

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Bioquímica Médica



Rômulo Almeida Nazareth

*Efeito antitrombótico do Ixolaris, um potente
inibidor exógeno da coagulação sanguínea*

Rio de Janeiro

Maio de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Rômulo Almeida Nazareth

*Efeito antitrombótico do Ixolaris, um potente
inibidor exógeno da coagulação sanguínea*

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, visando ao grau de Doutor em Química Biológica

Orientador: Robson Q. Monteiro

Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ

Rio de Janeiro
Maio de 2007

Ficha Catalográfica

Nazareth, Rômulo Almeida

Efeito antitrombótico do Ixolaris, um potente inibidor exógeno da coagulação sanguínea / Rômulo A. Nazareth. Rio de Janeiro, 31 de maio de 2007.

xvii, 63 f.

Tese (Doutorado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica – CCS, 2007.

Orientador: Robson Queiroz Monteiro

1. Palavras chaves: Ixolaris, trombose, fator tecidual, rato.

I. Monteiro, Robson Q. (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Bioquímica Médica. III. Título.

Folha de Aprovação

Rômulo Almeida Nazareth

Efeito antitrombótico do Ixolaris, um potente inibidor exógeno da coagulação sanguínea

Rio de Janeiro, 31 de maio de 2007.

Paulo A. Melo, Prof Adjunto do Depto de Farmacologia Básica e Clínica, ICB, UFRJ.

Mauro S. G. Pavão, Prof Adjunto do IBqM, UFRJ.

Telma B. Gadelha, Profa Adjunta do Serviço de Hematologia, Depto de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFRJ.

Revisor e suplente externo
Mariana Sá Pereira, Profa Adjunta do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.

Suplente interno
Geórgia C. Atella, Prof Adjunto do IBqM, UFRJ.

Orientador
Robson Q. Monteiro, Prof Adjunto do IBqM, UFRJ.

Agradecimentos

Ao meu orientador Robson Monteiro, por ter me aceito em seu laboratório após um momento conturbado e pela enorme paciência em orientar esta tese até o final. Obrigado por ter acreditado em mim e desculpe pelas “tempestades” do período.

Ao Professor Wladimir Farias que me orientou nos primeiros passos em experimentos *in vivo*, espinha dorsal de toda minha vida em pesquisa.

Ao Prof. Mourão e à Profa Ana Tovar, por terem permitido o meu ingresso em seu laboratório e me ensinado aplicar o pensamento científico no laboratório e em outras áreas da ciência, método que me é útil até hoje na carreira médica. Minha participação no Programa MD-PhD da UFRJ é resultado direto da ação dessas duas pessoas excepcionais.

A Clarice Kirszberg, Fabio Rabelo e Flavia Frattani pela grande ajuda na parte escrita da tese.

À Luana, minha estudante de Iniciação Científica e aos Drs Susana Ortiz-Costa, Geórgia Atella e Ivo Francischetti, fundamentais na realização da parte experimental desta tese.

À Profa Mariana que também foi fundamental na minha formação como orientadora, mas principalmente pelos momentos em que soube me ouvir de igual para igual como ninguém. Incluo aqui também vários amigos de verdade que tive e tenho, importantíssimos não só nesses três anos e sete meses, como em toda vida: Xuxu, minha amiga pesquisadora ombro e ouvidos ótimos para as “lágrimas de bancada”; Alemão - incluído no estrito hall dos meus melhores amigos dividindo o pódio com mais dois ou três (no máximo); Arakaki e Rafael – ocupando também esta mesma posição; Gabriela – importantíssima na minha seleção para o doutorado, todo apoio e carinho inesquecíveis; PC – grande companheiro de bancada, IC e gargalhadas no laboratório.

Aos demais amigos e professores do Laboratório de Tecido Conjuntivo e do Laboratório de Hemostase e Venenos pelas muitas horas e aprendizado e convívio com todos

A todos os amigos de faculdade, pelos ótimos momentos, por dividirem o aprendizado, o crescimento nessa fase da vida tão única e em seus detalhes e inesquecível.

Ao meu querido pai que me ensinou a levantar a cabeça diante do obstáculo, a ter fé, por suas palavras e pela fé em mim, pelo amor por mim, que é essa fé.

À minha mãe, minha fã número um, meu riso mais querido, meu abraço mais gostoso, meu porto mais seguro cercado de mar bravoio.

À Amaralina, minha luz, por todo Amor, paciência, por tudo que sinto e sei.

A Deus, que fez a vida simples. Desculpai pelas complicações e mais ainda por tentar descomplicá-la desse jeito humano.

Resumo

O Ixolaris é uma proteína com dois domínios do tipo *Kunitz* identificada na glândula salivar do carrapato *Ixodes scapularis*. Este apresenta uma extensa homologia na seqüência primária com um inibidor fisiológico da coagulação sanguínea denominado Inibidor da Via do Fator Tecidual (TFPI). De forma similar ao TFPI, o Ixolaris se liga ao Fator Xa (FXa), formando um complexo binário que inibe o complexo Fator Tecidual/FVIIa (complexo tenase extrínseco). No entanto, diferentemente do TFPI, o Ixolaris não se liga ao sitio catalítico do FXa. Ao invés disso, a formação do complexo Ixolaris-FXa é mediada por uma região carregada positivamente na enzima denominada exsítio de ligação à heparina. Além disso, o Ixolaris também se liga com grande afinidade ao zimogênio Fator X (FX), algo que também o difere do TFPI. Dados prévios demonstraram que a formação do complexo Ixolaris-FXa diminui a atividade da enzima no complexo protrombinase (FXa/FVa), responsável pela conversão da protrombina em trombina. Nesta tese, foi demonstrado que o Ixolaris interage especificamente com o FX do plasma de rato ou humano. O Ixolaris é um potente anticoagulante, inibindo as vias extrínseca e intrínseca da coagulação, como demonstrado nos ensaios *in vitro* de tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), respectivamente. Em seguida foi avaliado o possível efeito antitrombótico do Ixolaris, utilizando um modelo *in vivo* de trombose venosa em ratos. A administração intravenosa ou subcutânea (s.c.) do Ixolaris causou uma redução dose-dependente da formação de trombos, sendo que a inibição completa foi observada com 10 µg/kg e 20 µg/kg, respectivamente. O efeito antitrombótico por via s.c. foi observado 3 h após a administração da droga e persistiu por mais de 24 h, indicando uma meia-vida prolongada no plasma. Esta observação foi corroborada com experimentos utilizando Ixolaris marcado com ¹²⁵I e sua detecção após administração s.c. Experimentos ex-vivo mostraram que doses de Ixolaris de até 100 µg/kg não afetaram significativamente o aPTT, ao passo que o PT foi aumentado em cerca de 40% (100 µg/kg). De forma marcante, doses antitrombóticas efetivas de Ixolaris por via s.c. (20 µg/kg) não aumentaram o sangramento induzido, indicando uma baixa tendência a um efeito hemorrágico. Desta forma, conclui-se que o Ixolaris é um agente antitrombótico extremamente potente e possivelmente seguro para utilização *in vivo*.

Abstract

Ixolaris is a two-Kunitz protein identified in the salivary gland of the tick *Ixolaris scapularis*. It presents an extensive primary sequence homology with the physiological coagulation inhibitor Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). Similarly to TFPI, Ixolaris binds to Factor Xa (FXa) thus forming a binary complex that inhibits the Tissue Factor/FVIIa complex (extrinsic Xnase complex). However, differently from TFPI, Ixolaris does not bind to the catalytic site of FXa. Instead, complex formation is mediated by a positively charged region in the enzyme named heparin-binding exosite. Furthermore, Ixolaris also binds FX with high affinity. Previous data demonstrated that the formation of Ixolaris-FXa complex diminishes the activity of the enzyme in the prothrombinase complex (FXa/FVa), responsible for the conversion of prothrombin into thrombin. In this work, it was demonstrated that Ixolaris specifically interacts with FX from either rat or human plasma. Ixolaris is a potent anticoagulant that inhibits either the extrinsic or the intrinsic pathways of coagulation, as demonstrated by the *in vitro* assays Prothrombin time (PT) and Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT), respectively. The antithrombotic effect of Ixolaris was further evaluated using an *in vivo* model of venous thrombosis in rats. Intravenous or subcutaneous (s.c.) administration of Ixolaris caused a dose-dependent reduction in thrombus formation, in which the complete inhibition was observed at 10 µg/kg e 20 µg/kg, respectively. The antithrombotic effect by s.c. route was observed after 3 h and persisted for more than 24h, indicating a prolonged half-life in plasma. This observation was corroborated by assays employing ¹²⁵I-labeled Ixolaris and its detection after s.c. administration. Ex-vivo experiments showed that Ixolaris doses up to 100 µg/kg did not affect the aPTT while PT was increased by ~40% (100 µg/kg). Remarkably, effective antithrombotic doses of Ixolaris by s.c. route (20 µg/kg) did not increase the induced bleeding, indicating a low tendency to hemorrhagic effect. Thus, it is concluded that Ixolaris is an extremely potent antithrombotic agent and possibly safe for *in vivo* use.

Lista de Figuras

Figura 1 - Teoria da coagulação proposta por Morawitz	pág 03
Figura 2 - Modelo da cascata de coagulação	pág 05
Figura 3 - Modelo celular da coagulação sanguínea	pág 06
Figura 4 - Complexos multimoleculares da coagulação sanguínea	pág 09
Figura 5 - Formação do polímero de fibrina	pág 13
Figura 6 - Mecanismo de inibição pelo TFPI	pág 15
Figura 7 – Distribuição percentual mundial de causas de morte em 2005	pág 16
Figura 8 - Estrutura secundária do Ixolaris	pág 18
Figura 9 - Mecanismo de ação do Ixolaris.	pág 20
Figura 10 – Atividade anticoagulante <i>in vitro</i> do Ixolaris	pág 31
Figura 11 – Detecção dos complexos de FX e ¹²⁵ I-Ixolaris por PAGE	pág 32
Figura 12 - Efeitos do Ixolaris no modelo de trombose venosa induzida em ratos	pág 34
Figura 13 - Efeito do Ixolaris na trombose venosa após administração s.c.	pág 35
Figura 14 - Estimativa da meia-vida plasmática do ¹²⁵ I-Ixolaris	pág 36
Figura 15 - Atividade anticoagulante <i>ex vivo</i> do Ixolaris	pág 38
Figura 16 - Efeito do Ixolaris no sangramento induzido	pág 39

Abreviaturas

APC – proteína C ativada (*activated C protein*)

aPTT – tempo de tromboplastina parcial ativada (*activated parcial thromboplastin time*)

AT – antitrombina

Fator – F (Sigla utilizada para todos os fatores da coagulação citados nesta tese, incluindo: Fatores IX, IXa, X, Xa, XI, XIa, XII, XIIa, VIII, VIIIa, VII, VIIa, V e Va.

HCII – Cofator II da heparina (*Heparin Cofactor II*)

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*)

PT – tempo de protrombina (*prothrombin time*)

TF – fator tecidual (*tissue factor*)

TFPI – inibidor da via do fator tecidual (*tissue factor pathway inhibitor*)

TNF- α – fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor)

vWF - fator von Willebrand

Sumário

Ficha Catalográfica	III
Folha de Aprovação	IV
Agradecimentos	V
Resumo	VI
Abstract	VII
Lista de Figuras	VIII
Abreviaturas	IX
1 - Introdução	1
1.1 – Considerações gerais sobre o processo hemostático.....	2
1.2 – As fases da coagulação sangüínea.....	3
1.3 – Fator Tecidual e Fase de Iniciação.....	7
1.4 - Fase de Amplificação.....	10
1.5 – Fase de Propagação e Trombina.....	11
1.6 – Fase de Terminação e Inibidores Fisiológicos da Coagulação Sangüínea.....	14
1.7 – Aspectos gerais acerca da trombose.....	16
1.8 – Inibidores Exógenos da Coagulação.....	17
2 -Objetivos	20
2.1 - Objetivo Geral.....	21
2.2 – Objetivos Específicos.....	21
3 - Materiais e Métodos	22
3.1 – Materiais.....	23

3.2 – Animais	23
3.3 – Expressão e purificação do Ixolaris.....	23
3.4 – Efeito Anticoagulante <i>in vitro</i> do Ixolaris – avaliação pelo aPTT e PT.....	24
3.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	25
3.6 – Modelo de trombose venosa induzida por estase e administração de tromboplastina tecidual.....	25
3.7 – Determinação da meia-vida plasmática do ¹²⁵ I-Ixolaris.....	26
3.8 – Efeito ex-vivo do Ixolaris sobre o aPTT e o PT.....	26
3.9 – Efeito do Ixolaris sobre o sangramento induzido.....	27
3.10 – Estatística.....	27
4 - Resultados.....	28
5 - Discussão.....	39
6 - Conclusão.....	43
7 – Bibliografia.....	45
8 – Anexo.....	51

1. Introdução

1.1 Considerações gerais sobre o processo hemostático

A hemostasia é o mecanismo que mantém a fluidez do sangue pelos vasos, além de impedir que danos vasculares causem uma perda extensiva de sangue. Isto se dá por meio de eventos mecânicos e bioquímicos e, didaticamente, pode-se dividir a hemostasia em primária, secundária e terciária, embora os três processos estejam inter-relacionados.

Na hemostasia primária, tem-se vasoconstrição local, adesão e agregação plaquetária com conseqüente formação de um tampão plaquetário inicial. A hemostasia secundária compreende uma série de reações enzimáticas cujo resultado final é a formação de fibrina a partir do fibrinogênio que confere estabilidade ao coágulo. Por fim, a hemostasia terciária ou fibrinólise é ativada subsequente à coagulação, existindo um equilíbrio fisiológico entre as mesmas, onde a plasmina atua degradando a fibrina e desfazendo o coágulo formado. A ativação da fibrinólise depende da presença de fibrina recém formada em interação com o tPA (ativador tissular de plasminogênio) que gera a plasmina a partir do plasminogênio, dando início a fibrinólise, responsável pela lise do coágulo e restabelecimento do fluxo sanguíneo (Broze, 1995; Furie e Furie, 1995; Roberts e col., 2001).

A hemostasia requer a formação de um plugue impermeável de plaquetas e fibrina no sítio da lesão ao vaso, sendo crucial que as poderosas substâncias pró-coagulantes ativadas nesse processo permaneçam localizadas no sítio da injúria. Isto se dá localizando-se as reações pró-coagulantes principalmente na superfície de células específicas. Além disso, a ação de inibidores fisiológicos da coagulação impede que a resposta ao dano vascular se dissemine além do sítio de lesão.

1.2 Plaquetas

As plaquetas são células anucleadas e de formato discóide derivadas da fragmentação de uma célula precursora, gerada na medula óssea, denominada megacariócito. Apesar de não ser o tipo celular majoritário encontrado no sangue, as plaquetas desempenham um papel central no sistema hemostático (Kalafatis e col., 1994; Mann, 1999). Um dos primeiros eventos que se seguem à injúria vascular é a adesão das plaquetas ao sítio agredido, seguido da formação de um agregado sobre a lesão vascular que reduz ou interrompe temporariamente a perda de sangue.

A adesão das plaquetas ao subendotélio exposto após a injúria vascular é principalmente mediada por uma glicoproteína plasmática denominada fator de von Willebrand. Esta proteína interage com as plaquetas através de um receptor específico denominado complexo glicoproteína (GP) Ib-IX-V, criando uma ponte entre as células e o subendotélio exposto (Plow & Ginsberg, 1995). Outra proteína fundamental neste processo é o colágeno, presente no subendotélio exposto, que também promove a adesão das plaquetas utilizando um mecanismo similar através do receptor GP Ia-IIa (Plow & Ginsberg, 1995; Watson, 1999). Além da adesão das plaquetas ao subendotélio, o colágeno também é capaz de induzir a ativação destas células, num processo mediado pelos receptores GP IV e GP VI (Watson, 1999). A ativação plaquetária também é mediada por outros agonistas que são formados no sítio de injúria ou secretados pelas próprias plaquetas, amplificando a resposta celular.

Atuando em receptores plaquetários específicos, estes agonistas desencadeiam uma série de processos (Brass, 1995), tais como: i) sinalização intracelular gerada pelo acoplamento dos receptores à proteínas G, canais de cálcio ou tirosina quinases; ii) reorganização do citoesqueleto e mudança de forma das plaquetas – as plaquetas passam de

um formato discóide para uma forma esférica com intensa emissão de pseudópodos; iii) secreção do material contido nos grânulos α e δ , constitutivos destas células; iv) exposição de novos receptores, dentre eles o complexo GP IIb-IIIa, que é reconhecido pelo fibrinogênio e permite a interação entre as plaquetas (agregação plaquetária); v) alteração da composição de sua membrana externa com exposição de fosfolípidos aniônicos, principalmente a fosfatidilserina (Bever e col., 1983). Em condições normais, a membrana das plaquetas apresenta uma distribuição assimétrica dos fosfolípidos aniônicos, sendo a maior parte destes presentes na parte interna da membrana. A ativação plaquetária induz a liberação de estoques intracelulares de cálcio bem como a abertura de canais para este íon. O aumento na concentração de Ca^{+2} intracelular inibe uma aminofosfolípido translocase responsável pela manutenção da assimetria na distribuição dos fosfolípidos e concomitantemente ativa uma proteína que transporta fosfatidilserina para a parte externa da membrana das plaquetas (Solum, 1999). Em condições fisiológicas, a principal fonte de fosfolípidos para a formação de alguns complexos da coagulação sanguínea, discutidos adiante, é a superfície de células ativadas, especialmente as plaquetas aderidas ou agregadas junto ao sítio de lesão vascular (Kalafatis e col., 1994; Solum, 1999).

As fases da coagulação sanguínea

Em 1905, Morawitz propôs uma teoria para a coagulação sanguínea que influenciaria as pesquisas nessa área nos próximos 50 anos. Ele foi o primeiro a introduzir o termo “trombokina” para descrever a substância presente nos tecidos que promoveria o coágulo. Sua teoria propôs a existência de quatro elementos: trombocina (fator tecidual), cálcio, protrombina e fibrinogênio, onde a trombocina, na presença de cálcio, converteria a protrombina em trombina, que por sua vez converteria o fibrinogênio em fibrina (Figura 1) (Bächli, 2000; Doyle 2006).

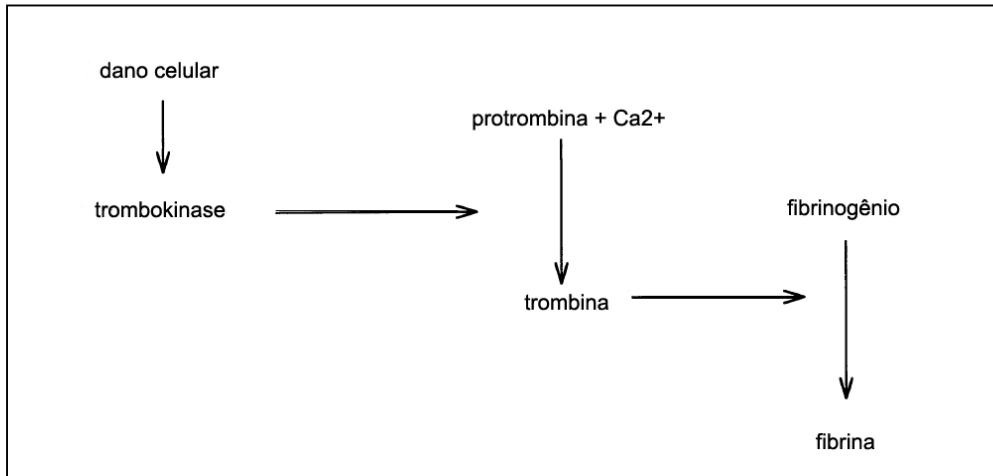


Figura 1 – Teoria da coagulação proposta por Morawitz. Figura adaptada de Bächli, 2000.

Com o passar dos anos, o processo de coagulação vem se elucidando, conforme a identificação de novos elementos celulares ou plasmáticos participantes das reações enzimáticas presentes nas suas diversas fases.

Em 1964, dois grupos de bioquímicos propuseram a teoria da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação no sangue. Nesse modelo (Figura 2), a coagulação consistia de uma série de passos que ativariam proteoliticamente, e em seqüência, zimogênios que seriam convertidos a enzimas e que iriam resultar na geração exacerbada de trombina (MacFarlane, 1964; Davie e Ratnoff, 1964). Os modelos originais das cascatas foram modificados subsequentemente para incluir a observação de que alguns pró-coagulantes eram co-fatores e não possuíam atividade enzimática. O esquema dividia a coagulação em uma via extrínseca que consistia do fator VIIa (FVIIa) e do fator tecidual (TF), onde este último era visto como ocorrendo somente fora da circulação sangüínea, e uma via intrínseca, iniciada por componentes que se acreditava estarem presentes somente no compartimento intravascular. Ambas as vias convergiam no ponto de ativação do FX (“via final comum”), que em conjunto com o seu cofator Va converteriam protrombina em trombina. Os componentes da via

extrínseca e da via comum se refletem laboratorialmente no tempo de protrombina (prothrombin time – PT), e componentes da via intrínseca e comum se refletem no tempo de tromboplastina parcial ativada (activated partial thromboplastin time – aPTT) (Hoffman, 2003).

Estes testes possuem grande importância até hoje na prática médica, uma vez que são capazes de identificar, ainda que de maneira não tão específica, qual fase do processo de coagulação pode estar envolvida em certa patologia por exemplo. Isto fica evidenciado pelo fato de estes testes se utilizarem componentes do plasma que participam diretamente deste processo. No caso do aPTT a seqüência de reações da coagulação é disparada pelos fatores calicreína e cininogênio de alto peso molecular que ativa o fator XII quando em contato com superfícies negativas. Além disso, a presença de cefalina e cálcio fornecem cofator e superfície favorável respectivamente para que a reação a coagulação aconteça *in vitro*. No caso do PT, a via extrínseca pode ser avaliada a partir da adição de tromboplastina ao plasma que fornece o fator tecidual que dispara a coagulação ativando Fator VII (vide Material e Métodos).

Na via extrínseca, o FVII plasmático, na presença do seu cofator, o TF, ativaria diretamente o FX em FXa. Na via intrínseca, a ativação do FXII ocorreria quando o sangue entrasse em contato com uma superfície, contendo cargas negativas. Tal processo foi denominado “ativação por contato” e requeria ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-calicreína (zimogênio da serino-protease calicreína) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O FXIIa ativaria o FXI, que, por sua vez, ativaria o FIX. O FIXa, na presença de FVIIIa, ativaria o FX da coagulação, desencadeando a geração de trombina e subsequente formação de fibrina (Broze, 1995; Hoffman, 2003).

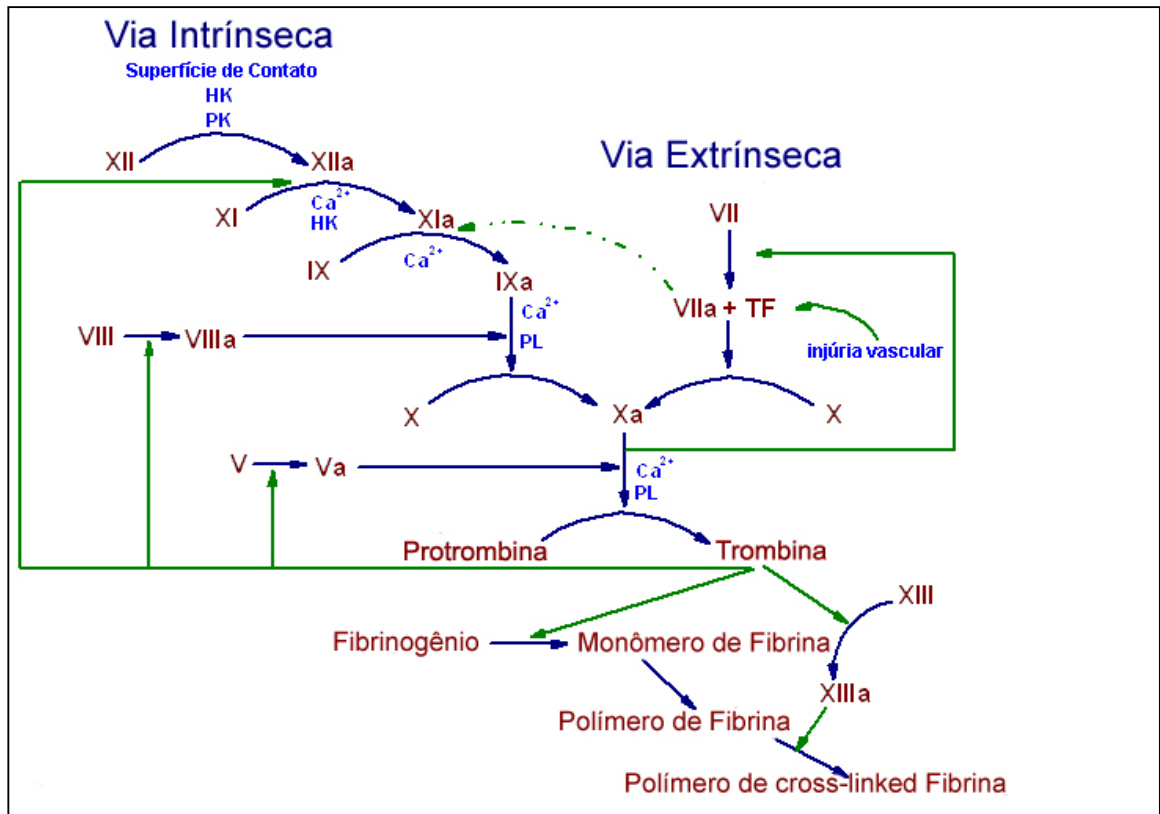


Figura 2 – Modelo da cascata de coagulação. HK = cininogênio de alto peso molecular. PK = pré-caliceína. PL = fosfolípido. Figura adaptada de King MW. <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/blood-coagulation.html>

No entanto, o modelo de cascata não explicava como, *in vivo*, a ativação do FX pelo complexo TF-FVIIa não conseguia compensar deficiências dos Fatores IXa ou FVIIIa, vistos nas hemofilia A e B. Além disso, pacientes deficientes nos componentes iniciais da via intrínseca (cininogênio de alto peso molecular, caliceína e FXII) não têm tendência a sangramentos, enquanto que os deficientes nos fatores IX e VIII apresentam sangramentos severos, mesmo possuindo uma via extrínseca normal. De forma similar, pacientes deficientes no FVII também possuem sangramentos severos apresentando uma via intrínseca normal. Portanto, a via intrínseca e a via extrínseca não operam de forma independente. *In vivo* estas vias são interligadas e complementares (Broze, 1995; Hoffman, 2003).

Recentemente, foi proposto que o processo de coagulação ocorreria em uma série de 3 fases interligadas que ocorreriam em diferentes superfícies celulares (Hoffman & Monroe, 2001). Os dois tipos celulares principais são “Células que expressam TF” e plaquetas. Estes dois tipos celulares são mantidos afastados, prevenindo a coagulação, até que haja uma lesão que torne favorável a ativação do sistema de coagulação. Nesse momento, e na região limitada da lesão, haveria a possibilidade destas células intra e extra-vasculares entrarem em contato e promoverem as reações que produzem a coagulação (Figura 3).

A primeira fase da coagulação, aqui denominada fase de iniciação, ocorreria em células que expressam TF. Nesta fase, concentrações picomolares de trombina (10^{-12} M) são produzidas. Na fase de amplificação, plaquetas e cofatores seriam ativados a fim de se preparem para a geração de trombina em larga escala. Finalmente, a propagação ocorreria na superfície das plaquetas, e resultaria em uma produção de trombina que seria produzida em concentrações micromolares (10^{-6} M), um milhão de vezes mais concentrada que a sua produção durante a fase de iniciação (Figura 3) (Mann, 1999; Monroe e col., 2002; Hoffman, 2003).

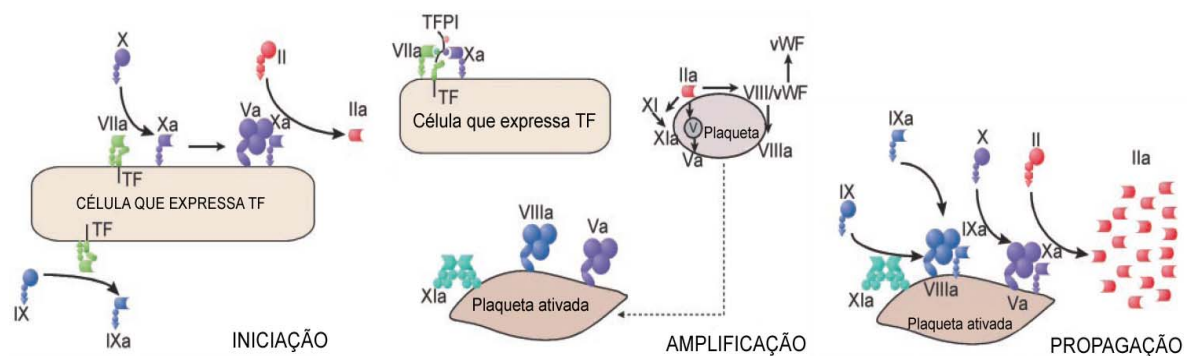


Figura 3 – Modelo celular da coagulação sanguínea. Neste esquema mostramos que a coagulação ocorre em diferentes células (células que expressam TF e plaquetas). O processo é dividido em 3 fases: iniciação, amplificação e propagação. Figura adaptada de Monroe e col, 2002.

1.3 Fator Tecidual e a Fase de Iniciação

A fase de iniciação começa com a exposição do Fator Tecidual ao sangue, evento que levará à geração de trombina.

O termo Fator Tecidual (TF) e o seu conceito foram introduzidos pela primeira vez em 1935. A noção de que uma única proteína seria responsável pela promoção da coagulação nos tecidos levou a tentativas de purificação do TF. Finalmente, em 1981, o TF foi purificado pela primeira vez e com isso o seu significado biológico como iniciador da coagulação ganhou espaço (Spek, 2004). Hoje, sabe-se que o TF é uma proteína de 47-kDa, com 219 aminoácidos no domínio extracelular, 21 aminoácidos no domínio transmembranar hidrofóbico e 21 aminoácidos no domínio da cauda intracelular, que contém 3 possíveis sítios de fosforilação em serina. Também chamado de CD142, a seqüência do TF tem um grau de similaridade com os receptores classe II das citocinas, como o interferon (Morrissey, 2001).

O TF não é normalmente expresso em células em contato direto com o sangue (tais como células endoteliais e leucócitos), mas apresenta expressão constitutiva em fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular. Também é encontrado em queratinócitos, células epiteliais do trato respiratório e trato gastrointestinal, cérebro, células musculares cardíacas e glomérulos renais. Células endoteliais e monócitos, que, normalmente, não expressam o TF podem expressá-lo na vigência de lesão endotelial e na presença de estímulos específicos, tais como endotoxinas e citocinas (TNF- α e interleucina-1, por exemplo) (Østerud & Bjørklid, 2006).

A exposição do TF ao plasma, na luz do vaso, induz a uma cadeia de reações onde os processos chave são a ativação de proenzimas e procofatores derivados do plasma, que dão

origem à enzimas e cofatores capazes de interagir com membranas carregadas negativamente.

As proenzimas são proteínas sintetizadas no fígado e são dependentes de vitamina K. A vitamina K medeia a adição pós-translacional de grupos carboxil à resíduos de ácido glutâmico específicos, localizados na região amino-terminal dessas proenzimas, formando os domínios Gla, compostos de ácido γ -carboxi-glutâmico (Gla) (Kalafatis e col., 1994).

Após a ativação proteolítica, as enzimas possuem vida curta na circulação; a exceção a regra é o FVIIa. A forma clivada do FVII é uma protease inativa que requer a ligação ao TF para revelar seu sítio ativo. Como consequência, o FVIIa escapa dos inibidores plasmáticos que reconhecem a função do sítio ativo, e uma pequena fração (1-2%) do total de FVII circula no sangue como FVIIa (Morrisey e col., 1993). Após uma lesão vascular, o TF, agora exposto, se liga ao FVIIa presente no plasma formando o complexo catalítico inicial que irá disparar a cascata de coagulação. O resultante sistema pró-coagulante pode ser representado por uma série de 3 complexos enzimáticos similares, cada um composto por uma serino-protease e um cofator montados como um complexo na superfície da membrana. Cada complexo atua em um substrato também ligado à membrana (Figura 4) (Mann, 1999).

Durante a Fase de Iniciação, o participante principal é o complexo Tenase Extrínseco, um complexo composto por membrana celular, TF exposto devido a uma lesão vascular ou estimulação de citocinas, e o FVIIa presente no plasma. O complexo é formado pelo FVIIa e o TF na superfície de “Células que expressam TF” e ativa as proenzimas FX e FIX em seus respectivos produtos, FXa e FIXa. (Roberts, Hoffman & Monroe, 2006).

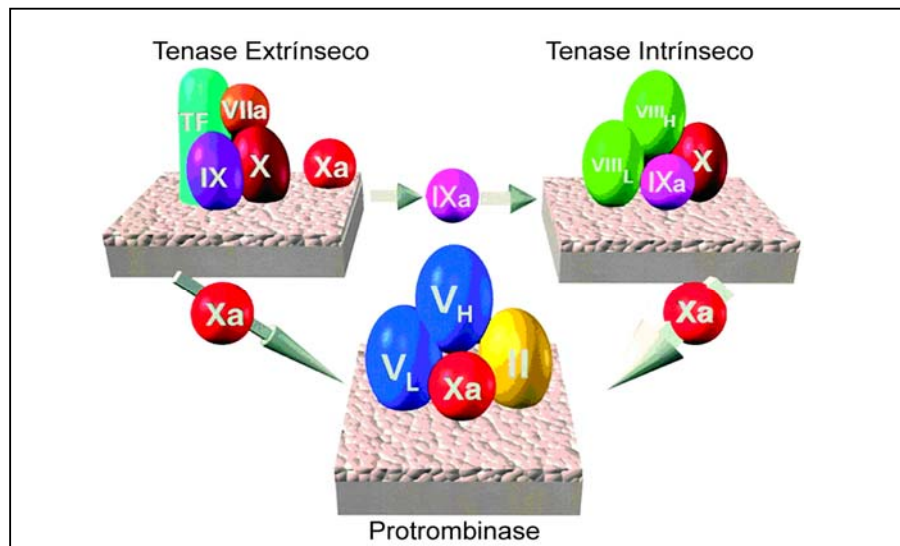


Figura 4 – Complexos multimoleculares da coagulação sanguínea. Cada complexo é composto por uma serino-protease (FVIIa, FIXa ou FXa) ligado a um cofator (TF, FVIIIa ou FVa, respectivamente) ligados a superfície da membrana. Cada complexo catalisa a ativação de um zimogênio dependente de vitamina K (FIX, FX ou protrombina (II), respectivamente) (“Coagulation Explosion”, Vermont Business Graphics, Kenneth G. Mann, 1997).

A reação inicial leva à geração de pequenas quantidades de FXa, FIXa e trombina. O FXa se dissocia do complexo tenase extrínseco e se associa ao cofator protéico FVa, íons cálcio e membranas carregadas negativamente para formar o complexo protrombinase, que converte o zimogênio protrombina na serino-protease trombina com eficiência catalítica cerca de 10^5 vezes superior ao FXa isolado (Figura 3 e Figura 4) (Kalafatis e col., 1994). O FV plasmático se liga, reversivelmente, a sítios na membrana e pode ser ativado diretamente por FXa nas plaquetas, mas a maior parte do FV é ativado pelas primeiras moléculas de trombina geradas durante o processo de coagulação. De fato, a pequena quantidade de trombina formada também tem um papel importante na subsequente ativação de plaquetas e FVIII na Fase de Amplificação (Hoffman & Monroe, 2001).

1.4 Fase de Amplificação

A fase de amplificação prepara a cena para a subsequente geração em larga escala de trombina durante a fase de propagação (Figura 3).

O dano na vasculatura permite às plaquetas, aderir a matriz extravascular, localizando-as perto do sítio de exposição de TF. A pequena quantidade de trombina gerada pelas células que expressam TF amplifica o sinal inicial de pró-coagulação aumentando a adesão e ativando completamente as plaquetas e os fatores V, VIII e XI. A ativação das plaquetas pela trombina expõe receptores e sítios de ligação para os fatores ativados da coagulação (Hoffman & Monroe, 2001; Hoffman, 2003).

Durante o processo de ativação do FVIII pela trombina, este se dissocia do Fator de Von Willebrand (FvW) - o complexo FVIII/FvW circula no plasma tornando estes dois fatores inativos quando ligados. O FvW participa na fase de hemostasia primária e é responsável pela ligação entre uma glicoproteína de superfície plaquetária (GP IIb/IIIa) à matriz extracelular do subendotélio através da glicoproteína Ib, enquanto que o FVIII é mantido ligado à superfície das plaquetas podendo fazer parte da montagem do complexo tenase intrínseco durante a fase de propagação (Hoffman & Monroe, 2001; Hoffman, 2003).

1.5 Fase de Propagação e a Trombina

Como dito anteriormente, trombina amplifica sua própria produção ao ativar os fatores XI, V e VIII, e também controla a fase de propagação da coagulação, além disso, promove a coagulação do fibrinogênio, a ativação do FXIII e a ativação plaquetária (Kalafatis e col., 1994; Mann, 1999, Davie & Kulman, 2006).

Esta protease desempenha um papel central no processo de coagulação dos vertebrados. Ela foi identificada como a substância capaz de promover a formação de um coágulo fibroso (fibrina), e seu nome deriva de *thrombos*, que em grego significa coágulo. A forma circulante, inativa, desta enzima é a protrombina, composta por 579 resíduos de aminoácidos, um domínio N-terminal rico em ácido γ -carboxiglutâmico (Gla), dois domínios estruturais denominados *kringle*, um pequeno peptídeo de ativação (short activation peptide), e o domínio trombina/catalítico/serina proteinase (Bode, 2006).

A Fase de Propagação ocorre na superfície das plaquetas ativadas. O complexo composto por FIXa-FVIIIa (complexo tenase intrínseco) ativa o FX a FXa muito mais eficientemente que o complexo TF-FVIIa (complexo tenase extrínseco); portanto, a maior quantidade de FXa gerada é provida pelo complexo tenase intrínseco. O FXa formado rapidamente se associa ao FVa ligado às plaquetas – em condições fisiológicas, a superfície de plaquetas ativadas na área de lesão vascular constitui o principal componente lipídico do complexo protrombinase – e a montagem do complexo protrombinase nas plaquetas gera uma massiva produção de trombina, gerando um efeito crescente na coagulação, onde complexos adicionais são montados e geram trombina (Mann, 1999; Solum, 1999; Hoffman & Monroe, 2001).

A carga negativa do fosfolipídio de membrana das plaquetas ativadas na qual os complexos protrombinase e tenase intrínseco são montados é conferida pela fosfatidilserina. Sob condições normais a fosfatidilserina se localiza na camada interna da membrana das plaquetas, mas é translocada para a camada externa durante a ativação das mesmas (Zwaal e col., 1998).

Todas as proteínas que participam dos complexos protrombinase e tenase possuem afinidade por fosfolipídios carregados negativamente e tanto as enzimas como os substratos

se ligam na membrana através do seu domínio amino-terminal que contém resíduos Gla.

Os domínios Gla estão unicamente presentes nas proteínas dependentes de vitamina K e se ligam ao cálcio, que é importante para o enovelamento correto deste domínio (Mann, 1999).

A trombina, uma vez gerada, ativa plaquetas adicionais e cliva os fibrinopeptídeos transformando fibrinogênio em fibrina que formará com as plaquetas já ativadas no local do dano vascular, um coágulo estável para selar a parede do vaso. O fibrinogênio contém seis cadeias arranjadas como três pares simétricos de cadeias (Figura 5). A clivagem deste pela trombina libera pequenos peptídeos das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ (os fibrinopeptídeos), expondo regiões de cargas opostas que tendem a se polimerizar e formar um gel estável. Este gel de fibrina, inicialmente gerado por interações não-covalentes, é posteriormente estabilizado pela introdução de ligações covalentes entre resíduos específicos de glutamina e lisina, presentes na molécula de fibrina. Esta reação é catalisada pelo FXIIIa, uma transglutaminase que circula no plasma em uma forma precursora (FXIII) que é ativada pela trombina. O resultado final é a formação de um coágulo estável de fibrina (Figura 5).

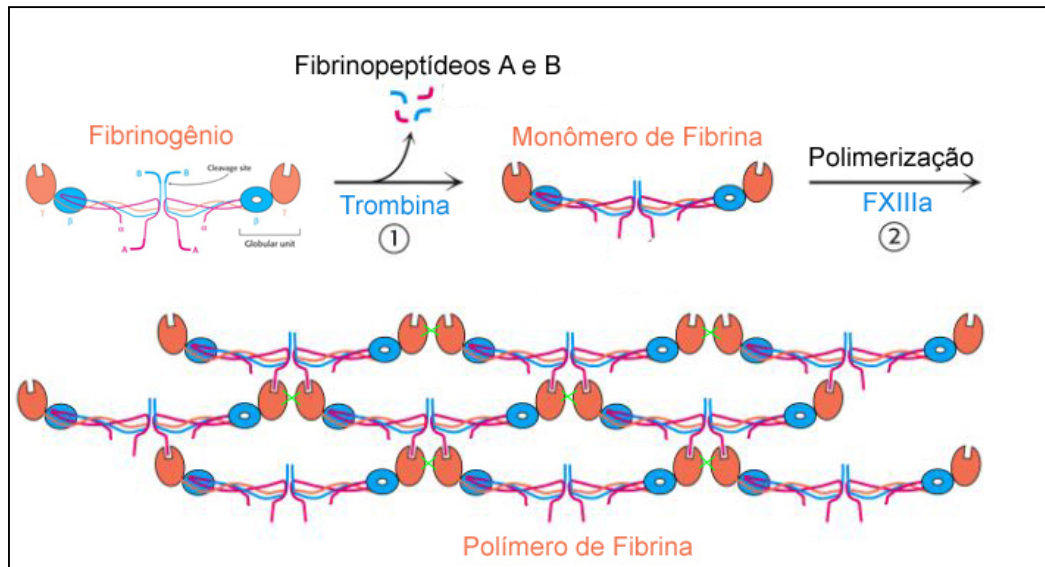


Figura 5 – Formação do polímero de fibrina. A trombina cliva os fibrinopeptídeos A e B da molécula de fibrinogênio, formando os monômeros de fibrina. Esses monômeros se associam por ligações não covalentes entre as cadeias α e β . O FXIIIa catalisa as reações covalentes (linhas verde) entre as cadeias γ dos monômeros de fibrina, formando um polímero de fibrina estável. Figura adaptada de <http://oregonstate.edu/instruction/bb450/stryer/ch10/Slide53.jpg>.

De acordo com o modelo de geração de trombina baseado em células descrito por Roberts, Hoffman e Monroe em 2006, foi demonstrado que uma pequena quantidade de trombina formada pela ativação de TF não é capaz de coagular o fibrinogênio, mas é suficiente para ativar plaquetas e alguns fatores que formam o complexo protrombinase e tenase intrínseco além do FXI. O FXIa serve para impulsionar a geração de FIXa na plaqueta ativada, aumentando a geração de FXa e a subsequente geração de trombina. O FIXa formado na célula que expressa TF não permanece nela, ele irá converter FX em FXa na superfície das plaquetas. Obviamente que na ausência de FXI, os complexos tenase intrínseco e protrombinase irão se formar na superfície das plaquetas, portanto a geração de trombina sempre é possível. Isto explica o porquê de humanos com deficiência no FXI terem

uma tendência suave de sangramento quando comparados a pacientes com deficiência no FVIII e FIX.

1.6 Fase de Terminação e inibidores fisiológicos da coagulação sanguínea

O término da coagulação é atingido por um conjunto de processos que inativa as proteínas dos complexos pró-coagulantes. Neste contexto, os principais inibidores fisiológicos são a antitrombina (AT), o cofator II da heparina (*Heparin Cofactor II* - HCII), a proteína C ativada (*activated protein C* – APC) e o Inibidor da Via do Fator Tecidual (*Tissue Factor Pathway Inhibitor* - TFPI).

A AT, previamente conhecida como antitrombina III, é uma glicoproteína de cerca de 59 kDa, sintetizada no fígado, e que circula no plasma com uma meia-vida de cerca de 72 horas. Esta proteína apresenta uma homologia estrutural de cerca de 50% em sua sequência primária com outros inibidores de serino-proteases da família da α 1-antitripsina (serpinas) e, no plasma, seus principais alvos são a trombina, o FXa e o FIXa (Olson & Björk, 1992). Estas proteases atacam o sítio reativo Arg393-Ser da AT criando um complexo 1:1 estável e enzimaticamente inativo. deficiência da AT determina eventos trombóticos, tanto venosos quanto arteriais, especialmente em pacientes jovens. Esta trombofilia parece ocorrer por diferentes tipos de deficiência: diminuição de concentração e de atividade da AT; diminuição de atividade com concentração normal ou elevada da AT; diminuição de concentração e de atividade adquiridas da AT. A primeira situação é facilmente compreensível. Nesta trombofilia genética, os acidentes trombóticos espontâneos são raros, as trombozes geralmente ocorrem após a segunda década da vida e são subseqüentes a outras condições de risco (infecção, trauma, etc.) Da mesma forma, são comuns oclusões de enxertos arteriais e de fistulas AV para hemodiálise, ocorrência de trombozes “espontâneas”, progressão rápida da

aterosclerose obliterante com trombose precoce, etc. Um dado clínico significativo é a instalação de coágulos precoces nos processos cirúrgicos apesar do uso da heparina, visto que a heparina só pode agir amplamente na presença da AT III. Ressalve-se que mesmo pequenas taxas de AT são suficientes para exercer a função de cofator da heparina. Na segunda situação, presume-se que haja produção hepática de antitrombina III qualitativamente anormal. A diminuição de concentração e de atividade da AT III adquirida ocorre no decurso de doenças hepáticas graves, na síndrome nefrótica, na hipoalbuminemia, na caquexia, na coagulação vascular disseminada, no uso de anovulatórios, nas cirurgias de grande porte entre outros. Mesmo pequenos valores abaixo da taxa normal implicam aumento do risco de trombose. (Duque FLV e col, 2003) Notoriamente, o efeito inibitório da AT é extremamente aumentado na presença de heparina (cerca 3 ordens de magnitude) (Pratt & Church, 1993).

Assim como a AT, o HCII também pertence à família das serpinas. O HCII é uma proteína sintetizada no fígado, com cerca de 66 kDa, e apresentando uma meia-vida de cerca de 60 horas no plasma. Diferentemente da AT, o efeito inibitório do HCII é específico para a trombina, que ataca o sítio reativo Leu444-Ser no inibidor formando um complexo 1:1 estável e enzimaticamente inativo, sendo este fenômeno extremamente potencializado pela heparina ou pelo dermatan sulfato (Tollefsen, 1995).

A via da proteína C é uma importante via inibitória, na qual esta se liga ao complexo trombomodulina-trombina no endotélio vascular, e é convertida pela trombina em uma protease ativa - APC (Esmon, 2000). Após sua ativação, a APC se desprende do complexo trombomodulina-trombina e se liga ao seu cofator protéico, proteína S, na superfície de plaquetas ativadas. O complexo formado por APC e proteína S inativa o fator Va por

proteólise específica, inibindo a ação do complexo protrombinase (Esmon, 2000). De forma semelhante, o complexo APC-proteína S inativa o complexo tenase intrínseco, através da clivagem do fator VIIIa (Dahlbäck, 2005). A proteína C é uma protease sérica, vitamina K-dependente, e com atividade potencializada pela proteína S. Além da ação limitante da via intrínseca da coagulação, a proteína C age como auxiliar no sistema fibrinolítico ao efetuar a lise da substância [PAI-1], que bloqueia o ativador tecidual do plasminogênio.

A deficiência congênita ou adquirida de proteína C está associada a eventos trombóticos. A deficiência congênita da forma homozigótica é incompatível com a vida. Quando a redução do nível da proteína C gira em torno de cinquenta por cento (ou seja, nos pacientes heterozigóticos), geralmente ela propicia a instalação da trombose a partir da segunda ou terceira décadas de vida por ocasião de traumas, cirurgias, etc. Recentemente, foi constatado que os acidentes tromboembólicos são mais comuns quando há resistência à proteína C ativada do que quando há diminuição da taxa total da proteína C. (Duque FLV e col, 2003)

Em condições fisiológicas, a atividade do complexo tenase extrínseco dura não mais que alguns minutos em decorrência da regulação exercida pelo TFPI. Esta proteína apresenta entre 34 e 43 kDa e encontra-se em pequenas quantidades no sangue (2,5 nM). Sua estrutura, contendo três domínios do tipo *Kunitz*, permite um mecanismo de ação bastante singular (Figura 6): seu segundo domínio *Kunitz* se liga ao sítio catalítico do FXa e o complexo binário formado interage com o complexo TF-FVIIa, onde o primeiro domínio *Kunitz* do TFPI interage diretamente com o sítio catalítico do FVIIa. O resultado final é a formação de um complexo quaternário onde o FXa e o FVIIa encontram-se inativados (Broze, 1995; Bajaj e col, 2001).

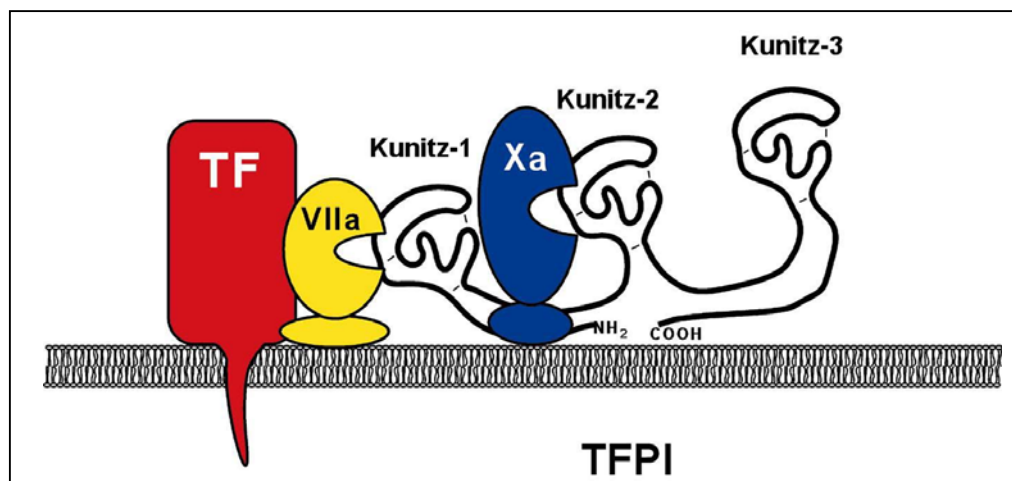
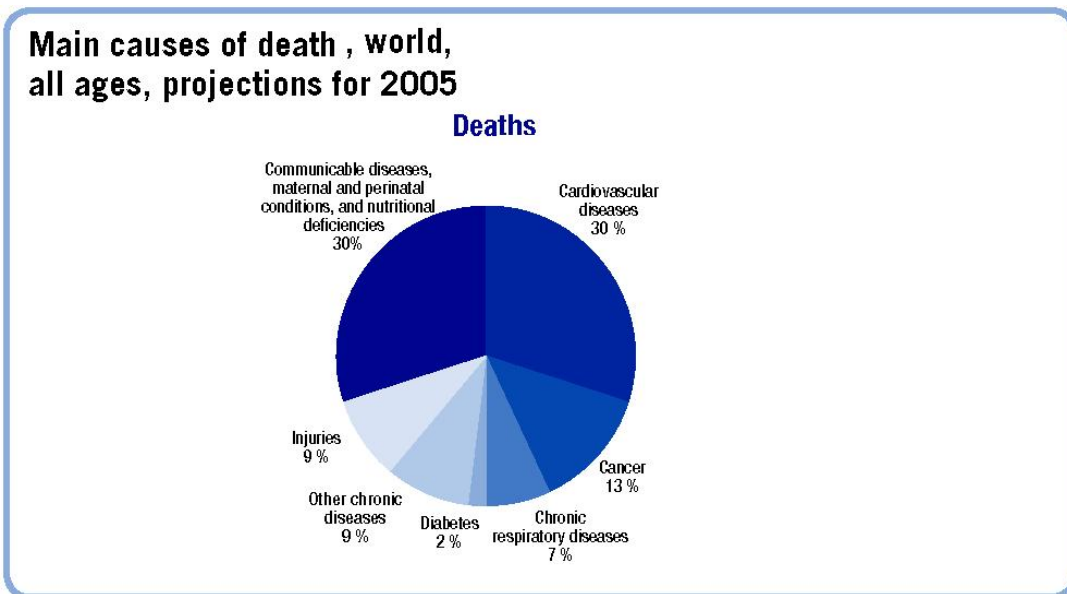


Figura 6 – Mecanismo de inibição pelo TFPI. O complexo TF-FVIIa é inativado pela ligação do complexo FXa-TFPI ao complexo TF-FVIIa, eliminando a geração de FIXa e FXa. O efeito resultante é que a geração de FXa passa a ser catalisada pelo complexo tenase intrínseco. Adaptado de “Coagulation Explosion”, Vermont Business Graphics, Mann KG, 1997.

1.7 Aspectos gerais acerca da trombose

Diversos estados patológicos como diabetes, aterosclerose, sepse e câncer podem conduzir à formação de tampões hemostáticos (trombos) de uma forma inespecífica e prejudicial ao organismo. De fato, os eventos tromboembólicos constituem a segunda maior causa de morte natural no mundo em 2005 (Figura 7). Este tipo de doença se mostra associado a mecanismos de isquemia por obstrução do fluxo sanguíneo evidenciados em patologias como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico, tromboembolismo pulmonar ou ainda coagulopatias relacionadas ao câncer que podem se desenvolver principalmente sob a forma de trombose venosa profunda – também associada ao aumento da mortalidade no pós-operatório de algumas cirurgias, nos campos da ortopedia, neurocirurgia e outras cirurgias de grande porte (Weitz & Hirsh, 2001; Rickes & Levine, 2001).



(Source: WHO, 2005⁶)

Figura 7 – Distribuição percentual de causas de morte no mundo de acordo com a OMS em 2005. Notamos que o índice de mortes relacionadas às doenças cardiovasculares e por conseguinte a eventos trombo-embólicos ocupam o segundo lugar. Figura adaptada de <http://www.who.int/whosis/whostat2006highlights/en/index4.html>

As causas predisponentes à trombose venosa profunda foram descritas por Virchow em 1856. Atualmente sugere-se que a trombose seja conseqüência de mudanças indesejáveis na função celular do endotélio vascular (que Virchow denominava de lesão vascular) desequilíbrio no sistema pró- e/ou anticoagulante (denominado por Virchow como modificação na composição do sangue) ou decorrente de fenômenos que levam à ativação plaquetária (Blan & Lip, 2001). Alguns fatores de risco como tabagismo, atividade de doenças como câncer e diabetes mellitus, além de imobilização e uso de anticoncepcionais orais configuram situações intimamente relacionadas a eventos trombóticos, sendo estes dois últimos os de maior incidência. (Duque FLV e col, 2003)

Dada a enorme importância dos processos patológicos tromboembólicos, o seu tratamento constitui um importante setor da indústria farmacêutica. Atualmente a heparina e os anticoagulantes orais – fármacos cujo principal exemplo é a warfarina – são os mais amplamente utilizados (Weitz & Hirsh, 2001). Todavia, o grande risco de efeitos colaterais – principalmente a hemorragia – observado com estas substâncias, torna a procura por drogas mais seguras um desafio na medicina cardiovascular (Gresele & Agnelli, 2002).

1.8 Inibidores exógenos da coagulação

Uma das principais fontes de novas moléculas anti-hemostáticas com potencial aplicação no tratamento de eventos pró-trombóticos são os organismos hematófagos (Law e col., 1992; Ribeiro & Francischetti, 2003) . Uma série de inibidores atuando em diferentes pontos do processo de coagulação tem sido caracterizados nas últimas décadas, dentre os quais podemos destacar a hirudina, um inibidor extremamente potente e específico da trombina, que foi isolado originalmente da sanguessuga *Hirudo medicinalis* (Stone & Maraganore, 1992) e o NAPc2 (*Nematode Anticoagulant Peptide C2*), capaz de interagir com o complexo TF-FVIIa através de um mecanismo de ação similar ao TFPI (Lee & Vlasuk, 2003). Estas duas moléculas já tem sido empregadas em diversos testes clínicos com humanos.

Em 2002, Francischetti e col., descreveram a expressão e a caracterização de um novo análogo do TFPI, denominado Ixolaris, obtido do carrapato *Ixodes scapularis* por técnicas de biologia molecular. O sequenciamento maciço de uma biblioteca de cDNA construída a partir de glândulas salivares deste carrapato revelou uma seqüência homóloga ao TFPI humano, utilizando ferramentas específicas de bioinformática (Francischetti e col., 2002). Esta seqüência permitiu então a expressão de uma proteína de cerca de 17 kDa com

potente atividade sobre o complexo tenase extrínseco. A análise da seqüência primária desta proteína demonstrou que a mesma é formada por dois domínios *Kunitz* (Figura 7). Ensaaios funcionais revelaram que o seu mecanismo de ação é muito similar ao TFPI: o Ixolaris se liga ao FXa e posteriormente forma um complexo quaternário com o TF e FVIIa, resultando na inativação do complexo tenase extrínseco (Francischetti e col., 2002). Diferentemente do TFPI, porém, o Ixolaris não inibe o sítio catalítico do FXa. De fato estudos posteriores demonstraram que o Ixolaris interage com uma região do FXa denominada exossítio de ligação à heparina (Monteiro e col, 2005). O exossítio de ligação à heparina do FXa é uma região formada por sete resíduos carregados positivamente (Rezaie, 2000a; Rezaie 2000b). Interessantemente, esta região é análoga ao exossítio de ligação à heparina da trombina, também conhecida como exossítio 2 da trombina (Sheehan & Sadler, 1994).

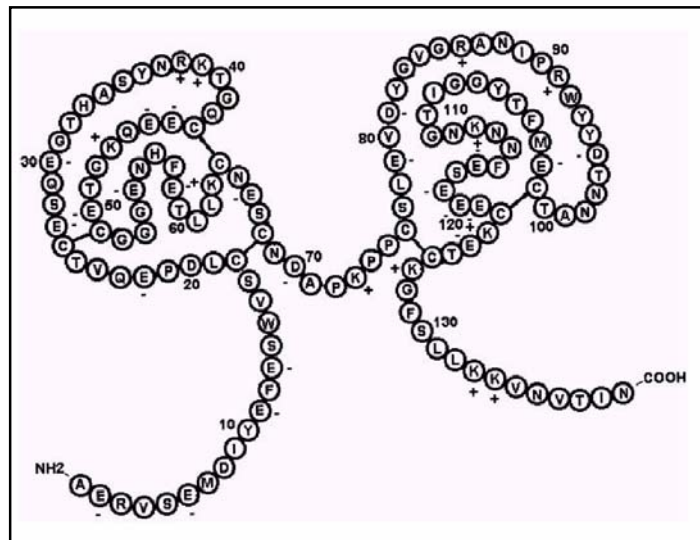


Figura 8 – Estrutura secundária do Ixolaris. A molécula é composta por dois domínios do tipo *Kunitz*. Retirado de Francischetti e col., 2002.

Interessantemente, a interação do Ixolaris com o FXa embora não afete o sítio catalítico da enzima, inibe significativamente o reconhecimento do seu substrato macromolecular, a protrombina (Monteiro e col., 2005; Monteiro, 2005). Desta forma, além de ser um potente inibidor do complexo tenase extrínseco, o Ixolaris também é capaz de inibir o complexo protrombinase.

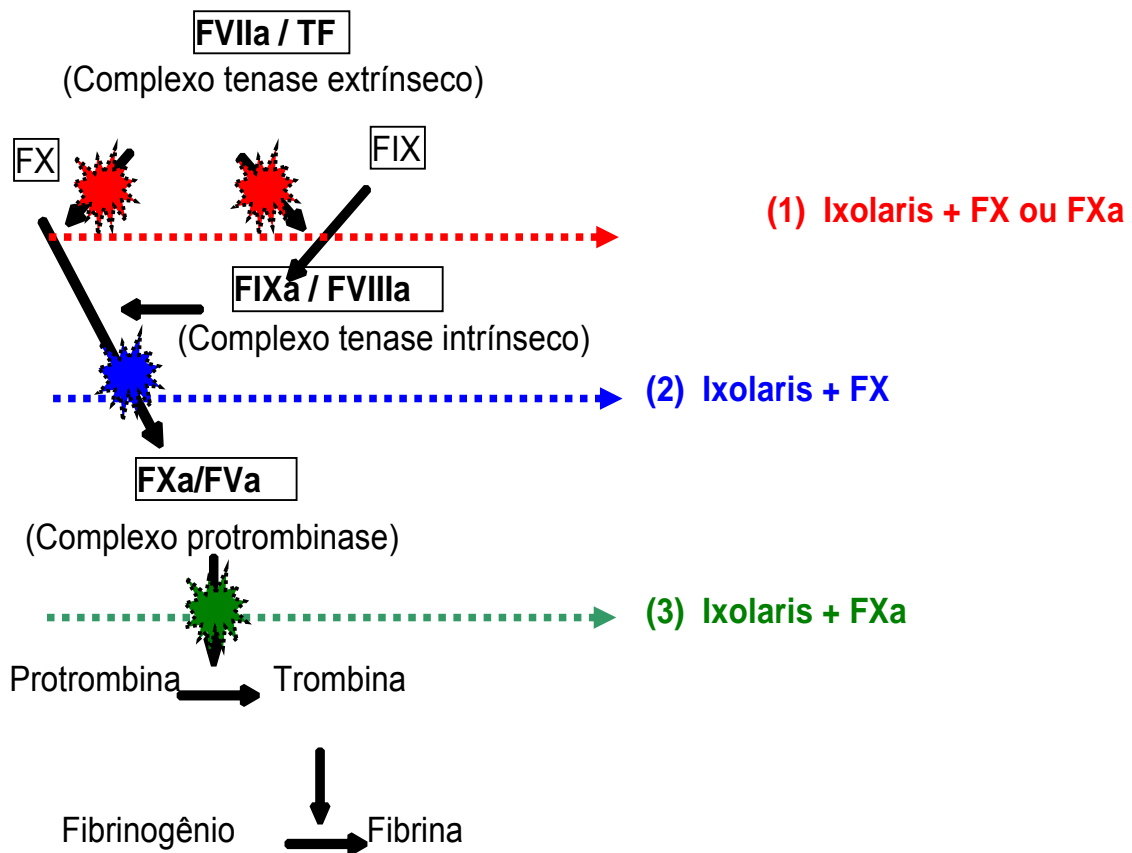


Figura 9 – Mecanismo de ação do Ixolaris. A molécula ao se ligar ao FX ou FXa forma um complexo binário que inativa o complexo tenase extrínseco (1), reduzindo a ativação dos FX e FIX. A ligação do Ixolaris ao FX também reduz a ativação do zimogênio pelo complexo tenase intrínseco (2) e por fim, a interação do Ixolaris com o FXa reduz a atividade do complexo protrombinase, reduzindo a formação de trombina (3).

Outra diferença marcante entre o Ixolaris e o TFPI é capacidade do primeiro interagir com alta afinidade com o FX (Francischetti e col., 2002). De fato a formação do complexo binário Ixolaris-FX também é capaz de interagir com o complexo TF-FVIIa, inativando este último. Interessantemente, a formação do complexo FX-Ixolaris inibe a conversão do zimogênio em FXa pelo complexo tenase intrínseco (Monteiro e col., 2007), indicando que na realidade o Ixolaris apresenta um terceiro mecanismo de ação anticoagulante.

Visto que os mecanismos de ação inibitória sobre os complexos da coagulação sanguínea pelo Ixolaris estão bem estabelecidos, o próximo passo na caracterização desta molécula seria determinar sua ação *in vivo*. Desta forma nossa proposta de estudo foi avaliar o potencial antitrombótico do Ixolaris em um modelo *in vivo* de trombose venosa em ratos.

2. Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

- Esta tese teve como objetivo central avaliar o efeito *in vivo* do Ixolaris, um potente inibidor *in vitro* dos complexos pró-coagulantes, sobre a trombose.

2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial anticoagulante do Ixolaris sobre as vias intrínseca e extrínseca da coagulação sanguínea.
- Determinar o efeito antitrombotico do Ixolaris utilizando um modelo *in vivo* de trombose venosa em ratos.
- Estimar a meia-vida do Ixolaris no modelo animal escolhido.
- Avaliar o a capacidade do Ixolaris em promover eventos hemorrágicos, importante efeito colateral dos antitrombóticos.

3. Materiais e Métodos

3.1 - Materiais

O FX humano foi adquirido através da empresa Heamatologic Technologies (Essex Junction, VT, EUA). Os reagentes para a determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) (cefalina mais caolim) e do tempo de protrombina (PT) (tromboplastina com cálcio) foram obtidos junto à empresa bioMérieux (Rio de Janeiro, Brasil). Os anestésicos Anasedan (Xilazina) e Dopalen (Ketamina) foram adquiridos da Agribands (Rio de Janeiro, Brasil). Os marcadores de peso molecular foram comprados da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

3.2 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar (de ambos os sexos) pesando entre 200 e 250 g, abrigados sob temperatura ($24 \pm 1^\circ \text{C}$) e luz (12 h de luz começando às 7:00) controladas. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas de utilização de animais estabelecidas pelo Comitê Institucional do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.3 - Expressão e purificação do Ixolaris

O Ixolaris recombinante foi expresso em células High Five, utilizando o sistema de expressão em Baculovirus (Invitrogen, San Diego, CA, EUA), conforme descrito por Francischetti e col. (2002). O meio de cultura contendo a proteína recombinante foi aplicado em uma coluna de afinidade FX acoplado à resina Sepharose 4B (Calbiochem, EUA) montada conforme instruções do fabricante, previamente equilibrada em Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5.

Após a incorporação a coluna foi extensivamente lavada com o mesmo tampão e em seguida incubada com uma solução de HCl 0,01 N, 1,0 M NaCl, pH 2,0 por 15 min. O material eluído foi concentrado e dialisado *overnight* contra Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. A pureza do material obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

O Ixolaris foi marcado com ^{125}I (^{125}I -Ixolaris) foi preparado através de iodização com iodeto de sódio [^{125}I] (CNEN, São Paulo, Brasil) na proporção de 200 μCi por mg de proteína usando o reagente Iodogen (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) (100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), seguindo as instruções do fabricante. O iodeto livre foi retirado através de uma diálise *overnight* contra Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5.

3.4 - Efeito anticoagulante *in vitro* do Ixolaris – avaliação sobre o aPTT e o PT

O efeito *in vitro* do Ixolaris nos testes de coagulação aPTT e PT foram realizados utilizando-se um coagulômetro Amelung KC4A (Labcon, Heppenheim, Alemanha). Amostras de sangue humano foram recolhidas de doadores saudáveis em citrato trisódico 3,8% (9:1, v/v) e o plasma pobre em plaquetas foi obtido através de centrifugação a 2.000 x g por 10 minutos. Amostras do plasma de ratos foram obtidas através do mesmo processo. O plasma (50 μl) foi incubado com Ixolaris (10 μl) por 2 minutos a 37° C. Em seguida, o reagente de aPTT foi adicionado (50 μl , 1 minuto) e, logo depois, 25 mM de CaCl_2 (100 μl) ou o reagente de PT (100 μl). O tempo de formação do coágulo foi, então, registrado no equipamento.

3.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi realizada sob condições não desnaturantes. O Ixolaris marcado com ^{125}I ($4,0 \times 10^4$ cpm em 320 ng de proteína) e o FX purificado (4,5 μg) ou o plasma de humanos ou ratos foram incubados em temperatura ambiente por 15 minutos e depois submetidos ao PAGE (10% de acrilamida). O gel, então, foi exposto ao phosphorimaging (Storm, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

3.6 - Modelo de trombose venosa induzida por estase e administração de tromboplastina tecidual.

O modelo de trombose animal utilizado nesta tese baseia-se na formação de trombos venosos através de uma combinação de estase e hipercoagulabilidade, conforme descrito por Vogel e col. (1989) com pequenas modificações (Farias e col., 2001). Ratos Wistar foram anestesiados com xilazina (16 mg/kg, via intramuscular) seguida de ketamina (100 mg/kg, via intramuscular). O abdome foi aberto cirurgicamente e, após a dissecação da veia cava inferior, exposto e separado dos outros tecidos. Duas ligaduras livres foram colocadas a 1 cm de distância entre si no vaso dissecado, logo abaixo da veia renal direita com ligadura da veia renal esquerda que termina no segmento da cava entre as duas ligaduras livres. Diferentes doses de Ixolaris foram administradas por via i.v. (abaixo do local da ligadura distal livre da cava inferior) ou por via s.c. em momentos diferentes anteriormente à indução da trombose. A tromboplastina tecidual (3 mg/kg do peso corporal) foi injetada na veia cava, e a estase foi imediatamente estabelecida com a ligadura proximal. A ligadura distal foi realizada durante 20 minutos após a administração da tromboplastina. Logo depois o segmento ligado foi removido.

O trombo formado foi removido do segmento, lavado, colocado em papel filtro, seco durante uma hora, a 60° C, e pesado.

3.7 - Determinação da meia-vida plasmática do ¹²⁵I-Ixolaris

A distribuição *in vivo* do Ixolaris marcado com ¹²⁵I no sangue dos ratos foi realizada após a administração s.c. da proteína. Amostras contendo ~5,5 x 10⁶ cpm (4 µg de Ixolaris) foram ressuspensas em 200 µl de tampão de fosfato-salina (PBS) e administrada por via s.c. O sangue foi coletado após 3, 20, 40 ou 60 horas por punção cardíaca e anticoagulado com EDTA (5 mM, concentração final). O plasma pobre em plaquetas foi obtido através de centrifugação e alíquotas de 500 µl foram colocadas em tubos de ensaio de vidro. A radioatividade foi determinada através de um contador gama (LKB, Wallac, Finlândia).

3.8 - Efeito ex-vivo do Ixolaris sobre o aPTT e o PT

O efeito do Ixolaris nos testes de coagulação aPTT e PT foi avaliado através de um coagulômetro Amelung KC4A (Labcon). O Ixolaris foi administrado por via s.c. nos ratos e, após 24 h, o sangue foi coletado através de punção cardíaca utilizando citrato trisódico a 3,8% (9:1, v/v) como anticoagulante. O plasma pobre em plaquetas foi obtido através de centrifugação a 2.000 x g por 10 minutos. O plasma (50 µl) foi incubado por 1 minuto a 37° C. Seguiu-se a adição do reagente de aPTT (50 µl, 1 min) e, posteriormente, 25 mM de CaCl₂ (100 µl) ou reagente de PT (100 µl). O tempo de formação do coágulo foi, então, registrado no equipamento.

3.9 - Efeito do Ixolaris sobre o sangramento induzido

Um modelo de secção da cauda do rato foi utilizado para analisar o efeito do Ixolaris sobre o sangramento induzido. O Ixolaris foi administrado por via s.c. e os animais foram anestesiados após um período de 3 ou 24 horas – tal qual descrito acima. A cauda do rato foi cortada a 3 mm da ponta e cuidadosamente imersa em 40 ml de água destilada à temperatura ambiente. A hemoglobina, dissolvida na água, medida por absorbância à 540 nm, foi usada para estimar a perda de sangue, conforme descrito por Herbert e col. (1996). Controles adequados foram realizados em paralelo, por meio de administração s.c. de PBS.

3.10 - Estatística

Todos os dados apresentados representam o erro \pm desvio padrão. As diferenças entre as médias foram analisadas usando o teste T de Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

Inicialmente foi avaliado o efeito anticoagulante do Ixolaris sobre o plasma humano, utilizando os ensaios de PT e aPTT que avaliam as vias extrínseca e intrínseca, respectivamente. Como demonstrado na Figura 10A, o Ixolaris provocou um aumento dose-dependente tanto no PT quanto no aPTT. No entanto é possível verificar que o efeito inibitório é mais pronunciado sobre a via extrínseca. Isso não foi de todo inesperado, visto que observações realizadas anteriormente (Francischetti e col., 2002), utilizando proteínas purificadas, mostraram que o Ixolaris é um inibidor potente do complexo tenase extrínseco (TF-FVIIa).

Em seguida foram avaliadas as propriedades anticoagulantes do Ixolaris no plasma de rato. A Figura 10B mostra o padrão de inibição em relação ao PT e ao aPTT. De forma similar ao que foi visto com o plasma humano, o Ixolaris aumentou os tempos de coagulação de forma dose-dependente. Contudo, as concentrações de Ixolaris superiores a 0,75 µg/ml aparentemente produziram uma maior efeito em ambos os testes de coagulação – com um aumento mais pronunciado no PT.

O Ixolaris forma um complexo com o FX, como previamente demonstrado por PAGE não-desnaturante (Francischetti e col., 2002). Para tentar detectar a ligação do Ixolaris ao FX no plasma, usamos o Ixolaris marcado com iodo radioativo (^{125}I), seguido de identificação da formação do complexo em PAGE não-desnaturante. A Figura 11 mostra os padrões de migração eletroforética identificados neste ensaio. A *lane* 1 corresponde à migração do Ixolaris sozinho. Como visto na *lane* 2, a incubação de Ixolaris com FX purificado resultou na formação de uma banda com padrão de migração mais lento, consistente com a formação do complexo Ixolaris-FX. De forma similar, a incubação do ^{125}I -Ixolaris com o plasma humano (*lane* 3) ou de rato (*lane* 4) produziu bandas com padrão de migração similar ao observado para na *lane* 2, indicando a formação do complexo Ixolaris-FX no plasma.

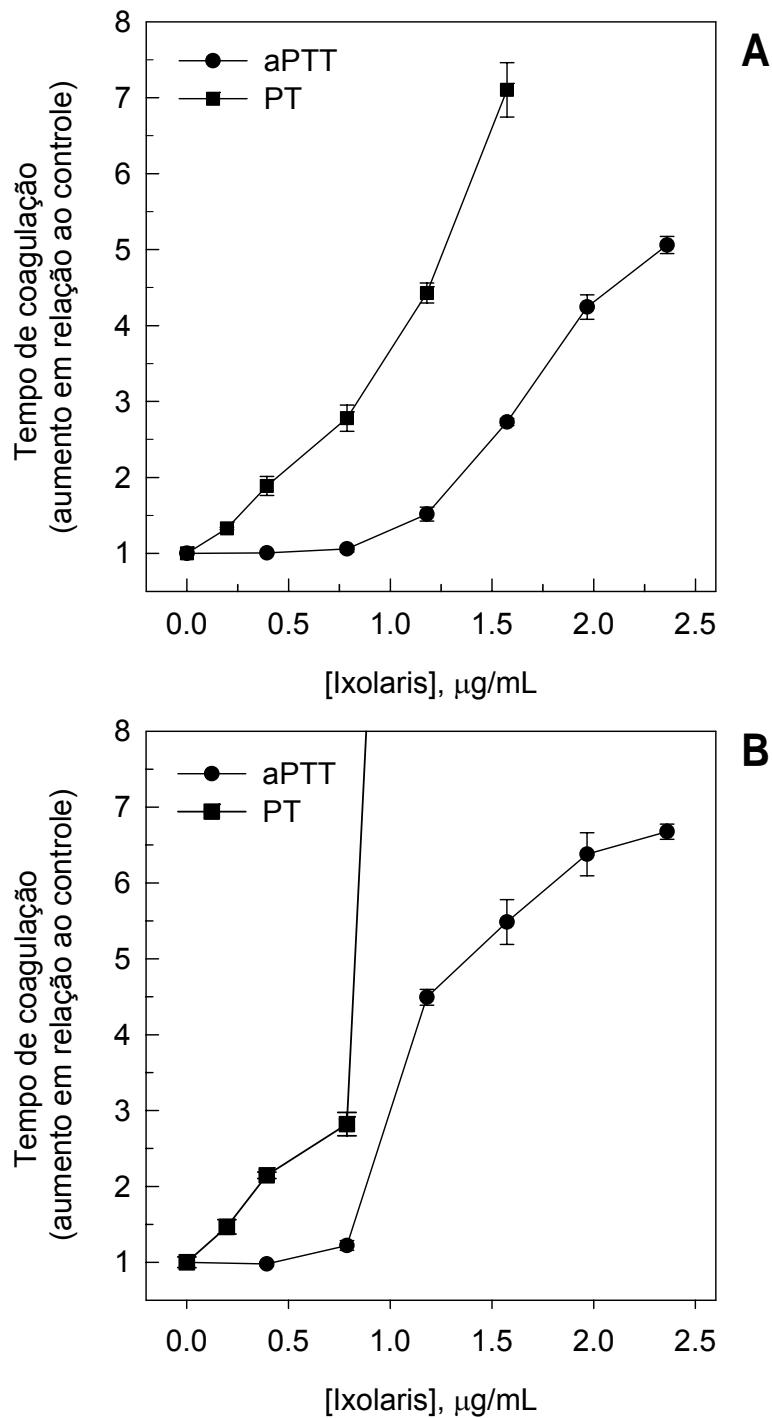


Figura 10: Atividade anticoagulante *in vitro* do Ixolaris.

O Ixolaris (nas doses indicadas) foi incubado com plasma citratado humano (A) ou de rato (B) por dois minutos. Os testes de coagulação aPTT (●) e PT (■) foram determinados conforme descrição presente nos *Materiais e Métodos*. Cada ponto representa média \pm desvio padrão de três determinações distintas.

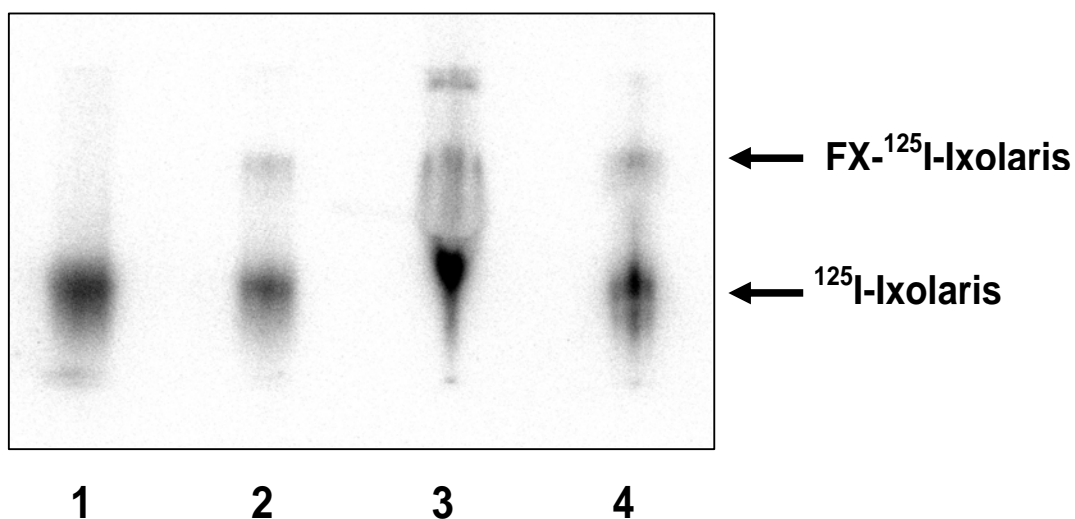


Figura 11: Detecção dos complexos de FX e ^{125}I -Ixolaris por PAGE não-desnaturante.

Amostras de ^{125}I -Ixolaris foram incubadas com e FX purificado ou plasma humano, ou plasma de rato à temperatura ambiente por 15 minutos e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) em condições não-desnaturantes. Os géis foram posteriormente expostos ao Phosphorimaging. *Lane 1*: 10 μL de Ixolaris marcado com ^{125}I (4×10^4 cpm). *Lane 2*: 10 μL de Ixolaris marcado com ^{125}I (4×10^4 cpm) + 10 μL de FX humano (10 μM). *Lane 3*: 10 μL de Ixolaris marcado com ^{125}I (4×10^4 cpm) + 20 μL de plasma humano. *Lane 4*: 10 μL de Ixolaris marcado com ^{125}I (4×10^4 cpm) + 20 μL de plasma de rato. As setas estão indicando as bandas correspondentes ao ^{125}I -Ixolaris livre ou o complexo ^{125}I -Ixolaris-FX.

Para determinar se o Ixolaris apresentava efeito antitrombótico *in vivo*, utilizamos um modelo de trombose induzida em ratos que combina estase e hipercoagulabilidade (ver *Materiais e Métodos*). O grupo controle, que recebeu PBS e em seguida tromboplastina tecidual (3 mg/kg), demonstrou 100% de formação de trombos, sendo que o peso médio do trombo foi de $5,1 \pm 0,26$ mg ($n=4$). A administração i.v. do Ixolaris, em contraste, provocou uma diminuição progressiva no peso dos trombos, sendo que o efeito máximo foi observado a 10 µg/kg (Fig. 12).

Em seguida, o efeito antitrombótico do Ixolaris foi testado após a administração s.c. A Figura 13A mostra que o Ixolaris teve uma ação muito eficiente na redução da trombose venosa através da via s.c., sendo que a inibição completa foi obtida com 20 µg/kg de Ixolaris. Também analisamos a dependência temporal da atividade antitrombótica do Ixolaris. A Figura 13B mostra que o Ixolaris (20 µg/kg) inibiu totalmente a formação de trombos 3 h após a administração s.c. O efeito durou por 24 h e a partir de então foi progressivamente perdido. Para confirmar a duração da meia-vida do ixolaris *in vivo*, uma estimativa semi-quantitativa da farmacocinética do Ixolaris foi realizada através da administração de ^{125}I -Ixolaris e sua posterior detecção no plasma. A Figura 14 mostra que a concentração do ^{125}I - Ixolaris no plasma atingiu o ponto máximo após 3 h de administração s.c. e estava a 40% de seu valor máximo 20 h após a sua administração. Esta observação confirmou os dados de atividade antitrombótica, indicando uma meia-vida longa desta proteína no plasma.

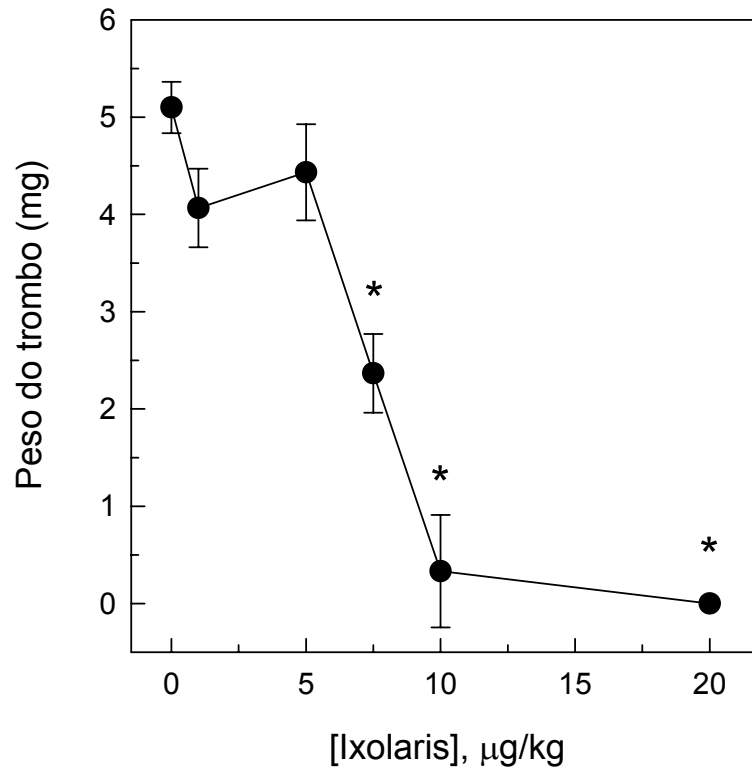


Figura 12: Efeitos do Ixolaris no modelo de trombose venosa induzida em ratos.

O Ixolaris – nas doses de 1; 5; 7,5; 10 e 20 µg/Kg – foi administrado i.v. 15 minutos antes da indução de trombose por tromboplastina (3 mg/kg) e estase, tal qual descrito na seção *Materiais e Métodos*. O grupo controle recebeu PBS ao invés de Ixolaris. Cada ponto representa media \pm desvio padrão dos resultados obtidos com três a cinco animais. Os asteriscos indicam os pontos com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com os valores detectados nos animais controle, na ausência de Ixolaris. (n= 3 a 5 animais)

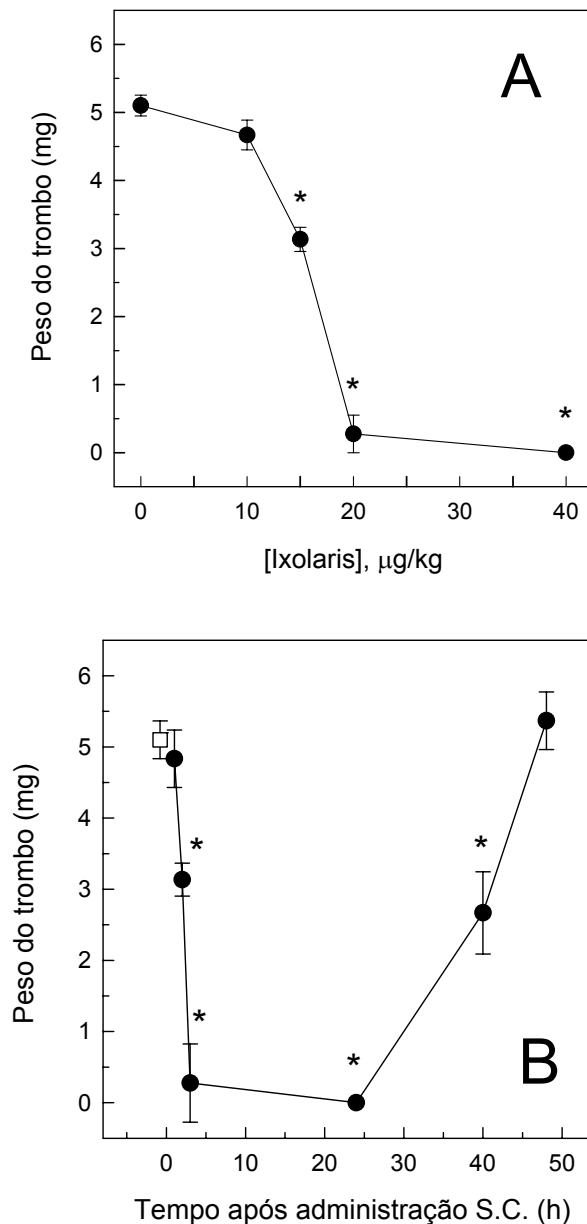


Figura 13: Efeito do Ixolaris na trombose venosa após administração s.c.

A) Efeito dose-dependente do ixolaris da trombose venosa após administração s.c. O efeito antitrombótico do ixolaris das doses de 10 a 40 µg/kg foi medido 3 h após da administração da droga. B) Efeito tempo-dependente do ixolaris após a administração s.c. O Ixolaris (20 µg/kg) foi administrado s.c. em animais, e a trombose foi induzida após 1, 3, 24, 40 e 48 h . O grupo controle (□) recebeu PBS ao invés de Ixolaris. Cada ponto representa media ± desvio padrão dos resultados obtidos com três a cinco animais. Os asteriscos indicam os pontos com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com os valores detectados nos animais controle, na ausência de Ixolaris.

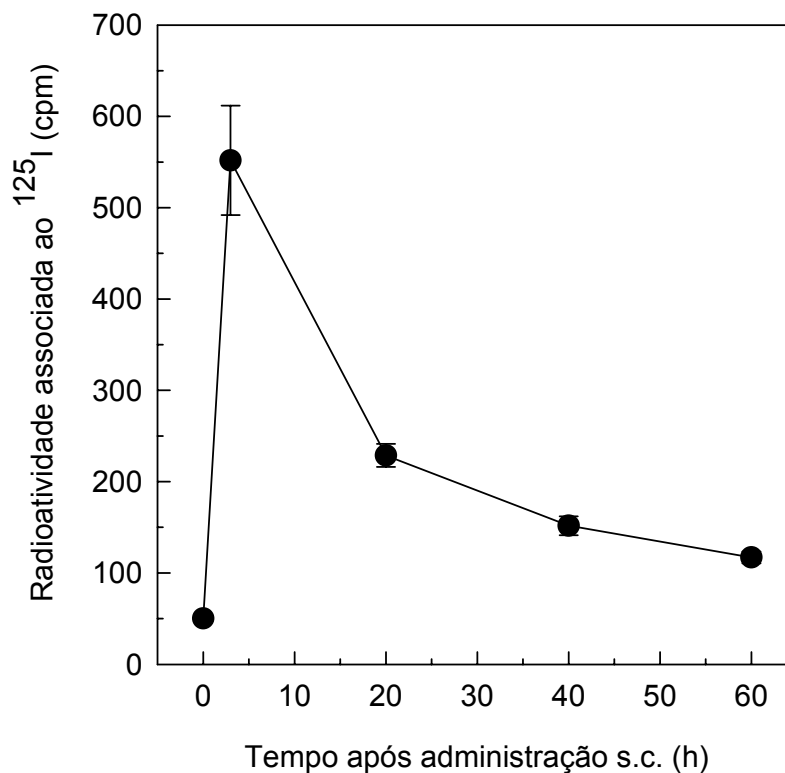


Figura 14: Estimativa da meia-vida plasmática do ^{125}I -Ixolaris.

Após a administração s.c de ^{125}I -Ixolaris, as amostras de sangue foram retiradas através de punção cardíaca e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Aliquotas de 500 μL de plasma foram separadas após a centrifugação do sangue. A radioatividade do plasma foi medida em um contador gama em diferentes tempos (3, 20, 40 e 60 h). (n=3 a 5 animais)

Os efeitos do Ixolaris em estudos de coagulação *ex vivo* foram, então, avaliados. A Figura 15A mostra que o aPTT não foi afetado após a administração s.c. de 40 ou 100 µg/kg de Ixolaris. Por outro lado, os valores de PT foram estatisticamente mais altos do que os do controle nas doses de Ixolaris mais altas do que 20 µg/kg, mostrando um aumento de 0,4 vezes com uma dose de 100 µg/kg (Figura 15B).

Finalmente, o efeito do Ixolaris no sangramento induzido foi medido através de um modelo de secção da cauda do animal (Fig. 16). Este ensaio permite avaliar a capacidade do antitrombótico em potencializar um processo hemorrágico. Nenhum sangramento significativo foi observado após 3 ou 24 h da administração de 20 µg/kg Ixolaris. Por outro lado, um sangramento estatisticamente significativo foi observado 24 h após a administração de 40 µg/kg de Ixolaris.

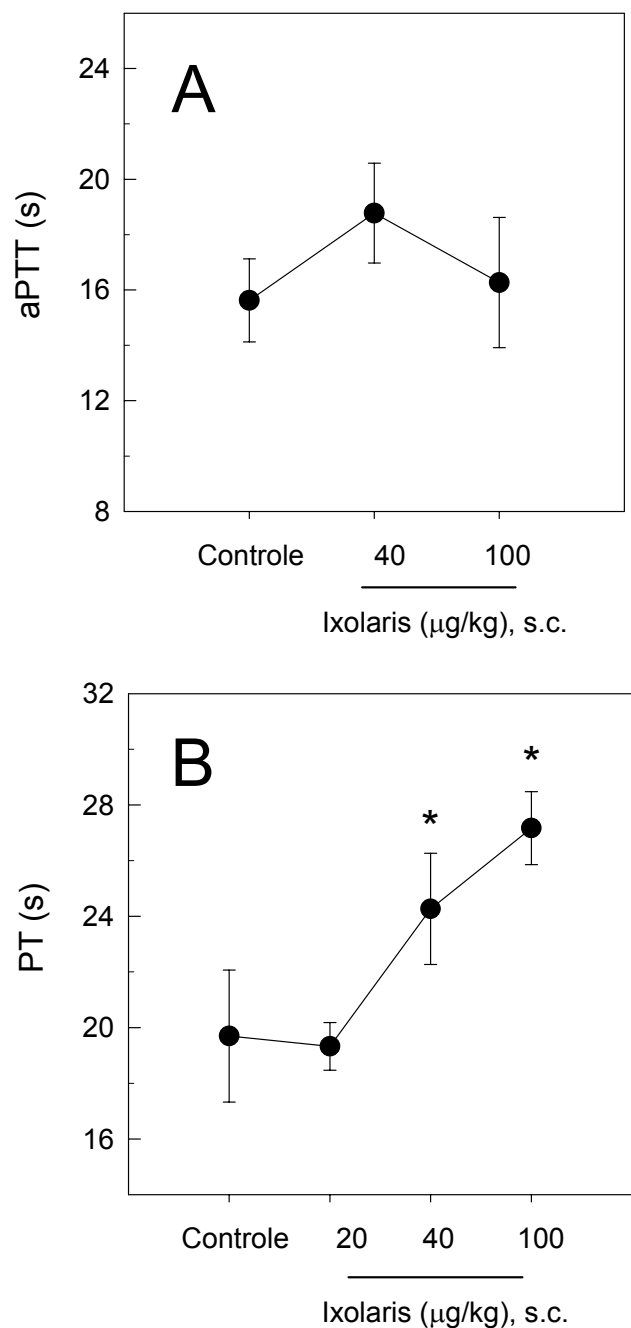


Figura 15: Atividade anticoagulante ex vivo do Ixolaris.

O Ixolaris – nas doses de 20 a 100 µg/kg – foi administrado s.c. nos animais; após 24 h, o sangue foi coletado, e obteve-se o plasma pobre em plaquetas. Os testes de coagulação aPTT (A) e PT (B) foram medidos como descrito na seção *Materiais e Métodos*. Cada ponto representa média ± desvio padrão dos resultados obtidos com quatro a cinco animais. Os asteriscos indicam os pontos com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com os valores detectados nos animais controle, na ausência de Ixolaris.

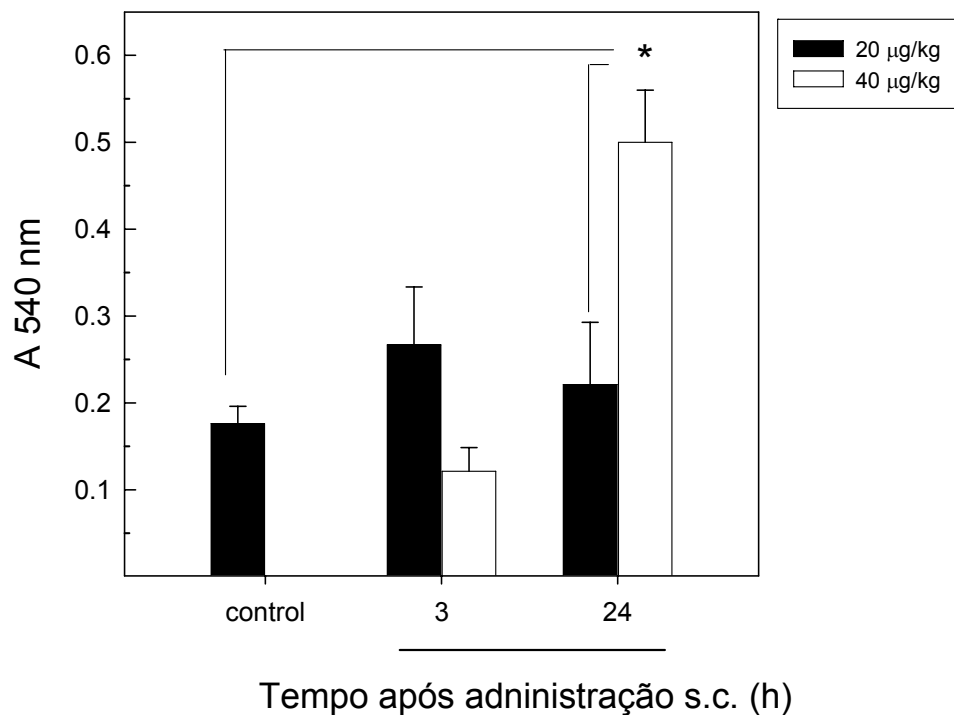


Figura 16: Efeito do Ixolaris no sangramento induzido.

O Ixolaris – nas doses de 20 µg/kg (barra escuras) e 40 µg/kg (barras brancas) – foi administrado s.c. Após um período de 3 ou 24 h a administração, a cauda do rato foi cortada a uma distância de 3 mm a partir da ponta. Esta foi cuidadosamente imersa em 40 ml de água destilada à temperatura ambiente. A perda de sangue (conteúdo de hemoglobina) foi estimada por leitura a 540 nm após 60 minutos. Cada ponto representa media ± desvio padrão dos resultados obtidos com três a cinco animais. Os asteriscos indicam os pontos com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado com os valores detectados nos animais controle, na ausência de Ixolaris.

5. Discussão

O Ixolaris é uma proteína que foi identificada na glândula salivária do carrapato *Ixodes scapularis* através de técnicas de biologia molecular (Francischetti e col., 2002). A análise de sua estrutura primária demonstrou uma grande homologia com o inibidor fisiológico TFPI – uma proteína contendo três domínios *Kunitz* cujo alvo principal é o complexo tenase extrínseco (TF-FVIIa) (Broze, 1995; Bajaj e col, 2001). Diferentemente do TFPI, o Ixolaris possui somente dois domínios *Kunitz*, embora tenha sido previamente caracterizado como um potente inibidor do complexo tenase extrínseco, apresentando um mecanismo de ação muito similar ao inibidor fisiológico (Francischetti e col., 2002). No entanto, apesar do Ixolaris apresentar extensa homologia primária com o TFPI, ele não se liga ao sítio catalítico do FXa. De fato, a formação do complexo é mediada por determinados resíduos carregados positivamente da superfície do FXa (Monteiro e col., 2005; Monteiro, 2005), que constituem uma região na enzima denominada exossítio de ligação à heparina (Rezaie, 2000a; Rezaie, 2000b). Outra diferença marcante entre o Ixolaris e o TFPI é a capacidade do primeiro formar um complexo com o zimogênio FX. Esta interação é de alta afinidade (Monteiro e col., 2007) e também resulta num complexo binário capaz de se ligar ao complexo TF-FVIIa (Francischetti e col., 2002)

Vários estudos têm reportado o grande potencial e aplicabilidade terapêutica do TFPI na sepse, especialmente em modelos animais e em humanos. Todavia, a maioria dos trabalhos mostra que a eficácia do TFPI se deve principalmente a sua ação sobre a trombose no leito microvascular - evento precoce e que determina a falência de órgãos vitais no caso da sepse grave. No entanto, sabe-se que o efeito sobre a atividade inflamatória independente da coagulação mediada por TF é pouco expressivo no caso do TFPI em situações de inflamação sistêmica (Opal e col, 2001; Abrahan e col 2003). Alguns ensaios preliminares de avaliação

da atividade do Ixolaris sobre a sepse induzida em camundongos (utilizando o modelo de ligadura e punção cecal) foram realizados e revelaram uma piora da sobrevida do grupo tratado em relação ao grupo controle (dados não mostrados). Estes resultados foram compatíveis com dados prévios observados para o TFPI (Opal e col, 2001).

No presente trabalho, demonstramos que o Ixolaris apresenta grande capacidade anticoagulante e antitrombótica. Estudos *in vitro* realizados com plasma humano e de rato demonstraram um importante prolongamento do PT e, em menor grau, do aPTT. O forte efeito causado na via extrínseca (PT) indica claramente que a droga causa inibição potente e preferencial do complexo TF-FVIIa. A observação de que o Ixolaris também afeta a via intrínseca (aPTT), em concentrações mais elevadas sugere que o inibidor atue em outros pontos do processo de coagulação.

De fato, estudos prévios demonstraram que o exosítio de ligação à heparina apresenta uma região importante no reconhecimento da protrombina (Rezaie, 2000a). Essas descobertas foram corroboradas por estudos de mutagênese sítio-dirigida, que demonstraram que o exosítio de ligação da heparina possui uma série de resíduos relacionados ao reconhecimento do zimogênio (Rezaie, 2000a; Rezaie 200b). Desta forma, a formação do complexo Ixolaris-FXa inibe a conversão da protrombina em trombina pela enzima (Monteiro e col., 2005). Isto explicaria o efeito observado sobre o aPTT. Adicionalmente, foi recentemente demonstrado que a formação do complexo FX-Ixolaris previne a ativação do zimogênio pelo complexo tenase intrínseco (Monteiro e col., 2007). Este fenômeno também pode contribuir para os efeitos observados no aPTT.

Como previamente observado com o FX purificado (Francischetti e col., 2002), o Ixolaris forma um complexo estável e não-covalente com o zimogênio no plasma humano ou de rato. Essa observação nos direcionou a testar o efeito do inibidor sobre a trombose

utilizando um modelo de trombose venosa induzida em ratos. O Ixolaris demonstrou potente atividade antitrombótica, tanto após administração i.v. quanto s.c. O Ixolaris, notavelmente, demonstrou ter uma alta potência ($IC_{50}=7,5-15 \mu\text{g/kg}$) quando comparado com outras moléculas antitrombóticas testadas no mesmo modelo animal. Por exemplo, a heparina não-fracionada e polissacarídeos sulfatados isolados de um organismos marinhos – apresentando como mecanismo de ação a potencialização da atividade antitrombótica do HCII e/ou da antitrombina – atuam em dose entre 250–3.000 $\mu\text{g/kg}$ (Pacheco e col., 2000; Vicente e col., 2001) Além disso, vários inibidores diretos da trombina, incluindo o argatroban e a hirudina, também inibem a trombose venosa com IC_{50} entre 170 a 250 $\mu\text{g/kg}$, ambos com meia-vida menor que 60 minutos (Finkle e col., 1998).

A análise da dependência de tempo da ação antitrombótica do Ixolaris, assim como a análise da radioatividade associada ao ^{125}I -Ixolaris no plasma de rato, indicaram uma meia-vida longa desta droga. Isso não nos surpreendeu, visto que o Ixolaris é um forte ligante do FX e este possui uma meia-vida no plasma de por volta de 34-40 horas (Roberts e col., 2001). Esta importante característica de ligação entre o Ixolaris e o FX confere uma meia vida plasmática relativamente longa, visto que a interação entre essas duas proteínas constitui um complexo estável com “clearance” plasmático semelhante ao do FX (Figura 14). Apesar de alguns dados preliminares obtidos com esses resultados, vimos que o método de quantificação da radioatividade plasmática não possui uma sensibilidade adequada, uma vez que a contagem absoluta de cpm é baixa apesar de grande quantidade de material radioativo incorporado à proteína. Encaramos este fato como uma limitação do método. Outras técnicas mais eficazes e com maior confiabilidade estatística foram aventadas para avaliação da meia vida do Ixolaris como, por exemplo, ensaios de detecção por ELISA que acabaram por esbarrar na extrema dificuldade em se produzir um anticorpo anti-Ixolaris. Tal fato não chega

a ser uma desvantagem completa, já que nos leva a crer numa característica benéfica do ponto de vista terapêutico que é a baixíssima antigenicidade desta molécula.

A ligação do Ixolaris ao FX representa uma vantagem em relação a outras moléculas anticoagulantes de baixo peso molecular e de meia-vida curta (Weitz & Bates, 2005). Um padrão farmacocinético similar foi observado em humanos após administração do NAPc2, um anticoagulante caracterizado no *Ancilostoma caninum*, cujo alvo é a via extrínseca e que, recentemente, passou por testes clínicos, mostrando-se uma droga eficaz na prevenção de eventos trombóticos em pacientes submetidos à angioplastia coronariana, como um importante inibidor da geração de trombina através de sua ação sobre o complexo tenase extrínseco (Moons e col., 2003). É salutar reconhecer que a administração de anticoagulantes cujo alvo é o TF-FVIIa, tal como o Ixolaris, o NAPc2, e o TFPI humano parece ser eficiente *in vivo* e, notavelmente, está menos frequentemente associado à grandes sangramentos (Weitz & Bates, 2005; Vlasuk e col., 2003). De fato, uma observação importante foi a de que não houve um aumento significativo no sangramento induzido, 3 ou 24 h após a administração de Ixolaris em concentrações que impediram efetivamente a formação de trombos (20 µg/kg). Estes fatos nos levam a pensar numa possível viabilidade do Ixolaris como uma alternativa terapêutica aos antitrombóticos existentes ou, mais precocemente, investir em estudos que avaliem a eficácia dessa droga em outros modelos de trombose como no caso da trombose arterial - visto que os mecanismos envolvidos para ativação da coagulação nos diferentes leitos vasculares se fazem com predominância de uma ou outra fase, sejam estes primariamente dependentes de superfície celular ou plaquetária (trombose arterial) ou com maior envolvimento dos fatores plasmáticos (trombose arterial) ou ainda principalmente em eventos nos quais a prevenção da trombose se faça benéfica como nos modelos de sepsis induzida e neoplasias.

Em resumo, o Ixolaris provou ter um forte efeito antitrombótico *in vivo*, com uma meia vida de longa duração apresentando poucos sangramentos significativos. Portanto, esta proteína parece ser um anticoagulante promissor na prevenção e no tratamento da trombose venosa e/ou para utilização em condições patológicas com expressão anormal de TF, como o câncer, hipertensão arterial e sepse (Belting e col., 2005; White e col., 2005; Levi e col., 2006).

6. Conclusão

Com base nos resultados apresentados nesta tese, concluímos que:

- O Ixolaris é um potente anticoagulante *in vitro*, com ação sobre as vias intrínseca e extrínseca, embora apresente um efeito mais proeminente sobre esta última.
- O Ixolaris interage com o FX plasmático com alta especificidade, produzindo um complexo estável.
- Utilizando um modelo de trombose venosa induzida pela administração de trombolastina combinada à estase foi possível demonstrar que o Ixolaris é um potente antitrombótico, sendo biodisponível por via subcutânea.
- O Ixolaris apresentou uma ação antitrombótica de longa duração – superior a 24 h – muito provavelmente devido à sua ligação ao FX plasmático.
- A avaliação do sangramento induzido demonstrou que doses efetivas do Ixolaris não aumentaram a perda sanguínea de forma significativa.

7. Bibliografia

- ABRAHAN E, et al. Efficacy and Safety of Tifacogin (Recombinant Tissue Factor Pathway Inhibitor) in Severe Sepsis. *JAMA* 2003; 290: 238-246.
- BÄCHLI E. History of tissue factor. *Br J Haematol.* 2000; 110: 248-55.
- BAJAJ MS, BIRKTOFT JJ, STEER SA, et al. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 959–72.
- BELTING M, AHAMED J, RUF W. Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1545–50.
- BLANN AD & LIP GYH. Virchow's triad revisited: The importance of soluble coagulation factors, the endothelium and platelets. *Thromb. Res.* 2001; 101: 323-327.
- BODE W. The structure of thrombin: a janus-headed proteinase. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32 Suppl 1:16-31.
- BROZE GJ JR. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med* 1995; 46: 103–12.
- DAHLBÄCK B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *J Intern Med.* 2005; 257: 209-23.
- DAVIE EW & RATNOFF OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science.* 1964; 145: 1310-2.
- DAVIE EW, KULMAN JD. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32 Suppl 1:3-15.
- DOYLE D. Thomas Addis of Edinburgh (1881-1949) and the coagulation cascade: 'for the greatest benefit done to practical medicine'. *Br J Haematol.* 2006; 132: 268-76.
- ESMON CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477: 349-60.
- FARIAS WR, NAZARETH RA, MOURAO PA. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algæ *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1540–6.
- FERNANDO L.V. DUQUE, N.A. MELLO. Trombogênese – Trombofilia. *J Vasc Br* 2003; 2:105-118.
- FINKLE CD, ST.PIERRE A, LEBLOND L, et al. BCH2763, a novel potent parenteral thrombin inhibitor, is an effective antithrombotic agent in rodent models of arterial and venous

thrombosis comparisons with heparin, r-hirudin, hirulog, inogatran and argatroban. *Thromb Haemost* 1998; 79: 431–8.

FRANCISCHETTI IM, VALENZUELA JG, ANDERSEN JF, ET AL. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 2002; 99: 3602–12.

FURIE B & FURIE BC Molecular basis of blood coagulation. Em: *Hematology. Basic principles and practice* (Eds: Hoffman, R., Benz, E.J., Jr., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J. & Silberstein, L.E.), Churchill Livingstone Inc., New York, USA 1995, pgs. 1566-1587.

GRESELE P & AGNELLI G. Novel approaches to the treatment of thrombosis. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 25–32.

HERBERT JM, HÉRALT JP, BERNAT A, et al. Biochemical and pharmacological properties of SANORG32701. Comparison with the “synthetic pentasaccharide (SR90107/org 31549)” and standard heparin. *Circ Res* 1996; 79: 590–600.

HOFFMAN M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis*. 2003; 16: 17-20.

HOFFMAN M, MONROE DM 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb haemost*. 2001; 85(6): 958-65.

KALAFATIS, M, SWORDS, NA, RAND, MD & MANN, KG. Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1227: 113-129.

LAW JH, RIBEIRO JM, WELLS MA. Biochemical insights derived from insect diversity. *Annu Rev Biochem* 1992;61: 87–111.

LEE AY, VLASUK GP. Recombinant nematode anticoagulant protein c2 and other inhibitors targeting blood coagulation factor VIIa/tissue factor. *J Intern Med* 2003; 254: 313-321.

LEVI M, VANDER POLL T & TEN CATE H. Tissue factor in infection and severe inflammation. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 33–9.

- MACFARLANE RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*. 1964; 202:498-9.
- MANN KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 1999; 82: 165-74.
- MONROE DM, HOFFMAN M & ROBERTS HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22(9):1381-9.
- MONTEIRO RQ, REZAIE AR, RIBEIRO JM, ET AL. Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochem J* 2005; 387:871-7.
- MONTEIRO RQ. Targeting exosites on blood coagulation proteases. *An Acad Bras Cienc*. 2005; 77: 275-80.
- MONTEIRO RQ, REZAIE AR, BAE, JSRIBEIRO JM, ET AL. Ixolaris: A Factor X Heparin-Binding Proexosite Inhibitor. *Biochem J* 2007; submetido.
- MOONS AH, PETERS RJ, BIJSTERVELD NR, et al. Recombinant nematode anticoagulant protein2, an inhibitor of the tissue factor/factor VIIa complex, in patients undergoing elective coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2147-53.
- MORRISSEY JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost*. 2001; 86: 66-74.
- MORRISSEY, JH, MACIK, BG, NEUENSCHWANDER, PF & COMP, PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 1993; 81: 734-744.
- OLSON AT & BJÖRK I Regulation of thrombin by antithrombin and heparin cofactor II. Em: *Thrombin. Structure and function*. (Ed. Berliner, L.J.), Plenum Press, New York, USA 1992, pgs. 159-217.
- OPAL SM, PALARDY JE, PAREJO NA, CREASEY AA. The activity of tissue factor pathway inhibitor in experimental models of superantigen-induced shock and polymicrobial intra-abdominal sepsis. *Crit Care Med* 2001; 29; 13-17.
- ØSTERUD B & BJØRKLID E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost*. 2006; 32(1):11-23.

- PACHECO RG, VICENTE CP, ZANCAN P, et al. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11: 563–73.
- PRATT CW & CHURCH FC. General features of heparin-binding serpins antithrombin, heparin cofactor II and protein C inhibitor. *Blood Coagul. Fibrin.* 1993; 4: 479-490.
- REZAIIE AR. (a) Identification of basic residues in the heparin binding exosite of factor Xa critical for heparin and factor Va binding. *J Biol Chem* 2000; 275: 3320–7.
- REZAIIE AR. (b) Heparin-binding exosite of factor Xa. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10: 333-8.
- RIBEIRO JMC & FRANCISCHETTI IMB. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Ann Rev Entomol* 2003; 48: 73–88.
- RICKLES FR & LEVINE MN. Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematol.* 2001; 106: 6-12.
- ROBERTS HR, HOFFMAN M, MONROE DM. A cell-based model of thrombin generation. *Semin Thromb Hemost.* 2006 Apr;32 Suppl 1:32-8.
- ROBERTS HR, MONROE III DM, HOFFMAN, M. Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis. In: *Williams Hematology.* McGraw Hill 2001; 1409–34.
- SHEEHAN JP & SADLER JE. Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 5518-22.
- SOLUM NO. Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 2841-6.
- SPEK CA. Tissue factor: from 'just one of the coagulation factors' to a major player in physiology. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004; 15 Suppl 1:S3-10.
- STONE SR & MARAGANORE JM. Hirudin interactions with thrombin. Em: *Thrombin. Structure and function.* (Ed. Berliner, L.J.), Plenum Press, New York, USA 1992, pgs.219-256.
- TOLLEFSEN, DM. Insight into the mechanism of action of heparin cofactor II. *Thromb. Haemost.* 1995; 74: 1209-1214.

VICENTE CP, ZANCAN P, PEIXOTO LL, et al. Unbalanced effects of dermatan sulfates with different sulfation patterns on coagulation, thrombosis and bleeding. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1215–20.

VLASUK GP, BRADBURY A, LOPEZ-KINNINGER L, et al. Pharmacokinetics and anticoagulant properties of the factor VIIa-tissue factor inhibitor recombinant nematode anticoagulant protein c2 following subcutaneous administration in man. Dependence on the stoichiometric binding to circulating factor X. *Thromb Haemost* 2003; 90: 803–12.

VOGEL GM, MEULEMAN DG, BOURGONDIEN FG, et al. Comparison of two experimental thrombosis models in rats: effects of four glycosaminoglycans. *Thromb Res* 1989; 54: 399–410.

WEITZ JI, HIRSH J. New anticoagulant drugs. *Chest*. 2001 Jan; 119 (1 suppl): 95S-107S

WEITZ JI, BATES SM. New anticoagulants. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1843–53.

WHITE RJ, GALARIA II, HARVEY J, et al. Tissue factor is induced in a rodent model of severe pulmonary hypertension characterized by neointimal lesions typical of human disease. *Chest* 2005; 128: 612S-613S.

ZWAAL RF, COMFURIUS P, BEVERS EM. Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1376: 433-53.

8. Anexo

Blood Coagulation, Fibrinolysis and Cellular Haemostasis

Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade

Rômulo A. Nazareth¹, Luana S. Tomaz¹, Susana Ortiz-Costa², Geórgia C. Atella¹, José M. C. Ribeiro³, Ivo M. B. Francischetti³, Robson Q. Monteiro¹

¹Instituto de Bioquímica Médica and ²Instituto de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ³Section of Vector Biology, Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, Maryland, USA

Summary

Ixolaris is a two-Kunitz tick salivary gland protein identified in *Ixodes scapularis* that presents extensive sequence homology to TFPI. It binds to FXa or FX as scaffolds and inhibits tissue factor/FVIIa complex (extrinsic Xnase). Differently from TFPI, ixolaris does not bind to the active site cleft of FXa. Instead, complex formation is mediated by the FXa heparin-binding exosite, which may also results in decreased FXa activity into the prothrombinase complex. In this report, we show that recombinant ¹²⁵I-ixolaris interacts with rat and human FX in plasma and prolongs the prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) *in vitro*. We have also investigated the effects of ixolaris *in vivo*, using a venous thrombosis model. Subcutaneous

(s.c.) or intravenous (i.v.) administration of ixolaris in rats caused a dose-dependent reduction in thrombus formation, with complete inhibition attained at 20 µg/kg and 10 µg/kg, respectively. Antithrombotic effects were observed 3 h after s.c. administration of ixolaris and lasted for 24 h thereafter. *Ex vivo* experiments showed that ixolaris (up to 100 µg/kg) did not affect the aPTT, while the PT was increased by ~0.4-fold at the highest ixolaris concentration. Remarkably, effective antithrombotic doses of ixolaris (20 µg/kg) was not associated with bleeding which was significant only at higher doses of the anticoagulant (40 µg/kg). Our experiments demonstrate that ixolaris is an effective and possibly safe antithrombotic agent *in vivo*.

Keywords

Anticoagulant, ixolaris, venous thrombosis, factor Xa, tissue factor, tick saliva, *Ixodes scapularis*

Thromb Haemost 2006; 96: 7–13

Introduction

Following tissue injury, exposition of membrane-bound tissue factor (TF) is a crucial step in the initiation of blood coagulation. TF binds to blood coagulation factor VIIa (FVIIa), and the binary FVIIa/TF complex (extrinsic tenase) then generates FIXa and FXa (1–3). Generation of FIXa by the FVIIa/TF complex results in formation of the Xnase complex following binding to the nonenzymatic co-factor, activated factor VIII (FVIIIa). The Xnase complex, along with FVIIa/TF, converts FX to activated

factor X (FXa), which assembles with activated factor V (FVa) into the prothrombinase complex that is directly responsible for the formation of thrombin (1–3).

Once generated, and depending on the particular vascular bed and rheologic environment, thrombin will convert fibrinogen to fibrin monomers, activate platelets, and eventually lead to thrombus development. Under pathologic conditions, clot formation will present clinically as deep vein thrombosis, pulmonary embolism, acute coronary syndrome, cerebrovascular events, peripheral arterial thrombosis, and even disseminated in-

Correspondence to:
Prof Robson Monteiro
Instituto de Bioquímica Médica
CCS, UFRJ, Cidade Universitária, Ilha do Fundão
Avenida Bauhinia 400, Rio de Janeiro, 21941590, Brazil
Tel: +55 21 2562 6782, Fax: +55 21 2270 8647
E-mail: robsonqm@bioqmed.ufrj.br

Financial support:
This research was supported in part by a grant from "Programa Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão em Biologia do Câncer" by Fundação Ary Frauzino para Pesquisa e Controle do Câncer (FAF) and Fundação Educacional Charles Darwin (FECD). Additional support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho (FAPERJ), Fundação Universitária José Bonifácio and from the Division of Intramural Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, USA.

Received February 21, 2006
Accepted after revision June 11, 2006

Prepublished online June 14, 2006 doi:10.1160/TH06-02-0105

travascular coagulation. Therefore, efforts to develop potent and specific antithrombotic agents are still a priority in cardiovascular medicine (4, 5).

In addition to physiologic blood coagulation inhibitors tissue factor pathway inhibitor (TFPI), antithrombin, and heparin cofactor II (6, 7), a number of specific inhibitors from exogenous sources have been identified from the salivary gland of blood-sucking arthropods (8, 9). We have recently characterized ixolaris, a two Kunitz-like TFPI from the tick *Ixodes scapularis* (10). Ixolaris binds to FXa or FX as scaffolds and inhibits extrinsic Xnase. Differently from TFPI, however, ixolaris does not bind to the active site cleft of FXa. Instead, complex formation is mediated by the FXa heparin-binding exosite (11).

In the present study, we evaluated the *in vivo* effects of ixolaris on thrombus formation using a thrombosis model in rats. After intravenous (i.v.) or subcutaneous (s.c.) administration, ixolaris showed effective and long-lasting antithrombotic activity that was not associated with hemorrhage or bleeding. Therefore, ixolaris may be used as a prototype to develop new anticoagulants targeting the extrinsic pathway.

Material and methods

Materials

Human FX was purchased from Hæmatologic Technologies (Essex Junction, VT, USA). Activated partial thromboplastin time (aPTT) (cephalin plus kaolin) and prothrombin time (PT) (thromboplastin with calcium) reagents were from bioMérieux (Rio de Janeiro, Brazil). Anasedan (Xylazine) and Dopalen (Ketamin) were from Agribands (Rio de Janeiro, Brazil). NUPAGE, MES buffer, and molecular weight markers were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Animals

Adult Wistar rats (both sexes) weighing 200–250 g were housed under controlled conditions of temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) and light (12-h light starting at 07:00 a.m.), and all experiments were conducted in accordance with standards of animal care defined by the Institutional Committee (Institute of Medical Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro).

Ixolaris expression and purification

Recombinant ixolaris was expressed in High Five cells, using Baculovirus expression system (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Ixolaris was purified through affinity chromatography on a FX-Sepharose column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) followed by a Macrosphere octadecylsilica column (Altech, Deerfield, IL, USA). One single band was observed in 4% to 12% NUPAGE gel with MES buffer.

Iodination of ixolaris

^{125}I -labeled ixolaris (^{125}I -ixolaris) was prepared by iodination with [^{125}I] sodium iodide (CNEN, São Paulo, Brazil) in 200 μCi /mg of protein, using Iodogen (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) (100 μg /mg of protein) following the manufacturer's instructions. Free iodide was removed by extensive dialysis against Tris-buffered saline, pH 7.4.

In vitro effect of ixolaris on aPTT and PT

The *in vitro* effect of ixolaris on coagulation tests aPTT and PT was evaluated on an Amelung KC4A coagulometer (Labcon, Heppenheim, Germany). Human blood samples were collected from healthy donors in 3.8% trisodium citrate (9:1, v/v), and platelet-poor plasma was obtained by further centrifugation at $2,000\times\text{g}$ for 10 min. Rat plasma samples were obtained following the same procedure. Plasma (50 μl) was incubated with ixolaris (10 μl) for 2 min at 37°C , followed by addition of aPTT reagent (50 μl , 1 min) and then 25 mM CaCl_2 (100 μl) or PT reagent (100 μl). Time for clot formation was then recorded.

Polyacrylamide gel electrophoresis

Electrophoresis was performed in polyacrylamide gels (PAGE) under non-denaturing conditions. ^{125}I -ixolaris (4.0×10^4 cpm in 320 ng) and purified FX (4.5 μg) or human or rodent plasma were incubated at room temperature for 15 min and loaded onto a PAGE (10% acrylamide). Gels were further exposed to phosphorimaging (Storm, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

Stasis-induced thrombosis after injection of tissue thromboplastin

Thrombus formation by a combination of stasis and hypercoagulability was induced as described by Vogel et al. (12) with slight modifications (13). Wistar rats were anesthetized with xylazine (16 mg/kg, intramuscularly) followed by ketamin (100 mg/kg, intramuscularly). The abdomen was surgically opened and, after careful dissection the vena cava, was exposed and dissected free from surrounding tissues. Two loose ligatures were prepared 1 cm apart on the inferior vena cava just below the left renal vein. Ixolaris at the indicated doses was administered i.v. (below the distal loose suture) or s.c. at different times before thrombosis induction. Tissue thromboplastin (3 mg/kg body weight) was injected into the vena cava, and stasis was immediately established by tightening the proximal suture. Tightening of the distal suture was performed 20 min after administration of thromboplastin, and the ligated segment was removed. The formed thrombus was removed from the segment, rinsed, blotted on filter paper, dried for 1 h at 60°C , and weighed. The protocol received official approval with regard to the care and use of laboratory animals.

Determination of radioactivity of ^{125}I -ixolaris in rat blood

The *in vivo* distribution of ^{125}I -ixolaris in rat blood was evaluated after s.c. administration. Samples containing $\sim 5.5 \times 10^6$ cpm (4 μg ixolaris) were resuspended in 200 μl of phosphate-buffered saline (PBS) and administered by s.c. route. After 3, 20, 40, or 60 h, blood was collected by cardiac puncture in EDTA (5 mM, final concentration). Platelet-poor plasma was obtained by centrifugation, and aliquots of 500 μl were placed in glass test tubes. Radioactivity was determined in a gamma counter (LKB, Wallac, Finland).

Ex vivo effect of ixolaris on aPTT and PT

The *ex vivo* effect of ixolaris on aPTT and PT coagulation tests was evaluated on an Amelung KC4A coagulometer (Labcon).

Ixolaris was administered s.c. to rats, and after 24 h blood was collected by cardiac puncture in 3.8% trisodium citrate in (9:1, v/v). Platelet-poor plasma was obtained by centrifugation at $2,000 \times g$ for 10 min. Plasma (50 μ l) was incubated for 1 min at 37°C followed by addition of aPTT reagent (50 μ l, 1 min) and then 25 μ M CaCl_2 (100 μ l) or PT reagent (100 μ l). Time for clot formation was then recorded.

Bleeding effect

A rat-tail-transection model was used to evaluate the effect of ixolaris on bleeding time. Ixolaris at appropriate doses was administered s.c. and animals were anesthetized after three or 24 h, as described above. The rat tail was cut 3 mm from the tip and carefully immersed in 40 ml of distilled water at room temperature. The hemoglobin content in water solution (absorbance at 540 nm) was used as an estimated of blood loss (14). Appropriate controls (s.c injection of PBS) were run in parallel.

Statistics

All data presented represent mean \pm SD. Differences in mean values were analyzed using Student's t-test. P-values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

The *in vitro* anticoagulant effect of ixolaris on human plasma is shown in Figure 1A. Ixolaris caused a dose-dependent increase in both PT and aPTT; however, ixolaris showed a more pronounced effect toward the extrinsic pathway. This was not surprising since previous observations employing purified proteins showed that ixolaris is potent inhibitor of the extrinsic Xnase complex (10). We further evaluated the anticoagulant properties of ixolaris on rat plasma. Figure 1B shows a similar pattern of inhibition towards PT and aPTT. However, ixolaris concentrations above 0.75 μ g/ml seem to produce a more pronounced effect in both clotting tests with a more remarkable increase in the PT.

Ixolaris forms a complex with FX, as demonstrated by non-denaturing PAGE (10). In an attempt to detect ixolaris binding to FX in plasma, we used ^{125}I -ixolaris followed by identification of complex formation using non-denaturing PAGE. Figure 2, lane 1, shows the migration patterns obtained for ^{125}I -ixolaris; and lane 2 shows ^{125}I -ixolaris bound to purified FX, which displays a slower migration pattern. Figure 2 also shows that incubation of ^{125}I -ixolaris with human (lane 3) or rat (lane 4) plasma produces a band with a similar migration pattern observed for ^{125}I -ixolaris and purified FX. We have also tried to identify the FX-ixolaris

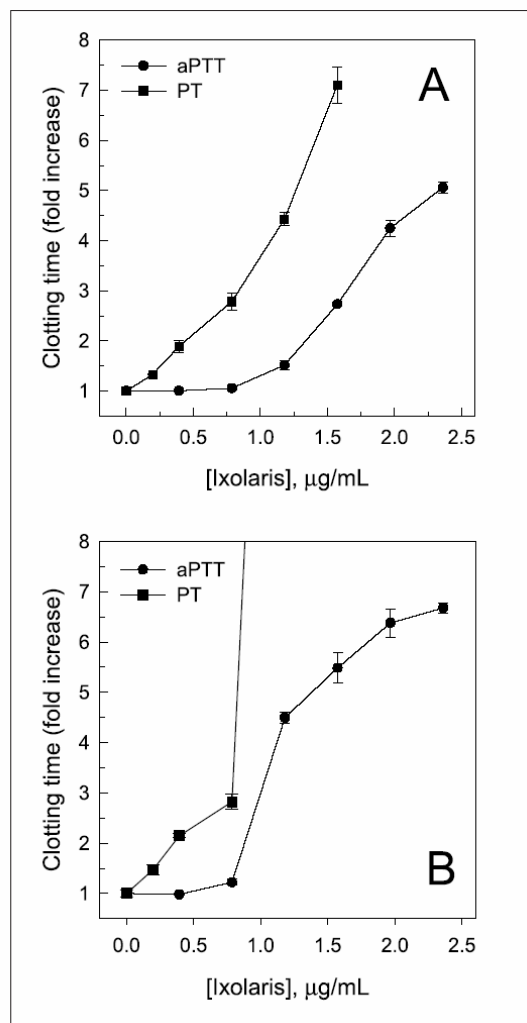


Figure 1: *In vitro* anticoagulant activity of ixolaris. Ixolaris at the indicated doses was incubated with human (A) or rat (B) citrated plasma for 2 min. Coagulation aPTT (●) and PT (■) were determined as described in *Materials and methods*. Each point represents mean \pm SD of three independent determinations.

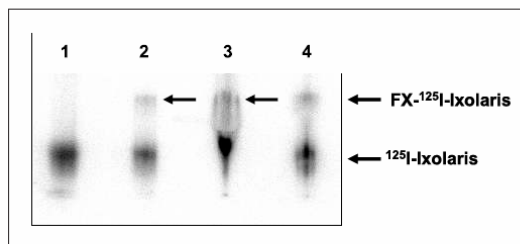


Figure 2: Detection of FX- ^{125}I -ixolaris complexes by PAGE. Samples containing ^{125}I -ixolaris and purified FX or human or rodent plasma were incubated at room temperature for 15 min and then loaded onto non-denaturing 10% PAGE. Gels were further exposed to phosphorimaging. Lane 1, 10 μ l ^{125}I -ixolaris (4.0×10^4 cpm); lane 2, 10 μ l ^{125}I -ixolaris (4.0×10^4 cpm) + 10 μ l of human FX (10 μM); lane 3, 10 μ l ^{125}I -ixolaris (4.0×10^4 cpm) + 20 μ l of human plasma; lane 4, 10 μ l ^{125}I -ixolaris (4.0×10^4 cpm) + 20 μ l of rodent plasma. Arrows indicate bands corresponding to free and bound ^{125}I -ixolaris.

complex in plasma using monoclonal antibodies against the zymogen. This was not possible due to the highly heterogeneous migration pattern exhibited by FX, under non-denaturing conditions, either in the absence or in the presence of ixolaris.

To determine whether ixolaris exerts antithrombotic action *in vivo*, we used a thrombosis model in rats that combines stasis and hypercoagulability (see *Materials and methods*). The control group that received tissue thromboplastin (3 mg/kg) showed 100% of thrombus formation, with a mean thrombus weight of 5.1 ± 0.26 mg (n=4). In contrast, i.v. administration of ixolaris produced a progressive decrease on thrombus formation, with a maximum effect observed at 10 μ g/kg (Fig. 3).

Next, the antithrombotic effect of ixolaris was tested after s.c. administration. Figure 4A shows that ixolaris was highly effective in preventing venous thrombosis by the s.c. route, with complete inhibition attained with 20 μ g/kg ixolaris. We also evaluated the time dependence of antithrombotic activity of ixolaris. Figure 4B shows that ixolaris (20 μ g/kg) completely abolished thrombus formation after 3 h of s.c. administration. The effect persisted for 24 h and was progressively reversed thereafter. To confirm the prolonged half-life of ixolaris *in vivo*, a semiquantitative estimate of ixolaris pharmacokinetics was obtained using 125 I-ixolaris. Figure 5 shows that 125 I-ixolaris concentration in plasma reached a peak after 3 h of s.c. administration and was 40% of the maximum value 20 h after administration of the anticoagulant.

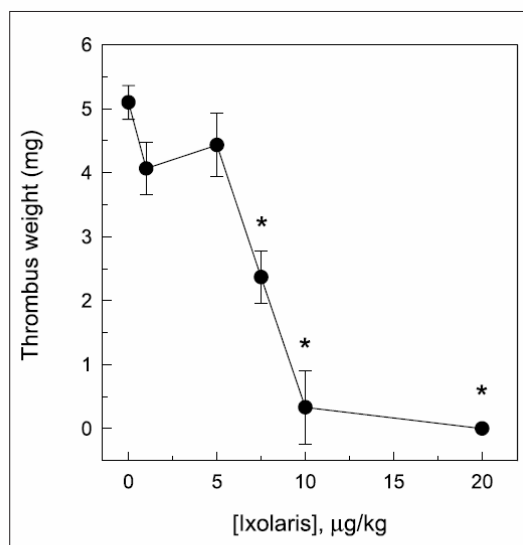


Figure 3: Effect of ixolaris on stasis-induced venous thrombosis in rats. Ixolaris at the indicated doses was administered i.v. 15 min before induction of thrombosis by thromboplastin (3 mg/kg) and stasis, as described in *Materials and methods*. The control group received PBS instead of ixolaris. Each point represents mean \pm SD of three to five animals. Asterisk, $p < 0.05$, as compared to values observed in the absence of ixolaris.

The effects of ixolaris on *ex vivo* clotting assays were then tested. Figure 6A shows that aPTT was not affected by 40 or 100 μ g/kg ixolaris. In contrast, PT values were statistically higher in

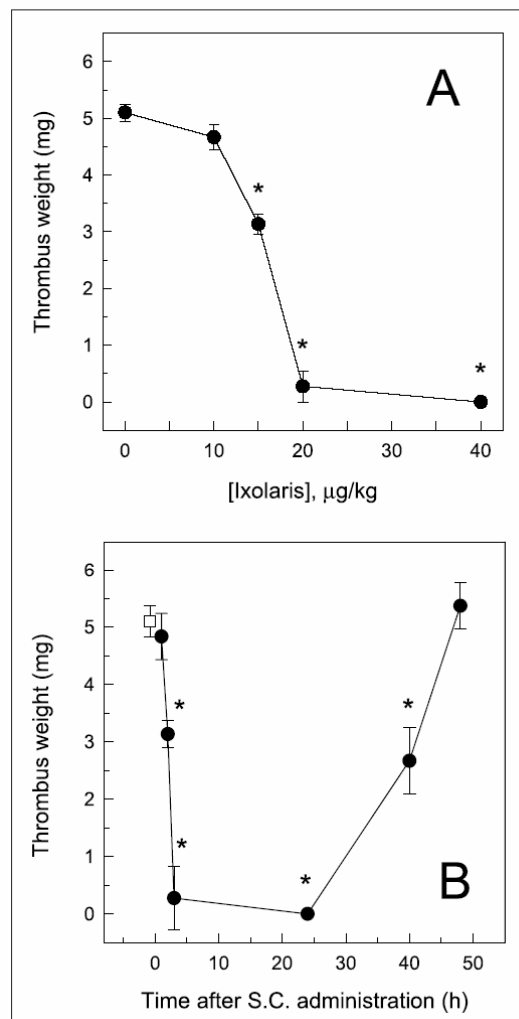


Figure 4: Effect of ixolaris on venous thrombosis in rats after s.c. administration. A) Dose-dependence effect of ixolaris on venous thrombosis following s.c. administration. The antithrombotic effects of ixolaris, at the indicated doses, was evaluated after 3 h of drug administration. Thrombosis was induced as described in *Material and methods*. B) Time-dependence effect of ixolaris following s.c. administration. Ixolaris (20 μ g/kg) was administered s.c. to animals, and thrombosis was induced after the indicated times. Control group (\square) received PBS instead of ixolaris. Each point represents mean \pm SD of three to five animals. Asterisk, $p < 0.05$, as compared to values observed in the absence of ixolaris.

relation to control for ixolaris doses higher than 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, showing a ~ 0.4 -fold increase at 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Finally, the bleeding effect of ixolaris was evaluated using a tail-transection model (Fig. 7); no significant bleeding was observed three or 24 h after ixolaris administration (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$). On the other hand, a statistically significant blood loss was observed 24 h after administration of 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ixolaris (see *Discussion*).

Discussion

Ixolaris is a two-Kunitz salivary gland protein that has been previously characterized as a potent inhibitor of the extrinsic Xnase (FVIIa-TF) complex (10). Although ixolaris presents extensive primary sequence homology with TFPI, it does not bind to the FXa catalytic site. On the contrary, complex formation is mediated by a number of surface-charged residues that constitute the FXa heparin-binding exosite (11). Another striking difference between ixolaris and TFPI is the ability of the former to form a tight complex with zymogen FX. In fact, interaction of ixolaris with FXa or FX is a prerequisite for inhibition of the extrinsic Xnase complex (10).

In the present study, we demonstrated that ixolaris displays potent anticoagulant and antithrombotic activities. *In vitro* assays performed with human plasma demonstrated a robust prolongation of PT and, to a lesser extent, of aPTT. The prominent effect toward the extrinsic pathway (PT) clearly indicates the potent and preferential inhibitory activity toward the FVIIa-TF complex. The finding that ixolaris at higher concentrations also affects the intrinsic pathway (aPTT) suggests that the inhibitor

interferes with protrombin conversion by FXa. In fact, we have recently demonstrated that ixolaris is a specific ligand of the FXa heparin-binding exosite and impairs the productive assembly of the prothrombinase complex (11). These findings are corroborated by site-directed mutagenesis studies demonstrating that the

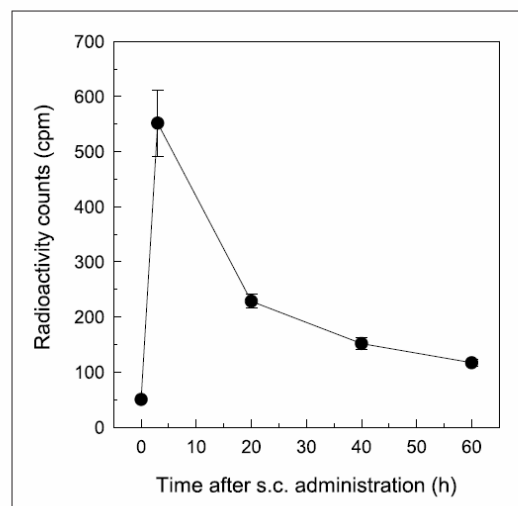


Figure 5: Determination of blood distribution of ^{125}I -ixolaris after s.c. administration. After s.c. injection of ^{125}I -ixolaris (4 μg ; 5.5×10^6 cpm), blood samples were collected at the indicated times by cardiac puncture, and platelet-poor plasma was obtained by centrifugation. Aliquots of 500 μl of plasma were placed in glass test tubes, and radioactivity was determined in a gamma counter.

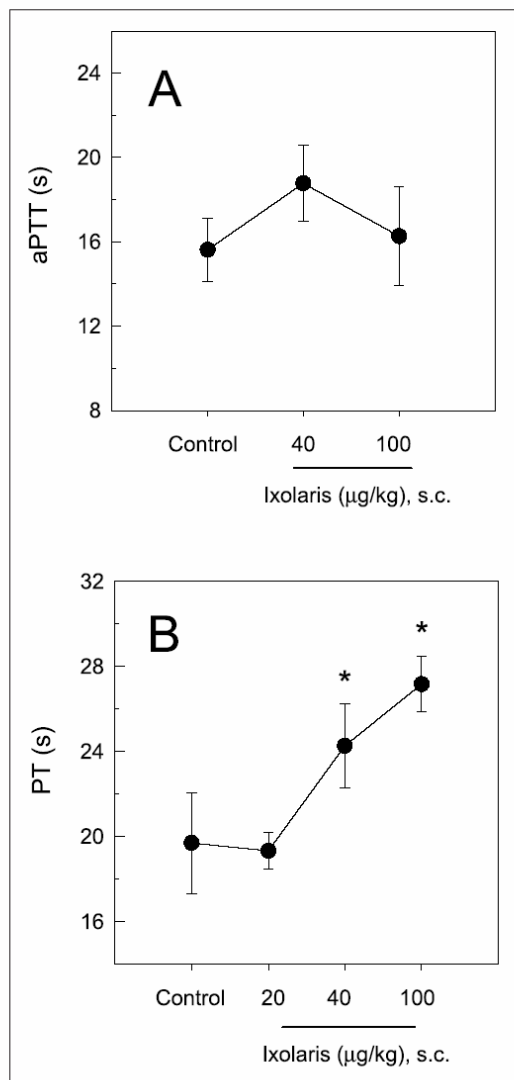


Figure 6: Ex vivo anticoagulant activity of ixolaris. Ixolaris at the indicated concentrations was given s.c. to animals; after 24 h, blood was collected, and platelet-poor plasma was obtained. Coagulation tests aPTT (A) and PT (B) were determined as described in *Materials and methods*. Each point represents mean \pm SD of four or five animals. Asterisk, $p < 0.05$, as compared to values observed in the absence of ixolaris.

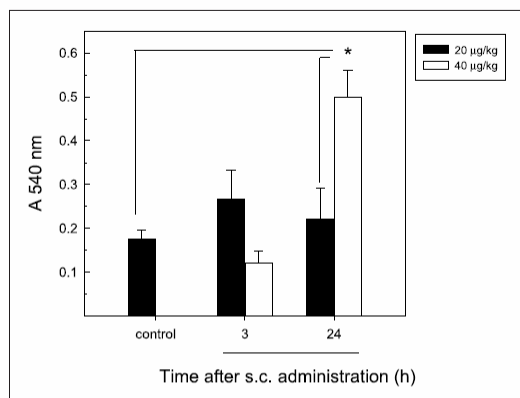


Figure 7: Determination of the bleeding effect of ixolaris. Ixolaris at the indicated doses was administered s.c.; after three or 24 h of administration, the rat tail was cut 3 mm from the tip. The tail was carefully immersed in 40 ml of distilled water at room temperature, and blood loss (hemoglobin content) was estimated at 540 nm after 60 min. The absorbance detected for a group that received PBS instead of ixolaris was taken as control. Results represent the mean \pm SD of five to ten animals. Asterisk, $p < 0.05$.

FXa heparin-binding exosite contains a number of specific residues implicated in zymogen recognition (15, 16).

As observed with purified FX, ixolaris forms a stable, non-covalent complex with zymogen either in human or rat plasma. These observations lead us to test the inhibitor using an *in vivo* model of venous thrombosis. Ixolaris showed a potent antithrombotic activity following i.v. or s.c. administration in rats. Remarkably, ixolaris displays very high potency (IC_{50} =7.5–15 µg/kg) compared with that of other antithrombotic molecules tested in this same animal model. A number of sulfated polysaccharides including unfractionated heparin that potentialize either antithrombin or heparin cofactor II present antithrombotic activ-

ity in the range of 250–3,000 µg/kg (17, 18). In addition, a number of direct thrombin inhibitors, including argatroban and hirudin variants, inhibit venous thrombosis with IC_{50} ranging from 170 to 250 µg/kg and with half-lives below 60 min (19).

Analysis of the time-dependence pattern of the antithrombotic action of ixolaris (Fig. 4) as well as the disappearance of ^{125}I -ixolaris radioactivity in rat plasma (Fig. 5) indicates a prolonged half-life. This is not surprising since ixolaris is a tight ligand of FX which plasma half-life is about 34–40 hours (20). Notably, no significant bleeding was observed three or 24 h after ixolaris administration at concentrations that effectively blocked thrombus formation (20 µg/kg). In addition, blood loss was not observed 3 h after administration of ixolaris at 40 µg/kg but it was significant at 24 h. The slower distribution of ixolaris after s.c. administration at higher doses as compared to the distribution observed with 4 µg/kg ^{125}I -ixolaris (Fig. 5) appears to account for the bleeding effects detected at later time points (Fig. 7).

The tight binding of ixolaris to FX may represent an advantage when compared with other low-molecular-weight anticoagulants that display a shorter half-life (5). A similar pharmacokinetic property has been observed in humans after administration of NAPc2, a hookworm anticoagulant that targets the extrinsic pathway and that has recently undergone clinical trials (21). It is important to recognize that administration of anticoagulants targeting FVIIa/TF such as ixolaris, NAPc2, and TFPI appears to be effective *in vivo* and, notably, is most often not associated with major manifestations of bleeding (5, 6, 21, 22).

In conclusion, ixolaris displays potent antithrombotic effect *in vivo*, with prolonged half-life and minor significant bleeding. Therefore, ixolaris appears to be a promising anticoagulant for the prevention and treatment of venous or arterial thrombosis and/or in pathologic conditions with abnormal expression of TF (23–25).

Acknowledgements

We thank NIAID intramural editor Brenda Rae Marshall for assistance.

References

1. Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988; 53: 505–18.
2. Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 1999; 82: 165–74.
3. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1381–9.
4. Greslele P, Agnelli G. Novel approaches to the treatment of thrombosis. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 25–32.
5. Weitz JJ, Bates SM. New anticoagulants. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1843–53.
6. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med* 1995; 46: 103–12.
7. Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, et al. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 959–72.
8. Law JH, Ribeiro JM, Wells MA. Biochemical insights derived from insect diversity. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 87–111.
9. Ribeiro JMC, Francischetti IMB. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Ann Rev Entomol* 2003; 48: 73–88.
10. Francischetti IM, Valenzuela JG, Andersen JF, et al. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 2002; 99: 3602–12.
11. Monteiro RQ, Rezaie AR, Ribeiro JM, et al. Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochem J* 2005; 387: 871–7.
12. Vogel GM, Meuleman DG, Bourgondien FG, et al. Comparison of two experimental thrombosis models in rats: effects of four glycosaminoglycans. *Thromb Res* 1989; 54: 399–410.
13. Farias WR, Nazareth RA, Mourao PA. Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1540–6.
14. Herbert JM, Héralt JP, Bernat A, et al. Biochemical and pharmacological properties of SANORG 32701. Comparison with the “synthetic pentasaccharide (SR90107/org 31549)” and standard heparin. *Circ Res* 1996; 79: 590–600.
15. Rezaie AR. Identification of basic residues in the heparin binding exosite of factor Xa critical for heparin and factor Va binding. *J Biol Chem* 2000; 275: 3320–7.
16. Manithody C, Rezaie AR. Functional mapping of charged residues of the 82-116 sequence in factor Xa: evidence that lysine 96 is a factor Va independent recognition site for prothrombin in the prothrombinase complex. *Biochemistry* 2005; 44: 10063–70.
17. Pacheco RG, Vicente CP, Zancan P, et al. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglyc-

- ans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11: 563–73.
18. Vicente CP, Zancan P, Peixoto LL, et al. Unbalanced effects of dermatan sulfates with different sulfation patterns on coagulation, thrombosis and bleeding. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1215–20.
19. Finkle CD, St. Pierre A, Leblond L, et al. BCH2763, a novel potent parenteral thrombin inhibitor, is an effective antithrombotic agent in rodent models of arterial and venous thrombosis comparisons with heparin, r-hirudin, hirulog, inogatran and argatroban. *Thromb Haemost* 1998; 79: 431–8.
20. Roberts HR, Monroe III DM, Hoffman, M. Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis. In: *Williams Hematology*. Mc Graw Hill 2001; 1409–34.
21. Moons AH, Peters RJ, Bijsterveld NR, et al. Recombinant nematode anticoagulant protein c2, an inhibitor of the tissue factor/factor VIIa complex, in patients undergoing elective coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2147–53.
22. Vlasuk GP, Bradbury A, Lopez-Kinninger L, et al. Pharmacokinetics and anticoagulant properties of the factor VIIa-tissue factor inhibitor recombinant nematode anticoagulant protein c2 following subcutaneous administration in man. Dependence on the stoichiometric binding to circulating factor X. *Thromb Haemost* 2003; 90: 803–12.
23. Belting M, Ahamed J, Ruf W. Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1545–50.
24. White RJ, Galaria II, Harvey J, et al. Tissue factor is induced in a rodent model of severe pulmonary hypertension characterized by neointimal lesions typical of human disease. *Chest* 2005; 128: 612S–613S.
25. Levi M, van der Poll T, Ten Cate H. Tissue factor in infection and severe inflammation. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 33–9.
-

Curriculum Vitae

Nome: Rômulo Almeida Nazareth

Nascimento: 24/05/1979

Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica:

- Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, agosto de 1997 a junho de 2004

- Doutorado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, MD - PhD, agosto de 2003 a maio de 2007

Orientação de Estudante:

Luana Tomaz – Iniciação Científica de abril de 2005 a junho de 2006

Comunicação em Congresso:

- 8 Comunicações em Congressos Nacionais;
- 1 premiação de melhor trabalho em Congresso Nacional.

Publicações:

- Farias WR, Nazareth RA, Mourao PA. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. *Throm Haemost.* 2001 Dec;86(6):1540-6.

- Tovar AM, de Mattos DA, Stelling MP, Sarcinelli-Luz BS, Nazareth RA, Mourao PA. Dermatan sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Apr 15;1740(1):45-53. Epub 2005 Mar 11

- Nazareth RA, Tomaz LS, Ortiz-Costa S, Atella GC, Ribeiro JM, Francischetti IM, Monteiro RQ. Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. *Thromb Haemost.* 2006 Jul;96(1):7-13.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)