



EFEITOS DA INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA POR GLICOSAMINOGLICANOS EXTRAÍDOS DO MOLUSCO *NODIPECTENS NODOSUS*, NA ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA

Christiano Lacerda Reis¹, Mauro Pavão².

¹ Bacharelado Bioquímica e Análises Clínicas, Biomedicina, USS – Universidade Severino Sombra, lacerdareis_clr@hotmail.com

² Doctor of Philosophy (Ph.D.), Bioquímica e Biologia Molecular, Bacharelado Biologia Marinha, UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro , mpavao@hucff.ufrj.br

Resumo- O presente trabalho concentrou-se no estudo de novos análogos de Heparina visando as propriedades anticoagulantes e antitrombóticas do heparam sulfato (HS), polissacarídeo sulfatado extraído de invertebrados marinhos, do molusco *Nodipecten nodosus*. Os polissacarídeos totais foram extraídos do molusco e fracionados por precipitação seletiva (concentrações de etanol). O principal componente (~90%) foi identificado como um HS, por eletroforese em gel de agarose, e o mesmo foi tratado com condroitinase AC e ABC e ácido nitroso. O HS do molusco é resistente à degradação por condroitinases, porém é clivado por ácido nitroso. Avaliando a potência anticoagulante do HS através do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT) *ex vivo* observamos que ele atinge sua máxima ação em 5 minutos e esse efeito começa a ser revertido a partir de 15 minutos, diminuindo progressivamente até 60 minutos, apresentando atividade anticoagulante, sendo cerca de 5 vezes menor que a da heparina de mamífero, conforme quantificada pelo ensaio de tempo parcial de tromboplastina ativada. Em experimento de trombose venosa o heparam sulfatos inibiu em 50% o tamanho do trombo em relação ao do controle, constatando sua ação antitrombótica.

Palavras-chave: Glicosaminoglicanos, heparam sulfato, heparina, atividade anticoagulante, antitrombótico, agregação plaquetária, molusco *Nodipecten Nodosus*.

Área do Conhecimento: Bioquímica.

INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Hemostático

É essencial para a vida humana, a manutenção do fluxo sanguíneo e mediante uma lesão vascular não haja perda excessiva de sangue, para isso o próprio sangue é o principal fornecedor de pró-proteínas, as quais sofrem uma mudança conformacional, para que haja uma mudança no seu estado, do estado líquido ao estado sólido, e é feita por uma rede de ativação e inibição enzimática, atenuando a perda excessiva de sangue (KENICHI, NIGEL & JERROLD, 2009), lesões nos vasos sanguíneos levam à ativação de um complexo mecanismo, o sistema hemostático. O sistema hemostático é um mecanismo de defesa do hospedeiro que preserva a integridade do aparelho circulatório fechado, permitindo que os tecidos sejam reparados e as suas funções restabelecidas (FURIE & FURIE, 2007), havendo uma sequência de reações locais culminando no controle da hemorragia, onde essas reações levam a uma resposta vascular, a uma hemóstase primária e a hemóstase secundária, impedindo o

extravasamento de sangue no local da lesão (FRANCO, 2001).

A resposta vascular inicia-se mediante a uma lesão vascular, ocorrendo a constrição do vaso, esta ação imediata e transitória, permite uma redução do fluxo sanguíneo no local da lesão e a manutenção das superfícies endoteliais, esse mecanismo apresenta maior eficiência em vasos da microcirculação, envolvendo uma série de peptídeos como a endotelina que é um potente vasoconstritor liberado pelo endotélio, da bradicinina que aumenta a permeabilidade vascular e contrai as células musculares lisas e do fibrinopeptídeo B que é um segmento do fibrinogênio liberado mediante a ação da trombina.

A hemóstase primária é a formação do trombo plaquetário nos locais de lesão vascular, ocorrendo poucos segundos após a lesão. Os principais constituintes deste coágulo incluem, as plaquetas, leucócitos, incluindo granulócitos, monócitos, linfócitos e um polímero insolúvel de fibrina, que é formada a partir de uma proteína solúvel do plasma, denominada fibrinogênio, os monômeros de fibrina interagem entre si

através de interações eletrostáticas formando uma rede insolúvel, porém instável, de fibrina.

A consolidação deste polímero é feita pela ação do fator XIIIa, uma enzima que também é ativada pela trombina, a qual une, covalentemente, as moléculas de fibrina presentes na rede instável (MONROE, HOFFMAN & ROBERTS, 2002). Micro partículas, derivada de leucócitos e plaquetas, também circula no sangue, embora informações sobre o seu papel funcional sejam limitadas. Componentes desempenham um papel fundamental em diversas formas de defesa, mas participam diretamente no processo hemostático. Em condições normais, circulam no sangue como inativo e componentes inertes (FURIE & FURIE, 2007). Após a lesão tecidual, o sistema é ativado. Em casos de lesão, a deposição de plaquetas e fibrina se inicia rapidamente em toda extensão da lesão (DAVID, FUJIKAWA & KISIEL, 1991).

1.2 Plaquetas

A plaqueta sanguínea ou trombócito é um fragmento de célula anucleada e de formato discóide presente no sangue, é formado na medula óssea a partir dos prolongamentos citoplasmáticos dos megacariócitos, conhecidos como pró-plaquetas. A sua principal função é a formação de coágulos, participando, portanto do processo de coagulação sanguínea (DAVID, FUJIKAWA & KISIEL, 1991), estão presentes em altas concentrações no sangue (2,3 x 10⁸ mL) e circulam no corpo humano durante sete dias (FREEDMAN & LOSCALZO, 2003).

Para que a plaqueta exerça seu papel na coagulação sanguínea, é de extrema importância a integridade de três componentes da função plaquetária: adesão, atividade e agregação, o início de todo esse processo ocorre quando há uma lesão vascular. A adesão plaquetária ao local da lesão vascular é feita por uma camada de glicoproteínas presentes na membrana plasmática das plaquetas, mas em áreas não lesionadas essa camada de glicoproteínas impede a adesão plaquetária no endotélio normal (BEVERS, COMFURIUD & ZWAAL, 1983).

Havendo uma lesão vascular, é exposto às plaquetas circulantes no plasma, o colágeno, o fator tecidual (TF) entre outras células, iniciando então a fase de adesão mediada por receptores de adesão plaquetários, sendo esses: a glicoproteína VI (GPVI) que se liga ao colágeno e o complexo glicoproteína Ib-IX-V (GPIb-IX-V) ao fator de von Willebrand (FvW) (WALLACE, 2005, ANREWS et al., 1991), que forma uma ponte entre o receptor e as proteínas do subendotélio exposto (PLOW et al., 1995). O fator de Von Willebrand, expõe o

seu sítio de ligação ao receptor GP Ib-V-IX, receptor da plaqueta para o vWF e trombina, em vasos onde o fluxo sanguíneo é maior, ou seja, em artérias (SAKAARIASSEN, BOLHUIS & SIXMA, 1979). O fator tecidual (TF) atua como um receptor e co-fator para FVII, e é expresso subendotelial nas camadas dos vasos sanguíneos e sobre as células, portanto, extravascular e só é exposta ao sangue, quando a vasculatura normal é interrompida (ROBERT, 2006), ligando-se as plaquetas, fazendo com que sofram uma mudança conformacional, aderindo-se ao sítio agredido, tornando-se esféricas e emitindo pseudópodes, formando um agregado no local, impedindo temporariamente a perda de sangue (ROBERT, 2006).

As ligações da glicoproteína GPVI com o colágeno e do complexo GPIb-IX-V com o FvW exercem um aumento de expressão das integrinas plaquetárias, incluindo integrinas $\alpha 2\beta 1$ que se ligam ao colágeno, e integrinas $\alpha 2\beta 3$ que se ligam ao fibrinogênio ou ao FvW, mediando a agregação plaquetária. Uma vez a plaqueta aderida, ela sofre a ação de agonistas plaquetários, incluindo o próprio colágeno, a trombina e a epinefrina, que inicia a ativação das plaquetas. Esses agonistas ligam-se a receptores da membrana das plaquetas e ativam cascatas de coagulação (PLOW et al., 1995; WATSON, 1999). Ocorre, então, a secreção do conteúdo dos grânulos plaquetários, Lisossomas (endoglicosidases e enzima de clivagem da heparina), os grânulos densos (cálcio, serotonina, ADP, ATP e pirofosfato) e os grânulos α (FvW, factor plaquetário 4, factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), α - tromboglobulina, trombospondina, fibronectina) (BERTINA et al., 1994).

O colágeno presente no subendotélio faz a adesão plaquetária, mediada pelo receptor GP Ia-IIa, receptor da fibrila de colágeno (específico para a plaqueta). Além disso, o colágeno também é capaz de induzir a ativação das plaquetas. Esse processo é mediado pelos receptores GP IV e GP VI (WATSON, 1999). As plaquetas são também ativadas por agonistas específicos, tais como o ADP, o fator de ativação plaquetária (PAF), o α -trombina e o tromboxano A₂, que são secretados pela própria plaqueta ou no local da lesão vascular. O fibrinogênio liga-se à glicoproteína IIb/IIIa agregando as plaquetas entre si num trombo hemostático (BRASS, 1995).

1.3 Coagulação Sanguínea

Reações de proteases plasmáticas inativas ou zimogênios estão envolvidas na coagulação sanguínea, na formação de um polímero insolúvel fibrina, que apresenta um

papel fundamental na coagulação sanguínea, estabilizando o agregado de plaquetas formado no local da lesão vascular, por meio de proteólise (DAVID, FUJIKAWA & KISIEL, 1991). A trombina promove a formação de coágulos através da clivagem de fibrinogênio em fibrina, as plaquetas, estimulam a agregação, a secreção, e ativa certas proteínas (Fatores V, VIII e XI) na montagem da cascata de coagulação. A trombina também tem vários efeitos nas células endoteliais vasculares, células musculares lisas e monócitos / macrófagos que podem ser importante na reparação tecidual em lesões ou no desenvolvimento de aterosclerose (LI HE et al., 2008).

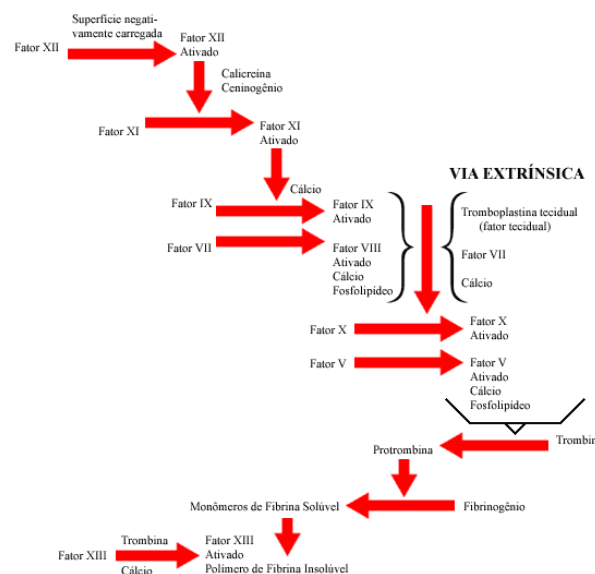
Em 1964, Macfarlane e Davie & Ratnoff propuseram a hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação do sangue. A cascata de coagulação é geralmente dividida em duas vias para a conveniência de discussão e análise dos fatores da coagulação. As vias intrínsecas e extrínsecas podem ser potencializadas separadamente, mas fundem-se num caminho comum que leva ao FIIa (ERWIN, 2009). Por apresentar uma série de reações acopladas (Figura 1), as vias extrínsecas e intrínsecas não devem ser consideradas isoladamente *in vivo*, mesmo havendo evidências de que a via intrínseca é crucial para a manutenção e desenvolvimento do coágulo, a via extrínseca é necessária para o início da formação do coágulo. Atualmente, considera-se que a coagulação sanguínea é disparada pela via do fator tecidual (TF) (DAVID, FUJIKAWA & KISIEL, 1991). O fator tecidual é uma lipoproteína presente na superfície de células que não está diretamente em contato com o sangue, como fibroblastos e macrófagos. Com estímulo as células endoteliais expressam TF (GAILANI & BROZE, 1993). O início da coagulação se dá mediante o contato do plasma com células expressas na lesão vascular.

O fator tecidual se liga ao fator VIIa, formando o complexo tenase extrínseco que converte o zimogênio fator X em uma serino-protease ativa, o fator Xa. Este se dissocia do complexo tenase e se associa ao fator Va, íons cálcio e superfícies celulares para formar o complexo protrombinase, que ativa o zimogênio protrombina na serino-protease trombina (SEGERS, DAHLBACK & NICOLAES, 2007). O complexo XIIa catalisa a ativação do fator IX em fator IXa. O fator IXa forma um complexo com seu cofator, o VIIIa, fosfolípidos e cálcio, denominado “tenase intrínseco”. Esse complexo ativa o fator X de forma idêntica ao “Tenase extrínseco”, porém, apresentando uma maior eficiência

catalítica (AHMAD, RAWAALA-SHEIKH & WALSH, 1992).

O fator X se associa com o fator Va na superfície de plaquetas ativadas, numa reação dependente de cálcio, formando complexo protrombinase. Esse complexo passa a ser o responsável pela ativação da protrombina em trombina (DAVID, FUJIKAWA & KISIEL, 1991).

Figura 1. Diagrama simplificado da cascata de coagulação, mostrando intersecção das vias intrínseca e extrínseca



Fonte: www.diagnosticobucal.com.br/trabalhos

A coagulação sanguínea é amplificada por um mecanismo de feedback positivo mediado por trombina, ativando o fator V, VIII, XI e XIII e outras funções biológicas são associadas a trombina uma vez que ela possui alvos específicos em diferentes tipos celulares (DAVID, FUJIKAWA & KISIEL, 1991). A trombina é um potente agonista plaquetário, que promove a mudança conformacional da plaqueta e a liberação de outros ativadores como ADP, como serotonina e o tromboxano A₂, por meio da clivagem de receptores do tipo PAR. Além disso, a trombina é capaz de induzir a exposição da molécula de adesão P-selectina e do ligante CD40 na superfície de plaquetas ativadas além de ativar a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (DAVID, FUJIKAWA & KISIEL, 1991).

1.4 Trombose

A necessidade de melhores cuidados com a saúde cardiovascular no mundo inteiro é grande e crescente. Algumas estatísticas dão uma idéia da escala. Segundo os Centros de Controle de Doenças, 23 milhões de pessoas foram diagnosticadas com problemas cardíacos em 2001, impulsionando o uso de quase dois

milhões stents e mais de 200.000 implantes de válvulas de coração. Neste mesmo ano, 700.142 pessoas morreram nos Estados Unidos devido às doenças cardiovasculares, tornando-se uma das principais causas de morte (ERWIN, 2009). A trombose venosa profunda (TVP) dos membros inferiores é bastante freqüente, com incidência estimada de 0,6 a 0,9 casos por 1000 habitantes por ano. Sua complicação mais temida é a embolia pulmonar (EP) responsável pela morte de 200.000 pacientes por ano (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2009). A incidência de TVP e de EP aumenta na razão direta da idade. Nos pacientes na faixa etária de 60 anos, a incidência pode oscilar em torno de 30 a 35%, enquanto nos pacientes acima de 70 anos gira ao redor de 50 a 70%, quando não se submetem a qualquer tipo de tratamento profilático. A trombose arterial é um evento extremamente comum que afeta cerca de 50% da população. Ela é a principal responsável pelas doenças cardiovasculares, como doença da artéria coronária, infartos do miocárdio e doenças de artérias periféricas (SURESH, 2009). No Brasil, dados do Ministério da Saúde mostram que essas doenças são responsáveis por 28% de óbitos. Estimativas indicam que, em 2020, as doenças aterotrombóticas serão as causas de morte de maior frequência em todo mundo (LLOYD-JONES et al., 2010).

Virchow (1956) postulou três principais causas para a trombose: mudanças na parede vascular (trauma), na composição do sangue (hipercoabilidade) ou no fluxo sanguíneo (estase). Os fatores de risco adquiridos para a trombose venosa incluem imobilização, cirurgias, traumas, gravidez, lúpus, doenças malignas e hormônios femininos (reposição hormonal e uso de contraceptivos orais) (MACKMAN, 2008).

Os fatores de risco da trombose arterial diferem dos da trombose venosa. Incluem fatores como o tabagismo, hipertensão, hiperlipidemia e diabetes mellitus. Normalmente, a trombose arterial é iniciada pela ruptura de placa aterosclerótica que dispara uma cascata de eventos mediados por plaquetas, que resultam na formação de um trombo rico em plaquetas (MACKMAN, TILLEY & KEY, 2007). A composição dos trombos nas trombooses venosa e arterial também é diferente. Na trombose venosa, há a formação de um trombo rico em fibrina e hemácias enquanto que, na arterial, o trombo é formado por fibrina e plaquetas. Essas condições diferem, pois veias e artérias são diferentes na estrutura e na velocidade do fluxo sanguíneo (mais rápido nas artérias) (VIRCHOW, 1856).

As drogas utilizadas no tratamento da trombose podem ser divididas em três categorias

básicas: os anticoagulantes, os trombolíticos e os agentes antiplaquetários. Entre os anticoagulantes, encontra-se a heparina não-fractionada, as heparinas de baixo peso e o warfarin. No grupo dos trombolíticos, podem ser citados a estreptoquinase e o ativador de plasminogênio tecidual. Já entre os antiplaquetários estão a aspirina, a ticlopidina, clopidrogel, entre outros.

1.5 Glicosaminoglicanos

Há muito os glicosaminoglicanos (GAGs) vêm despertando interesse clínico em todas as áreas da medicina, por apresentar um importante papel no reconhecimento celular, na migração, na proliferação e diferenciação celular, estariam direta ou indiretamente envolvidos com tumores, metástases, angiogênese, reações imunológicas, desenvolvimento folicular e infertilidade, entre outros (LOPES, DIETRICH & NADER, 2006).

De forma geral, os GAGs contribuem para a estrutura e as propriedades de permeabilidade do tecido conjuntivo, bem como guia para enzimas e fatores de crescimento tanto na matriz quanto na superfície das células (CECHOWSKA-PASKO, PALKA & BANKOW, 1996).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos lineares, compostos por unidades dissacarídicas repetidas, de um ácido hexurônico (açúcar ácido) e uma hexosamina (açúcar aminado) (Figura 2), presentes em todas as células animais com diferenças estruturais dependendo do tecido ou do organismo de origem (CECHOWSKA-PASKO & PALKA, 2000). Quase todos os glicosaminoglicanos (condroitim / dermatam sulfato, heparina, heparan sulfato e queratam sulfato) contêm grupamento sulfato em suas unidades dissacarídicas ao longo da molécula, com exceção do ácido hialurônico, esses grupamentos sulfato associados ao grupo carboxila do ácido hexurônico conferem aos glicosaminoglicanos uma alta densidade de carga negativa.

Esse caráter aniônico permite que esses polímeros interajam com vários tipos de moléculas, como: fatores de crescimento, enzimas, proteínas de superfície celular, proteínas plasmáticas entre outras (CONRAD, 1998; WODARZ & NUSSER, 1998), modulam diversos processos biológicos, como desenvolvimento, angiogênese, crescimento axonal, progressão do câncer, patogênese microbiana, hemostase, dentre outros (SASISEKHARAN, RANAN & PRABHAKAR, 2006).

Os GAGs diferem entre si na composição dissacarídea básica, grau e posição da

sulfatação, podem ser classificados de acordo com o tipo do ácido hexurônico (ácido glucurônico ou ácido idurônico), pelo tipo da hexosamina (glucosamina ou galactosamina), e pelo tipo de ligação glicosídica. De acordo com os monossacarídeos constituintes e o tipo das ligações glicosídicas, os GAG podem ser divididos em 4 grupos principais: 1: Ácido Hialurônico, 2: Queratam sulfato, 3: Heparan sulfato e heparina, 4: galactosaminoglicanos (condroitim sulfato e dermatam sulfato) (CONRAD, WODARZ & NUSSER, 1998).

Figura 2: Unidades dissacarídicas presentes nos GAGs

Glicosaminoglicano	Ácido Hexurônico	Hexosamina	Ligação O-glicosídica
Condroitim-4-sulfato	Ácido Glicurônico (GlcUA)	N-Acetil Galactosamina (GalNAc)	GlcUA 1→3 GalNAc
Condroitim-6-sulfato	Ácido Glicurônico (GlcUA)	N-Acetil Galactosamina (GalNAc)	GlcUA 1→3 GalNAc
Dermatam sulfato	Ácido Idurônico (IdUA)	N-Acetil Galactosamina (GalNAc)	IdUA 1→3 GalNAc
Heparina/Heparan sulfato	Ácido Idurônico/ Glicurônico (IdUA/GlcUA)	Glicosamina (GlcN)	IdUA/GlcUA 1→4 GlcN
Queratam sulfato	Galactose (Gal)	N-Acetil-Glicosamina (GlcNAc)	Gal 1→4 GlcNAc

Os GAGs são formados por uma hexosamina e um ácido hexurônico. O queratam sulfato apresenta galactose no lugar do ácido hexurônico, ao passo que o ácido hialurônico não apresenta grupamentos sulfato (GOMES, 2010). O ácido hialurônico possui a estrutura mais simples de todos os GAGs, sendo o único não sulfatado. É constituído de unidades dissacarídicas de GlcUA e GalNAc. O queratam sulfato é o único GAG que não apresenta ácido idurônico, sendo suas unidades dissacarídicas compostas por GalNAc e um açúcar neutro, a galactose. Ambos os resíduos podem estar sulfatados na posição 6, dando origem a unidades mono e dissulfatadas (HASCALL & RIOLO, 1972).

A heparina e o heparan sulfato possuem a mesma estrutura dissacarídica repetitiva básica, constituídas por (4- β -D HexUA-1 $\rightarrow$ 4- β -D GlcNAc- 1)n. Essas

unidades sofrem extensas modificações no decorrer da biosíntese do polímero (LINDAHL et al, 1989). A heparina é extensivamente N-sulfatada, rica em ácido idurônico e grupamentos O-sulfato (2,3 - 2,8 sulfatos por dissacarídeo), enquanto que o heparan sulfato possui uma quantidade de regiões N-acetilada (0,6 – 1,5 sulfatos por dissacarídeo) (DREYFUSS et al., 2009).

A estrutura do condroitim sulfato (CS) consiste em dissacarídeos contendo ácido glicurônico (GlcUA) e N-acetilgalactosamina (GalNAc). Os dissacarídeos do CS podem estar sulfatados nas posições 4 ou 6 da N-acetilgalactosamina, e não apresentam, normalmente, sulfatação no ácido glicurônico. No dermatam sulfato (DS) a unidade dissacarídica repetitiva é composta por um ácido idurônico, e uma GalNAc. O ácido hexurônico também pode ocorrer sob a forma de ácidos glicurônico e os dois isômeros podem ocorrer na mesma cadeia. Com exceção do ácido hialurônico, todos os GAGs são encontrados na natureza ligando covalentemente a cadeias polipeptídicas, formando proteoglicanos (PGs). Os PGs apresentam uma grande diversidade estrutural, resultante de tipo e da quantidade de cadeias de GAGs presentes nas cadeias polipeptídicas.

Geralmente as cadeias de GAGs sulfatados estão ligadas covalentemente por uma ligação O-glicosídica a um resíduo de serina da cadeia polipeptídica. O alongamento da cadeia de GAG é feito a partir de um tetrassacarídeo que forma a região de ligação com a cadeia peptídica. Este tetrassacarídeo é formado por xilose, galactose, e ácido glicurônico e está presente na maioria dos PGs, com exceção do PG de queratam sulfato.

Os PG estão em vários órgãos e tecidos, sendo encontrados na matriz extracelular, inserindo na membrana plasmática ou em grânulos intracelulares (DREYFUSS et al., 2009).

1.6 Heparan Sulfato e Heparina

1.6.1 Heparan Sulfato

O heparan sulfato é encontrado em praticamente todos os tecidos, sob a forma de diferentes tipos de proteoglicanos (PGHS) presentes na superfície celular, na matriz extracelular (MEC) e membrana basal (JIN-PING & ISRAEL, 2009), e são expressas e secretadas pela maioria, senão todas, as células de mamíferos, e compreende 50 a 90% do total de proteoglicanos endoteliais (IHRCKE WRENSHALL & LINDMAN, 1993).

De todos os membros da família de GAGs este é o que apresenta maior variabilidade

estrutural, onde o ácido hexurônico pode ser glicurônico ou idurônico, além disso a glucosamina pode estar N-acetilada, N-livre ou N-sulfatada, seu tamanho pode variar de 5 a 70 kDa (TURNBULL, POWELL & GUIMOND, 2001), possui uma maior quantidade de regiões N-acetiladas não modificadas (LINDAHL, 1989). Nos tecidos de vertebrados e invertebrados são essenciais nos processos de adesão da célula à matriz, nos sistemas de reconhecimento de célula-célula, na ligação a fatores de crescimento e quimiocinas, entre outros.

1.6.2 Heparina

A heparina foi descoberta em 1916, e tem sido usado clinicamente como um anticoagulante desde 1935 (RABENSTEIN, 2002).

A heparina é um polissacarídeo sulfatado linear constituído por unidades dissacarídicas repetitivas contendo majoritariamente ácido idurônico 2-O-sulfatado e glicosamina N-sulfatada (DAY, 1985) e, por isso, é pertencente à família dos glicosaminoglicanos. Devido ao seu grande conteúdo de grupos negativos como a carboxila e grupamentos sulfato, a heparina contém a maior densidade de carga negativa dentre todas as macromoléculas biológicas. Normalmente, essa molécula apresenta uma média de 2,7 grupamentos sulfato. O grupamento amino da glicosamina pode ser substituído por um grupamento acetil (Ac), por um sulfato (SO₃) ou não ser substituído. As posições 3 e 6 da glicosamina também podem ser substituídas por grupos O-sulfato. A heparina tem um peso molecular que varia de 5 a 40 kDa, com uma média de peso de 20 kDa. Durante sua biosíntese, moléculas de heparina ligam-se a fragmentos de serina presentes em um esqueleto protéico, formando o proteoglicano serglicina, encontrado apenas em mastócitos e algumas células hematopoiéticas (LINHARDT, 1997).

A heparina e seus derivados de baixo peso molecular são os anticoagulantes mais usados na clínica médica. A heparina é administrada intravenosamente (heparina de baixo peso molecular pode ser administrada também intravenosamente ou subcutaneamente, aumentando sua versatilidade terapêutica) durante a maioria dos procedimentos extracorpóreos (quando o sangue é removido do corpo e passa através de um aparelho) como diálise do rim (WEITZ, 1997) e procedimentos de transplantes cardíacos.

A ação anticoagulante da heparina se dá pela formação de um complexo heparina-antitrombina (AT) que inibe a trombina (Fator IIa) e os fatores Xa, IXa, XIa e XIIIa

(ROSENBERG, 1977). A trombina humana é cerca de 10 vezes mais sensível para inibição pelo complexo heparina-AT do que o fator Xa. Para inibir a trombina, a heparina deve ligar-se tanto à enzima coagulante quanto a AT, porém a ligação com a enzima não é necessária para a inibição do fator X ativado (BOURIN & LINDAHL, 1993). A antitrombina é uma glicoproteína com peso molecular de 58 kDa, sintetizada pelo fígado. Está presente no plasma numa concentração de aproximadamente 2,6 μ M e é o principal inibidor fisiológico da trombina (BOURIN & LINDAHL, 1993). Moléculas de heparina contendo menos de 18 polissacarídeos não se ligam simultaneamente com a trombina e a AT são desta forma, incapazes de catalisar a inibição de trombina. Em contraste, fragmentos de heparina muito pequenos, contendo uma sequência pentassacarídica de alta afinidade catalisam a inibição do fator Xa pela AT (LINDAHL et al., 1989). Inibindo a trombina, a heparina não só previne a formação de fibrina, mas também inibe a ativação induzida por trombina dos fatores V e VIII (LIAW et al., 1999). O uso de aparelhos que requerem heparinização, como aparelhos de circulação extracorpórea, utilizados em cirurgias cardíacas e em hemodiálise pode geralmente levar a uma complicação hemorrágica, devido a altas concentrações de heparina aplicada no paciente, e o principal efeito da heparina, na circulação extracorpórea é a inibição da formação da fibrina a partir do fibrinogênio. A heparinização sistêmica é também usada no tratamento de trombose venosa profunda e numa variedade de outros procedimentos cirúrgicos (CASU, 1989).

1.6.3 Efeitos Colaterais da Heparina

O efeito colateral mais frequente é a hemorragia, que pode ocorrer em 1 a 37% dos pacientes operados utilizando heparina, a redução da pressão arterial e da resistência vascular periférica em cerca de 10 a 20% dos pacientes, sem afetar o débito cardíaco (SELTZER & GERSON, 1979), e a elevação dos níveis de lipoproteínas plasmáticas, são outros efeitos causados pela utilização contínua da heparina (OLIVERCRONA & BENGTTSSON, 1989). Algumas alterações da resposta imunológica do organismo podem ser relacionadas à presença da heparina. Na atualidade, a atenção dos perfusionistas se concentra em dois efeitos colaterais capazes de produzir complicações severas: a resistência à heparina e a trombocitopenia induzida pela heparina. A resistência à heparina consiste na necessidade de doses crescentes da droga para a obtenção do

mesmo efeito anticoagulante (JAQUES & MAHADOO, 1978), a trombocitopenia induzida por heparina é um processo complexo que resulta na perda de plaquetas, levando a uma hemorragia (RABENSTEIN, 2002).

Os pacientes que recebem tratamentos prolongados com heparina podem apresentar resistência à heparina, causada por redução dos níveis de ATIII (JAQUES, 1978).

1.6.4 Crise Mundial da Heparina

No ano de 2008, surgiram vários casos de efeitos adversos em pacientes submetidos à heparinoterapia, sendo esses, desmaios, taquicardia, urticárias, náuseas e, em alguns casos, sintomas mais severos. Além Estados Unidos que apresentou mais de 100 mortos, alguns países da Europa e Ásia relataram o mesmo problema, alertando o mundo todo. Autoridades americanas iniciaram uma investigação e observaram que a hipersensibilidade relatada estava associada com lotes de heparina produzidos pela Companhia *Baxter Healthcare* (ROCKVILLE, 2008), resultando na retirada de nove lotes de heparina do mercado, o mesmo ocorreu em outros países como na Alemanha que também retirou lotes de heparina devido a mais relatos de reações adversas. A *Food and Drug Administration* (FDA) recomendou que todas as empresas distribuidoras de heparina analisassem seus lotes, revelando uma contaminação na heparina em, pelo menos, doze países.

Guerrini e colaboradores, em 2008, através de análises de ressonância magnética nuclear, identificaram que o contaminante presente nas preparações de heparina se tratava de um condroitim sulfato *oversulfatado* (OSCS), contendo quatro sulfatações por dissacarídeo. Estudos mostraram que o OSCS era capaz de induzir a formação de proteínas do sistema complemento como C3a e C5a, levando então a possível choque anafilático a ativação do sistema cinina-caliceína, resultando na produção de bradicinina, potente vaso mediador, gerando uma hipotensão no paciente.

A ativação de pré-caliceína em caliceína é mediada pelo fator XII, que pode ser ativado por superfícies carregadas negativamente, como o OSCS, fosfolípidos e células endoteliais lesadas (KISHIMOTO et al., 2008). Devido a esses fatores, torna-se cada vez mais evidente a necessidade de obter fontes alternativas de heparina.

1.7 *Nodipecten nodosus*

O invertebrado marinho *Nodipecten nodosus*, é um molusco bivalve pertencente ao filo Mollusca, classe bivalve, ordem Ostreoida, família

Pectinidae, gênero *Nodipecten*, esses animais são conhecidos como vieiras, “coquilles Saint-Jacques” e como “scallops” (Figura 3). São cultivados em fazendas aquáticas no litoral brasileiro como em Angra dos Reis e na Praia Grande do Bonete, Ubatuba, Estado de São Paulo. Muito apreciado na culinária mundial, onde é utilizando principalmente o músculo e as gônadas, e as vísceras são descartadas. A maricultura é um segmento do agronegócio que se encontra em franca expansão. Dentre os moluscos, o cultivo de vieiras (pectinicultura) cresceu mais de 10% na última década, com a produção mundial passando de 1.153.465 toneladas em 1995 para 1.274.843 toneladas em 2005 (BUENO, MARQUES & ROMA, 2010).

Na América do Sul, o Chile apresenta-se como um país pioneiro em relação aos trabalhos de cultivo de pectinídeos. No Brasil, os coquilles têm se apresentado com um grande potencial para o cultivo, devido principalmente a sua excelente receptividade no mercado interno e externo. A pectinicultura iniciou-se no Japão em 1935 e o sucesso da atividade naquele país despertou o interesse de outras nações que, a partir da década de 70/80, passaram a empregar as técnicas básicas desenvolvidas no Japão (BUENO, MARQUES & ROMA, 2010). A espécie *N.nodosus* por apresentar um elevado valor de comercialização mundial, no Brasil apresentou um grande potencial para maricultura. O Instituto de Ecodesenvolvimento da Baía de Ilha Grande (IED-BIG), organização não-governamental patrocinada pela Eletrobrás e Petrobras, desenvolve o cultivo de *N.nodosus* desde 1991. Esse cultivo inclui a produção de larvas e pós-larvas em laboratório e cultivo em fazendas marinhas. Esses moluscos são doados aos moradores da ilha grande em Angra dos Reis, como uma nova fonte de renda que pode ajudar a quem antes dependia só da pesca e ainda preservar o meio ambiente. Os franceses fizeram dos coquille um quitute incluindo também a ova em seus pratos, os japoneses e norte-americanos consome somente o músculo e as gônadas, as vísceras são descartadas.

Figura 3: **Invertebrado marinho *Nodipecten nodosus***, filo Mollusca, classe bivalve, ordem Ostreoida, família *Pectinidae*, gênero *Nodipecten*



Fonte: QUEIROZ (2005).

Devido aos problemas causados pela heparinoterapia, como hemorragias entre outras reações, o Laboratório de Tecido Conjuntivo da Universidade Federal do Rio de Janeiro busca análogos de heparina em invertebrados marinhos. Há muitos artigos hoje falando sobre a presença de análogos de heparina em diversos moluscos. Trabalhos anteriores (GOMES et al., 2010) mostraram que há grandes concentrações de heparinoides nas vísceras do *N. nodosus*.

METODOLOGIA

4.1 Modelo Animal

Os experimentos envolvendo animais foram realizados utilizando-se Ratos Wistar (ambos os sexos) pesando entre 200 e 250g. Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), Segundo Vogel e Vogel (1989) e do *Committee on Animal Research and Ethics* (CARE), e dos aprovados pelo comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde / Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ (IBqM 2004).

4.2 Coleta

Os espécimes de *N. nodosus* foram fornecidos pelo Instituto de Ecodesenvolvimento da Baía da Ilha Grande (IEDBIG), responsável pelo cultivo da espécie em fazendas marinhas no município de Angra dos Reis, RJ.

4.3 Polissacarídeos Sulfatados

O experimento previamente desenvolvido em nosso laboratório constatou uma grande concentração de Heparan Sulfato nas vísceras do molusco *N. nodosus* que foram removidas e submetidas ao processo de extração (PAVÃO et al., 2007).

4.4 Isolamento do Polissacarídeo

4.4.1 Extração de Polissacarídeos *N. nodosus*.

As vísceras previamente secas (25g) sofreram digestão proteolítica com papaína (20%), em 500 mL de tampão Acetato de Sódio 100 mM, pH 5,5, contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM. Após 18 horas a 60 °C, o produto da digestão foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos. O material precipitado, contendo restos teciduais, foi digerido novamente sob as mesmas condições descritas anteriormente. Este processo de digestão proteolítica foi repetido por três vezes. Visando uma pré-purificação dos polissacarídeos sulfatados com Cloreto de cetilpiridina (CPC) 0,5% e etanol absoluto, CPC10% foi adicionado ao sobrenadante de cada digestão proteolítica, a fim de atingir uma concentração de 0,5%. Após 24 horas à temperatura de 4 °C, a mistura foi centrifugada a 5.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado (Pellet) lavado com água destilada e centrifugado a 5.000 rpm, por 10 minutos e o pellet foi então solubilizado em 50 mL de uma solução de NaCl 2M e etanol (100:15, v/v) e, a esta solução foi adicionado 100mL de etanol absoluto. Após 24 horas, a 4 °C os polissacarídeos precipitados foram recolhidos por centrifugação a 5.000 rpm, 10 minutos e o sobrenadante descartado. Os polissacarídeos totais obtidos foram secos em estufa a 60 °C.

4.4.2 Purificação do Heparan Sulfato de *N. nodosus*

Os polissacarídeos totais do molusco foram submetidos a uma precipitação seletiva para purificar o heparan sulfato, a precipitação seletiva sucintamente significa a separação dos compostos por diferentes concentrações de etanol.

4.2.3 Precipitação Seletiva

Os polissacarídeos totais são solubilizados em água destilada, deixando o material bem diluído com um volume de 50 mL, é feita uma precipitação de 75% de etanol absoluto e 2% de NaCl, essa solução é resfriada a 4 °C por 18 horas, é separado um polissacarídeo por centrifugação a 5.000 rpm, o pellet (P1) é seco a 60 °C, no sobrenadante é adicionado um volume de etanol absoluto atingindo uma concentração de 90%, essa solução é resfriada a 4 °C por 18 horas, é formado um pellet (P2) separado por uma centrifugação a 5.000 rpm, que é levado para secar a 60 °C, o sobrenadante é adicionado duas vezes o volume de etanol que forma um pellet (P3), os pellets das precipitações foram solubilizado

em água destilada e os polissacarídeos são analisados por eletroforese em gel de agarose.

4.5 Eletroforese

4.5.1 Eletroforese em Gel de Agarose

Os polissacarídeos sulfatados obtidos da extração e purificados pela Precipitação Seletiva foram analisados por eletroforese em gel de agarose, como descrito por Dietrich e Dietrich (1976), alíquotas contendo 6µL foram aplicadas em um gel de agarose 0,5% em tampão 1,3-diaminopropano /ácido acético 50mM, pH 9. O gel foi submetido a um campo elétrico de 100V, por aproximadamente 1 hora. Uma mistura de controitim sulfato, dermatam sulfato e heparina foram utilizados como padrão de GAG. Ao término da eletroforese, os polissacarídeos foram fixados no gel por incubação com uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio 0,1%. Após 3 horas, o gel foi seco sob calor e os polissacarídeos sulfatados foram corados com azul de toluidina 0,1% e descorados em uma solução ácido acético, etanol, água destilada (0,1:5:5,v/v).

4.5.2 Eletroforese em gel de Poliacrilamida

O peso molecular do Heparan Sulfato foi estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida. Cerca de 6µL das amostras de heparan sulfato purificado foram aplicados em um gel de poliacrilamida 7,5% com 1 mm de espessura, em tampão barbital sódico 0,06 M, pH 8,6. Após corrida de 30 minutos a 100V, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1%, em ácido acético 1% e descorado em solução de ácido acético 1%. A migração dos glicanos foi comparada com os seguintes padrões: dextran sulfato 500 (500KDa), condroitim sulfato 6-O-sulfato (54KDa), condroitim sulfato 4-O-sulfato (34KDa) e dextran sulfato 8 (8KDa).

4.6 Dosagem de Ácido Hexurônico

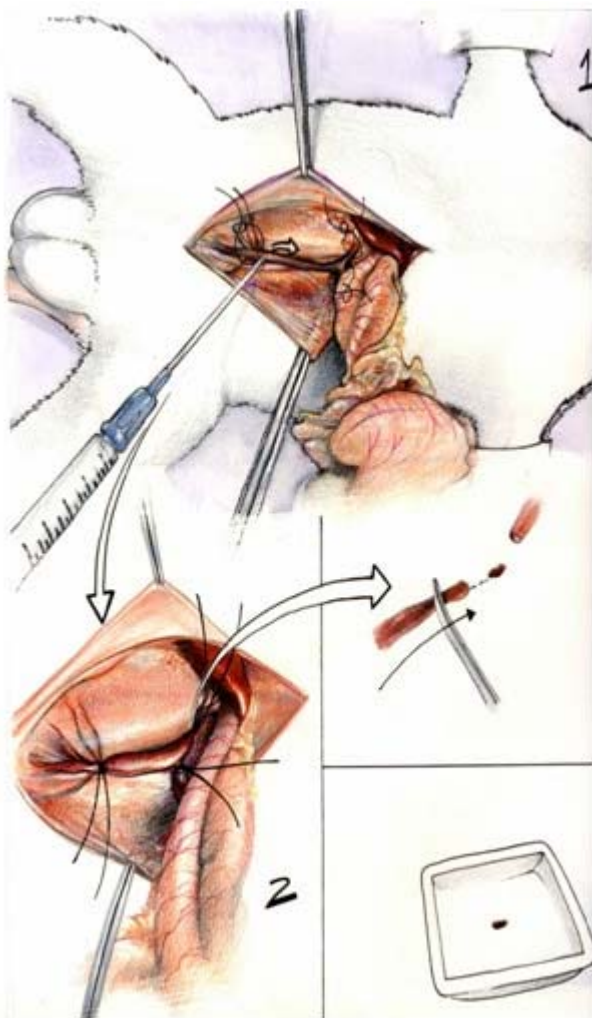
A concentração de GAGs foi estimada pelo conteúdo de ácido urônico, através do método do carbazol. Aproximadamente, 20 µg do HS purificado do molusco foram avolumados a 200 µL e acrescidos de 1 mL de ácido sulfúrico com borato e incubados a 100 °C por 12 min. Em seguida, foram adicionados 40 µL de carbazol, incubando-se a 100 °C por 10 min. Dessa forma, a absorbância foi lida com um comprimento de onda de 530 nm no espectrofotômetro (Ameisham Biosciences).

4.7 Ensaios da atividade antitrombótica no modelo venoso

4.7.1 Ensaio com Tromboplastina

A atividade antitrombótica do Heparan Sulfato em modelo experimental de trombose venosa foi investigada em ratos, usando a tromboplastina como estímulo trombogênico. Ratos Wistar (machos e fêmeas, ~200 a 250g de peso corporal) foram anestesiados com uma injeção intramuscular de Ketamina (Cristália, São Paulo, Brasil) na dose de 100 mg/kg de peso corporal e 16 mg/kg de Xilazina (Bayer AS, São Paulo, Brasil). A veia cava abdominal foi cuidadosamente isolada onde foi administração do Heparan Sulfato (HS). A dose do composto administrada é de 0,75 mg/kg, 0,50 mg/kg e 1 mg/kg e o tempo de circulação é de 5 minutos. Após o intervalo a tromboplastina (5 mg/kg de peso corporal) será injetada e um segmento (~0,8 cm) da veia cava abdominal, é suturada distal e proximal. Após 20 minutos de estase, o trombo formado no segmento ocluído é cuidadosamente lavado com salina 0,9%, seco a 60 °C durante 2 horas e pesado (Figura 4).

Figura 4. **Ilustração do modelo experimental, em ratos, de trombose venosa.** Como descrito acima, neste modelo de Wessler modificado, a trombose é induzida por um estado de estase e hipercoagulabilidade sangüínea induzida por tromboplastina



Fonte: cedida pelo Lab. Tec. Conj. prof. Mauro Pavão.

4.7.2 Ensaio de aPTT ex vivo

Ratos Wistar pesando ~300 a 400g foram previamente anestesiados com uma injeção intramuscular de Ketamina (Cristália, São Paulo, Brasil) na dose de 100 mg/kg de peso corporal e 16 mg/kg de Xilazina (Bayer AS, São Paulo, Brasil). A artéria carótida foi cuidadosamente dissecada e canulada com um cateter intravenoso (0,9 x 25 mm). As amostras de sangue (1000µL) foram coletadas em tubos Eppendorf com citrato e foram obtidas quatro amostras, nos tempos de 5, 15, 30 e 60 min., após a retirada da primeira amostra foi administrada o heparam sulfato nas concentrações de 1 mg/kg e 2 mg/kg, pela própria carótida. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm para obtenção de plasma deficiente em plaquetas. No ensaio, de Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT), 50µL de plasma e 50µL de tampão TBS

(Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) são adicionados, em seguida foram acrescentados 50µL de cefalina e as amostras incubadas por 2 minutos. A reação foi disparada com 100µL de CaCl₂ 0,025M, em um volume final de 250µL, a 37 °C. O tempo que o plasma demorou a coagular foi medido no coagulômetro (SIGMA DIAGNOSTICS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e Identificação dos GAGs Presentes em *N.nodosus*

Os polissacarídeos sulfatados foram extraídos de vísceras secas aproximadamente 25g em um processo de digestão proteolítica com papaína.

Após precipitação com CPC e etanol, o pellet é solubilizado em água com um volume aproximado de 20 mL. Com o intuito de verificar quais são os polissacarídeos presente nessa extração, foi feita uma eletroforese em gel de agarose, apresentando uma banda migrando com as mesmas características da heparina padrão, e apresenta ainda mais duas bandas metacromáticas. Os polissacarídeos sulfatados extraídos do molusco foram submetidos a tratamentos enzimáticos com condroitinase ABC, que cliva as cadeias de condroitim sulfato e dermatam sulfato, com condroitinase AC que cliva as cadeias do condroitim sulfato. O heparam sulfato foi submetido ao tratamento químico com ácido nítrico em pH 1,5 por apresentar ligação glicosídica de glucosamina Nsulfatada, que são clivadas com a ação do ácido nítrico (Figura 5). Após todos os tratamentos, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, mostrando que banda metacromática que migra como as mesmas características que a heparina padrão, foi degradada pelo tratamento químico com ácido nítrico, indicando a presença de heparam sulfato, e as outras bandas metacromáticas, que migraram entre o condroitim sulfato e dermatam sulfato padrão, foram degradadas com o tratamento com condroitinase AC e ABC, demonstrando, dessa forma, que essa banda metacromática é um condroitim sulfato.

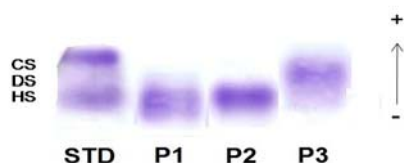
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos antes e depois do tratamento com ácido nítrico.



5.2 Fracionamento dos Polissacarídeos Sulfatados e Caracterização Inicial do Heparinóide

Mediante a constatação da presença do condroitim sulfato e do heparam sulfato na extração de polissacarídeos do molusco, foi realizada a purificação do composto de interesse o heparam sulfato, através da precipitação seletiva, onde diferentes concentrações de etanol são adicionadas. Adicionando uma concentração de 75% de etanol precipita uma pequena concentração de heparam sulfato e um polissacarídeo não identificado (P1), para a obtenção do heparam sulfato puro é adicionado etanol na concentração de 90% (P2) e o ultimo fracionamento onde é adicionado etanol na concentração de 200%, obtém se o condroitim sulfato (P3). Após os três fracionamentos foi feito uma eletroforese em gel de agarose (Figura 6).

Figura 6. **Gel de Agarose.** Os polissacarídeos totais foram fracionados com concentrações crescentes de etanol - P1 (75%), P2 (90%) e P3 (200%) - e analisados por eletroforese em gel de agarose.



A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita com o intuito de obter uma caracterização e quantificar o peso molecular do heparam sulfato extraído do *N. nodosus*. Utilizando marcadores padrões de peso molecular, concluímos que o peso do heparinóide é de aproximadamente 27 KDa.

5.3 aPTT *ex vivo*

O HS foi avaliado em um experimento *in vitro* para verificar sua atividade anticoagulante. Sendo este o aPTT *ex vivo*, que avalia sua ação farmacodinâmica, (é a avaliação da ação fisiológica dos fármacos nos organismos, seus mecanismos de ação e a

relação entre concentração do fármaco e seu efeito). De forma simplificada, podemos considerar farmacodinâmica como o estudo do efeito da droga nos tecidos.

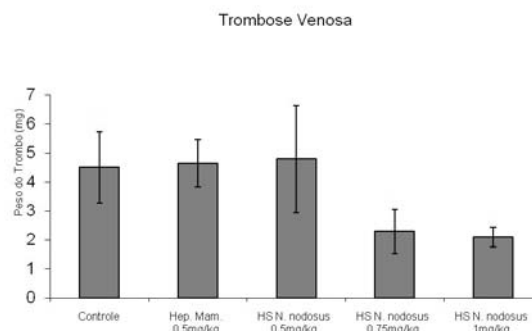
O HS extraído do molusco *N. nodosus* foi avaliado em diferentes doses (1 mg/kg e 2 mg/kg). Desta forma, foi constatado que o HS do *N. nodosus* aumenta, de forma dose-dependente, o tempo de coagulação do plasma do rato.

5.4 Efeito antitrombótico do Heparam Sulfato do *N. nodosus*

Verificado o efeito anticoagulante do HS do *N. nodosus* o próximo passo foi verificar se o composto apresentaria capacidade de inibir a formação de trombo *in vivo*. Para constatar, utilizamos um modelo de trombose venosa. Neste modelo, o estímulo trombótico usado foi a tromboplastina, que apresenta à circulação sanguínea o TF disparando a cascata de coagulação.

O HS foi administrado por via intravenosa (veia cava abdominal), após 5 minutos foi dado o estímulo trombótico com tromboplastina. Com isso, pode-se observar que o HS apresenta efeito antitrombótico de forma dose-dependente (Figura 7). Na dose de 0,75 mg/kg e de 1 mg/kg, o HS inibiu aproximadamente 50%, o tamanho do trombo em relação ao do controle.

Figura 7. **Efeito antitrombótico *in vivo* do HS do *N. nodosus*.** O HS foi administrado nas doses indicadas.



Após, 5 min a ação trombótica foi iniciada pela injeção da tromboplastina. No mínimo, 5 animais foram usados por dose.

CONCLUSÃO

O Heparam sulfato extraído do molusco *N. nodosus* possui uma atividade antitrombótica considerável nas doses de 0,75 mg/kg e 1 mg/kg, no modelo venoso.

O Heparan sulfato extraído do molusco *N. nodosus* apresenta uma função anticoagulante, em modelo *ex vivo*, como mostrado no aPTT.

A ação antitrombótica e anticoagulante do HS de *N. nodosus* permanecem vinculadas quando analisadas pelo modelo de trombose venosa.

O presente estudo contribui de forma significativa para o desenvolvimento de novos compostos antitrombóticos e anticoagulantes que não apresentam muitos efeitos colaterais e que atuem de maneira efetiva nas diversas

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S.S., RAWAALA-SHEIKH, R., WALSH P.N., - Components and assembly of the factor X activating complex. **Semin. Thromb. Haemost.** v. 18, p.311-323, 1992.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION HEART DISEASE AND STROKE STATISTICS UPDATE. **Dallas, Texas:** p.26, 2009.
- ANREWS, R.K., SHEN, Y., GARDINER, E.E., DONG, J.F., LÓPEZ, J.A., BERNDT, M.C., -The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. **Thromb. Haemost.** v. 82, p. 357-364, 1991.
- BERTINA, R.M., KOELEMAN, B. P. C., KOOSTER, T., ROSENDAAL, F. R., DIRVEN, R.J., DERONDE, H., - Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature.** v.369, p. 64-67, 1994.
- BEVERS, E. M., COMFURIUS, P., ZWAAL, R. F., -Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. **Biochim. Biophys. Acta** v.736, p.57-66, 1983.
- BOURIN, M.C., LINDAHL, U., Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. **Biochemical Journal.** v. 289, p. 313-330, 1993.
- BRASS, L.F., - Molecular basis for platelet activation. **Hematology: basic principles and practice, Churchill Livingstone Inc.,** New York, USA, p. 1536-1551, 1995.
- BUENO, R. S., MARQUES, H. L. A., ROMA, R. P. C. R., - Crescimento e sobrevivência da vieira *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758), (Mollusca: Pectinidae) em diferentes estruturas de cultivo na Praia Grande do Bonete, Ubatuba, Estado de São Paulo. **Biotemas.** v. 23 (1), p. 121-130, 2010.
- CASU, B., - Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications, **Ed: D. A. Lane and U. Lindahl, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL,** p. 25, 1989.
- CECHOWSKA-PASKO, M., PALKA, J., - Age-dependent changes in glycosaminoglycans content in the skin of fasted rats: a possible mechanism. **Exp Toxicol Pathol.** v. 52, p. 127-31, 2000.
- CECHOWSKA-PASKO, M., PALKA J., BANKOW, S. E., - Decreased in glycosaminoglycans content in the skin of diabetic rats: the role of IGF-I, IGF-binding proteins and proteolytic activity. **Mol Cell Biochem.** v. 154, p. 1-8, 1996.
- CONRAD, H. E., - Heparin Binding Proteins. **Ed. Academic Press,** San Diego, CA, 1998.
- DAVID, E.W., FUJIKAWA, K., KISIEL, W., - The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry** v.30, p.10363-10370, 1991.
- DAVIE E. W., RATNOFF O. D., - Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science** v. **145**, p. 1310-1312, 1964.
- DAY, T. K., - Variability of heparin levels and bleeding with low-dose heparin prophylaxis following transurethral resection of the prostate. **JR Soc Med.** v. 78(2), p.109-11, 1985.
- DREYFUSS, J. L., REGATIERI, C. V., JARROUGE, T. R., CAVALHEIRO, R. P., SAMPAIO, L. O., NADER, H. B., - Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences** v.81: p. 409-429, 2009.
- ERWIN A. V., CHRISTOPHER A., SIEDLECKI, - Contact activation of blood plasma coagulation. **Biomaterials.** v. 30, p. 1857-1869, 2009.
- FRANCO R.F., - Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis. **Medicina, Ribeirão Preto,** v. 34, p. 229-237, 2001.
- FREEDMAN, J.E., LOSCALZO, J., - Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. **J Thromb Haemost,** v. 1, p. 1183-8, 2003.
- FURIE, B., FURIE, B. C., - *In vivo* thrombus formation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis.** v. 5, p.12-17, 2007.

GAILANI, D., BROZE, G.J., - Factor XI activation by thrombin and factor XIa. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis** v. 19, p 396–404, 1993.

GOMES, A. M., - Caracterização estrutural e propriedades anticoagulantes do heparan sulfato do molusco *Nodipecten nodosus*. **Tese de Mestrado, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2010.

GOMES A. M., KOZLOWSKI E. O., POMIN V. H., BARROS C. M., ZAGANELI J.L., PAVÃO M. S. G., - Unique Extracellular Matrix Heparan Sulfate from the Bivalve *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) Safely Inhibits Arterial Thrombosis after Photochemically Induced Endothelial Lesion. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. v. 285, n. 10, 2010.

GUERRINI, M., BECCATI, D., SHIHVER, 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: p.669-675, 2008.

HASCALL, V. C., RIOLO, R. L., - Characteristics of protein-Keratan sulfate core and of Keratan sulfate prepared from bovine nasal cartilage proteoglycan **J.Biol.Chem.** v. 247, p. 4529-38, 1972.

IHRCKE, N. S., WRENSHALL, L. E., LINDMAN, B. J., - Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. **Immunol.** p.500-505, 1993.

JAQUES, L. B.; MAHADOO, J., - Pharmacodynamics and clinical effectiveness of heparins. **Semin. Thromb. Hemost.**, v.4, p.298-325, 1978.

JEANLOZ, R. W., - The nomenclature of mucopolisaccharides. **Arthritis Rheum.**v.3, p.233-237, 1960.

JIN-PING L., ISRAEL V.,- Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. **Thromb Haemost.** v. 102, p. 823–828, 2009.

KENICHI, A. T., NIGEL, S. K., JERROLD, H. L. – **Blood Coagulation: Hemostasis and Thrombin**

Regulation. **International Anesthesia Research Society**. v. 108, n. 5, 2009.

KISHIMOTO, T. K., VISWANATHAN, K., GANGULY, T., ELANKUMARAN, S., SMITH, S., PELZER, K., LANSING, J. C., SRIRANGANATHAN, N., ZHAO, G., GALCHEVA-GARZOVA, 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., SHIRIVER, Z., LANGER, R. S., VENKATARAMAN, G., AUSTEN, K. 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, p. 2457-2467, 2008.

LI AW, P. C. Y., AUSTIN, C. R., FREDENBURGH, J. C., STAFFORD, A. R., WEITZ, J. I., - Comparison of heparin- and dermatan sulfate-mediate catalysis of thrombin inactivation by heparin cofactor II. **The Journal of Biological Chemistry** v. 274:p. 27597-27604, 1999.

LI HE, TUSAR K. G., CRISTINA P. V., DOUGLAS M. T.,- Vascular dermatan sulfate regulates the antithrombotic activity of heparin cofactor II. **Hemostasis, thrombosis, and vascular biology**. v. 111, n. 8, p. 4118-4125, 2008.

LINDAHL, U. - Biosynthesis of heparin and related polysaccharides Chemical and Biological Properties, **Clinical applications**, CRC Press Inc, Florida, p.159-89, 1989.

LINHADT, R. G., TOIDA, WITZAR, Z. B., NIEFORT K. A., - T.Carbohydrates drugs – heparin oligosaccharides – new analogs development and applications. **Marcel Dekker**: New York., p.707-774, 1997.

LLOYD-JONES, D., ADAMS, R.J., BROWN, T.M., CARNETHON, M., DAI, G., DE SIMONE, G., FERGUSON, T.B., FORD, E., FURIE, K., GILLESPIE, H., GO, A., GREENLUND, K., HAASE, N., HAILPERN, S., HO, P.M., HOWARD, V., KISSELA, B., KITTNER, S., LACKLAND, D., LISABETH, L., MARLLI, A., MCDERMONT, M.M., MEIGS, J., MOZAFFARIAN, D., MUSSOLINO, M., NICHOL, G., ROGER, V., ROSAMMOND W., SACCO, R., SORLIE, P., STAFFORD, R., THOM, T., WASSERTHIEL-SMOLLER, S., WONG, N.D., WYLIE-ROSETT, J., - Heart Disease and Stroke Statistics. **A**

Report From the American Heart Association. Circulation v. 121, p. 1-170, 2010.

LOPES, C. C., DIETRICH, C. P., NADER, H. B., - Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. **Braz J Med Biol Res.** v. 39, p. 157-67, 2006.

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

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

MACKMAN, N., TILLEY, R. E., KEY, N.S., - Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** v.27: p.1687-1693, 2007.

MONROE, D. M., HOFFMAN, M., ROBERTS, H. R., - Arterioscler. **Thromb. Vasc. Biol.** v. 22, p. 1381, 2002.

OLIVERCRONA, T., BENGTSSON, O. G., - Heparin and lipases. In Lane, D.A.; Linsdahl. V.: **Heparin. Chemical and Biological properties, Clinical Applications.** C.R.C. Press, Boca Raton, 1989.

PLOW, E.F., GINSBERG, M.H., HOFFMAN, R., BENZ, E.J.,JR., SHATTIL, S. J., FURIE, B., COHEN, H.J. SILBERSTEIN, L.E. - Molecular basis of platelet function. **Hematology. Basic principles and practice,** Churchill Livingstone Inc, New Yourk, p.1524-1535, 1995.

QUEIROZ, C. R., - Técnica de produção de coquille, *nodipecten nodosus*, (linnaeus, 1758) no laboratório do terminal de minério da empresa mbr - mangaratiba – RJ. **Universidade Castelo Branco.** p. 1-12, 2005.

RABENSTEIN, D.L., - Heparin and heparan sulfate: structure and function. **Natural Product Reports.** v.19: p. 312-331, 2002.

ROBERT W. C., - Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin?. **The Journal of Experimental Medicine.** v. 203, n. 3, p.493-495, 2006.

ROCKVILLE, M. D., - Acute allergic-type reactions among patients undergoing hemodialysis — multiple states, 2007–2008. Information on adverse event reports and heparin.

Morbidity and Mortality Weekly Report. v. 57, p. 124-125, 2008.

ROSENBERG, R. D., - Biologic action of heparin. **Semin Hematol.** v.14 (4): p. 427-40, 1977.

SAKARIASSEN, K. S., BOLHUIS, P. A., SIXMA, J. J., - Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-Von Willebrand factor bound to the subendothelium. **Nature.** v. 279, p. 636–638, 1979.

SASISEKHARAN, R., RANAN, R., PRABHAKAR V., - Glycomics Approach to Structure-Function Relationships of Glycosaminoglycans. **The Annual Review of Biomedical Engineering** v. 8, p. 181–231, 2006.

SEGERS, K., DAHLBACK, B., NICOLAES, G. A., - Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. **Thrombosis and Haemostasis.** v. 98: p.530 –542, 2007.

SELTZER, J. L.; GERSON, J. I. – Decrease in arterial pressure following heparin injection prior to cardiopulmonary bypass. **Acta Anaesth. Scand.** v.23: p. 575-578, 1979.

Suresh V., - Deep Venous Thrombosis:The Opportunity at Hand. **Vascular and interventional radiology.** v. 193, p. 922–927, 2009.

TURNBULL J, POWELL A, GUIMOND S., - Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. **Trends Cell. Biol.** v.11, p. 75-82, 2001.

VIRCHOW, R., - Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin. **Meidinger, Frankfurt,** 1856.

WALLACE, J. L., - Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 100, supl. 1, 2005.

WATSON, S.P., - Coallagen recptors sinaling in platelets and megakaryocytes. **Thromb. Haemost.** v.82: p.365-376, 1999.

WEITZ, J.I., - Low-molecular-weight heparins. **The New England Journal of Medicine** v.337:p. 688-98, 1997.

WODARZ, A, NUSSE, R., - Mechanisms of Wnt signaling in development. **Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.**, v.14: p. 59-88, 1998.

