tempo de coagulação do plasma é referido como um efeito anticoagulante. No entanto, a investigação da atividade antitrombótica requer a utilização de modelos *in vivo* de trombose, o que é uma metodologia laboriosa. Estes modelos imitam diferentes condições patológicas envolvidas na trombose, tais como diminuição do fluxo sanguíneo, estado de hipercoagulabilidade e lesão do endotélio vascular. Porém, poucos estudos reportam atividade antitrombótica de galactanas sulfatadas (Pomin e Mourão, 2008).

A galactana da alga vermelha *Pterocladia capillacea*, apesar de não apresentar atividade anticoagulante no teste de TTPa, mostrou-se antitrombótica em modelo de trombose venosa (QUINDERÉ, 2008). Fontes (2009) mostrou que a galactana sulfatada da alga vermelha *Acanthophora spicifera* apresentou atividade anticoagulante de 20 UI/mg, quando comparada a heparina, e atividade antitrombótica em modelo de trombose venosa. Queiroz (2010) relatou a atividade antitrombótica em modelo de trombose venosa para a alga vermelha *Gelidiella acerosa*, que não apresentou atividade anticoagulante de forma semelhante ao obtido para a galactana de *P. capillacea* (QUINDERÉ, 2008).

As galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas com propriedades anticoagulantes e antitrombóticas melhor estudadas são as das algas *Botryocladia occidentalis* e *Gelidium crinale*. Farias *et al.* (2000) caracterizaram a estrutura de um D-galactana sulfatada obtida da alga vermelha *Botryocladia occidentalis*, que apresentou unidades $(-4-\alpha\text{-D-Galp-1}\rightarrow 3-\beta\text{-D-Galp-1}\rightarrow)$ repetidas com padrão de sulfatação variável. Claramente um terço do total de unidades α são 2,3-di-*O*-sulfatadas e outro um

terço são 2-*O*-sulfatada. A galactana desta alga apresentou uma atividade anticoagulante de potência semelhante a heparina não fracionada, reforçando a inibição da trombina e do fator Xa pela antitrombina e/ou pelo cofator II da heparina.

Posteriormente, Pereira *et al.* (2005) caracterizaram a estrutura de um D-galactana sulfatada obtida da alga vermelha *Gelidium crinale*, que apresentou unidades (-4- α -Galp-1 \rightarrow 3- β -Galp-1 \rightarrow), repetidas com padrão de sulfatação variável. Claramente 15% do total das unidades α são 2,3-di-sulfatadas e 55% são 2-sulfatadas. A estrutura da galactana de *G. crinale* é semelhante a de *B. occidentalis*, porém com um menor percentual de unidades α 2,3-di-sulfatadas.

A galactana sulfatada de *G. crinale* apresentou uma menor atividade anticoagulante em ensaio de coagulação (TTPa) quando comparada com a de *B. occidentalis*. Em ensaios utilizando proteases específicas e inibidores da coagulação, elas não diferiram na inibição de trombina mediada por antitrombina, mas em ensaios em que o cofator II da heparina substituiu a antitrombina, a galactana de *G. crinale* necessitou de uma concentração significativamente mais elevada para alcançar o mesmo efeito inibitório da galactana de *B. occidentalis*. Em contraste, quando o fator Xa, em vez da trombina, foi usado como a protease alvo, a galactana sulfatada de *G. crinale* mostrou-se mais potente (PEREIRA *et al.*, 2005).

Como consequência de suas diferenças estruturais, as duas galactanas sulfatadas das algas *G. crinale* e *B. occidentalis* diferem em suas atividades anticoagulante e antitrombótica. A galactana de *G. crinale* exibe efeitos pró-coagulante e pró-trombótico em doses baixas (até 1,0 mg de peso corporal/kg), mas em doses elevadas (> 1,0 mg/kg) este polissacarídeo inibe tanto a trombose venosa como a arterial em ratos e prolonga o tempo de recalcificação *ex vivo* (FONSECA *et al.*, 2008).

Em contraste, galactana de *B. occidentalis* é um anticoagulante muito potente e um composto antitrombótico em doses baixas (até 0,5 mg/kg), inibindo a trombose venosa experimental e prolongando o tempo recalcificação *ex vivo*, mas estes efeitos são revertidos em doses elevadas. A galactana de *B. occidentalis* inibe a trombose arterial apenas em doses elevadas (> 1,0 mg/kg). Assim como a heparina, a galactana de *G. crinale* não ativa o fator XII, enquanto a de *B. occidentalis* ativa o fator XII em concentrações elevadas, o que poderia justificar seu efeito pró-coagulante em doses

elevadas. Ambas as galactanas sulfatadas não modificam o tempo de sangramento em ratos (FONSECA *et al.*, 2008).

Estes resultados indicam que pequenas diferenças nas proporções e/ou distribuição de resíduos de sulfato ao longo da cadeia polissacarídica podem ser críticas para a interação entre proteases, inibidores e ativadores do sistema de coagulação, resultando em um padrão distinto de atividades anti e pró-coagulante e antitrombótica (FONSECA *et al.*, 2008).

Glauser *et al.* (2009) mostraram que, diferentemente da heparina, a galactana sulfatada de *B. occidentalis* prolonga o tempo de coagulação e retarda a geração de trombina e de fator Xa em plasma livre de serpina, ou seja, livre de antitrombina e cofator II da heparina. Foi demonstrado também que a galactana sulfatada inibe os complexos tenase intrínseca e protrombinase, que são críticos para a geração de fator Xa e de trombina, respectivamente. Utilizando recombinantes mutantes específicos da protease, foi demonstrado que a galactana sulfatada interage com o exossítio de ligação à heparina do fator Xa e que os resíduos Arg-236 e Lys-240 deste sítio são críticos para esta interação, assim como observado para a heparina.

A capacidade da galactana sulfatada de potencializar a inibição do fator Xa pela antitrombina é dependente de cálcio, semelhante à heparina. No entanto, em contraste com a heparina, este efeito não é totalmente dependente da conformação do domínio rico em ácido γ -carboxiglutâmico da protease. A galactana sulfatada e heparina apresentam alguns efeitos semelhantes sobre a coagulação sanguínea, mas diferem significativamente ao nível molecular (GLAUSER *et al.*, 2009).

1.3.1.3 Outras atividades biológicas

A atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados também tem sido bastante relatada (DUARTE *et al.*, 2004, HARDEN *et al.*, 2009; YASUHARA-BELL; LU, 2010). A estrutura química, incluindo grau de sulfatação, peso molecular, açúcares constituintes, conformação e dinâmica estereoquímica, afeta a atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados de algas (VO; KIM, 2010).

A λ -carrageenan de baixa massa molecular (9,3 kDa) da alga *Chondrus ocellatus* aumentou a atividade antitumoral do agente quimioterápico 5-fluorouracil em camundongos com Sarcoma 180. Além disso, mostrou-se imunomodulatória, melhorando a diminuição da imunocompetência causada pelo quimioterápico (ZHOU *et al.*, 2005). As galactanas sulfatadas da alga *Champia feldmannii* também apresentaram propriedades imunoestimulantes e antitumorais em camundongos com Sarcoma 180 (LINS *et al.*, 2009).

Há poucos estudos sobre atividade antinociceptiva e antiinflamatória de galactanas sulfatadas de macroalgas marinhas. Viana *et al.* (2002) demonstraram a atividade antinociceptiva de polissacarídeos das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii*. Assreuy *et al.* (2008) reportaram o efeito antinociceptivo de uma fração polissacarídica sulfatada da alga *Champia feldmannii*.

Recentemente o nosso grupo de pesquisa demonstrou que a κ -carragenana isolada da alga *Solieria filiformis* apresenta propriedades antinociceptivas, além de apresentar potencial inflamatório envolvendo prostaglandinas, óxido nítrico e citocinas primárias (IL-1 e TNF- α) (ARAÚJO *et al.*, 2011). As galactanas sulfatadas da alga *Gracilaria cornea* também apresentaram atividades antinociceptivas (COURA *et al.* 2011), porém, enquanto a κ -carragenana de *S. filiformis* apresentou ação periférica, a ação antinociceptiva de *G. cornea* envolve mecanismos centrais.

A galactana sulfatada de *Gelidium crinale* apresentou efeito anti-inflamatório envolvendo a inibição de histamina e de metabolitos do ácido araquidônico. Além disso, apresentou também atividade antinociceptiva, especialmente na dor inflamatória, com a participação do sistema opióide (SOUSA *et al.*, 2011). Vanderlei *et al.* (2011) reportaram o envolvimento da via da hemoxigenase-1 na ação anti-inflamatória da galactana sulfatada da alga *Gracilaria birdiae*, visto que seu efeito antiedematogênico foi inibido por zinco protoporfirina IX.

A galactana sulfatada da alga *Acanthophora muscoides* apresentou atividade antinociceptiva, reduzindo o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% e o tempo de lambadura da pata induzida por formalina 1% somente na segunda fase do teste, o que indica mecanismos periféricos na antinocicepção. Estes

resultados foram confirmados pelo não prolongamento no tempo de reação do teste da placa quente, que é específico para drogas de efeito central. A galactana sulfatada também apresentou efeito anti-inflamatório no modelo de peritonite induzida por carragenana e no modelo de edema de pata induzido por dextrano (QUINDERÉ, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar as atividades anticoagulante e antitrombótica de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha vermelha *Acanthophora muscoides* (AmII).

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da fração AmII em estudos de coagulação sanguínea *in vitro* e *ex vivo*.

Avaliar os efeitos fração AmII sobre os fatores da coagulação sanguínea Xa e IIa em presença de antitrombina e de cofator II da heparina.

Avaliar os efeitos da fração AmII sobre a ativação do fator XII.

Avaliar os efeitos da fração AmII sobre a agregação plaquetária.

Avaliar a interação da fração AmII com a antitrombina, utilizando a técnica de espectro fotômetro de fluorescência.

Avaliar os efeitos antitrombóticos da fração AmII utilizando modelos experimentais de trombose venosa e arterial em ratos.

Avaliar o potencial hemorrágico da fração AmII.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Alga marinha

A alga marinha *Acanthophora muscoides* (Linnaeus) Bory de Saint-Vincent foi coletada em maré baixa (-0,2 a 0,3 m) na praia do Pacheco município de Caucaia-CE. Após a coleta, foi acondicionada em sacos plásticos e transportada ao laboratório em recipiente isotérmico, onde as epífitas foram removidas e a alga foi lavada com água corrente e destilada e estocada a -20 °C, para posterior utilização (Figura 12). Uma excisada da espécie foi depositada sob o número 46093 no Herbário Prisco Bezerra (EAC) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.



Figura 12 – Fotografia de um espécime da alga marinha *Acanthophora muscoides* (Linnaeus) Bory de Saint-Vincent.

3.1.2 Animais

Os ratos *Wistar* (machos e fêmeas, 190-250 g, n=5) foram obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da referida instituição.

A autorização para o uso dos animais nos experimentos foi obtida junto a Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA – UFC) como parte do projeto “Bioprospecção de polímeros de algas marinhas com potencial biotecnológico” aprovado sob o processo de número 80/10.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção da fração polissacarídica sulfatada

Os polissacarídeos sulfatados totais foram obtidos segundo descrito por Farias *et al.* (2000). O fracionamento por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose seguindo as mesmas condições descritas por Quinderé (2011). A fração eluída com 0,75 M de NaCl, denominada AmII, foi utilizada nos ensaios posteriores.

3.2.2 Atividade anticoagulante *in vitro*

A avaliação da atividade anticoagulante foi realizada *in vitro* pelo Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) segundo Anderson *et al.* (1976). Inicialmente, o sangue citratado de humano normal (diferentes doadores) foi centrifugado (73,75 x g; 15 min, 25 °C) para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas. Para a realização do teste, 50 µL de plasma humano foram incubados a 37 °C por 3 min com 10 µL da

solução de AmII (0,01 à 0,75 mg/mL) ou heparina (0,001 à 0,25mg/mL) e 50 µL do reagente TTPa (CLOT, Bios diagnóstica). Após a incubação, foram adicionados 50 µL de cloreto de cálcio 0,025 mmol (CLOT, Bios diagnóstica) à mistura para ativar a cascata de coagulação. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo o tempo de coagulação registrado automaticamente em um coagulômetro (Drake, modelo Quick-timer) e a atividade anticoagulante foi expressa em unidades internacionais por mg utilizando como referência a heparina (193 UI mg⁻¹).

3.2.3 Ação anticoagulante ex vivo

Foram coletadas amostras de sangue com citrato (nove partes de sangue: uma parte de citrato de sódio tamponado à 3,2%, v/v) da artéria carótida antes da infusão (controle) e 5 min após a administração intravascular da fração AmII ou heparina. O plasma então foi separado por centrifugação (1.600 x g por 10 min, 25 °C) e analisado pelo ensaio *ex vivo* de TTPa. As atividades anticoagulantes de AmII e da heparina foram expressas como T_1/T_0 , que é a relação entre o tempo de coagulação na presença (T_1) e na ausência (T_0) de polissacarídeo sulfatado na mistura de incubação.

3.2.4 Atividade antitrombótica in vivo em modelo venoso

Os testes de atividade antitrombótica na veia cava de ratos foram conduzidos por uma combinação entre hipercoagulabilidade e estase como descrito por Wessler (1962). Ratos foram inicialmente anestesiados intramuscularmente com xilazina 2% (3,5 mg/kg) e ketamina 5% (5,0 mg/kg). Depois de anestesiados, os ratos foram abertos cirurgicamente para exposição da veia cava e obtenção de um segmento de 0,7 cm, começando imediatamente numa região abaixo da veia renal direita e terminando logo abaixo da veia renal esquerda que foi previamente ligada (Figura 14). Após o segmento ter sido isolado, salina, heparina (0,05; 0,1; 0,25; 0,5 ou 0,75 mg/kg) ou a fração AmII (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 ou 1 mg/kg) foram injetadas 2,0 cm abaixo do segmento isolado e deixado circular por um período de 5 minutos antes da indução da trombose. Após esse

período, o estado de hipercoagulabilidade foi induzido através da administração intravenosa, 1,0 cm abaixo do segmento isolado, de tromboplastina cálcica na dosagem de 5,0 mg/kg. Imediatamente após a inoculação da tromboplastina, o segmento isolado foi fechado, primeiro a extremidade proximal e, por último, a extremidade distal. Após 20 minutos de estase, o trombo formado foi retirado cuidadosamente. O trombo obtido foi seco em estufa a 60 °C por 1 h e pesado.

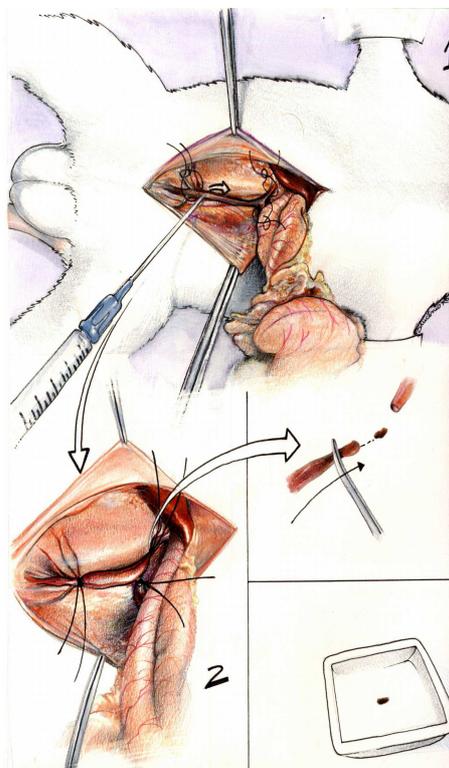


Figura 13 - Esquema ilustrativo do modelo experimental de trombose venosa em ratos. Nesse modelo, a trombose é induzida por um estado de estase e hipercoagulabilidade sanguínea, como descrito anteriormente. 1, laparostomia animal com isolamento da veia cava; 2, oclusão do fluxo sanguíneo, mimetizando um processo de estase venosa (Desenho cedido pelo LABTEC).

3.2.5 Tempo de recalcificação

Os ensaios de coagulação foram realizados em placas de 96 poços. Inicialmente, 90 μL de plasma humano foram misturados com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados em NaCl 0,15 M (10 μL) e aquecidos por 60 segundos a 37 °C. Em seguida, 100 μL de CaCl_2 a 0,25 M foram adicionados. A transmitância a 405 nm foi registrada por 720 segundos. A taxa de mudança na transmitância foi proporcional à formação do coágulo.

3.2.6 Ativação do fator XII na presença de polissacarídeos sulfatados

Os testes de ativação do fator XII foram feitos em placas de 96 poços. Plasma humano (40 μL) foi diluído com 3 volumes de tampão Tris-PEG (Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,15 M, e 1,0 mg/mL de polietileno glicol 8000, pH 7,4) e incubado com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados (30 μL). Depois de 60 segundos de incubação a 37 °C, 30 μL de substrato cromogênico S-2302 a 0,6 mM (Chromogenix, MA, EUA) foram adicionados, e a absorbância a 405 nm foi registrada por 300 segundos. O S-2302 é um substrato cromogênico para a calicreína plasmática, que é ativada a partir de seu precursor pré-calicreína pela ação do fator XII ativo. O método para a determinação da atividade é baseado na diferença de absorbância entre a p-nitroanilida formada e o substrato original. A taxa de formação da p-nitroanilida, ou seja, o aumento da absorbância a 405 nm é proporcional à atividade da enzima. Não ocorre ativação do fator XII na ausência de polissacarídeos sulfatados.

3.2.7 Inibição da trombina ou fator Xa por AT ou HCII na presença de polissacarídeos sulfatados

As incubações foram realizadas em placas de 96 poços. As concentrações finais dos reagentes foram AT 10 nM ou HCII 15 nM, 2 nM de trombina ou fator Xa, 0-1000 µg/mL de polissacarídeos sulfatados em 40 µL de tampão Tris-PEG e 100 µM de substrato cromogênico. Trombina ou fator Xa foi adicionado no início da reação. Depois de 60 segundos de incubação a 37 °C, 25 µL de substrato cromogênico S-2238 para trombina ou S-2765 para fator Xa (Chromogenix, MA, EUA) foram adicionados e a absorbância a 405 nm foi registrada por 120 segundos. As taxas de variações na absorbância foram proporcionais à atividade da trombina ou do fator Xa remanescentes na incubação. Quando o plasma foi utilizado como fonte de AT ou HCII, o volume final de 100 µL da reação foi completado com o tampão Tris-PEG e omitiu-se a adição exógena dos polissacarídeos ao plasma. Não houve inibição nos experimentos controle em que a trombina ou fator Xa foi incubado com AT ou HCII na ausência de polissacarídeos sulfatados. Além disso, nenhuma inibição foi observada quando a trombina ou fator Xa foram incubados somente com polissacarídeos sulfatados ao longo das concentrações testadas. O controle, na ausência dos polissacarídeos sulfatados, foi considerado como 100% da atividade da trombina ou do fator Xa.

3.2.8 Modificação da fluorescência intrínseca da antitrombina induzida por heparina ou AmII

Alíquotas de uma solução estoque de heparina ou AmII foram adicionadas a uma cubeta de quartzo 1 x 1 cm² contendo 600 µL de uma solução de AT 0,5 µM em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo EDTA 0,1 mM, PEG 8000 0,1% e NaCl 0,1 M. Após 1 min, as mudanças no espectro de emissão de fluorescência intrínseca da AT foram monitoradas entre 290 e 450 nm, usando um fluorímetro (JASCO FP 6300, EUA), com excitação a 280 nm a cada adição dos polissacarídeos sulfatados. As fendas de emissão e de excitação foram 10 e 5 nm, respectivamente. As

integrais das curvas de fluorescência foram calculadas através do programa específico do equipamento. Todos os experimentos foram realizados a uma temperatura de 25 °C e sob agitação contínua.

3.2.9 Ensaio da atividade antitrombótica no modelo de injúria do endotélio arterial induzida por FeCl₃

A trombose na artéria carótida foi induzida utilizando o método de Kurz, Main e Sandusky (1990), com modificações. Ratos (ambos os sexos) foram anestesiados com a mistura de ketamina e xilazina, como anteriormente descrito, e colocados na posição supinada. A carótida direita foi isolada, através de uma incisão mediana cervical, e uma sonda de fluxo ultra-sônica foi aplicada (modelo 0,5 VB; Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, EUA). Diferentes doses de polissacarídeos sulfatados foram lentamente injetadas na carótida esquerda e deixadas circulando por 5 min. Após este intervalo, foi colocado papel filtro (formato retangular 1 mm x 3 mm) embebido em FeCl₃ 50% (m:vol) sobre a superfície ventral da artéria durante 1 minuto. Logo após a retirada do papel filtro, a artéria foi limpa com solução salina para a remoção de algum possível resíduo de FeCl₃. O fluxo foi monitorado até a oclusão total da artéria, indicado por uma cessação do fluxo, ou até 60 min após a aplicação de FeCl₃.

3.2.10 Efeito hemorrágico

Ratos *Wistar* foram anestesiados com uma combinação de ketamina e xilazina, como descrito anteriormente. Uma cânula foi inserida na artéria carótida direita para a administração intravascular de polissacarídeos sulfatados. Após 5 minutos de circulação da amostra, um segmento de 3 mm da cauda do rato foi cortado e, logo após, a cauda foi inserida cuidadosamente numa proveta contendo 40 mL de água destilada (Figura 14). A perda sanguínea foi determinada após 60 minutos, mensurando o nível de

hemoglobina dissolvida na água pelo método espectrofotométrico descrito por Herbert *et al.* (1992). O volume de sangue perdido foi determinado através de uma curva padrão de hemoglobina baseada na absorvância a 540 nm.

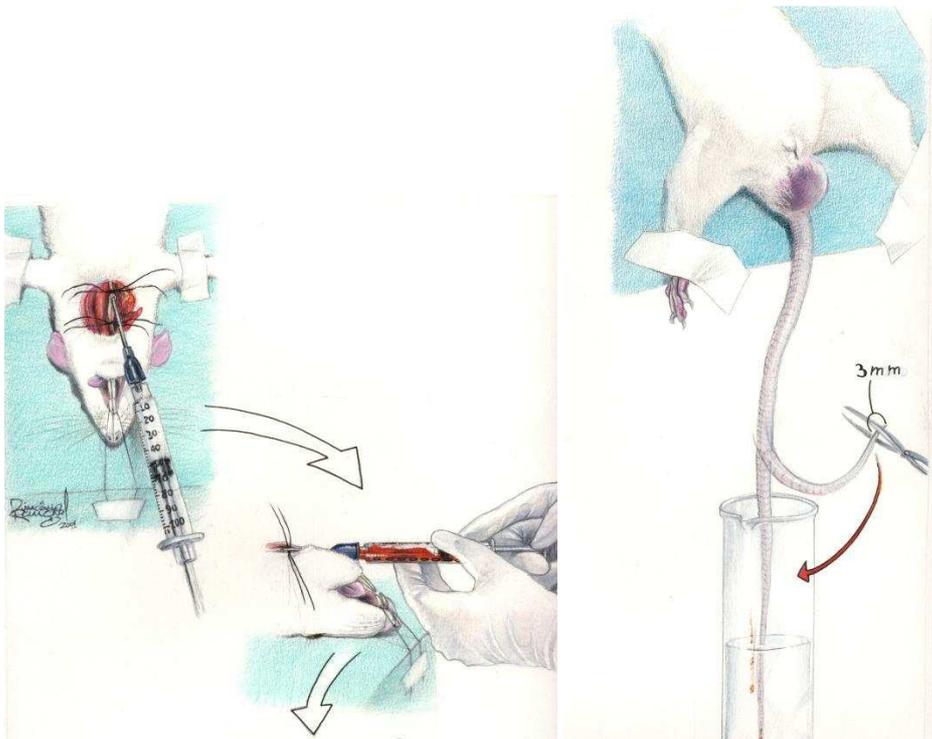


Figura 14 - Esquema ilustrativo do modelo do efeito hemorrágico. Neste modelo, o volume de sangue perdido é calculado mensurando-se a concentração de hemoglobina dissolvida na água destilada contida na proveta (Desenho cedido pelo LABTEC).

3.2.11 Ensaio de agregação plaquetária

Sangue venoso periférico foi coletado de voluntários humanos (idade 20-25), não-fumantes e que não tomaram nenhum agente ativador plaquetário por dez dias. O sangue foi coletado em tubos contendo citrato de sódio 3,8% e centrifugado a 200 x g

por 10 min à temperatura ambiente, para obter um plasma rico em plaquetas (PRP). Uma alíquota de PRP foi centrifugada a 1.200 x g por 10 min para se obter um plasma pobre em plaqueta (PPP). A agregação plaquetária em PRP foi medida por um método turbidimétrico (a contagem final de plaquetas foi de 300.000/ μ L) em um Cronolog Agregometer (Havertown, PA, USA). A linha base (0%) e 100% de agregação foram estabelecidas por medição da transmissão de luz em PRP e PPP, respectivamente. Polissacarídeos sulfatados (0-150 μ L/mL) foram adicionados a 400 μ L de PRP e, após 1 min de incubação a 37 °C, ADP (0,1 μ M) e colágeno (0,1 μ M) foram adicionados e a agregação foi registrada por 8 min. Simultaneamente, foram realizados controles sem polissacarídeos sulfatados.

3.2.12 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). Diferenças nos valores da média foram analisadas usando o teste Mann-Whitney U. Quando mais de um grupo foi comparado com um controle, a significância foi avaliada usando a análise de variância pelo ANOVA. $P < 0,01$ foi considerada estatisticamente significativa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados

4.1.1 Teste do TTPa

Os testes de TTPa realizados com plasma humano mostraram que a fração AmII apresentou um pequeno prolongamento no tempo de coagulação sanguínea (20,17 UI/mg), quando comparado com o controle positivo heparina (193 UI/mg) (Figura 16). Comparando-se a atividade anticoagulante da fração estudada no presente trabalho com frações polissacarídicas sulfatadas de outras espécies de algas vermelhas já estudadas (Tabela 2), podemos observar que a fração AmII apresenta potencial anticoagulante intermediário, sendo superior aos obtidos para as algas *Hypnea musciformis* (2,7 UI/mg) e *Solieria filiformis* (8,5 UI/mg), mas inferior aos obtidos para as algas *Gelidium crinale* (65 UI/mg) e *Botryocladia occidentalis* (150 UI/mg).

A capacidade de prolongar o tempo de coagulação sanguínea é uma das propriedades mais estudadas dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas (MELO, F, R. *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010a). Estudos na literatura, além de incluírem atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas vermelhas, como já descrito, também a reportam em fucanas sulfatadas, obtidas de algas pardas, como por exemplo, das algas *Laminaria cichorioides* (YOON *et al.*, 2007) e *Sargassum horneri* (ATHUKORALA *et al.* 2007). Além disso, a atividade anticoagulante também tem sido relatada para os polissacarídeos sulfatados obtidos de algas verdes, como das algas *Caulerpa racemosa* e *C. cupressoides* (RODRIGUES *et al.* 2010b).

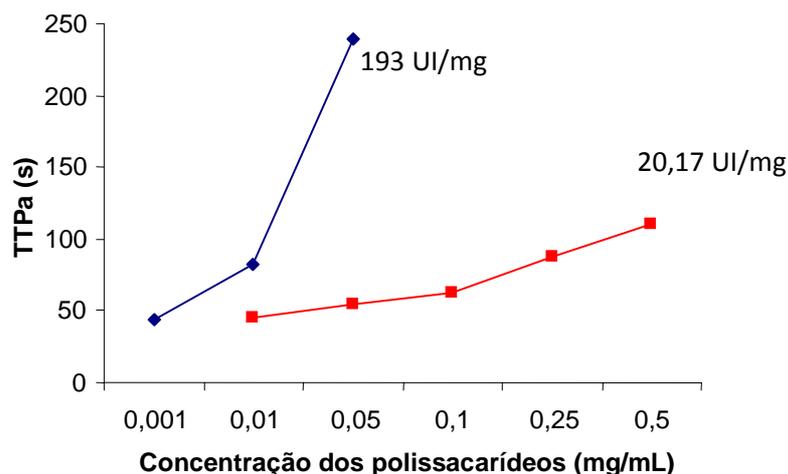


Figura 15 – Atividade anticoagulante pelo teste de TTPa em diferentes concentrações da fração AmII (quadrado vermelho) e da heparina (losângulo azul), como controle.

Tabela 2 - Potenciais anticoagulantes de galactanas sulfatadas de macroalgas vermelhas.

Espécie	Heparina controle	Galactana sulfatada	Referência
	UI/mg	UI/mg	
<i>Acanthophora muscoides</i>	193	20,17	Este trabalho
<i>Acanthophora spicifera</i>	NI*	>120s	Duarte <i>et al.</i> (2004)
<i>Botryocladia occidentalis</i>	193,00	150,00	Farias <i>et al.</i> (2000)
<i>Champia feldmannii</i>	NI*	3xT ₀	Assreuy <i>et al.</i> (2008)
<i>Gelidium crinale</i>	180,00	65,00	Pereira <i>et al.</i> (2005)
<i>Halymenia floresia</i>	193,00	68,40	Amorim <i>et al.</i> (2011)
<i>Halymenia sp</i>	100,00	143,10	Rodrigues <i>et al.</i> (2010a)
<i>Halymenia pseudofloresia</i>	100,00	464,20	Rodrigues <i>et al.</i> (2009)
<i>Hypnea musciformis</i>	193	2,7	Rodrigues <i>et al.</i> (2010a)
<i>Lomentaria catenata</i>	183	62,5	Pushpamali <i>et al.</i> (2008)
<i>Solieria filiformis</i>	193	8,5	Rodrigues <i>et al.</i> (2010a)

* não informado

4.1.2 Teste do TTPa *ex vivo*

Para determinar a existência de correlação entre os efeitos *in vitro* e *in vivo*, os polissacarídeos sulfatados foram administrados por via intravenosa em ratos. Assim como foi verificado no ensaio de TTPa *in vitro*, a fração AmII apresentou uma baixa atividade anticoagulante no modelo *ex vivo* (Figura 17). A fração AmII, somente na dose de 1 mg/kg, apresentou diferença estatística na razão entre o controle e a amostra (T_1/T_0 $2,94 \pm 0,65$), quando comparada ao grupo controle salina. Esse resultado, quando comparado com os obtidos para as algas *B. occidentalis* e *G. crinale*, também na dose de 1 mg/kg, apresentam-se semelhantes, sendo obtidos os valores de $2,4 \pm 0,06$ e $2,52 \pm 0,2$, respectivamente (FONSECA *et al.*, 2008). A heparina mostrou-se um anticoagulante muito mais efetivo que a fração AmII, apresentando uma razão de $4,92 \pm 0,07$ na dose de 0,1 mg/kg.

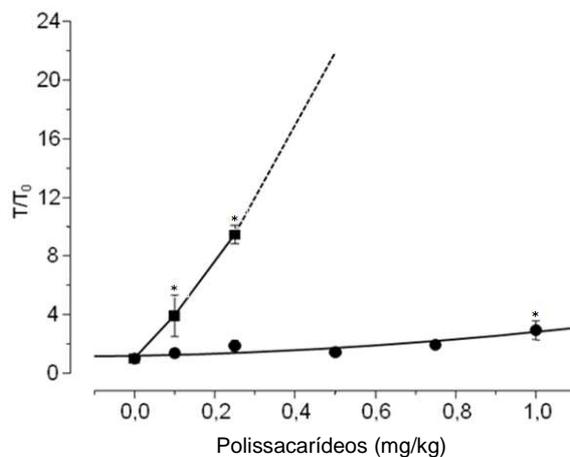


Figura 16 – Ensaio de TTPa *ex vivo*. As atividades anticoagulantes da fração AmII e da heparina foram expressas como T_1/T_0 , que é a relação entre o tempo de coagulação na presença (T_1) e ausência (T_0) de polissacarídeos sulfatados na mistura de incubação (* $p < 0.01$ versus controle salina).

4.2 Atividade antitrombótica in vivo em modelo venoso

Distúrbios relacionados a trombose venosa principalmente, trombose venosa profunda e embolia pulmonar, apresentam em média um índice de ocorrência de um a três indivíduos por 1000 por ano, com incidência maior entre os homens e em pessoas com idade mais avançada. As regiões do corpo que apresentam uma maior ocorrência de trombose venosa profunda são as pernas e embolia, esta última sendo considerada grave, com uma taxa de letalidade superior a 5% (FLINTERMAN *et al.*, 2008).

Os modelos animais de trombose têm desempenhado um papel crucial na descoberta e desenvolvimento de compostos utilizados com sucesso para o tratamento e prevenção de doenças trombóticas (LEADLEY JR., 2000). O modelo experimental de trombose venosa (WESSLER, 1959) é baseado na ativação da coagulação sanguínea através da administração intravascular de tromboplastina e da estase venosa. O trombo venoso resultante, composto principalmente por fibrina e hemácias, apresenta-se não aderido à parede do vaso (VOGEL *et al.*, 1989; FREUND *et al.*, 1990; HERBERT *et al.*, 1992).

No presente trabalho, a fração AmII (0,05; 0,10; 0,25 e 0,50 mg/kg) apresentou atividade antitrombótica em modelo de trombose venosa, sendo esse efeito semelhante a heparina. Nas doses superiores a 0,50 mg/kg (0,75 e 1,00 mg/kg), teve seu efeito revertido, deixando de apresentar atividade antitrombótica (Figura 22).

Comparando esses dados com frações polissacarídicas de outras algas vermelhas (Tabela 3), podemos observar que, interessantemente, a fração polissacarídica AsIV da alga de mesmo gênero *Acanthophora spicifera* apresentou comportamento semelhante, sendo sua atividade antitrombótica máxima na dose de 0,50 mg/kg (69,13%) tendo seu efeito antitrombótico reduzido em doses superiores (FONTES, 2009).

De forma semelhante, a fração polissacarídica PC I obtida da alga *Pterocladia capillacea* apresentou atividade antitrombótica máxima na dose de 0,50 mg/kg (65,65%), mas seus efeitos em doses superiores (1,00 e 2,00 mg/kg) foram menos pronunciados (QUINDERÉ, 2008). Esse mesmo comportamento dual foi observado na fração polissacarídica (GaIV) isolada da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa*, que reduziu o peso dos trombos formados em 94,40% quando administrada na dose de

1mg/kg, tendo sido esta atividade reduzida na dose de 2,00 mg/kg e na dose de 3 mg/kg não houve diferença em relação ao controle salina (QUEIROZ, 2010)

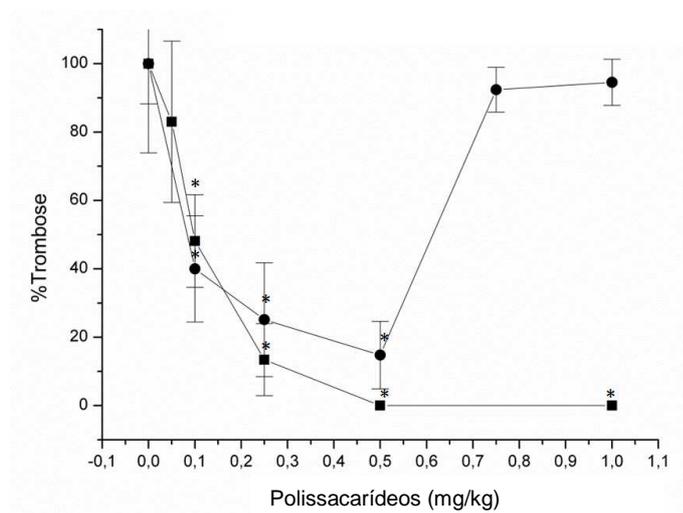


Figura 17 - Efeitos antitrombóticos após administração de polissacarídeos sulfatados em ratos. Atividade antitrombótica venosa foi estudada usando um modelo de estase venosa que combina estase e hipercoagulação. Diferentes doses de heparina (quadrado fechado) ou galactana sulfatada de *A. muscoides* (círculo fechado) foram administradas. A tromboplastina (5 mg/kg) foi injetada por via i.v., e ocluído um segmento (0,7 cm) da veia cava inferior. Após 20 min, o trombo formado foi removido, seco e pesado. Os resultados foram expressos em porcentagem do peso. 100% representa a ausência da inibição da trombose (n=5, média \pm SEM, * p< 0.01 versus controle).

Tabela 3 - Potenciais antitrombótico de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas vermelhas.

Espécie	Fração	Inibição máxima da trombose (%)	Dose aplicada na inibição máxima (mg/kg)	Referência
<i>Acanthophora muscoides</i>	AmII	81,52	0,5mg/kg	Este trabalho
<i>Acanthophora spicifera</i>	AsIV	69,13	0,5mg/kg	Fontes, 2009
<i>Botryocladia occidentalis</i>	FII	75	0,25mg/kg	Fonseca <i>et al.</i> , 2008
<i>Gelidiella acerosa</i>	GaIV	94,36	1mg/kg	Queiroz, 2010
<i>Gelidium crinale</i>	FII	100	3 mg/kg	Fonseca <i>et al.</i> , 2008
<i>Pterocladia capillacea</i>	PCI	65,65	0,5mg/kg	Quinderé, 2008

O fato da fração AmII apresentar atividade antitrombótica e não alterar de maneira significativa o TTPa pode ser considerado vantajoso considerando que uma das principais razões que torna o tratamento com heparina não fracionada laborioso é a necessidade do paciente permanecer internado e submeter-se ao teste de TTPa até que volte a níveis normais devido ao risco de hemorragia.

Para superar o potencial efeito adverso de sangramento, tem-se investigado meios de reduzir as atividades anticoagulantes da heparina, reforçando simultaneamente as suas atividades antitrombóticas, através de modificações químicas e de fracionamento de heparina nativa para formas com menores massas moleculares. O desenvolvimento de polissacarídeos com atividade antitrombótica de algas também seria vantajoso por evitar uma potencial contaminação com príons ou vírus das heparinas comerciais, que são obtidas a partir de tecidos animais. Além disso, com atividades ou alvos mais específicos, os polissacarídeos sulfatados de algas poderiam apresentar aplicações complementares à heparina (JIAO *et al.*, 2011).

O efeito dual de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas sobre a trombose venosa já foi relatado para as algas *B. occidentalis* e *G. crinale*, mas há diferenças marcantes nos comportamentos destes polissacarídeos. A galactana da alga *B. occidentalis* apresenta o efeito antitrombótico em baixas doses (até 0,25 mg/kg) e um efeito pró-trombótico em doses acima de 0,5 mg/kg. Já a galactana da alga *G. crinale* apresenta leve efeito pró-trombótico em doses baixas (até 1,0 mg/kg) e um potente efeito antitrombótico em doses superiores a 2,0 mg/kg, tendo sido observado um efeito máximo (100% de inibição da trombose) na dose de 3 mg/kg (FONSECA *et al.*, 2008). No presente trabalho, a fração AmII apresentou pronunciado efeito antitrombótico até a dose de 0,50 mg/kg e teve seu efeito reduzido em doses superiores, mas não se mostrou pró-trombótica até a dose máxima utilizada (1,0 mg/kg).

Fonseca *et al.* (2008) discutiram esse comportamento dual através dos ensaios do tempo de recalcificação e de ativação do fator XII. No tempo de recalcificação, foi observado que a galactna sulfatada da alga *G. crinale* mostrou-se pró-coagulante em baixas doses e a galactna de *B. occidentalis* mostrou-se pró-coagulante em doses mais elevadas, sendo semelhantes aos resultados obtidos na curva da trombose venosa. A

galactana sulfatada da alga *B. occidentalis* foi capaz de ativar o fator XII, enquanto a da *G. crinale*, assim como a heparina, não ativou o fator XII.

Para melhor compreender a redução da atividade antitrombótica em doses superiores a 0,50 mg/kg, a fração AmII também foi avaliada nos ensaios do tempo de recalcificação e de ativação do fator XII.

4.3 Tempo de recalcificação

O tempo de recalcificação fornece uma melhor análise da atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados no sistema de coagulação que o TTPa, por não apresentar a interferência dos fosfolipídeos. No ensaio do TTPa, amplamente utilizado para monitorar a atividade anticoagulante em estudos clínicos e experimentais, a coagulação é iniciada através da adição de fosfolipídeos, o que pode simular a superfície negativa dos polissacarídeos de alto peso molecular (FONSECA *et al.*, 2008).

No ensaio de tempo de recalcificação, a fração AmII não alterou significativamente o tempo levado para a formação do coágulo (Figura 18), apresentando resultado semelhante ao ensaio do TTPa *ex vivo*. Foram necessárias doses elevadas de AmII para que ocorresse uma alteração na razão T_1/T_0 (doses > 1000 $\mu\text{g/mL}$). Como pode ser observado pelo gráfico, a fração AmII e a heparina não apresentaram atividade pró-coagulante nas doses testadas ($T_1/T_0 < 1$). A heparina, utilizada como controle positivo, apresentou prolongamento do tempo de recalcificação deste ensaio ($T_1/T_0 = 3$) na dose de 5 $\mu\text{g/mL}$.

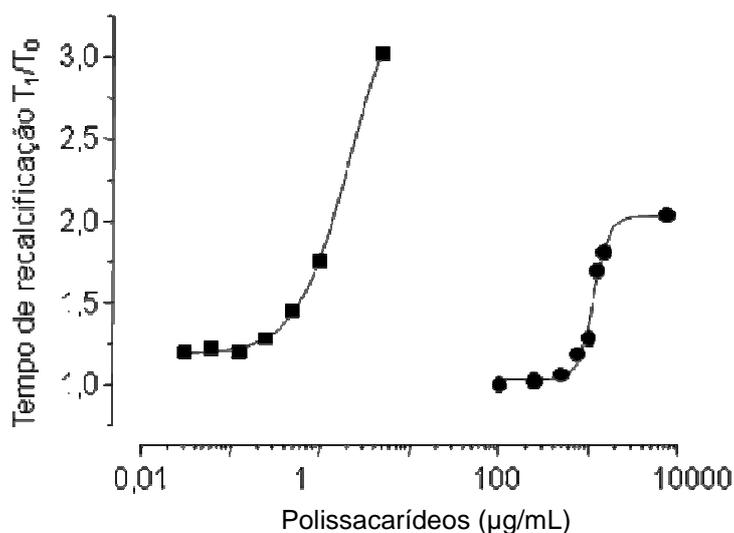


Figura 18 – Ensaio do tempo de recalcificação. O ensaio foi realizado utilizando plasma humano ao qual foram adicionados diferentes concentrações de AmII (círculo fechado) ou heparina (quadrado fechado). Após 60 segundos de incubação a 37 °C, 100 µL de CaCl₂ a 0,25 M foram adicionados e a transmitância a 405 nm registrada por 720 segundos (T_1/T_0).

A galactana de *G. crinale* tem um discreto efeito pró-coagulante ($T_1/T_0 < 1$) em baixas concentrações (até ~15 µg/mL) no tempo de recalcificação e um forte efeito anticoagulante em altas concentrações ($T_1/T_0 > 1$). Já a galactana de *B. occidentalis* apresenta comportamento oposto, ou seja, um forte efeito anticoagulante em baixas concentrações (até ~10 µg/kg), atingindo a eficácia máxima em ~5,0 µg/mL ($T_1/T_0 \sim 2,5$) e efeito pró-coagulante em concentrações acima de 10 µg/mL (FONSECA *et al.*, 2008). Diferentemente, a fração AmII não apresentou efeito pró-coagulante nas doses analisadas (de 100 a 1000 µg/mL).

4.4 Ativação do fator XII na presença de polissacarídeos sulfatados

Para investigar se a redução da atividade antitrombótica em doses elevadas poderia ser explicada pela ativação do fator XII, assim como ocorre com a galactana sulfatada da alga *B. occidentalis*, a galactana da alga *A. muscoides* foi utilizada no ensaio de ativação do fator XII, que embora não inicie a coagulação sanguínea, atua na estabilização da formação de coágulo via ativação de FXI (SCHOUSBOE, 2008).

Diante do exposto, neste estudo, a ativação do FXII foi analisada na presença de heparina, controle negativo neste ensaio, AmII, e dois controles positivos, condroitim sulfatado fucosilado (FuCs) e galactana da alga *B. occidentalis*. Foi observado que a fração AmII começa ativar o FXII em FXIIa em concentração plasmática (~ 70 µg/mL) semelhante a dose em que AmII não apresentou efeito antitrombótico (Figura 19), visto que a dose de 0,75 mg/kg é aproximadamente igual a concentração de 70 µg/mL no plasma. Esses resultados indicam que a redução da atividade antitrombótica em modelo de trombose venosa em doses superiores a 0,5 mg/kg pode estar relacionada à ativação do FXII.

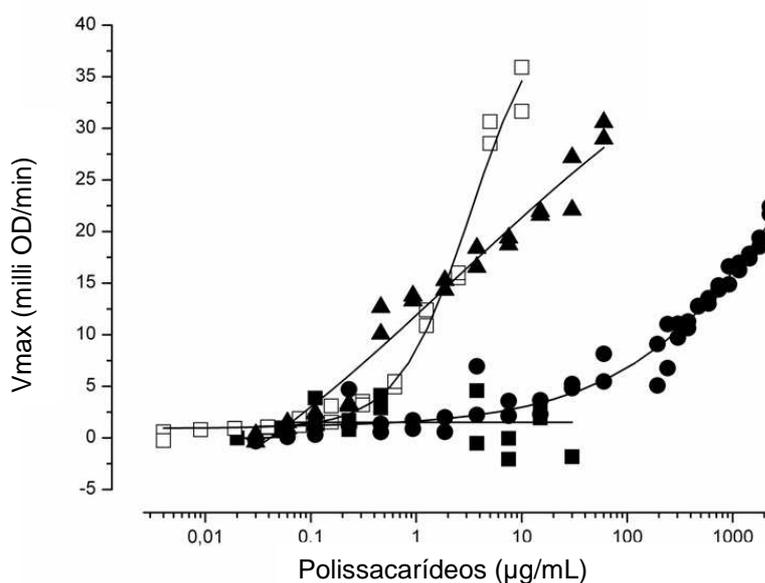


Figura 19 – Efeito dos polissacarídeos sulfatados na ativação do fator XII. Plasma humano foi incubado com concentrações crescentes de AmII (círculo fechado), galactana de *B. occidentalis* (triângulo fechado), condroitim sulfato fucosilado (quadrado aberto) ou heparina (quadrado fechado). Após 60 segundos de incubação a 37 °C, foi adicionado 0,6 mM de substrato cromogênico para caliceína plasmática. O aumento na absorbância a 405 nm foi expresso em densidade óptica/min.

O FucCS, um polissacarídeo sulfatado do pepino do mar *Ludwigothurea grisea*, composto por um esqueleto semelhante ao de condroitim sulfato, mas com ramificações de fucose sulfatada, foi utilizado neste ensaio por ser um potente ativador do fator XII em plasma humano (FONSECA *et al.*, 2006). A galactana sulfatada da *B. occidentalis*, como já relatado anteriormente, ativou o FXII, enquanto a heparina por não ativá-lo foi utilizada no nosso estudo como controle negativo.

Melo e Mourão (2008), com o intuito de dissociar os efeitos anti e pró-trombóticos da galactana sulfatada da alga *B. occidentalis*, utilizaram frações com baixo peso molecular, obtidas por hidrólise branda, seguida de cromatografia de exclusão molecular. Os autores observaram que com a redução do peso molecular ocorria redução na ativação do FXII e que a fração de aproximadamente 5 kDa não foi capaz de ativar o FXII, apresentando efeito antitrombótico semelhante a heparina não fracionada quando avaliada em modelo de trombose venosa.

4.5 Inibição da trombina ou fator Xa por AT ou HCII na presença de polissacarídeos sulfatados

A atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga *A. muscoides* foi avaliada através de ensaios com proteases e inibidores da coagulação purificados. A fração AmII não foi capaz de inibir a trombina tanto por AT (Figura 19), como pelo HCII (Figura 20), nas mesmas concentrações em que apresentou efeito antitrombótico. No entanto, em concentrações elevadas AmII foi capaz de causar inibição próxima a 100%. Enquanto, no ensaio de inibição do fator Xa por AT (Figura 21), a fração AmII foi capaz causar inibição em doses semelhantes a da heparina, sugerindo que a fração apresenta especificidade pelo fator Xa.

Diferentemente, as galactanas sulfatadas das algas *B. occidentalis* e *G. crinale* apresentaram curvas sigmóides de inibição da trombina na presença de AT coincidentes à observada para heparina. No ensaio de inibição da trombina na presença de HCII, observou-se que a galactana de *B. occidentalis*, utilizando as mesmas concentrações, também apresentou curva semelhante a da heparina, enquanto que a galactana de *G. crinale*, mesmo em concentrações mais elevadas, não foi capaz de inibir completamente a atividade da trombina. Além disso, quando a protease alvo utilizada foi o fator Xa, concentrações mais elevadas das referidas galactanas sulfatadas foram necessárias para obtenção do mesmo efeito da heparina (PEREIRA *et al.*, 2005).

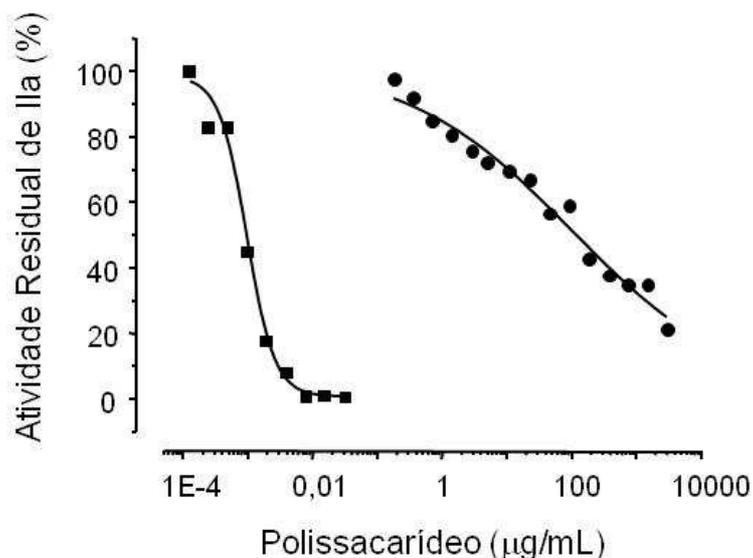


Figura 20 - Dependência da concentração de polissacarídeos sulfatados para inativação da trombina pela antitrombina. Antitrombina (10 nM) foi incubada com trombina (2 nM), na presença de várias concentrações de AmII (círculo fechado) ou heparina (quadrado fechado). Após 60 segundos de incubação a 37 °C, a atividade remanescente de trombina determinada através da adição de substrato cromogênico S-2238 e a absorbância registrada a 450 nm por 120 segundos.

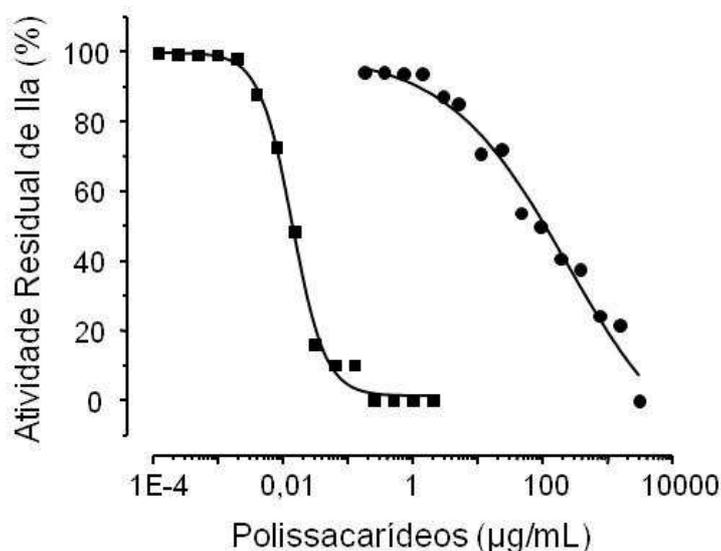


Figura 21 - Dependência da concentração de polissacarídeos sulfatados para inativação da trombina pelo cofator II da heparina. Cofator II da heparina (30 nM) foi incubado com trombina (2 nM), na presença de várias concentrações de AmII (círculo fechado) ou heparina (quadrado fechado). Após 60 segundos de incubação a 37 °C, a atividade remanescente de trombina determinada através da adição de substrato cromogênico S-2238 e a absorbância registrada a 450 nm por 120 segundos.

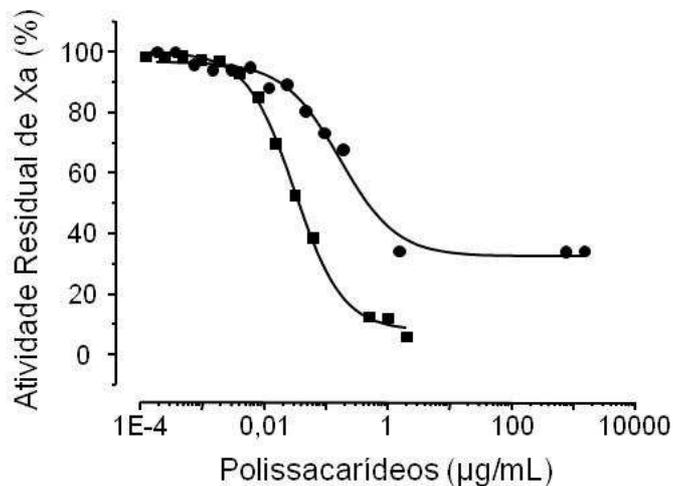


Figura 22 - Dependência da concentração de polissacarídeos sulfatados para inativação do fator Xa pela antitrombina. Antitrombina (10 nM) foi incubada com fator Xa (2 nM), na presença de várias concentrações de AmII (círculo fechado) ou heparina (quadrado fechado). Após 60 segundos de incubação a 37 °C, a atividade remanescente de trombina determinada através da adição de substrato cromogênico S-2765 e a absorbância registrada a 450 nm por 120 segundos.

As galactanas de *G. crinale* e *B. occidentalis* tem estruturas semelhantes, mas diferem principalmente na quantidade de unidades de galactose 2,3-disulfatadas. Comparações entre a atividade anticoagulante desses polissacarídeos revelam que os requisitos estruturais necessários para a interação de galactanas sulfatadas com inibidores da coagulação e suas proteases alvo não são apenas uma consequência de sua densidade de carga. A ocorrência de unidades de galactose 2,3-disulfatadas é importante, mas a proporção ótima destas unidades para o efeito do polissacarídeo em ensaios de coagulação varia, dependendo da protease e do inibidor da coagulação (PEREIRA *et al.*, 2005).

Moléculas com especificidade pelo FXa apresentam uma boa atividade em modelos de injúria arterial e não apresentam um aumento no sangramento, por essas razões tornaram-se o principal ponto de investigação no desenvolvimento de novos fármacos e terapias em doenças relacionadas ao sistema de coagulação (NORIKO, 2010). Vários estudos com o objetivo de desenvolver moléculas capazes de inativar o

FXa apresentaram resultados semelhantes, mesmo fazendo o uso de metodologias diferentes na formação da lesão arterial (VLASUK *et al.*, 1991; RAGOSTA *et al.*, 1994; LYNCH *et al.*, 1995; NICOLINI *et al.*, 1996; HAYASHI, 2001; WONG, 2002, 2007, 2008; NORIKO, 2010). Nesses estudos, todas as moléculas utilizadas foram produzidas sinteticamente, enquanto a fração AmII é um composto natural.

4.6 Avaliação das mudanças da fluorescência intrínseca da antitrombina induzida por heparinas e galactana sulfatada

Visto a especificidade da fração AmII para com o FXa ligado a AT, foi realizado o ensaio de mudança da fluorescência intrínseca da antitrombina, com o intuito de averiguar se a fração AmII liga-se na mesma região D-hélice que a heparina.

Sabe-se que a emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano (Trp) da AT é maior quando este se encontra em regiões mais hidrofóbicas da molécula. Essa internalização é ocasionada pela heparina, mais especificamente, pela região pentassacarídica da heparina, quando se liga na região D-hélice da AT. A internalização dos resíduos de triptofano, pode ser acompanhado por um fluorímetro, através da medida da emissão de fluorescência na faixa de 290 à 450 nm (STREUSAND *et al.*, 1995) (Figura 23 A). Nesse ensaio foram utilizadas quatro heparinas (bovina, suína e, as heparinas bovina de alta e baixa afinidade pela AT). As heparinas de alta e baixa afinidade pela AT foram obtidas por cromatografia de afinidade tendo como ligante AT e eluídas com concentrações crescentes de NaCl (OLSON, 1988).

Na análise dos dados obtidos no nosso trabalho, foi observado que a fração AmII não alterou a emissão de fluorescência, sugerindo que a AmII ligou-se AT para inativar o FXa por um mecanismo diferente da heparina (Figura 23 B). De maneira semelhante a fração AmII, os polissacarídeos sulfatados da alga *B. occidentalis* e *G. crinale* não foram capazes de ocasionar uma alteração na emissão de fluorescência (OLIVEIRA, 2010). Esse resultado pode ser justificado pela ausência da região pentassacarídica da heparina nessas galactanas sulfatadas.

Diante do exposto, a utilização futura de sondas hidrofóbicas, capazes de se ligar em outras regiões da AT, poderá ser considerada uma ferramenta importante na compreensão de como e onde as galactanas sulfatadas podem se ligar com AT e exercer suas funções inibitória nos fatores alvos da AT.

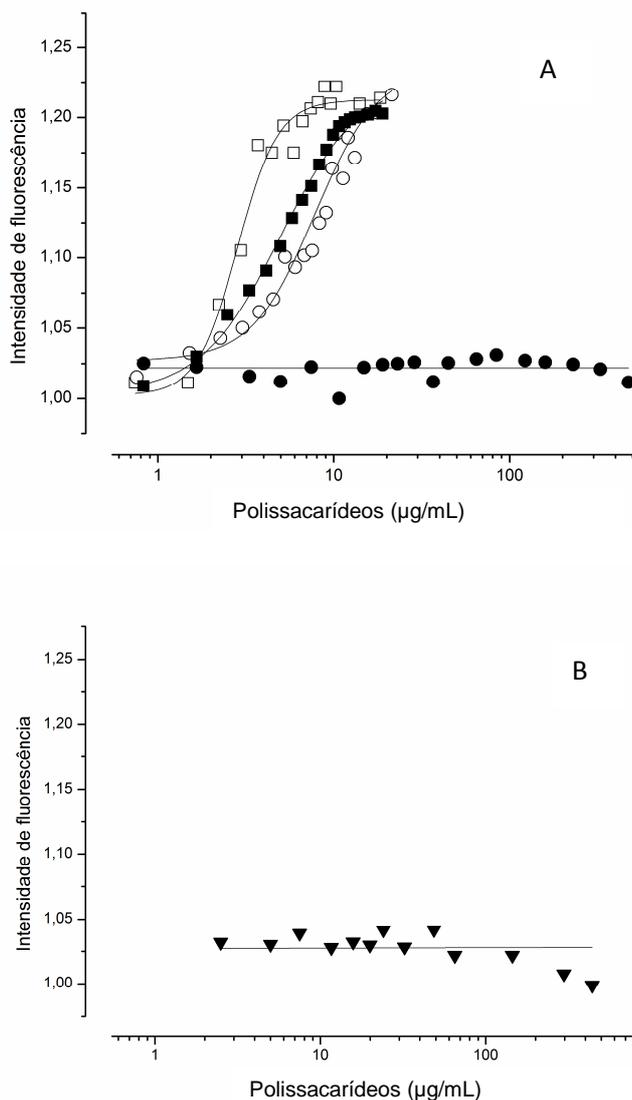


Figura 23. Modificações na fluorescência da antitrombina induzida por heparina ou AmII. (A) Adições de heparina suína (quadrado aberto), heparina bovina (círculo aberto), heparina bovina de alta afinidade (quadrado fechado) e de heparina bovina de baixa afinidade (círculo fechado). (B) Adições de AmII (triângulo fechado). Em A e B as heparinas e AmII foram adicionadas em uma solução de AT a 0,5 µM. As mudanças no espectro de emissão de fluorescência intrínseca da AT foram monitoradas entre 290 e 450 nm e expressas como as integrais das curvas obtidas.

4.7 Atividade antitrombótica *in vivo* em modelo arterial

A trombose arterial e, em especial, a arterosclerose estão se tornando um dos principais problemas de saúde no mundo. A arterosclerose caracteriza-se como uma doença sistêmica e progressiva em que a parede arterial engrossa através de um processo inflamatório, de estresse oxidativo e de dislipidemia. A formação de uma placa arterosclerótica restringe o fluxo no lúmen do vaso e em caso de ruptura causa trombose súbita e oclusão do vaso, resultando em lesão no miocárdio, derrame, infarto ou uma injúria no membro afetado (PARK, 2012).

Na avaliação da atividade da fração AmII no modelo de trombose arterial, foi utilizado o modelo de injúria do endotélio por cloreto férrico. Este modelo tem sido amplamente utilizado para avaliar as atividades antitrombóticas de agentes que atuam por mecanismos diferentes. Neste modelo, um trombo oclusivo é produzido na artéria carótida através da aplicação de papel de filtro saturado com FeCl_3 diretamente sobre a superfície externa da artéria. A formação do trombo é precedida por dano celular no endotélio, incluindo a separação das junções de células endoteliais. A exposição da parede do vaso e a ativação plaquetária e da cascata de coagulação produzem um trombo contendo fibrina, plaquetas e glóbulos vermelhos (ROBINSON *et al.*, 2003).

No presente trabalho, a fração AmII (0,10; 0,25; 0,50 e 1,00 mg/kg), quando avaliada em modelo de trombose arterial, apresentou atividade estatisticamente igual ao controle positivo heparina. Diferentemente do observado no modelo de trombose venosa, a atividade antitrombótica no modelo arterial foi crescente com o aumento das doses utilizadas.

As galactanas sulfatadas de *B. occidentalis* e *G. crinale* também apresentaram efeito dose-dependente em modelo de trombose arterial, porém doses mais elevadas dessas galactanas foram necessárias para a obtenção do mesmo efeito observado com a heparina (FONSECA *et al.*, 2008). Os autores utilizaram o modelo de trombose por injúria da parede do endotélio em que o corante rosa de bengala, quando em contato com a luz oriunda do laser posicionado sobre a artéria carótida, dissocia-se formando radicais livres que lesam o endotélio, provocando assim a formação gradual do trombo (VANDEPLASSCHE *et al.*, 1990). No entanto, não encontramos dados na literatura

sobre a atividade antitrombótica arterial de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas utilizando o modelo de injúria induzida por cloreto férrico.

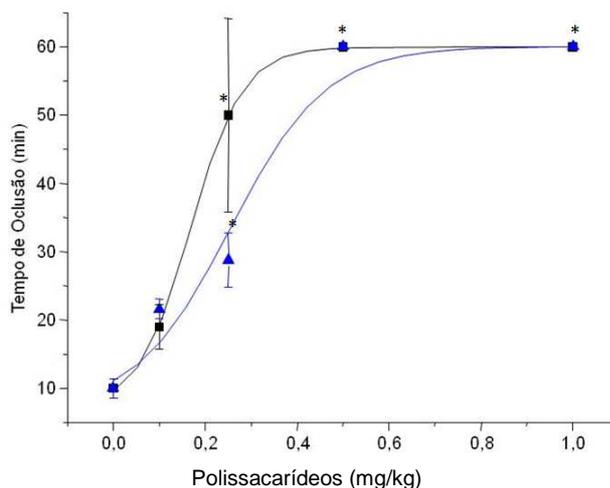


Figura 24 - Efeitos antitrombóticos de AmII e heparina em ratos. A atividade antitrombótica foi medida na artéria carótida direita. AmII (triângulo azul fechado) ou heparina (quadrado preto fechado) foram administradas e, após circulação por 5 min, adicionado sobre a artéria papel filtro embebido em FeCl_3 50% (m:vol) durante 1 minuto. Após remoção do papel filtro, a artéria foi lavada com solução salina e o fluxo monitorado até oclusão total da artéria ou até 60 min ($n=5$, média \pm SEM, * $p < 0,01$ versus controle).

Doenças tromboticas venosas e arteriais têm sido tradicionalmente vistas como eventos patofisiológicos isolados. A trombose arterial tem sido considerada em grande parte como um fenômeno de ativação plaquetária, ao passo que a trombose venosa é em grande parte uma questão de ativação do sistema de coagulação. No entanto, há evidências de que essa dicotomia seja provavelmente muito simplificada. Fármacos anticoagulantes tem-se mostrados eficazes para a prevenção de embolia arterial, assim como agentes antiplaquetários, eficazes para a prevenção de distúrbios tromboembólicos venosos, embora em menor extensão do que os fármacos anticoagulantes (PRANDONI, 2009).

4.8 Efeito hemorrágico

Uma das limitações na utilização da heparina não fracionada é a tendência hemorrágica. A heparina de baixo peso molecular também apresenta o risco de sangramento, já relatado na literatura e, em particular, pode causar disfunção renal que pode estar relacionada a utilização de dosagens superiores a realmente necessárias (PUYMIRAT *et al.*, 2011).

Dados na literatura, como o mencionado anteriormente, reforçam a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos, que preferencialmente não apresentem atividade hemorrágica. Desta forma, foi realizado o ensaio de tempo de sangramento em ratos para averiguar um possível efeito hemorrágico da fração AmII. No entanto, esta fração não diferiu estatisticamente do controle salina em nenhuma das doses utilizadas, mostrando-se segura quanto ao potencial efeito hemorrágico nesse modelo. Diferentemente, a heparina, nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg aumentou a perda sanguínea em 38,5% e 81,25%, respectivamente, em relação ao controle salina, indicando assim o seu alto potencial hemorrágico.

De forma semelhante a fração AmII, os polissacarídeos sulfatados das algas *B. occidentalis* e *G. crinale* também não apresentaram efeito hemorrágico utilizando o modelo, tendo sido empregadas doses de até 2 mg/kg (FONSECA *et al.*, 2008). Diferentemente, Sr *et al.* (1994), relataram que a alga vermelha *Grateloupia indica* apresentou atividade hemorrágica. Esses dados reforçam a atenção na realização de ensaios hemorrágicos prévios em estudos de atividades antitrombóticas com polissacarídeos sulfatados de algas.

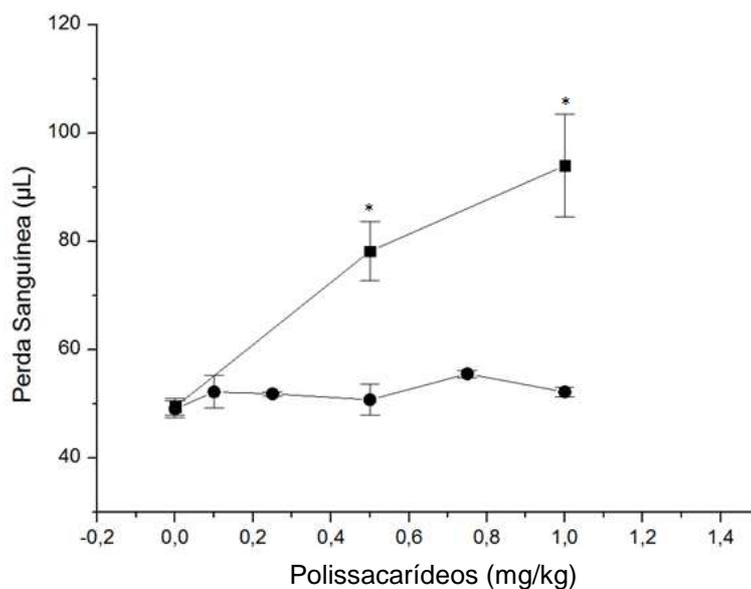


Figura 25 - Efeito hemorrágico de AmII ou heparina. Diferentes doses de heparina (quadrado fechado) e AmII (círculo fechado) foram administradas em ratos e, após circulação por 5 min, a extremidade da cauda foi cortada (3 mm) e imersa em água destilada (40 mL) à temperatura ambiente. A taxa de hemoglobina foi determinada após 60 min. Os resultados foram expressos em μL de sangue perdido ($n=5$, média \pm SEM, * $p < 0.01$ versus controle).

4.9 Ensaio de agregação plaquetária

A fração AmII nas concentrações de 0,1 até 1 mg/mL não apresentou nenhum efeito pró ou anti-agregante, quando testadas em plasma rico em plaqueta, na presença dos agonistas ADP ou colágeno (dados não mostrados).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Acanthophora muscoides* apresentou atividade anticoagulante de 20,17 UI/mg no teste do TTPa e discreto prolongamento no tempo de coagulação no TTPa *ex vivo*. Em ensaios com proteases e inibidores da coagulação purificados, a galactana apresentou especificidade em reforçar a inibição do fator Xa mediada por AT, em concentrações semelhantes a heparina.

Em modelo de trombose venosa, a galactana apresentou efeito semelhante a heparina até a dose de 0,50 mg/kg, sendo esse efeito revertido em doses superiores (0,75 e 1,00 mg/kg). No ensaio do tempo de recalcificação, a galactana não alterou significativamente o tempo levado para a formação do coágulo.

A galactana ativou o FXII na mesma concentração em que não apresentou efeito antitrombótico, indicando que a redução da atividade antitrombótica em modelo de trombose venosa em doses superiores a 0,5 mg/kg pode estar relacionada à ativação do FXII.

Em modelo de trombose venosa, a galactana apresentou efeito antitrombótico estatisticamente igual ao controle positivo heparina em todas as concentrações analisadas. Adicionalmente, a galactana não apresentou efeito hemorrágico.

Em ensaio de agregação plaquetária, a galactana não apresentou nenhum efeito pró ou anti-agregante. A galactana sulfatada não induziu mudanças da fluorescência intrínseca da antitrombina, sugerindo que sua possível interação com a antitrombina pode estar relacionada com um mecanismo diferente da heparina.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que a galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Acanthophora muscoides* apresentou baixo potencial anticoagulante e elevado potencial antitrombótico, além de não apresentar tendência hemorrágica. Esta galactana sulfatada abre novas perspectivas para um possível desenvolvimento de novos fármacos antitrombóticos.

REFERÊNCIAS

AMORIM, R. C. N.; RODRIGUES, J. A. G.; HOLANDA, M. L.; MOURÃO, P. A. S.; BENEVIDES, N. M. B. Anticoagulant properties of a crude sulfated polysaccharide from the red marine alga *Halymenia floresia* (Clemente) C. Agardh). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 3, p. 255-261, 2011.

ANDERSON L.O.; BARROWCLIFFE T.W.; HOLMER E.; JOHNSON E.A.; SIMS G. Anticoagulant effects of (n-3) polyunsaturated fatty acids in rat models of arterial and venous thrombosis. **Thrombosis research**, v.93, p. 6-16, 1976.

ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; COURA, C. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; JORGE, R. J. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; MONTEIRO, H. S. A.; PAULA, R. C. M., BENEVIDES N. M. B. Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1207– 215, 2011.

ASSREUY, A. M. S.; GOMES, D. M.; SILVA, M. S. J.; TORRES, V. M.; SIQUEIRA, R. C. L.; PIRES, A. F. P.; CRIDDLE, D. N.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 691-695, 2008.

AQUINO, R. S.; PEREIRA, M. S.; VAIRO, B. C.; CINELLI, L. P.; SANTOS, G. R. C.; FONSECA, R. J. C.; MOURAO, P. A. S. Heparins from porcine and bovine intestinal mucosa: Are they similar drugs? **Thrombosis and Haemostasis**, v.103, p. 1005-1015, 2010.

ATHUKORALA, Y.; JUNG, W.K.; VASANTHAN, T.; JEON, Y.J. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 184-191, 2006.

ATHUKORALA, Y.; LEE, K.; KIM,S.; JEON, Y. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1711–1716, 2007.

BORISSOFF, J. I.; SPRONK, H. M. H.; CATE, H. T. The Hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, p. 1746-1760, 2011.

BOUCHARD, B.A.; BUTENAS, S.; MANN, K.G.; TRACY, P.B. **Interactions Between Platelets and the Coagulation System**, In: Platelets, Michelson AD (2nd Ed), Academic Press, San Diego, p. 377-402, 2007.

BRUNSWICK; JOHN S., What are Seaweeds and their Significance in Coastal Systems. **Seaweeds and Their Mariculture**, p. 317 – 326, 2009.

CARDOZO, K.H.M.; GUARANTINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICCOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CASTELLINO, F. J.; PLOPLIS, V.A. The protein C pathway and pathological processes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7 p. 140-145, 2009.

CHARGAFF, E.; BANCROFT, F. W.; STANLEY-BROWN, M. Studies on the chemistry of blood coagulation II. On the inhibition of blood clotting by substances of high molecular weight. **Journal of Biological Chemistry**, v. 115, p. 155-161, 1936.

CHOPIN, T.; SAWHNEY, M.; Seaweeds and their mariculture, University of New Brunswick, Saint John, NB, Canada, p. 318-326, 2009.

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.

COURA, C. O.; ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; MENEZES, D. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; EVANGELISTA J. S. A. M.; BENEVIDES N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, p. 335–341, 2012.

CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

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

DAHLBÄCK, B.; VILLOUTREIX, B.O. The anticoagulant protein C pathway. **Federation of European Biochemical Societies**, Letters 579, p. 3310-3316, 2005.

DAVIS, T. A.; VOLESKYA, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, v. 37 p. 4311–4330, 2003.

DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CERZO, A. S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 335-347, 2004.

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CERZO, A.S. The system of galactans of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with emphasis on its minor constituents. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2575-2592, 2004.

EYRE, L.; GRAMLIN, F. Haemostasis, blood platelets and coagulation. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 11, p. 244-246, 2010.

FARIAS, W.R.L.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FLINTERMAN, L.E.; HYLCKAMA V. A.; ROSENDAAL, F.R.; DOGGEN, C.J.M. Recurrent thrombosis and survival after a first venous thrombosis of the upper extremity. **Circulation**, v. 118, p. 1366-1372, 2008.

FONSECA, R. J. C. **Desafios no estudo de novos polissacarídeos antitrombóticos: o condroitim sulfato fucosilado.** 2009. 194f. Tese (Doutorado) – Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

FONSECA, R. J. C.; MOURÃO, P. A. S. Fucosylated chondroitin sulfate as a new oral antithrombotic agent. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 96, p. 822-829, 2006.

FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. N. M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 3, p. 539-545, 2008.

FONTES, B. P. **Atividades anticoagulante e antitrombótica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Acanthophora spicifera* (M. Vahl) Børgesen (Rhodomelaceae).** 2009. 37f. Monografia (Graduação) – Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FREUND M.; CAZENAVE J.P.; COURTNEY M.; DEGRYSE E.; ROITSCH C.; BERNAT A.; DELEBASSÉE D.; DEFREYN G.; MAFFRAND J.P. Inhibition by recombinant hirudins of experimental venous thrombosis and disseminated intravascular coagulation induced by tissue factor in rats. **Thrombosis Haemostasis**, v. 63 p. 187-192, 1990.

FURIE, B.; FURIE, B. C. Mechanisms of thrombus formation. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 938-949, 2008.

FURIE, B.; FURIE, B. C. Thrombus formation in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 3355–3362, 2005.

GAILANI, D.; RENNÉ, T. Intrinsic Pathway of Coagulation and Arterial Thrombosis, **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 27, p. 2507-2513, 2007.

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

GLAUSER, B.F.; REZENDE, R.M.; MELO, F.R.; PEREIRA, M.S.; FRANCISCHETTI, I.M.B.; MONTEIRO, R.Q.; REZAIIE, A.R.; MOURAO, P.A.S.

Anticoagulant activity of a sulfated galactan: serpin-independent effect and specific interaction with factor Xa. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, p. 1183–1193, 2009.

GREINACHER, A. Heparin-induced thrombocytopenia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, p. 9-12, 2009.

GUERRINI, M.; BECCATI, D.; SHRIVER, Z.; NAGGI, A.; VISWANATHAN, K.; BISIO, A.; CAPILA, I.; LANSING, J. C.; GUGLIERI, S.; FRASER, B.; AL-HAKIM, A.; GUNAY, N. S.; ZHANG, Z.; ROBINSON, L.; BUHSE, L.; NASR, M.; WOODCOCK, J.; LANGER, R.; VENKATARAMAN, G.; LINHARDT, R. J.; CASU, B.; TORRI, G.; SASISEKHARAN, R. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 669-675, 2008.

HARDEN, E. A.; FALSHAW, R.; CARNACHAN, S. M.; KERN, E. R.; MARK, N.; PRICHARDA, M. N. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 83, p. 282–289, 2009.

HARRIS, G. U.S. Identifies Tainted Heparin in 11 Countries. New York Times, New York, 22 de abril de 2008. Disponível em: <
<http://www.nytimes.com/2008/04/22/health/policy/22fda.html?pagewanted=all>>.
Acesso em: 15 de julho de 2010.

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

HERBERT, J. M.; BERNAT, A.; MAFFRAND, J. P. Importance of platelets in experimental venous thrombosis in rats. **Blood**, v.80, p. 2281-86, 1992.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. **Marine Drugs**, v. 9, p. 196-223, 2011.

KAMP, P.; STRATHMANN, A.; RAGG, H. Heparin cofactor II, antithrombin-beta and their complexes with thrombin in human tissues. **Thrombosis Research**, v. 101, p. 483–491, 2001.

KALATSKAYA, I.; SCHUSSLER, S.; BLAUKAT, A. MULLER-ESTERL, W.; JOCHUM, M.; PROUD, D.; FAUSSNER, A. Mutation of tyrosine in the conserved NPXXY sequence leads to constitutive phosphorylation and internalization, but not signaling, of the human B2 bradykinin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 31268–76, 2004.

KISHIMOTO, T. K.; VISWANATHAN, K.; GANGULY, T.; ELANKUMARAN, S.; SMITH, S.; PELZER, K.; LANSING, J. C.; SRIRANGANATHAN, N.; ZHAO, G.; GALCHEVA-GARGOVA, Z.; AL-HAKIM, A.; BAILEY, G.S.; FRASER, B.; ROY, S.; ROGERS-COTRONE, T.; BUHSE, L.; WHARY, M.; FOX, J.; NASR, M.; DAL PAN, G.J.; Z.; LANGER, R.S.; VENKATARAMAN, G.; K. AUSTEN, F.; WOODCOCK, J.; SASISEKHARAN, R. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 23, p. 2457-2467, 2008.

KONISHI, N.; HIROE, K.; KAWAMURA, M. Synergistic effect of a factor Xa inhibitor, TAK-442, and antiplatelet agents on whole blood coagulation and arterial thrombosis in rats. **Thrombosis Research**, v. 126, p. 124-129, 2010.

KURZ, K.D.; MAIN, B. W.; SANDUSKY, G. E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. **Thrombosis Research**, v. 60, p. 269-280, 1990.

LAHAYE, M.; ROCHAS, C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. **Hydrobiology**. v. 221, p. 137-148, 1991.

LEADLEY JR., R. J.; CHI, L.; REBELLO, S. S.; GAGNON, A. Contribution of in vivo models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 43, p. 101-116, 2000.

LEE, S. H.; ATHUKORALA, Y.; LEE, J. S.; JEON, Y. J. Simple separation of anticoagulant sulfated galactan from marine red algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 1053-1059, 2008.

LEVINE, M.N.; HIRSH, J.; KELTON, J.G. **Heparin-Induced Bleeding**. London, England: Edward Arnold; 1989.

LINS, K. O. A. L.; BEZERRA, D.P.; ALVES, A. P. N. N.; ALENCAR, N. M. N.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.;

COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal Applied Toxicology**, v. 29, p. 20-26, 2009.

LYNCH JR., J. J.; SITKO, G. R.; LEHMAN, E. D.; VLASUK, G. P. Primary prevention of coronary arterial thrombosis with the factor Xa inhibitor rTAP in a canine electrolytic injury model. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 74, p. 640–645, 1995.

MANN, K.G. Thrombosis: theoretical considerations, **The American Journal of Chemical Nutrition**, v. 65 p. 1657-1664, 1997.

MATHEWS, M. B. **Polyanionic proteoglycans**. In: *Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution* Kleinzeller, Springer, G.F.; Witman, H.G. (eds). Berlin: Springer-Verlag, p. 93-125, 1975.

MINNEMA, M. C.; PETERS, R. J. G.; WINTER, R.; LUBBERS, Y. P. T.; BARZEGAR, S.; BAUER, K. A.; ROSENBERG, R. D.; HACK, C. E.; CATE, H. T. Activation of clotting factors XI and IX in patients with acute myocardial infarction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, p. 2489-2493, 2000.

MELO, E. I.; PEREIRA, M. S.; CUNHA, R. S.; SÁ, M. P. L.; MOURÃO, P. A. S. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 23, p. 169-174, 2008.

MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. An algal sulfated galactan has an unusual dual effect on venous thrombosis due to activation of factor XII and inhibition of the coagulation proteases. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 3, p. 531-538, 2008.

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

MESTECKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, V. D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, p. 267-273, 2010.

DOUGALD M. MONROE, D. M.; HOFFMAN, M.; ROBERTS, H. R., Platelets and Thrombin Generation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22 p. 1381- 1389, 2002.

MULLOY, B.; MOURÃO, P.A.S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulfated polysaccharides using NMR. **Journal of Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 126-135, 2000.

NICOLINI, F. A.; LEE, P.; MALYCKY, J. L.; LEFKOVITS, J.; KOTTKE-MARCHANT, K.; PLOW, E. F.; TOPOL, E. J. Selective inhibition of factor Xa during thrombolytic therapy markedly improves coronary artery patency in a canine model of coronary thrombosis. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 7, p. 39-48, 1996.

NORIKO K.; KATSUHIKO H.; MASAKI K. Synergistic effect of a factor Xa inhibitor, TAK-442, and antiplatelet agents on whole blood coagulation and arterial thrombosis in rats. **Thrombosis Research**, v.126 p. 124-129, 2010.

OLIVEIRA, S. N. M. C. G., **Galactanas Sulfatadas: efeitos na trombose e interação com a antitrombina**. 2010. 194f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

OLSON, S. T.; BJÖRK, Regulation of thrombin by antithrombin and heparin cofactor II. **Plenum Press**; v. 5, p. 159-170, 1992.

OLSON, S. T. Transient kinetics of heparin-catalyzed protease inactivation by antithrombin III. Linkage of protease-inhibitor-heparin interactions in the reaction with thrombin. **Journal of Biological Chemistry**. v. 263 p. 1698-1708, 1988.

ØSTERUD, B. Tissue factor/TFPI and blood cells. **Thrombosis Research**, v. 129, n. 3, p.274-8, 2012

PAINTER, T. J. **Algal polysaccharides**. IN: The polysaccharides, Academic Press Ed., N.Y., II: 195p, 1983.

PARFREY, L. W.; BARBERO, E.; LASSER, E.; DUNTHORN, M.; BHATTACHARYA D.; PATTERSON, D. J.; KATZ L. A. Evaluating Support for the Current Classification of Eukaryotic Diversity. **Plos Genetics**, v.12, n. 12, p. 2062-2073, 2006.

PARK, J.; PANDE, P.; SHRESTHA, S.; CLUBB, F.; JO, J. A., Biochemical characterization of atherosclerotic plaques by endogenous multispectral fluorescence lifetime imaging microscopy. **Atherosclerosis**, v. 220, p. 394-401, 2012

PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MELO, M. R. S.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.

PEREIRA, M. S.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? **Glycobiology** v. 12, p. 573–580, 2002.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, n. 12, p. 1016-1027, 2008.

PRANDONI, P. Venous and arterial thrombosis: Two aspects of the same disease? **Clinical Epidemiology**, v.1, p.1–6, 2009.

PUSHPAMALI, W. A.; NIKAPITIYA, C.; ZOYSA, M. D.; WHANG, I.; KIM, S. J.; LEE, J. Isolation and purification of an anticoagulant from fermented red seaweed *Lomentaria catenata*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.73, n.2, p.274-279, Jul 2008.

PUYMIRAT, E.; AÏSSAOUI, N.; COLLET, J.P.; CHAIB, A.; BONNET, J. L.; BATAILLE, V.; DROUET, E.; MULAK, G.; FERRIÈRES, J.; BLANCHARD, D.; SIMON, T.; DANCHIN, N. Comparison of bleeding complications and one-year survival of lowmolecular weight heparin versus unfractionated heparin for acute myocardial infarction in elderly patients. **International Journal of Cardiology**, Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.10.008>

QUEIROZ, I. N. L. **Atividade antitrombótica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa* (Forsskål) Feldmann & G. Hamel coletada nas praias dos municípios de Flecheiras e Paracuru do litoral cearense.** 2010. 46f.

Monografia (Graduação) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

QUINDERÉ, A. L. G. **Atividades anticoagulante e antitrombótica dos polissacarídeos sulfatados das algas marinhas vermelhas *Acanthophora muscoides* (Rhodomelaceae) e *Pterocladia capillacea* (Gelidiaceae)**. 2008. 37f. Monografia (Graduação) – Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

QUINDERÉ, A. L. G. **Propriedades na nocicepção e na inflamação de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha *Acanthophora muscoides***. 2011. 81f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

QUINSEY, N. S.; GREEDY, A. L.; BOTTOMLEY, S. P.; WHISSTOCK, J. C.; PIKE, R. N. Antithrombin: in control of coagulation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 386–389, 2004.

RAGOSTA, M.; GIMPLE, L. W.; GERTZ, S. D.; DUNWIDDIE, C. T.; VLASUK, G. P.; HABER, H. L.; POWERS, E. R.; ROBERTS, W. C.; SAREMBOCK, I. J. Specific factor Xa inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. **Circulation**, v. 89, p. 1262–1271, 1994.

RATNOFF, O. D. Hemostasis and blood coagulation. **Physiology**. 3 ed. St. Louis: Mosby Year Book; 1993. p. 327–57.

ROBINSON, M.A.; WELSH, D.C.; BICKEL, D.J.; LYNCH JR., J.J.; ELIZABETH A. LYLEB, E.A. Differential effects of sodium nitroprusside and hydralazine in a rat model of topical FeCl₃-induced carotid artery thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 111, p. 59–64, 2003.

RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 2, p. 224-231, 2009.

RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; COURA, C. O.; BENEVIDES, N. M. B. Avaliação do potencial anticoagulante de polissacarídeos

sulfatados de macroalgas marinhas. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**. v. 5, n. 1, p. 56-69, 2010a.

RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B.P.F.; BENEVIDES, N. M. B. Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 32, p.1 13-120, 2010b.

RODRÍGUEZ, M.C.; MATULEWICZ, M.C.; NOSEDA, M.D.; DUCATTI, D.R.B.; LEONARDI, P.I. Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina – Content, structure and physical properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1435-1441, 2009.

ROQUE, M.; RAUCH, U.; REIS, E. D.; CHESEBRO, J. H.; FUSTER, V.; JUAN J. BADIMON, J. J. Comparative study of antithrombotic effect of a low molecular weight heparin and unfractionated heparin in an ex vivo model of deep arterial injury, **Thrombosis Research**, v. 98, p. 499–505, 2000.

SCHERAGA, H.A. The thrombin–fibrinogen interaction. **Biophysical Chemistry**, v.112, p.117–130, 2004.

SCHOENMAKERS, S. H. H. F; REITSMA, P. H.; SPEK, C. A. Blood coagulation factors as inflammatory mediators. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 34, p. 30–37, 2005.

SCHOUSBOE, I. Pharmacological regulation of factor XII activation may be a new target to control pathological coagulation. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 1007–1013, 2008.

SOUSA, A. A. S.; BENEVIDES, N. M. B.; PIRES, A. F.; FIÚZA, F. P.; QUEIROZ, M. G. R.; MORAIS, T. M. F.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, M. A. S. A report of a galactan from marine alga *Gelidium crinale* with in vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Fundamental and Clinical Pharmacology**. doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.01001.x

SR, A. K.; SEM; DAS, A.; K.; BANERJI, N.; SIDDHANTA, A. K.; MODY K. H.; RAMAVAT, B. K.; CHAUHAN, V. D.; VEDASIROMONI J. R.; GANGULY, D. K. A new sulfated polysaccharide with potent blood anti-coagulant activity from the red seaweed *Grateloupia indica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16, p. 279-280, 1994.

STORTZ, C. A.; CEREZO, A. S. Novel findings in carragenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **Current Topics in Phytochemistry**, v. 4, p. 121-134, 2000

STREUSAND, V. J.; BJÖRK, I.; GETTINS, P. G.; PETITOU, M.; OLSON, S. T. Mechanism of acceleration of antithrombin-proteinase reactions by low affinity heparin. Role of the antithrombin binding pentasaccharide in heparin rate enhancement. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 9043-9051, 1995.

THOMAS, J.; SMEETON, F.; LEATHERDALE, B.A. Heparin-induced hyperkalemia. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 80, p. 7-8, 2008.

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.; MONAFO, W. J. Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. **Journal Biological Chemistry**, v. 258, p. 6713–6716, 1983.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Information on Heparin. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/UCM112597>>. Acesso em: 15 de julho de 2010.

USOV, A. I. NMR Spescctroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carragenanas and xylans. **Botanica Marina**, v. 27, p. 189-202, 1984.

VANDERLEI, E. S. O.; ARAÚJO, I. W. F.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; ELOY, Y. R. G.; RODRIGUES, J. A. G.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; MENEZES, D. B.; EVANGELISTA J. S. A. M.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES N. M. B. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflammation Research**, v. 60, p. 1121-30, 2011.

VANDEPLASSCHE, G.; BERNIER, M.; THONE, F.; BORGERS, M.; KUSAMA, Y.; HEARSE, D. J., Singlet oxygen and myocardial injury: ultrastructural, cytochemical and electrocardiographic consequences of photoactivation of rose bengal. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 22, p. 287–301, 1990.

VIANA, G. S. B.; FREITAS, A. L. P.; LIMA, M. M. L.; VIEIRA, L. A. P.; ANDRADE, M. C. H.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal of Medical Biological Research** v. 35, n. 6, p. 713-722, 2002.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VLASUK, G. P.; RAMJIT, D.; FUJITA, T.; DUNWIDDIE, C. T.; NUTT, E. M.; SMITH, D. E.; SHEBUSKI, R. J. Comparison of the in vivo anticoagulant properties of standard heparin and the highly selective Factor Xa inhibitors antistasin and tick anticoagulant peptide (TAP) in a rabbit model of venous thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 65, p. 257-262, 1991.

VOGUEL, G. M. T.; MEULEMAN, D. G.; BOURGONDIEN, 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.

VO, T.; KIM, S. Potential anti-HIV agents from marine resources: an overview. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2871-2892, 2010.

WALENGA, J. M.; FRENKEL, E. P.; BICK, R. L. Heparin-induced thrombocytopenia, paradoxical thromboembolism, and other adverse effects of heparin-type therapy. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 17, p. 259– 282, 2003.

WEITZ, J. I. Low-molecular-weight heparins. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 688–698, 1997.

WESSLER, S.; REIMER, S. M.; SHEPS, M. C. Biological assay of a thrombosis inducing activity in human serum. **Journal of Physiology**, v. 14, p. 943–946, 1959.

WONG, P. C.; CRAIN, E. J.; WATSON, C. A. Arterial antithrombotic and bleeding time effects of apixaban, a direct factor Xa inhibitor, in combination with antiplatelet therapy in rabbits. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, p. 1736–1741, 2008.

WONG, P. C.; CRAIN, E. J.; WATSON, C. A.; WEXLER, R. R.; LAM, P. Y.; QUAN M. L.; KNABB, R. M. Razaxaban, a direct factor Xa inhibitor, in combination with aspirin and/or clopidogrel improves low-dose antithrombotic activity without enhancing bleeding liability in rabbits. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 24, p. 43–51, 2007.

WONG, P. C.; CRAIN, E. J.; WATSON, C. A.; ZASPEL, A.M.; WRIGHT, M. R.; LAM, P. Y.; PINTO, D. J.; WEXLER, R. R.; KNABB, R. M. Nonpeptide factor Xa inhibitors III: effects of DPC423, an orally-active pyrazole antithrombotic agent, on arterial thrombosis in rabbits. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, p. 993–1000, 2002.

YASUHARA-BELL, J.; LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. **Antiviral Research**, v. 86, p. 231-240, 2010.

YOON, S. J.; PYUN, Y. R.; HWANG, J. K.; MOURÃO, P. A. S. A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* has mainly heparin cofactor II- dependent anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 15, p. 2326-2330, 2007.

ZHOU, G.; XIN, H.; SHENG, W.; SUN, Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo growth-inhibition of S180 tumor by mixture of 5-Fu and low molecular λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 153–157, 2005.

ZHUO, R.; MILLER, R.; BUSSARD, K.M., SIEDLECKI, C. A.; VOGLER, E. A. Procoagulant stimulus processing by the intrinsic pathway of blood plasma coagulation. **Biomaterials**, v. 26, p. 2965-2973, 2005.