

Lisandra Antonia Castro Teixeira

***Implicações do Processo Aterosclerótico  
sobre o Potencial Anticoagulante dos  
Glicosaminoglicanos Arteriais***

Rio de Janeiro – 2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

# **Implicações do Processo Aterosclerótico sobre o Potencial Anticoagulante dos Glicosaminoglicanos Arteriais**

Lisandra Antonia Castro Teixeira

Orientadores:

Paulo Antonio de Souza Mourão

Ana Maria Freire Tovar

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando a obtenção do grau de Mestre em Química Biológica.

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Bioquímica Médica

Rio de Janeiro, 2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Teixeira, Lisandra Antonia Castro Teixeira

Implicações do processo aterosclerótico sobre o potencial anticoagulante dos glicosaminoglicanos arteriais / Lisandra Antonia Castro Teixeira. Rio de Janeiro, 2009.

Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, 2009.

Orientadores: Paulo Antonio de Souza Mourão

Ana Maria Freire Tovar

1. Aterosclerose                      2. Glicosaminoglicanos                      3. Artéria

- I. Mourão, Paulo Antonio de Souza Mourão (Orient.).
- II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica
- III. Título

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Lisandra Antonia Castro Teixeira

Implicações do Processo Aterosclerótico sobre o Potencial Anticoagulante dos Glicosaminoglicanos Arteriais

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2009

---

**Prof<sup>a</sup>. Verônica Maria Morandi da Silva**

Professora Adjunta do Departamento de Biologia Celular e Genética, UERJ, Rio de Janeiro, RJ

---

**Prof<sup>a</sup>. Geórgia Correa Atella**

Professora Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

---

**Prof. Robson de Queiroz Monteiro**

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

**Revisor:**

---

**Prof. Luiz Cláudio F. Silva**

Professor Associado do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

**Suplente:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Silvana Allodi**

Professora Associada do Instituto de Bioquímica Ciências Biomédicas, Departamento de Histologia e Embriologia, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ

**Orientadores:** Prof. Paulo Antonio de Souza Mourão. Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

Prof<sup>a</sup>. Ana Maria Freire Tovar. Doutora Professora Visitante do Instituto de Bioquímica Médica (1998) pela UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

## APRESENTAÇÃO DA TESE

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecido Conjuntivo, durante o curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, sob a orientação do Professor Paulo Antonio de Souza Mourão e da Professora Ana Maria Freire Tovar, com auxílios financeiros da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Esta tese apresenta uma discussão abrangente durante a apresentação dos resultados.

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todos que direta ou indiretamente usufruirão o que está escrito aqui.

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram importantes durante o meu trajeto ao longo do mestrado, cada uma a sua maneira, ajudando no meu amadurecimento, permanência e persistência nos meus objetivos profissionais. Peço desculpas àquelas que não terão seus nomes citados, pois preencheria várias páginas de agradecimento se fosse colocar todas, mas deixo aqui registrado o meu carinho e amizade que dedico a todas elas. Cada uma que contribuiu para que eu chegasse até aqui sabe o quão importante foi na minha vida.

Começo agradecendo às agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPq que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto que tive o prazer de participar. No entanto, se fiz parte deste trabalho, foi porque fui gentilmente acolhida pelo professor Paulo Mourão. A ele agradeço todo o conhecimento doado, confiança e credibilidade ao me aceitar como parte do seu grupo, grupo este que pertenço há cinco anos.

Tanto tempo de dedicação ao Laboratório de Tecido Conjuntivo foi possível, principalmente, à orientação maravilhosa da professora Ana Tovar, que foi um dos maiores motivos de eu ter escolhido este laboratório para trabalhar, permanecer durante todo esse tempo e querer continuar durante mais alguns anos. Quando decidi que queria fazer minha Iniciação Científica com este grupo foi devido ao “exemplo” que estava diante de mim e que queria seguir. A Ana é uma pessoa muito detalhista, perfeccionista e que sabe discorrer com maestria a respeito de todos os assuntos. Espero um dia ter pelo menos a metade de todas as suas qualidades e de sua competência. Agradeço então à Ana por não ser apenas uma orientadora, mas uma amiga. Agradeço pela paciência diante das minhas dificuldades, pelos sermões sempre justos, por todo o conhecimento transmitido e por todo o trabalho e tempo que dedicou a mim.

Agradeço também aos meus amigos de laboratório que se tornaram a minha segunda família, pois convivo mais com eles do que com a minha própria. Incluo aqui todos da grande família “Lab Tec Conj” (pessoal do laboratório do Mauro Pavão e do Luiz Cláudio também) e aqueles que já fizeram parte, mas que não estão mais no nosso grupo. Cada um me ajudou de alguma forma: emprestando livros, ensinando conceitos, técnicas, dando dicas importantes. Muitas dessas pessoas se tornaram mais que colegas de trabalho, mas amigos pessoais de todas as horas e hoje eles são essenciais na minha vida. Gostaria de agradecer mais diretamente alguns deles como a Marianinha, que fez muita falta quando estive fora, ao Roberto, Angélica e Bruno.

Por fim, um agradecimento especial! Quero agradecer à minha família (pai, mãe, dinda, irmã, cunhado e sobrinho, além daquelas que não estão mais

conosco). Estes foram o tempo todo o meu alicerce. Sempre me apoiaram, investiram muito nos meus estudos (em detrimento de benefícios próprios), acreditaram em mim quando nem eu mesma acreditava. Só eu sei a falta que eles me fizeram e o quão penoso é ficar longe deles. Todos eles são uma motivação para querer continuar evoluindo, sendo a minha motivação principal o meu “cabritinho” Gabriel, o meu sobrinho e afilhado. Obrigada por tudo!

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b>	Taxa de ocorrência das principais doenças no mundo no ano de 2005. ....	2
<b>Figura 2:</b>	Processo de formação de um ateroma. ....	6
<b>Figura 3:</b>	Estrutura do proteoglicano. ....	14
<b>Figura 4:</b>	Estrutura do CS e do DS. ....	15
<b>Figura 5:</b>	Estrutura da heparina e do HS. ....	16
<b>Figura 6:</b>	Estrutura do queratam sulfato. ....	16
<b>Figura 7:</b>	Estrutura do ácido hialurônico. ....	17
<b>Figura 8:</b>	Esquema do mecanismo de coagulação. ....	26
<b>Figura 9:</b>	Representação molecular da ação anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados .....	31
<b>Figura 10:</b>	Concentração de GAG no segmento proximal, torácico e abdominal, referentes aos grupos N, L e LL. ....	44
<b>Figura 11:</b>	Avaliação do conteúdo de GAG total nos diferentes segmentos e suas respectivas áreas. ....	45
<b>Figura 12:</b>	Concentração de GAG total, em teor de ácido hexurônico, nas diferentes amostras (D e AAA) ou áreas (N, L e LL). ...	47
<b>Figura 13:</b>	Concentração de HA, em teor de ácido hexurônico, nas diferentes amostras (D e AAA) ou áreas (N, L e LL). ....	49
<b>Figura 14:</b>	Concentração de HS, em teor de ácido hexurônico, nas diferentes amostras (D e AAA) ou áreas (N, L e LL). ....	50
<b>Figura 15:</b>	Concentração de DS, em teor de ácido hexurônico, nas diferentes amostras (D e AAA) ou áreas (N, L e LL). ....	51

<b>Figura 16:</b>	Concentração de CS, em teor de ácido hexurônico, nas diferentes amostras (D e AAA) ou áreas (N, L e LL). .....	53
<b>Figura 17:</b>	(A) Variação nos ensaios de inibição da trombina das extrações de GAG total das áreas N, L, e LL, utilizando plasma humano como fonte de AT e HCII; e (B) concentração de GAG total necessária (média ± SEM) para inibir em 50% a atividade da trombina (IC <sub>50</sub> ) das extrações referentes às áreas N, L e LL. ....	56
<b>Figura 18:</b>	(A) Variação nos ensaios de inibição da trombina das extrações de GAG total das áreas N, L, e LL, na presença de AT purificada; e (B) concentração de GAG total necessária (média ± SEM) para inibir em 50% a atividade da trombina (IC <sub>50</sub> ) das extrações referentes às áreas N, L e LL. ....	58
<b>Figura 19:</b>	(A) Variação nos ensaios de inibição da trombina das extrações de GAG total das áreas N, L, e LL na presença de HCII purificado; e (B) concentração de GAG total necessária (média ± SEM) para inibir em 50% a atividade da trombina (IC <sub>50</sub> ) das extrações referentes às áreas N, L e LL. ....	60
<b>Figura 20:</b>	Fracionamento por cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q de <i>pools</i> das extrações referentes às áreas N (A), L (B) e LL (C). ....	62

<b>Figura 21:</b>	Ensaio de inibição da trombina (A) e do fator Xa (B) das frações de HS das áreas N, L, LL e dos grupos de doadores e AAA, na presença de AT. ....	64
<b>Figura 22:</b>	Ensaio de inibição da trombina das frações de CS+DS das áreas N e L e dos grupos de doadores e AAA, na presença de HCII. ....	66
<b>Figura 23:</b>	Ensaio de inibição da trombina (A) e do fator Xa (B) das frações de CS+DS das amostras N, L, LL, doadores e AAA, na presença de AT. ....	68
<b>Figura 24:</b>	Eletroforese em gel de agarose de frações de HS e CS+DS obtidas por cromatografia de troca iônica da área L, antes e depois do tratamento com condroitinase ABC (Chase ABC). ....	70
<b>Figura 25:</b>	Ensaio de inibição da trombina das frações CS+DS, antes e após tratamento com Chase ABC das áreas N, L e LL, na presença de AT. ....	71
<b>Figura 26:</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações HS (A) e CS+DS (B) obtidas da cromatografia de troca iônica dos <i>pools</i> de amostras de doadores e AAA e das áreas N, L e LL. ....	72
<b>Figura 27:</b>	Densitometria da PAGE das frações HS (A) obtidas da cromatografia de troca iônica dos <i>pools</i> de amostras de doadores e AAA e das áreas N, L e LL. ....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Taxa de mortalidade específica (TME) por doenças do aparelho circulatório segundo a região do Brasil no período de 2005 num total de 46,12% mortes. ....	2
<b>Tabela 2:</b> Principais características estruturais dos GAGs. ....	18

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AAA</b>	Aneurisma de Aorta Abdominal
<b>Abd</b>	Segmento Abdominal da aorta
<b>APC</b>	Proteína C Ativada
<b>ApoB</b>	Apolipoproteína B
<b>AT</b>	Antitrombina
<b>Chase ABC</b>	Condroitinase ABC
<b>CPC</b>	Cloreto de Cetil-Piridina
<b>CS</b>	Condroitim Sulfato
<b>D</b>	Grupo Doadores cadáveres de transplante
<b>DCNT</b>	Doenças Crônicas não Transmissíveis
<b>DS</b>	Dermatam sulfato
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetracético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EPCR</b>	Receptor Endotelial de Proteína C
<b>FGF</b>	Fator de Crescimento de Fibroblasto
<b>FPLC</b>	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
<b>FT</b>	Fator Tissular
<b>HA</b>	Ácido Hialurônico
<b>HCII</b>	Cofator II da Heparina
<b>HexUAc</b>	Ácido Hexurônico
<b>IC<sub>50</sub></b>	50% de inibição
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicano
<b>HS</b>	Heparam Sulfato
<b>ICAM-1</b>	Moléculas de Adesão Intercelular-1
<b>LDL</b>	<i>Low Density Lipoprotein</i>

<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PEG</b>	Poli(etil)enoglicol
<b>PG</b>	Proteoglicano
<b>PGCS</b>	Proteoglicano de Condroitim Sulfato
<b>PGDS</b>	Proteoglicano de Dermatan Sulfato
<b>PGHS</b>	Proteoglicano de Heparan Sulfato
<b>SP</b>	Segmento Proximal da aorta
<b>T</b>	Segmento Torácico da aorta
<b>TME</b>	Taxa de Mortalidade Específica
<b>VCAM-1</b>	Molécula de Adesão Celular Vascular-1
<b>vWF</b>	fator de von Willebrand

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos</b> .....	vii
<b>Lista de ilustração</b> .....	ix
<b>Lista de Tabelas</b> .....	xii
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b> .....	xiii
<b>Sumário</b> .....	xv
<b>Resumo</b> .....	xvii
<b>Abstract</b> .....	xix
<b>Introdução</b> .....	01
1. Aterosclerose .....	03
2. Tipos de lesões ateroscleróticas .....	08
a) Lesão do tipo I ou inicial .....	08
b) Lesão do tipo II ou estria lipídica .....	09
c) Lesão do tipo III ou lesão intermediária .....	10
d) Lesão do tipo IV ou ateroma .....	10
e) Lesão do tipo V ou fibroateroma .....	11
f) Lesões do tipo VI ou lesão complicada, lesões do tipo VII e tipo VIII .....	11
3. Patogenia da aterosclerose .....	12
3.1. Aspectos gerais dos PGs/GAGs .....	12
3.2. O papel dos GAGs na aterosclerose .....	19
3.3. O papel dos GAGs na coagulação sanguínea .....	22
3.3.1. O sistema de coagulação .....	24
<b>Objetivos</b> .....	34
<b>Materiais e Métodos</b> .....	35
3.1. Amostras .....	35
3.2. Isolamento e purificação dos GAGs .....	36
3.3. Eletroforese .....	37
3.4. Fracionamento das cadeias de GAGs .....	38
3.5. Tratamento com condroitinase ABC .....	38

3.6. Avaliação da atividade anticoagulante dos GAGs .....	39
3.7. Análise estatística .....	40
<b>Resultados e discussão</b> .....	41
4.1. Variações da concentração e composição relacionadas ao processo aterosclerótico dos GAGs nos diferentes segmentos da aorta .....	43
4.2. Comparação da concentração total e específica dos GAGs aórticos em função da idade e do tipo de lesão da parede arterial .....	46
4.3. Implicações do processo aterosclerótico no potencial anticoagulante dos GAGs aórticos .....	54
4.4. Avaliação da atividade anticoagulante de frações enriquecidas em cadeias de HS e DS nos diferentes grupos ...	61
<b>Conclusões</b> .....	75
<b>Considerações Finais</b> .....	77
<b>Bibliografia</b> .....	81

## RESUMO

TEIXEIRA, Lisandra Antonia Castro Teixeira. Implicações do processo aterosclerótico sobre o potencial anticoagulante dos glicosaminoglicanos arteriais. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A aterosclerose é a doença vascular de maior prevalência no mundo, responsável por elevados índices de mortalidade, principalmente associados à doença coronariana isquêmica e acidente vascular cerebral. Outra doença vascular freqüente e com forte associação com a aterosclerose é o aneurisma de aorta abdominal (AAA). Uma característica do processo aterosclerótico e também do AAA é o intenso remodelamento da parede arterial, afetando vários de seus constituintes. Os glicosaminoglicanos (GAGs) estão entre as moléculas comprometidas, o que provavelmente tem reflexo nas funções exercidas por esses componentes na parede vascular. As alterações descritas relatam tanto modificações quantitativas quanto estruturais dos GAGs na aterosclerose e AAA. O presente estudo teve por finalidade avaliar a influência do processo aterosclerótico sobre o potencial anticoagulante dos GAGs arteriais e comparar esta avaliação com o potencial anticoagulante dos GAGs presentes na lesão aneurismática abdominal (AAA). O desenho experimental constituiu na avaliação dos GAGs extraídos de áreas macroscopicamente preservadas e de áreas exibindo diferentes graus de lesão aterosclerótica (lesão tipo IV-V e lesão tipo VI-VII) de aorta humana e de AAA. Os nossos resultados referentes ao conteúdo e composição desses compostos nas lesões ateroscleróticas confirmaram dados já reportados, onde encontramos uma significativa diminuição da concentração total devido principalmente à diminuição das cadeias de heparan sulfato (HS) e de condroitim sulfato (CS) nas lesões ateroscleróticas, que foram mais acentuadas nas lesões mais avançadas (VI-VII). Apesar das variações quantitativas, estas não resultaram em prejuízo do potencial anticoagulante dos GAGs das lesões em relação ao das áreas mais preservadas da parede arterial. Por outro lado, na comparação com o AAA, verificamos que o conteúdo e composição dos GAGs de AAA se assemelham aos observados nas lesões ateroscleróticas, indicando uma

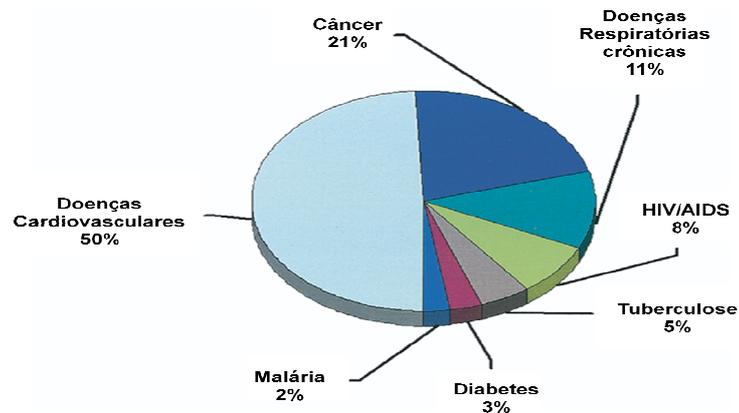
maior influência do processo aterosclerótico nas alterações observadas no AAA. Quanto ao potencial anticoagulante, este também se manteve preservado em relação às áreas normais ou ateroscleróticas, indicando não sofrer influência em decorrência da evolução da doença aneurismática. Também pudemos inferir que as cadeias de HS aórtico de indivíduos idosos exibem maior potencial anticoagulante em relação às obtidas de adultos mais jovens.

## ABSTRACT

Atherosclerosis is the most prevalent vascular disease in the world, responsible for high mortality rate and is mainly associated to ischemic coronary disease and stroke. Another common vascular disease that is strongly associated with atherosclerosis is abdominal aorta aneurysm (AAA). A common characteristic of the atherosclerotic process and AAA is intense remodeling of the arterial wall, affecting several of its components. As the glycosaminoglycans (GAGs) are among the committed molecules, their functions could probably be altered in the vascular wall. Quantitative and structural modifications of GAGs in atherosclerosis and AAA are reported in the literature. The present study evaluates the influence of atherosclerotic process on the anticoagulant activity of arterial GAGs and compares with anticoagulant activity of GAGs present in AAA lesions. The experimental approach involved evaluation of extracted GAGs from macroscopic preserved areas and from areas exhibiting different degrees of atherosclerotic lesion (type IV-V and type VI-VII lesion) and comparison with those obtained from human aorta AAA. Our results regarding the content and composition of those compounds in the atherosclerotic lesions confirm published data, where a significant decrease of total concentration due mainly to the decrease of the heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate (CS) chains in atherosclerotic lesions is found, which is more accentuated in the most advanced lesions (VI-VII). Despite of the quantitative variations, the anticoagulant property of GAGs from lesions is not altered, when compared with those from preserved areas of the arterial wall. On the other hand, in comparison with AAA, we observe that GAGs content and composition is similar to those from atherosclerotic lesions areas, indicating a great influence of the atherosclerotic process on AAA alterations. Anticoagulant property is also preserved in comparison to normal or atherosclerotic areas, indicating that it is not affected by aneurysm disease evolution. We also observe that aortic HS chains from aged individuals exhibit a greater anticoagulant potential than those obtained from younger adults.

## I. INTRODUÇÃO:

Entre os 58 milhões de óbitos mundiais em 2005, 35 milhões foram causados pelas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Trata-se do dobro do número total de óbitos por todas as doenças de notificação obrigatória (incluindo síndrome da imunodeficiência adquirida, tuberculose e malária), afecções perinatais e maternas e todas as deficiências nutricionais combinadas. No mesmo ano, a *World Health Statistics* (2006) apontou que entre as DCNT, as doenças circulatórias são a principal causa de óbito, responsáveis por 50% de todos os casos (17,5 milhões de óbitos), seguidas por câncer (7,6 milhões de óbitos) e doenças respiratórias crônicas (4,1 milhões de óbitos) (Murray e Lopez, 2007) (figura 1). A doença coronariana e o acidente vascular encefálico são responsáveis por aproximadamente 75% das mortes decorrentes de doença cardiovascular (WHO, 2004). No Brasil, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares também constituem as principais causas de mortalidade, destacando-se o infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular encefálico (tabela 1). Ambas se traduzem, na maioria das vezes, como manifestações clínicas do comprometimento da parede arterial por um tipo de lesão conhecida como aterosclerose. Mundialmente as DCNT, associadas biologicamente ao processo aterosclerótico, representam um crescente encargo para a sociedade, a família e o indivíduo.



**Figura 1:** Taxa de ocorrência das principais doenças no mundo no ano de 2005. As doenças cardiovasculares correspondem a 50% de mortes no mundo dentre as principais causas de morte (*fonte: DATASUS*).

TME p/doenças isquêmicas coração segundo região brasileira	
Período: 2005	
Região	TME p/doenças isquêmicas coração
<b>TOTAL</b>	<b>46,12</b>
Região Norte	17,97
Região Nordeste	33,47
Região Sudeste	56,43
Região Sul	59,65
Região Centro-Oeste	37,31

**Tabela 1:** Taxa de mortalidade específica (TME) por doenças do aparelho circulatório segundo a região do Brasil no período de 2005 num total de 46,12% mortes (*fonte: DATASUS*).

## **1. Aterosclerose:**

A aterosclerose é caracterizada por lesão conhecida como ateroma ou placa fibrogordurosa, constituída por uma capa de tecido conjuntivo denso, entremeado com células musculares lisas, encobrimdo um núcleo lipídico e debris necróticos. Sua patogenia evolui no decorrer de muitas décadas, e, durante a maior parte desse tempo, as lesões permanecem clinicamente silenciosas, de modo que o aparecimento de sintomas assinala a presença de doença avançada ou o desenvolvimento de trombose.

O depósito lipídico das lesões ateroscleróticas tem sua origem no colesterol plasmático, principalmente o colesterol transportado pela LDL (lipoproteína de baixa densidade), e a elucidação do metabolismo da LDL e de como a célula controla o seu conteúdo de colesterol provocou um grande avanço no entendimento da aterogênese.

De acordo com a hipótese original de resposta à injúria da aterogênese, a LDL modificada tem um papel fundamental na patogênese da aterosclerose e, ao sofrer esta modificação na íntima das artérias, torna-se um importante indutor de lesão endotelial. Quando o endotélio sofre esta injúria, uma cascata imunológica começa e todo este processo desencadeado pela LDL modificada contribui para a manutenção da resposta inflamatória dentro da parede do vaso (Libby, 2002). Ao ser aprisionada na artéria, a LDL pode sofrer oxidação progressiva (Steinberg, 1997) resultando na diminuição da geração de óxido nítrico (NO) pelo endotélio (Seppo et al, 2000), através da inibição da NO sintase (Vidal et al, 1998), resultando num desequilíbrio entre vasodilatação e vasoconstricção. O endotélio agredido passa a expressar moléculas de adesão para leucócitos circulantes, tais como a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), selectinas (E e P) e integrinas, que regulam a adesão e migração das células inflamatórias, monócitos e linfócitos T, para a íntima

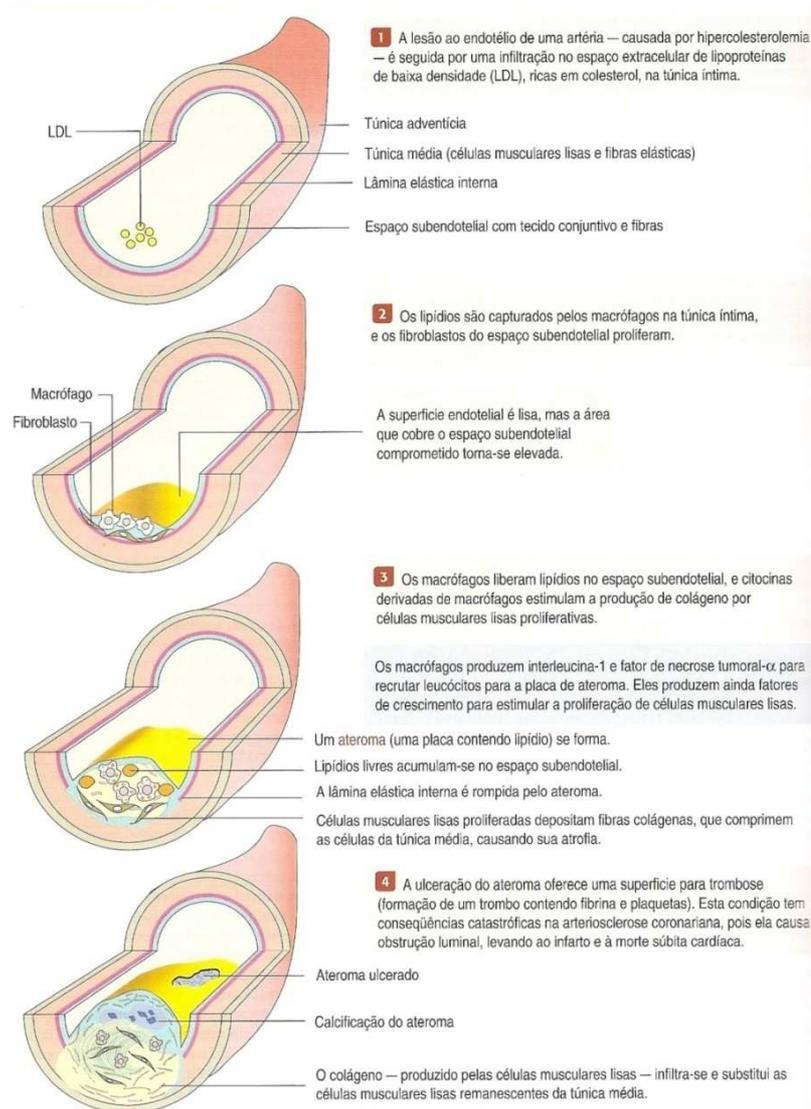
(Cushing et al, 1990; Stemme et al, 1995; Chen et al, 2002). Os monócitos transformam-se em macrófagos. Estes endocitam grande quantidade de LDL modificada através de receptores de varredura (“scavengers”), originando as células espumosas. A ativação dessas células leva à liberação de enzimas hidrolíticas, citocinas pró-inflamatórias (como TNF- $\alpha$  e interleucina-1), quimiocinas e fatores de crescimento, que ativam o sistema imune, aumentando a permeabilidade vascular e ativando as plaquetas. Esses eventos estimulam com isso, a proliferação e migração das células musculares lisas, promovendo o depósito de tecido fibroso na parede do vaso, em torno das células espumosas, e dos debrís celulares gerados pela morte dessas células (Gajdusek et al, 1980), gerando a placa ateromatosa (Jonasson et al, 1986; van der Wal et al, 1989; Libby & Ross, 1996).

O que foi descrito acima traduz a hipótese atualmente mais aceita, isto é, a estria gordurosa (lesão macroscópica mais precoce) refletiria acúmulo de células espumosas na camada íntima. Tardamente, em função da destruição dessas células, resulta no depósito extracelular de lipídeos. Porém, alguns estudos apontam para um acúmulo de lipídeos extracelulares, anterior à presença de macrófagos. Esse acúmulo se daria em áreas mais profundas da camada íntima, em regiões da parede arterial exibindo maior espessamento intimal. Napoli et al (1997) viram o acúmulo de lipídeos na íntima de uma aorta fetal humana na ausência de macrófagos. Nakashima et al (2007) descrevem a formação de estrias gordurosas, via depósito extracelular de lipídeos associados a proteoglicanos específicos, anteriores ao infiltrado de macrófagos. A progressão desse depósito estimula a migração de macrófagos para esta região, resultando na formação de células espumosas e posterior progressão da lesão ateromatosa.

Uma vez formado, os ateromas se projetam para o lúmen, enfraquecem a túnica média subjacente e sofrem uma série de complicações, que predis põem à trombose. A maioria dos infartos do miocárdio e muitos acidentes vasculares

cerebrais são devidos a rupturas de placas que não chegam a obstruir 50% da luz do vaso. Ao se romper, observa-se um extravasamento do conteúdo da placa, trombose e oclusão da artéria, culminando com o infarto do tecido abastecido pelo vaso afetado. Os principais vasos envolvidos são a aorta abdominal e as artérias coronárias e cerebrais (Kierszenbaum, 2008). As características da placa que a torna sujeita a ruptura incluem a presença de grande número de macrófagos e linfócitos T, traduzindo um alto grau de inflamação, e adelgaçamento da capa fibrosa, em função da ação de metaloproteinases liberadas neste processo inflamatório.

O esquema de todo o processo de formação da placa aterosclerótica está mostrada na figura 2.



**Figura 2:** Processo de formação de um ateroma. A LDL plasmática ao atingir a íntima arterial é retida por componentes da matriz extracelular tornando-se susceptível a sofrer modificações gerando produtos que são potentes agressores ao endotélio. Este passa a expressar moléculas de adesão para monócitos e linfócitos T que migram para a íntima. Os monócitos se diferenciam em macrófagos, sendo capazes de endocitar grande quantidade da LDL modificada, resultando num grande acúmulo lipídico em seu citoplasma dando origem às células espumosas. Por outro lado, os macrófagos ativados liberam uma série de mediadores da inflamação dando continuidade ao processo inflamatório (*fonte: Kierszenbaum, 2008*).

Na aterosclerose, agressões mínimas e crônicas ao endotélio arterial são causadas por um distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo em certos segmentos, como pontos de curvatura e áreas próximas às bifurcações do vaso. Apesar da controvérsia a respeito dos mecanismos envolvidos no início do processo aterosclerótico, o evento certamente começa na infância, progredindo então por toda a vida (Laron, 1991; Stary, 1992). Ou seja, a evolução das lesões iniciais até aquelas responsáveis pelo episódio clínico está diretamente relacionada com o envelhecimento do indivíduo. Desta forma, a idade é um fator de risco isolado para a aterosclerose dentro do grupo de fatores não modificáveis, assim como a história familiar. Desvendar os mecanismos pelos quais o processo de envelhecimento contribui para o agravamento das lesões ateroscleróticas, assim como os fatores genéticos associados à predisposição à doença, é um grande desafio na compreensão do processo aterogênico.

Quanto aos fatores de risco potencialmente modificáveis, destacamos quatro reconhecidos como principais, que são: a hipercolesterolemia, a hipertensão, o tabagismo e o diabetes. A prevenção da aterosclerose e de suas complicações passa pela avaliação do risco do paciente, onde os fatores de risco potencialmente modificáveis de maior relevância são os principais alvos a serem gerenciados (Smith et al, 2004). Neste contexto, o emprego de medicamentos como as estatinas, que controlam os níveis plasmáticos do colesterol, e os inibidores da ação da angiotensina, que reduzem a pressão arterial, vem revolucionando os eventos cardiovasculares em pacientes de alto risco. Entretanto a melhora clínica obtida em pacientes submetidos a esses tratamentos é muitas vezes independente do efeito sobre os níveis do colesterol ou da pressão arterial, sugerindo uma ação direta ou indireta dessas drogas na estabilização da placa de ateroma (Hu &, Willett, 2002; Fenster et al, 2003).

## 2. Tipos de lesões ateroscleróticas:

As lesões ateroscleróticas podem ser subdivididas morfológicamente em oito tipos, cada uma delas com composição e estrutura peculiares e grau de injúria intimal variável (Stary, 1994). A American Heart Association classifica estas lesões em dois grupos: lesões precursoras e lesões avançadas (Haust, 1990). As lesões que precedem e devem iniciar o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas avançadas são do tipo I, II e III, são silenciosas e discretas, além de não provocar desorganização da íntima. Lesões avançadas, que compreendem os tipos IV a VIII, são definidas como aquelas em que há desorganização da íntima arterial e espessamento da mesma, deformando a parede arterial. Pode provocar sérios danos, tais como trombose, embolia, hemorragia, levando ao infarto e conseqüentemente à necrose do tecido.

A distinção que separa os tipos de lesão individuais está baseada nas características morfológicas. Cada tipo de lesão a estabiliza temporariamente ou permanentemente e a transição para o próximo tipo deve requerer um estímulo adicional.

### a) Lesão do tipo I ou lesão inicial:

A lesão do tipo I consiste de um depósito de lipídeo na íntima e de reações celulares associadas com esse depósito, microscopicamente e quimicamente detectáveis. Caracteriza-se pela presença de macrófagos isolados e células espumosas (Stary, 1987; Stary, 1989). As mudanças histológicas iniciais são pequenas ou mínimas na íntima humana. É mais freqüente em jovens e crianças, embora seja encontrado também em adultos (Zinserling, 1925).

b) Lesão do tipo II ou estria lipídica:

A lesão do tipo II caracteriza-se pelo acúmulo intracelular de lipídeos. Consiste primariamente de camadas de células espumosas e células musculares lisas, com depósitos citoplasmáticos de lipídeos. Incluem lesões grosseiramente designadas estrias gordurosas, que são visíveis a olho nu como estrias amarelas na íntima das artérias. Microscopicamente, a lesão do tipo II é mais distintamente definida que a lesão do tipo I. Este tipo de lesão também contém um maior número de macrófagos e mastócitos em relação ao tipo I ou íntima normal, além de linfócitos T (Munro et al, 1987; Katsuda et al, 1992; Stary, 1990).

Cerca de 99% de indivíduos com idade entre 2 a 25 anos apresentam lesões do tipo II na aorta. Nestes indivíduos as lesões ocorrem principalmente no arco aórtico, na aorta torácica descendente e na aorta abdominal (Aschof, 1924). As lesões do tipo II podem ser subdivididas em IIa e IIb de acordo com seu estágio de progressão e características de comprometimento da íntima.

Há um pequeno subgrupo da lesão do tipo II, chamada IIa, que se situa em regiões específicas de espessamento da íntima, não estando em progressão. IIb corresponde ao maior grupo das lesões do tipo II, chamado também de progressão resistente ou lesão avançada resistente. As lesões do tipo IIb tampouco progridem, progridem lentamente, ou somente progridem em pessoas com um nível alto de lipoproteínas aterogênicas no plasma. Morfologicamente, a lesão do tipo IIa difere da IIb pela presença de células musculares lisas, a abundante da matriz intercelular no espessamento adaptativo, o grande acúmulo de lipoproteína e macrófagos, e a profundidade da localização das células espumosas na íntima e gotículas de lipídeo extracelular.

c) Lesão do tipo III ou lesão intermediária:

A lesão do tipo III caracteriza-se a priori por uma maior quantidade de colesterol não esterificado, ácidos graxos, esfingomiéline, lisolecitina e triglicéridos. É uma ponte morfológica e química entre a lesão do tipo II e o ateroma, isto é, a lesão do tipo IV. Tem como característica histológica gotículas de lipídeos extracelulares espalhadas entre as camadas musculares lisas e localizadas logo abaixo da camada de macrófagos e células espumosas. Estes pequenos depósitos de gotículas lipídicas extracelulares substituem a matriz intercelular de proteoglicanos e fibras, afastando as células musculares lisas. Posteriormente, estes pequenos depósitos lipídicos unem-se para formar um núcleo lipídico extracelular, o que caracteriza o ateroma.

d) Lesão do tipo IV ou ateroma:

O ateroma, classificado como tipo IV, é o primeiro tipo de lesão considerado como avançado pelo critério histológico, devido à desorganização da íntima e deformidade da artéria, proveniente do contínuo acúmulo de lipídeo da lesão do tipo III (Sary, 1989). Nas lesões do tipo IV há um denso acúmulo de lipídeo extracelular ocupando uma região extensa e não bem definida da íntima. É comum em adultos jovens. A íntima contém macrófagos, células espumosas e células musculares lisas, com ou sem depósitos citoplasmáticos de lipídeos. As células musculares lisas da íntima podem se encontrar calcificadas, além de encontrarmos linfócitos (Jonasson et al, 1987) e mastócitos nesta região.

e) Lesão do tipo V ou fibroateroma:

As lesões do tipo V são definidas como as lesões em que há formação de tecido conjuntivo fibroso. Caracterizam-se pelo desenvolvimento de uma ou várias camadas fibróticas ou lesões predominantemente fibróticas ou calcificadas e ocorrem, geralmente, em pessoas com mais de 40 anos. Quando há apenas formação de um agregado lipídico a lesão é chamada de tipo Va e quando há calcificação, de tipo Vb. Quando não há calcificação e o agregado de lipídeo é pequeno, a lesão é chamada de Vc. As lesões do tipo V apresentam fissuras, hematoma e/ou trombo. A presença de capilares ao redor do agregado lipídico é maior que na lesão do tipo IV, estando também presente no novo tecido formado. A lesão também apresenta linfócitos, monócitos, macrófagos e plasmócitos, freqüentemente associados aos capilares e micro hemorragias.

f) Lesões do tipo VI ou lesão complicada, lesões do tipo VII e tipo VIII:

Lesões do tipo VI são as lesões com erosões ou rupturas superficiais e/ou com hemorragia intraplaca ou depósitos trombóticos. Quando ocorre ruptura da superfície, a lesão é chamada de VIa, quando ocorre hematoma ou hemorragia é chamada de VIb, e quando ocorre trombose é chamada de VIc. Lesão tipo VIabc indica a presença de todos os eventos.

Habitualmente as lesões evoluem, sucessivamente, de I a VI, mas as lesões do tipo IV podem passar diretamente a VI e uma mesma lesão pode flutuar entre os tipos V e VI. Enquanto as lesões do tipo I a III poderiam regredir totalmente, as lesões do tipo IV a VI evoluiriam para as lesões do tipo VII, predominantemente calcificadas, ou tipo VIII, nas quais os depósitos de colágeno substituiriam o conteúdo lipídico (Stary, 1997). Estas lesões podem manifestar-se

cl clinicamente com angina e são passíveis de evoluir para a oclusão completa da artéria. Entretanto, se durante a evolução da lesão houve tempo para a indução e formação de uma circulação colateral, ao ocorrer a oclusão completa, esta poderá ser clinicamente silenciosa.

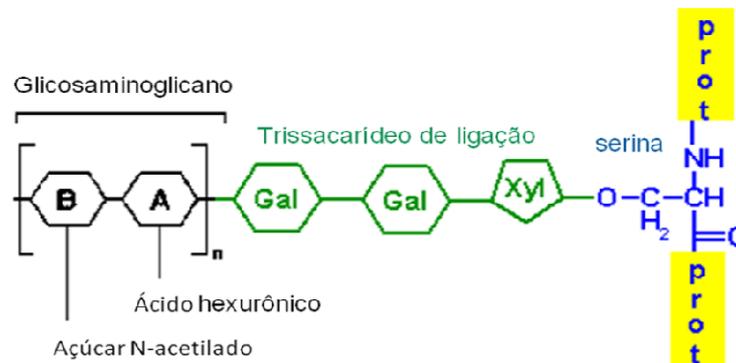
### **3. Patogenia da aterosclerose:**

Dentre as macromoléculas encontradas na parede arterial, as que mais acumulam evidências de interação com lipoproteínas plasmáticas, são os proteoglicanos (PGs), através de suas cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). São muitos os estudos que ressaltam as interações entre a LDL e cadeias de GAGs (Wight & Ross, 1975; Iverius, 1972; Iverius, 1973; Radhakrishnamurthy et al, 1975). Dentre esses estudos incluem-se aqueles que demonstram a susceptibilidade da lipoproteína para sofrer modificações quando associadas a GAGs (Camejo et al, 1991, Öörni et al, 1997). A importância desta interação no início do processo aterogênico foi elegantemente demonstrada no artigo de Skalen et al (2002), onde mutações na apo B-100 nos sítios comprometidos com a ligação aos PGs diminuíram de forma acentuada o número de lesões ateroscleróticas.

Para entender como os GAGs atuam na parede vascular e seu papel no processo aterosclerótico, é necessário que tenhamos em mente o que são GAGs, onde são encontrados, quais suas funções e como atuam.

### 3.1. Aspectos gerais dos proteoglicanos/glicosaminoglicanos:

Os proteoglicanos (PGs) são constituídos por uma cadeia protéica à qual está ligada a uma ou mais cadeias de açúcares complexos, os glicosaminoglicanos, antes conhecidos como mucopolissacarídeos (Figura 3). Na realidade, esta definição engloba uma variedade de macromoléculas que diferem em tamanho, composição e função. Com exceção do ácido hialurônico, todos os GAGs são encontrados ligados covalentemente a cadeias polipeptídicas, formando PGs. Os PGs apresentam uma grande diversidade estrutural, resultante de variações na proteína e no tipo ou quantidade das cadeias de GAGs. Estas macromoléculas estão presentes em vários órgãos e tecidos (Mathews, 1975; Cassaro e Dietrich, 1977), como componentes da matriz extracelular, inseridas na membrana plasmática ou em grânulos intracelulares (Ruoslahti, 1996; Yurt et al, 1977). Uma característica recorrente na biologia dos PGs é que sua estrutura está sujeita à extensa modulação. Mudanças na parte protéica são conhecidas, mas a maior fonte de variação estrutural são as cadeias de GAGs. Como resultado, temos um grupo de macromoléculas de grande diversidade, fato que reflete diretamente na sua capacidade de interação com uma infinidade de compostos biológicos (Wodarz e Nusse, 1998; Conrad, 1998; Kjellén e Lindah, 1991). Dessa forma, eles podem mediar interações tipo célula-matriz extracelular e célula-célula, como também capturar moléculas tais como fatores de crescimento, contribuindo para concentrá-los em determinados tecidos (Ruoslahti, 1989). Alguns PGs de membrana plasmática possuem uma capacidade intrínseca de regular o crescimento celular. Esta propriedade pode ser exemplificada com a atividade antiproliferativa de proteoglicanos de heparam sulfato (PGHS), produzidos em culturas de células musculares lisas, após atingirem o estado de confluência (Fritze et al, 1985).



**Figura 3:** Estrutura do proteoglicano.

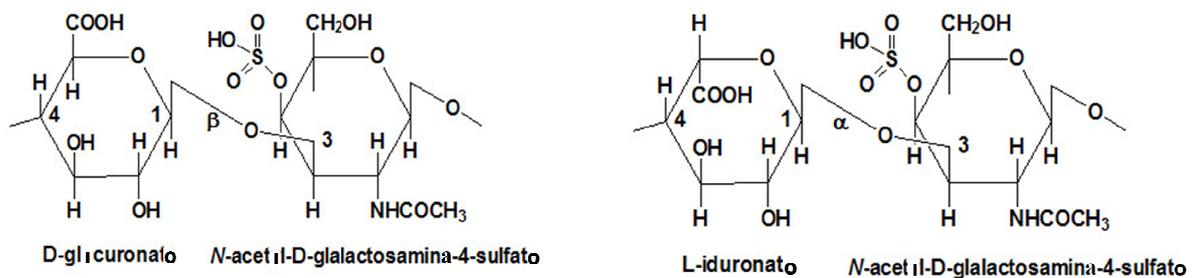
Muitas das propriedades dos PGs são conferidas por suas cadeias de GAGs, que são polímeros lineares compostos por unidades dissacarídicas repetitivas contendo uma hexosamina e um resíduo de ácido hexurônico ou galactose. Os GAGs, por serem macromoléculas biológicas que apresentam uma grande diversidade de estruturas diferentes, possuem habilidade de interação com um grande número de proteínas, incluindo proteases (como aquelas envolvidas na coagulação sangüínea), moléculas da sinalização extracelular (como quimiocinas e fatores de crescimento). Estas interações implicam em funções que incluem (a) transdução de sinal associada com processos como desenvolvimento, proliferação celular e angiogênese; e (b) adesão, localização e migração das células. Deste modo, eles podem atuar como receptores (Jackson et al, 1991; Casu & Lindahl, 2001).

A interação GAG-proteína pode requerer seqüências e padrões de sulfatação específicos da cadeia polissacarídica, como no caso da interação entre a heparina e a antitrombina (AT), o dermatam sulfato (DS) e o cofator II da heparina (HCII), o heparan sulfato (HS) e outros fatores de crescimento, etc...

Os GAGs são polímeros lineares de natureza ácida, conferida pela presença do resíduo de ácido hexurônico em suas unidades dissacarídicas e de

N- e O-sulfatações ao longo de suas cadeias. A composição das unidades dissacarídicas repetitivas e o tipo de ligação glicosídica permitem classificar os GAGs em quatro classes distintas:

1 ) Condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS): constituídos por unidades alternadas de N-acetilgalactosamina e ácido glucurônico (CS) ou idurônico (DS). São encontrados nas superfícies celulares e na matriz extracelular (Sugahara et al, 2003).

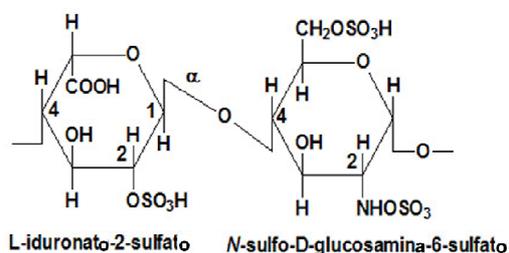


**Figura 4:** Estrutura do CS (esquerda) e DS (direita).

2 ) Heparina e heparan sulfato (HS): são unidades alternadas de glucosamina e ácido idurônico ou glucurônico. O HS é expresso em todas as células do corpo e compreende 50 a 90% do total de proteoglicanos endoteliais (Ihrcke et al, 1993). De todos os membros da família de GAGs este é o que apresenta maior variabilidade estrutural, principalmente devido às variações nos padrões de sulfatação de suas cadeias. Ainda, seu tamanho pode variar de 5 a 70 KDa (Turnbull J et al, 2001). A heparina é produzida quase que exclusivamente por mastócitos e é empregada terapêuticamente como um anticoagulante.

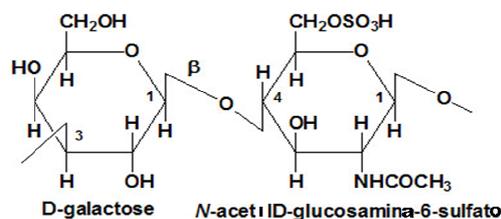
Tanto o HS quanto a heparina apresentam unidades dissacarídicas repetitivas que sofrem extensas modificações no decorrer da sua biossíntese, no

entanto, a principal diferença entre elas está no grau de sulfatação. A heparina é extensivamente *N*-sulfatada, rica em ácido idurônico e em grupamentos O-sulfato, enquanto que o HS possui maior número de regiões *N*-acetiladas não modificadas. Além da substituição de grupamentos *N*-acetil por *N*-sulfato, outros grupos sulfato ocorrem na posição 2 do ácido idurônico, na posição 6 da glucosamina e, em menor extensão, nas posições 3 da glucosamina e 2 ou 3 do ácido glucurônico (Bourin e Lindahl, 1993).



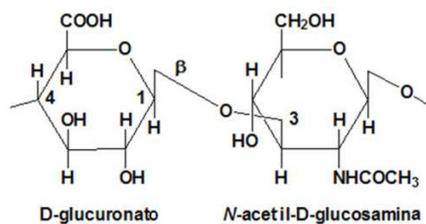
**Figura 5:** Estrutura da heparina e HS.

3 ) Queratam sulfato: único GAG que contém galactose e não ácido hexurônico como componente de sua unidade repetitiva e *N*-acetil-glucosamina. É principalmente encontrado na córnea e cartilagem (Funderburgh, 2000).



**Figura 6:** Estrutura do queratam sulfato.

4 ) Ácido hialurônico: constituído por unidades alternadas de N-acetil-glucosamina e ácido glucurônico. É conhecido como “cola” biológica por estar envolvido na lubrificação das articulações (Toole, 2004).



**Figura 7:** Estrutura do ácido hialurônico.

A Tabela 2 mostra resumidamente as diferenças entre os tipos de GAGs, assim como a posição de sulfatação e ligação glicosídica.

Glicosaminoglicano	MONOSSACARÍDEOS*	POSIÇÃO DO SULFATO	LIGAÇÃO GLICOSÍDICA
Ácido hialurônico	N-acetilglucosamina	-	$\beta(1-4)$
	Ácido glucurônico	-	$\beta(1-3)$
Condroitim 4-sulfato	N-acetilgalactosamina	4	$\beta(1-4)$
	Ácido glucurônico	-	$\beta(1-3)$
Condroitim 6-sulfato	N-acetilgalactosamina	6	$\beta(1-4)$
	Ácido glucurônico	-	$\beta(1-3)$
Dermatam sulfato	N-acetilgalactosamina	4	$\beta(1-4)$
	Ácido idurônico	-	$\alpha(1-3)$
Queratam sulfato	N-acetilglucosamina	6	$\beta(1-3)$
	galactose	-/6	$\beta(1-4)$
Heparam sulfato	glucosamina	2/6	$\alpha(1-4)$
	N-acetilglucosamina	-/6	$\alpha(1-4)$
	Ácido glucurônico	-	$\beta(1-4)$
	Ácido idurônico	-/2	$\alpha(1-4)$
Heparina	glucosamina	2/6	$\alpha(1-4)$
	ácido glucurônico	-	$\beta(1-4)$
	ácido idurônico	-/2	$\alpha(1-4)$

**Tabela 2:** Principais características estruturais dos GAGs.

Geralmente um tipo de GAG predomina numa molécula de PG, originando grupos representativos como: PGs de condroitim sulfato (PGCS); PGs de dermatam sulfato (PGDS); PGs de heparam sulfato (PGHS); e PGs de queratam sulfato. No entanto, muitos proteoglicanos, como o agregam, o sindecam e o betaglicam, possuem dois tipos de GAGs ligados ao core protéico e o tamanho e a

proporção dessas cadeias pode variar com o desenvolvimento, idade ou patologia. Na maioria dos PGs, as cadeias laterais de GAGs são fundamentais para as propriedades fisiológicas da molécula.

### **3.2. O papel dos GAGs na aterosclerose:**

O maior entendimento a respeito da patogênese das placas ateroscleróticas contribui para a compreensão dos mecanismos responsáveis pelas manifestações clínicas e do motivo da placa se manter silenciosa ou estável por alguns períodos, intercalados por complicações agudas em outros. O conhecimento da aterogênese esclarece como as intervenções terapêuticas modernas podem ser usadas para melhorar o prognóstico e sugere novos alvos para futuras intervenções (Harison, 2006).

Os GAGs estão implicados na retenção da lipoproteína na parede arterial, desempenhando um papel central no início do processo aterogênico. Lipoproteínas aterogênicas, associadas aos proteoglicanos na matriz extracelular, tornam-se mais vulneráveis a ataques oxidativos e enzimáticos gerando produtos que agredem o endotélio e desta forma desencadeando uma série de eventos característicos de resposta inflamatória. Enquanto a oxidação da lipoproteína promove sua dissociação da cadeia de GAG e subsequente captação por macrófagos, as modificações enzimáticas não oxidativas promovem o oposto: aumentam a afinidade da lipoproteína pelo proteoglicano. As modificações não oxidativas estimulam ainda mais o acúmulo de lipoproteínas. Também induzem a formação de células espumosas, resultando em um acúmulo tanto extra quanto intracelular de lipídeos na íntima arterial (Öörni & Kovanen, 2007).

Os PGs que estão presentes na parede arterial possuem cadeias de HS, condroitim 4- e 6-sulfato (C-4-S e C-6-S) e DS. Também é observada a presença de ácido hialurônico (Wagner, 1986; Alves & Mourão, 1988).

A interação dos resíduos de lisina da apoB da LDL com os grupos sulfato dos GAGs é o mecanismo pelo qual a LDL fica presa à íntima (Camejo et al, 1988). Estruturas especiais das cadeias de CS e DS são necessários para a otimização da interação com a LDL, com destaque para o tamanho e o grau de sulfatação das cadeias dos GAGs (Kjellen & Lindahl, 1991; Tovar et al, 1998; Sambandam et al, 1991). Cardoso & Mourão (1994) relataram que segmentos arteriais com maior susceptibilidade à aterosclerose exibem cadeias de CS e DS com maior afinidade pela LDL, em decorrência de seu maior peso molecular.

Em uma abordagem recente foram verificadas alterações dos GAGs arteriais em modelo de aterosclerose experimental em coelhos, avaliando o efeito da acidose no processo aterogênico. Foi verificado que a acidose afeta o conteúdo de GAGs nos animais hipercolesterolêmicos. A associação da hipercolesterolemia com a acidose tem reflexo no comprimento das cadeias de GAG, que passam a exibir peso molecular mais elevado e maior interação com a LDL. A acidose é provavelmente um agravante do processo aterosclerótico, como no paciente renal crônico (Tovar et al, 2007).

Iverius (1972) mostrou a interação do DS com LDL plasmático em condições fisiológicas, com afinidade maior quando comparado com outros GAGs, incluindo o CS. Além do aumento da afinidade, os níveis de GAGs sulfatados, como DS, aumentam durante os primeiros estágios da aterosclerose, enquanto o ácido hialurônico diminui e esta mudança acelera o desenvolvimento da aterosclerose (Stevens et al, 1976; Wagner & Salisbury, 1978). A associação do DS com apoB resulta em um aumento da retenção de LDL, captação da LDL pelos macrófagos (Vijayagopal et al, 1985) ou deixando LDL mais susceptível à oxidação (Camejo et al, 1991). Outros estudos mostraram que na maioria dos

tecidos, incluindo artérias, existem dois tipos de PGDS: biglican e decorina (Register & Wagner, 1990). Este último regula a fibrillogênese (Vogel et al, 1984), mas também se liga ionicamente à LDL. Nakashima et al (2007) descrevem a co-localização de depósito extracelular de lipídeos e dos PGs biglican e decorina na camada íntima de coronárias, em lesões iniciais da aterosclerose.

Na evolução do processo aterosclerótico ocorre uma série de modificações da parede vascular, como já discutido anteriormente, refletindo praticamente sobre todos os seus constituintes. Essas modificações vão desde alterações na concentração até modificações estruturais dos componentes, comprometendo ainda mais suas funções. Além disso, como os macrófagos começam a se acumular nas lesões do tipo II, uma série de enzimas que degradam PGs é produzida, contribuindo para intensificar as modificações da parede vascular.

Os PGHS encontrados na membrana basal e na superfície celular são importantes no processo aterogênico por que exibem efeitos antiproliferativos sobre as células musculares lisas (Schmidt et al, 1992). Essas moléculas se ligam a fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e esta interação regula a mitose dessas células na parede arterial. Mudanças na sua estrutura levam a uma diminuição da ligação ao FGF, resultando em um aumento do estímulo de FGF e da proliferação das células musculares lisas (Turnbull et al, 1992; Tyrrell et al, 1993).

A expressão de PGs de CS e DS aumenta durante o processo de aterosclerose e/ou com o avanço da idade (Wight, 1995). Por outro lado, na aterosclerose avançada, onde as lesões se tornam fibróticas, a quantidade global de PGs está diminuída (Wight, 1995; Cherchi et al, 1990).

O envelhecimento é um importante fator de risco para a aterosclerose. Deste modo, as modificações da composição dos GAGs da parede arterial, decorrentes do envelhecimento, podem contribuir para a progressão das lesões ateromatosas nas idades mais avançadas.

Nosso grupo, em estudos prévios, obteve resultados que explicaram por que as alterações encontradas na composição dos GAGs arteriais durante o envelhecimento não favorecem a interação com a LDL (Tovar et al, 1998). O envelhecimento acarreta a elevação do conteúdo de GAGs na parede da aorta, atingindo a concentração mais elevada em torno da 4<sup>a</sup>-5<sup>a</sup> década de vida, quando passa a exibir uma tendência de queda. No entanto, este aumento se deve basicamente às populações de CS, que nos ensaios de interação com a LDL exibiram interação mais fraca com esta lipoproteína. As alterações da composição dos demais GAGs foram mais discretas. Entretanto, estes dados não descartam que as modificações encontradas possam estar implicadas nas complicações da aterosclerose, por exemplo, na trombogênese.

### **3.3. O papel dos GAGs na coagulação sangüínea:**

É possível que a relevância dos GAGs vasculares esteja além da patogenia do ateroma. Uma mudança estrutural dos GAGs podem contribuir para a principal complicação clínica da doença aterosclerótica, ou seja, a trombose.

A hemostasia normal é o resultado de uma série de processos bem regulados, que controlam duas funções importantes: a manutenção do sangue num estado líquido, livre de coágulos nos vasos normais, e a indução de um tampão hemostático rápido e localizado no local da lesão vascular. Por sua vez, a trombose é um processo patológico decorrente de uma ativação inapropriada dos processos hemostáticos normais, tal como a formação de um coágulo sanguíneo (trombo) na vasculatura não lesionada ou oclusão trombótica de um vaso após lesão relativamente pequena. Tanto a hemostasia normal como a trombose são reguladas por três componentes gerais – a parede vascular, as plaquetas e o sistema de coagulação.

Num processo normal, após a lesão vascular, há inicialmente um breve período de vasoconstricção arteriolar, atribuível ao mecanismo neurogênico reflexo e potencializado pela secreção local de fatores, como a endotelina (um vasoconstrictor potente derivado do endotélio). O efeito é transitório, portanto o sangramento reiniciar-se-á se não houver uma ativação dos sistemas plaquetários e de coagulação. A lesão endotelial expõe a matriz extracelular subendotelial altamente trombogênica, permitindo a adesão e ativação plaquetária. As plaquetas sofrem uma mudança na forma e liberam o conteúdo dos seus grânulos secretórios. Em minutos, os produtos secretados recrutam e ativam plaquetas adicionais (agregação) para formar um tampão hemostático. Este processo é conhecido como hemostasia primária (Bick & Murano, 1994).

O fator tecidual, um fator pró-coagulante, também é exposto no local da lesão. Ele atua em conjunto com os fatores plaquetários secretados para ativar o sistema de coagulação, culminando na ativação da trombina. Sucessivamente, a trombina converte o fibrinogênio solúvel circulante em fibrina insolúvel, resultando na deposição local de fibrina. A trombina também induz adicionalmente o recrutamento plaquetário e a liberação granular. Esta seqüência de reações em cascata, denominada com a hemostasia secundária, leva mais tempo para ocorrer do que o tampão plaquetário inicial.

A fibrina polimerizada e os agregados plaquetários formam um tampão permanente e sólido para prevenir qualquer hemorragia adicional. Neste estágio, os mecanismos contra-regulatórios (por exemplo, o ativador do plasminogênio tecidual {t-PA}) são acionados para limitar o tampão hemostático ao local da lesão (Hoffman & Monroe, 2001). Contudo, um dos principais mecanismos de regulação da formação desse tampão hemostático ocorre através de inibidores de serino-proteases (serpinas) presentes no plasma. Entre as serpinas, destacam-se a antitrombina (AT) e o cofator II da heparina (HCII) (Bourin e Lindahl, 1993), que

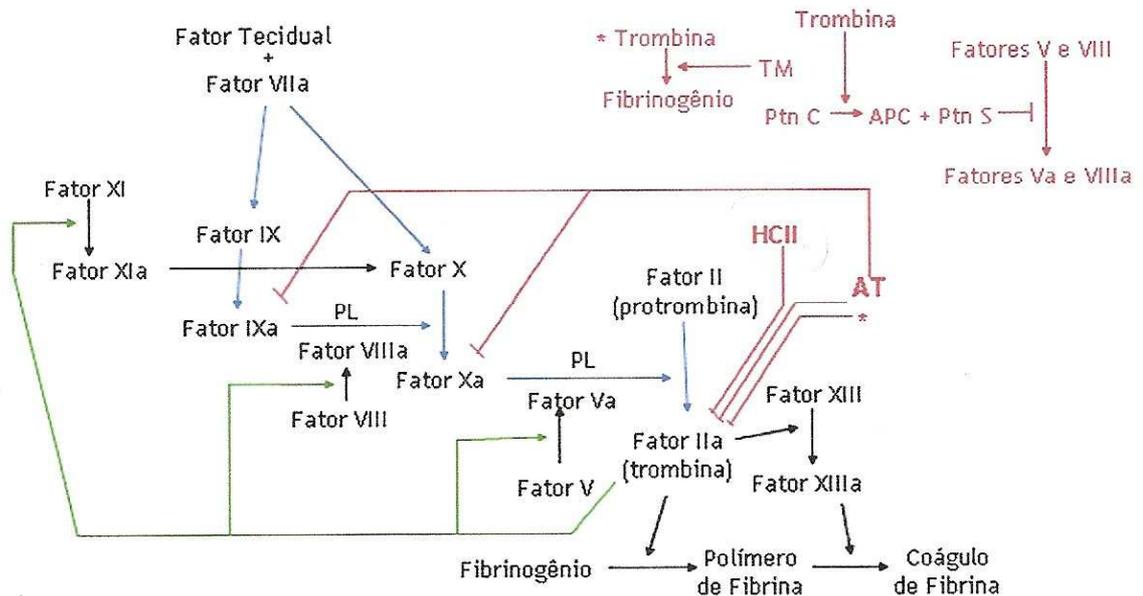
apresentam sua atividade acelerada na presença de determinados GAGs da parede arterial (HS e DS, respectivamente).

As plaquetas são outro componente essencial para a ativação do sistema de coagulação. Inicialmente as plaquetas aderem a macromoléculas das regiões subendoteliais do vaso sanguíneo lesado. As plaquetas circulantes ligam-se ao colágeno, exposto no sítio da lesão, por meio de uma ponte formada pelo fator de von Willebrand (vWF), uma glicoproteína plasmática, e outras glicoproteínas presentes em sua superfície, formando assim um tampão hemostático primário. Depois de aderidas, sofrem degranulação e tornam-se ativadas, promovendo mudança de forma e alteração de glicoproteínas da superfície da membrana para permitir agregação. Como resultado dessa ativação e agregação plaquetária, ocorre exposição de fosfolipídios que são críticos para a interação e a ligação de fatores da coagulação. As plaquetas estimulam a ativação local dos fatores plasmáticos de coagulação, e isso conduz à geração de um coágulo de fibrina que reforça o agregado plaquetário. Mais tarde, à medida que ocorre a cicatrização da lesão, o agregado plaquetário e o coágulo de fibrina são degradados (Mann, 1997).

### **3.3.1. O sistema de coagulação**

Hemostasia ou mecanismo hemostático é o processo fisiológico e dinâmico que, ao nível do sistema vascular, procura manter o equilíbrio entre vários fatores plasmáticos e celulares com a finalidade de evitar perdas sangüíneas e assegurar a fluidez do sangue. O sangue é um tecido especial, formado por células em suspensão num meio líquido – o plasma. Os sistemas fisiológicos que controlam a fluidez do sangue são complexos e refinados. O sangue tende a ser fluido no interior dos vasos íntegros e, simultaneamente, coagula rapidamente ao ser

exposto a superfícies não endoteliais, em locais de lesão vascular. A saúde das células e dos órgãos depende, criticamente, de uma circulação contínua para distribuir oxigênio e nutrientes e para remover os dejetos. A homeostase normal do líquido abrange a manutenção da integridade da parede do vaso, bem como a pressão intravascular e a osmolaridade dentro de variações fisiológicas. Por outro lado, anormalidades da permeabilidade vascular ou da hemostasia pode resultar em lesão, mesmo no cenário de um aporte sanguíneo intacto. A homeostase normal do líquido também significa manutenção do sangue fluido até determinado momento, quando numa lesão necessita da formação do coágulo. A coagulação em locais inapropriados (trombose) ou a migração desses coágulos (embolia) obstrui o fluxo sanguíneo aos tecidos e leva à morte da célula (infarto). Reciprocamente, a inabilidade em coagular após a lesão vascular resulta em hemorragia. O sangramento local pode comprometer a perfusão regional do tecido, enquanto a hemorragia mais extensa pode resultar em hipotensão acentuada (choque) e morte.



**Figura 8:** Esquema do mecanismo de coagulação. A hemostasia é desencadeada por uma lesão vascular com exposição do fator tecidual levando à ativação da cascata de coagulação (em azul). No mesmo momento da ativação da cascata uma série de ações antagônicas a este processo é desencadeada modulando a hemostasia (destacada em vermelho). A trombina gerada exerce *feed-back* positivo em vários pontos da cascata de coagulação (em verde). (fonte: Stelling, 2007).

- Fase de iniciação da coagulação sangüínea

Originalmente, foram descritas duas vias separando didaticamente a coagulação sangüínea: a via intrínseca ou via de contato e a via extrínseca ou via do fator tecidual. No entanto, para um melhor entendimento do sistema de

coagulação, atualmente se prefere usar os termos fase de iniciação e propagação, já que as duas fases são fisiologicamente bem intrincadas e são altamente complexas (Becker, 2005) (Figura 8). A fase de iniciação é ativada quando o plasma, contendo fator VII ou VIIa, entra em contato com o fator tissular (FT), exposto no local da lesão. Ao contrário dos outros fatores do sistema de coagulação, o FT sempre está presente como um co-fator ativado e é essencial para a vida (Bugge et al, 1996). O FT não é normalmente expresso em células que entram em contato com o plasma, porém, quando há uma injúria vascular, as células agora expostas expressam este fator ligado à membrana, que desse modo pode se ligar ao fator VIIa plasmático. A ligação do fator VIIa ao FT leva à formação do complexo FT-VIIa, um potente ativador do sistema de coagulação.

O fator VII é uma proteína plasmática dependente de vitamina K, produzida no fígado. Embora aproximadamente 99% do fator VII estar presente no estado inativo, 1% está presente como uma serino-protease ativa, o fator VIIa (Morrisey, 2001). Entretanto, quando o fator VIIa está livre, não fazendo parte do complexo FT-VIIa, ele é uma enzima relativamente fraca.

Uma vez formado o complexo FT-VIIa na superfície celular, este atua em dois potentes substratos: fator IX e o fator X. O fator IX é convertido a IXa, ativando o fator X, que é convertido a Xa. Essa reação é acelerada intensamente pelo fator VIIIa. *In vitro*, o fator X é o substrato preferido pelo complexo, mas *in vivo* esta via não é bem conhecida, podendo ser dependente dos fatores locais (Morrisey, 2001). O fator Xa, por sua vez, atua sobre a protrombina, culminando na geração de trombina (fator IIa), numa reação que é acelerada pelo fator Va. A partir daí, através de um *feed-back* positivo, uma série de proteases plasmáticas (zimogênios) são ativadas, culminando na amplificação da geração de trombina (fase de propagação da coagulação).

- Fase de propagação da coagulação

A trombina é a enzima efetora final do sistema de coagulação. Sua ação não se restringe apenas à clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina. Também atua na amplificação do mecanismo de coagulação através da ativação de alguns fatores do sistema, tais como fatores V, VIII e XI (fase de propagação), age como potente agonista da ativação plaquetária (Dahlback, 2000), além de uma reconhecida atividade pró-inflamatória.

A observação de que a trombina também pode ativar o fator XI sugere que a função principal deste fator não é iniciar a coagulação, mas sim a produção secundária de trombina, que é essencial para a hemostasia (Gailani & Broze, 1991). O estudo da trombofilia Leiden mostrou que o aumento nos níveis do fator XI é um risco aumentado para a trombose. Isso sugere, mais uma vez, que a função do fator XI é a geração secundária de trombina (Meijers et al, 2000).

Na etapa final do mecanismo de coagulação, a trombina cliva o fibrinogênio para gerar monômeros de fibrina, os quais polimerizam e ligam-se uns aos outros, formando um coágulo quimicamente estável (Rosenberg e Aird, 1999).

- Modulação da coagulação

A modulação inibitória das reações da coagulação é extremamente complexa e de fundamental importância para a hemostasia, uma vez que impede a extensão do coágulo além do sítio da injúria. Esta regulação acontece em cada estágio do sistema de coagulação, seja através de inibição enzimática ou pela modulação da atividade dos cofatores.

A trombina pode ser inibida por duas serpinas, a AT e o HCII, que são produzidas no fígado e circulam no plasma em concentrações micromolares

(Bock, 2006). Essas serpinas são pouco ativas como inibidores das proteases da coagulação. Porém, após se ligarem aos GAGs, a velocidade da inibição aumenta aproximadamente cerca de 1000 vezes (Figura 9). A AT inibe muitas das enzimas do sistema de coagulação, além da trombina. Componentes chaves do sistema, tal como os fatores IXa, Xa e trombina, ligam-se rapidamente à AT e são neutralizados. A habilidade da AT em inibir estes fatores é acelerado pelos PGHS e esta é a base para a ação anticoagulante das heparinas farmacêuticas. A AT inibe a trombina livre e o fator Xa mais eficazmente do que quando associados ao complexo de ativação; ela tem o efeito de remover estas proteases da circulação e limitar sua atividade ao sítio da formação do coágulo.

A trombina se liga a AT formando o complexo covalente trombina-antitrombina (IIa-AT), que é rapidamente eliminado da circulação (Fuchs, Shiffman & Pizzo, 1982). Os níveis do complexo IIa-AT são também usados como um marcador de hipercoagulabilidade por refletir a produção de trombina (Lopez et al, 1999).

A AT tem um papel essencial no controle da coagulação e sua ausência é incompatível com a vida, enquanto deficiência parcial dos seus níveis plasmáticos pode causar um problema clínico. Uma concentração de AT abaixo de 60-70% está associada com a trombose (Kauffman et al, 1978; Francis et al, 1992). Aproximadamente 5% dos pacientes com trombose venosa apresentam deficiência de AT, e deficiências herdadas ou adquiridas têm sido descritas (Harper et al, 1991).

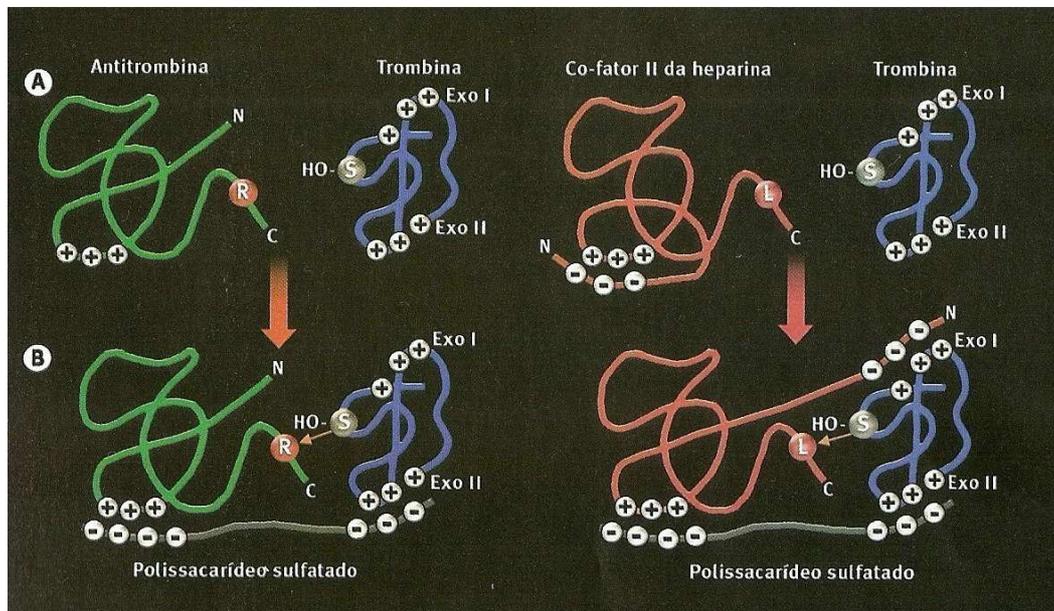
O HCII é uma glicoproteína plasmática com ação inibitória somente sobre a trombina. Assim como a AT, sua atividade inibitória ocorre através da formação de um complexo covalente com a trombina, que cliva inicialmente a ligação peptídica entre os resíduos Leu<sup>444</sup> e Ser<sup>445</sup> da protease, com liberação de um segmento peptídico. O HCII também possui uma fraca atividade inibitória da trombina na ausência de GAGs. Porém, seu potencial inibitório é aumentado em muitas vezes

na presença de cadeias de DS (Tollefsen et al, 1983), encontradas principalmente na matriz extracelular e em pequenas quantidades na superfície de células musculares lisas.

Tanto a AT quanto o HCII tem os seus efeitos inibitórios sobre a trombina potencializados por certos GAGs, como já mencionamos. A AT é ativada com maior eficiência por heparina ou PGHS sintetizados pelas células do endotélio vascular, produzindo um efeito antitrombótico na interface entre o endotélio e o sangue. O HCII é ativado pelo DS e HS (Tollefsen & Zhang, 2006).

Além disso, determinadas deficiências de fatores anticoagulantes plasmáticos estão relacionadas com a propensão à trombose em leitos vasculares específicos (Rosemberg, 1999), que por sua vez poderiam ser influenciados pela composição dos GAGs locais.

Tanto biglican quanto decorina aceleram a inibição da trombina pelo HCII e a co-localização desses PGs com HCII na parede arterial sugere que essas duas moléculas têm um papel importante na modulação da atividade pró-aterogênica da trombina (Shirk et al, 2000). É importante ressaltar que deficiências do HCII estão relacionadas a um aumento da resposta arterial à injúria (Vicente et al, 2007) sinalizando para um papel chave desta serpina, e conseqüentemente das cadeias de DS, no remodelamento arterial, como no caso da restenose.



**Figura 9:** Representação molecular da ação anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados. A trombina (em azul) é inibida pela ação da AT (em verde) e do HCII (em laranja). Em ambos os casos, o polissacarídeo sulfatado aproxima o inibidor e a trombina, através da interação de suas cargas negativas com as cargas positivas dessas moléculas (na trombina, a interação ocorre no sítio denominado EXO II). Em seguida, o grupo hidroxila (-OH) do aminoácido serina (S), presente na trombina, liga-se a aminoácidos situados na extremidade “C” dos inibidores – a arginina (R), na AT, e a lisina (L), no HCII. No entanto, o polissacarídeo sulfatado altera o mecanismo anticoagulante do HCII, induzindo nesse inibidor uma modificação estrutural que permite a interação de sua extremidade “N” com o sítio EXO I da trombina (*fonte: Mourão & Pomin, 2003*).

Modificações dos GAGs decorrentes da progressão das lesões ateromatosas poderiam estar associadas com a formação de trombos nesses locais. O DS é o GAG que exibe maior potencial anticoagulante e antitrombótico na parede vascular (Tovar, 2005). Shirk et al (2000) relataram a presença de cadeias de DS com menor potencial anticoagulante nas lesões ateroscleróticas. Assim, os PGs decorina e biglicam da placa aterosclerótica possuem uma

atividade reduzida via HCII. A perda da habilidade destes dois PGs nas lesões ateroscleróticas em regular a atividade da trombina através do HCII deve ser importante para a progressão da doença. O HCII interage com DS na parede dos vasos após uma injúria e esta interação modula a formação do trombo *in vivo* (Vicente & Tollefsen, 2004). Isso sugere que desordens no metabolismo do DS devem contribuir para uma patologia vascular pela diminuição da atividade do HCII, por exemplo, em lesões ateroscleróticas (Shirk et al, 2000; He et al, 2008).

Theocharis et al (2002) observa uma redução da concentração total dos GAGs em lesões ateroscleróticas do tipo V e em aneurismas de aorta abdominal (AAA). Relata ainda alteração na composição das unidades dissacarídicas presentes em cadeias de DS, com diminuição na proporção os dissacarídeos 2,6- e 2,4-dissulfatados, apesar da concentração do DS estar pouco afetada em ambas as patologias.

Os dados relatados acima apontam para uma possível participação dos GAGs vasculares na aterotrombose.

Corroborando essa hipótese, Marinho (2008) mostrou uma redução marcante no conteúdo de HS (80%) e de CS (60%) em AAA (n=11), em comparação com amostras de aorta abdominal de doadores cadáveres (n=9), utilizadas como controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Teocharis (1999). No entanto, ao avaliar o potencial anticoagulante dos GAGs extraídos de AAA, verificamos uma maior atividade das cadeias de heparan sulfato nessas amostras quando comparadas aos controles normais. A grande discussão em relação a esses achados está na diferença de idades entre os dois grupos estudados: controles normais (~37 anos) e AAA (~74 anos). Também é relevante a presença marcante de lesões ateroscleróticas avançadas nas amostras aneurismáticas, que colocam em dúvida se os resultados obtidos refletem alterações relacionadas à idade, ao processo patológico do AAA ou da aterosclerose.

Desse modo, o estudo desenvolvido nesta dissertação visa esclarecer se as diferenças no potencial anticoagulante encontradas nas amostras aneurismáticas seriam relativas ao processo aneurismático em si ou estariam relacionadas ao processo aterosclerótico concomitante. Para isto foi analisado o potencial anticoagulante dos GAGs extraídos de áreas preservadas da parede de aorta, comparando com os obtidos de áreas exibindo diferentes graus de lesão aterosclerótica, em paciente com idade superior a 70 anos.

## **II. OBJETIVO:**

O objetivo geral desta dissertação é avaliar a influência do processo aterosclerótico sobre o potencial anticoagulante dos GAGs aórticos e correlacionar os resultados com os de aneurisma de aorta abdominal (AAA).

### **Objetivos específicos**

- Determinar a concentração e a composição dos GAGs no segmento da aorta proximal, torácica e abdominal;
- Comparar a concentração e a composição dos GAGs aórticos presentes em áreas normais e em áreas exibindo diferentes graus de lesão aterosclerótica (lesão do tipo IV-V e do tipo VI-VII) e confrontar esses resultados com os obtidos de AAA.
- Avaliar o potencial anticoagulante dos GAGs aórticos presentes em áreas normais e com diferentes graus de lesão aterosclerótica (lesão tipo IV-V e lesão tipo VI-VII), correlacionando os resultados com os de AAA.
- Avaliar o efeito das cadeias de HS aórtico, extraídas de áreas normais e de áreas exibindo diferentes graus de lesão aterosclerótica (lesão tipo IV-V e lesão tipo VI-VII), sobre a inibição da trombina e do fator Xa pela AT, comparando com os resultados de AAA.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras

**3.1.1** Para uma análise mais detalhada das lesões produzidas pela aterosclerose, utilizamos um exemplar de aorta humana de indivíduo do sexo feminino, 78 anos, submetido à autopsia no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ). A aorta foi acondicionada em álcool 70% para transporte até o laboratório onde foi armazenada em acetona até ser processada.

A camada adventícia foi retirada e a aorta foi separada em três segmentos: proximal, torácico e abdominal, que por sua vez foram subdivididos em grupos de acordo com o seu aspecto macroscópico. Área N: áreas exibindo aspecto macroscópico normal; Área L, áreas exibindo lesões ateroscleróticas tipo IV-V; Área LL, de áreas exibindo lesões de grau mais avançado, lesões ateroscleróticas do tipo VIa- VII, de acordo com a classificação da *American Heart Association*.

**3.1.2** Também foram utilizadas amostras de GAG total obtidas de saco aneurismático de 11 pacientes submetidos à cirurgia eletiva para correção de aneurisma de aorta abdominal (AAA) realizadas no HUCFF/UFRJ e de aorta abdominal justa-renal normal (sem evidência macroscópica de lesão aterosclerótica) de 9 doadores cadáveres de órgão (D) utilizadas nos estudos de Marinho (2008), gentilmente cedidas pela Dra. Ana Cristina O. Marinho. A média de idade dos indivíduos referentes às amostras de AAA foi de 73,7 anos e às de doadores sãos foi de 36,9 anos.

### 3.2. Isolamento e purificação dos GAGs

Após a separação das diferentes áreas (N, L e LL) de cada segmento da aorta, as mesmas foram picadas em pedaços de aproximadamente 1mm<sup>2</sup> e submetidos à delipidação com uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1,v/v), à temperatura ambiente por pelo menos 24h, sob agitação intermitente. A partir da massa delipidada das diferentes amostras foram feitas várias extrações. Para cada extração aproximadamente 1 g de tecido seco e delipidado foi reidratado em solução acetado de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA dissódico 5 mM por 24 horas e submetido à digestão proteolítica com papaína a uma massa equivalente a 10% do peso seco da amostra. A digestão foi então processada a 60°C por 24 horas. Após digestão completa do tecido, o material foi centrifugado e o sobrenadante foi precipitado com cloreto de cetil-piridina (CPC) a 0,5% por 24 horas à temperatura ambiente. Novamente o material foi centrifugado, lavando-se o precipitado com 0,05% de CPC. Para a retirada do CPC o pellet foi solubilizado com NaCl 2M:etanol (100:15 v/v), reprecipitando o GAG com dois volumes de etanol absoluto *overnight* a - 20°C. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado 2x com etanol 80% para retirada do sal e 1x com etanol absoluto. O material precipitado foi ressuspensionado em água destilada (500 µL de água para cada 100 mg de tecido seco).

Para retirar a possibilidade de interferência do método de extração sobre os resultados obtidos foram realizadas 10 extrações da Área N (4 referentes ao segmento proximal, 3 ao segmento torácico e 3 ao segmento abdominal), 14 extrações da Área L (3 referentes ao segmento proximal, 4 ao segmento torácico e 7 ao segmento abdominal) e 17 extrações da Área LL (4 referentes ao segmento proximal, 3 ao segmento torácico e 10 ao segmento abdominal).

As amostras de GAG total cedidas pela Dra. Ana Cristina Marinho correspondem a uma extração de cada espécime de amostra de aorta abdominal, AAA ou D.

A concentração de GAG nos tecidos foi estimada pelo conteúdo de ácido hexurônico, medido através da reação do carbazol e expressa como o teor de ácido hexurônico por massa de tecido seco (Bitter & Muir, 1962).

### **3.3. Eletroforese:**

Para a identificação da composição dos GAGs sulfatados nas amostras, cerca de ~5 µg (em teor de ácido hexurônico) do total de GAG extraído de cada digestão foram aplicados em gel de agarose 0,5% em tampão 1,3-diaminopropano/acetato 0,05 M, pH 9,0. Após a eletroforese (120 V por 1 h) os GAGs foram fixados no gel com cetavlon 0,1%, *overnight* à temperatura ambiente e corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético/ etanol/ água (0,1:5:5, vol/vol/vol).

Para a avaliação do peso molecular médio das cadeias de GAGs as amostras de GAG (~ 5 µg em teor de ácido hexurônico) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 6%, com 1 mm de espessura, em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,6. Após a corrida (120 v por 30 min) o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em 1% de ácido acético. Como marcadores de peso molecular foram utilizados padrões de GAG com peso molecular médio de 60 e 40 kDa, além de dextran sulfato com peso molecular de 8 kDa.

A concentração relativa e a distribuição do peso molecular das espécies de GAGs sulfatadas foi avaliada através densitometria das lâminas de agarose ou PAGE utilizando o programa *Molecular Analyst* da Bio-Rad.

### **3.4. Fracionamento das cadeias de GAGs**

*Pools* referentes aos GAGs extraídos das áreas N, L e LL, como também às amostras de AAA e de D, foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna de Mono Q acoplada a um sistema de FPLC, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, sob fluxo de 1 mL/min. A eluição do material retido foi realizada aplicando-se gradiente linear de NaCl (0,4 a 2,0 M), no mesmo tampão, após lavagem prévia com solução contendo 0,4 M de NaCl. Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas e analisadas quanto ao seu conteúdo de ácido hexurônico (reação do carbazol) (Bitter & Muir, 1962). As frações referentes aos picos do HA, HS e CS+DS foram agrupadas e precipitadas com 2 volumes de etanol absoluto, *overnight* à – 20°C. Após lavagem com etanol a 80% (2x) e etanol absoluto (1x) os GAGs recuperados foram secos à temperatura ambiente e posteriormente dissolvidos em água.

O *pool* N foi constituído com 90 µg (em teor de ác. hexurônico) do GAG total obtido de cada extração da área normal, o *pool* L com 80 µg de cada extração da área L e o LL com 50 µg de cada extração da área LL. Em relação aos *pools* de AAA e D, estes foram constituídos com 40 µg de cada amostra de GAG total.

### **3.5. Tratamento com condroitinase ABC**

Para a avaliação do potencial anticoagulante específico das cadeias de HS presentes nas frações obtidas pela cromatografia de troca iônica, as mesmas foram submetidas a tratamento com condroitinase ABC (Chase ABC), que degrada cadeias de CS e DS. 50 µg (em teor de ácido hexurônico) das frações de CS+DS e HS foram incubadas com 5 mU de Chase ABC (*Seikagaku Corporation*

– *Code Number* 100330) em 200 µL de tampão etilenodiamino/ácido acético 50 mM, pH 7,0, por 24 horas a 37° C. Este tratamento foi repetido 2 vezes para assegurar que a totalidade das cadeias de CS e de DS foram clivadas pela enzima. Após o tratamento, o material foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto, a mistura mantida por 24 horas à - 18°C e os GAGs recuperados por centrifugação (45 minutos a 3200 rpm). A eficiência do tratamento, degradação das cadeias de CS e DS, foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

### **3.6. Avaliação da atividade anticoagulante dos GAGs**

A atividade anticoagulante dos GAGs foi avaliada por ensaio amidolítico baseado na determinação da atividade da protease da coagulação (IIa ou Xa) sobre seu substrato cromogênico específico, na presença de plasma, AT ou HCII, variando-se a concentração dos GAGs, de acordo com metodologia previamente descrita por Abildgaard & Larsen (1984). Os ensaios foram monitorados em leitor de placas de 96 poços modelo *Versa<sub>max</sub>* (*America Devices*, USA).

A  $\alpha$ -trombina, o fator Xa, AT e HCII humanos utilizados foram adquiridos da *Hematologic Technologies Inc.*, USA. Os substratos cromogênicos, S-2238 para a trombina e S-2765 para o Xa, foram adquiridos da *Chromogenix AB*, Itália. O *pool* de plasma humano foi obtido de doadores sadios do Banco de Sangue do HUCFF/UFRJ. Os ensaios foram realizados à 37° C com volume final de 100 µL, em tampão Tris/HCl 15 mM, pH 7.4 contendo NaCl 0,15 M e polietilenoglicol 8.000 1mg/ml. A concentração final nos ensaios de IIa ou Xa foi de 2nM, AT ou cofator II da heparina de 10nM, dos substratos cromogênicos de 100 µM e a diluição final do plasma foi de 120 vezes.

Nos ensaios, diferentes concentrações da amostra de GAG são incubadas a 37° C com a trombina e o inibidor (AT, HCII ou plasma) por 5 minutos. Após esse período o substrato cromogênico é adicionado e a placa imediatamente colocada no leitor de ELISA. A absorvância a 405 nm é monitorada através de 12 leituras no decorrer de 5 minutos de reação (programa utilizado: *Soft Max Pro*). O resultado é expresso como a variação da absorvância por minuto ( $\Delta A/mim$ ), convertida em porcentagem de trombina ativa.

### **3.7. Análise estatística**

Para a análise estatística foi aplicado o teste *Mann-Whitney Rank Sum*, utilizando o programa *Sigma Stat 3.0*. Foi considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .

#### **IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

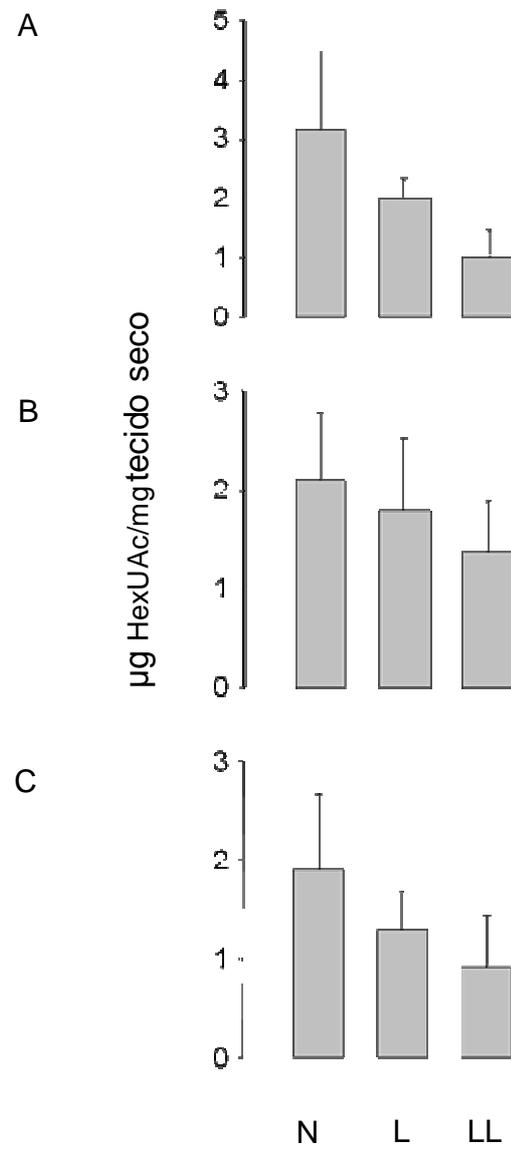
A concentração e composição dos GAGs da parede arterial humana já foram exaustivamente estudadas. Esses estudos abrangeram tanto vasos normais como vasos apresentando alto grau de lesões ateroscleróticas. A aorta foi a artéria mais estudada, principalmente em função de seu tamanho e facilidade de dissecação. Como já foi realçado anteriormente, as lesões ateroscleróticas mais avançadas exibem uma menor concentração de GAGs quando comparadas com regiões sem lesão da parede arterial (Iverius, 1972; Stevens et al, 1976; Wagner & Salisbury, 1978; Teocharis et al, 2002). Entretanto, muitos desses estudos envolveram amostras de vasos de diferentes indivíduos, e em muitos casos as amostras controle utilizadas correspondiam a indivíduos bem mais jovens do que os das amostras lesionadas. Sob o aspecto funcional dos GAGs na fisiologia e patogenia da parede arterial, a maioria dos estudos foi direcionada para a interação das cadeias desses polissacarídeos com lipoproteínas plasmáticas e a implicação dessas interações na aterogênese. Mais recentemente, vem sendo relatada a participação de determinadas cadeias de GAGs vasculares na modulação da atividade de proteases da coagulação, com importantes conseqüências na resposta do vaso às agressões sofridas. Têm sido relatadas alterações estruturais nas cadeias de DS, com provável prejuízo do seu potencial anticoagulante em lesões ateroscleróticas, apesar de sua concentração não estar comprometida (Shirk et al, 2000; Theocharis et al, 2002). Outro GAG que tem sua concentração significativamente diminuída nas lesões ateroscleróticas é o HS, que em lesões aneurismáticas também exhibe alterações estruturais com redução de unidades dissacarídicas N-sulfatadas (Theocharis et al, 1999 e 2002). No entanto, nenhum desses estudos avaliaram diretamente o potencial anticoagulante dos GAGs extraídos de lesões ateroscleróticas. Por outro lado, estudos do nosso

laboratório mostraram que o potencial anticoagulante global dos GAGs em AAA não é menor daqueles extraídos da parede de aortas abdominal controle (D). Na realidade, embora não apresentem diferença significativa, os resultados apontaram para um aumento da atividade anticoagulante dos GAGs de AAA. Mais surpreendente ainda, nos ensaios com AT, onde analisamos mais especificamente as cadeias de HS, os extratos de GAG total de ambos os grupos (D e AAA) exibiram o mesmo potencial anticoagulante, apesar da concentração relativa das cadeias de HS nas amostras aneurismáticas encontrarem-se significativamente diminuída (Marinho, 2008).

Em face das considerações acima e na tentativa de minimizar a interferência da idade, possíveis diferenças entre indivíduos e de variações na avaliação macroscópica da parede arterial, realizamos nessa tese estudos de um único espécime de aorta, com várias extrações de cada grupo, desse modo minimizando a interferência do método de avaliação.

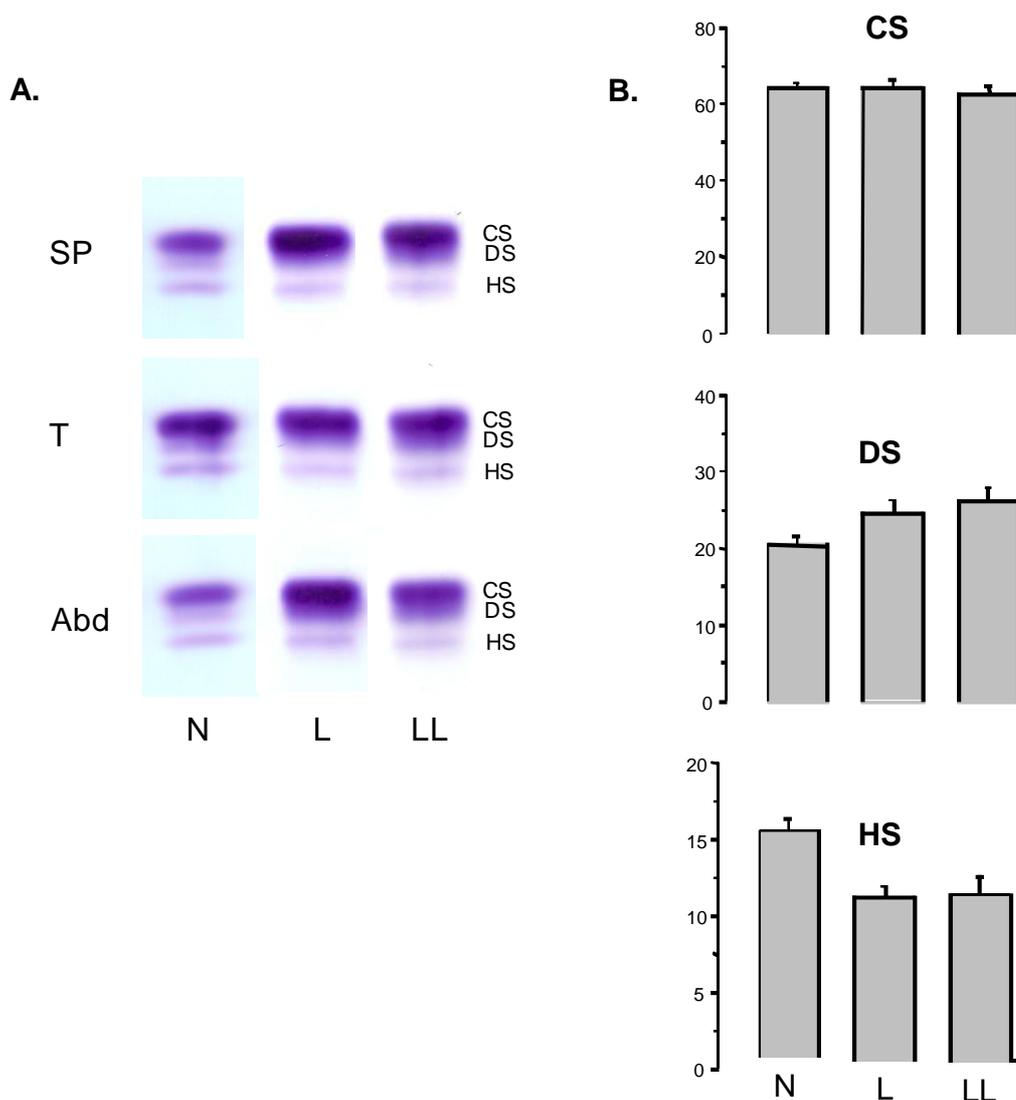
#### **4.1. Variações da concentração e composição relacionadas ao processo aterosclerótico dos GAGs nos diferentes segmentos da aorta:**

Como já foi publicado anteriormente, determinados sítios ao longo da artéria são mais propensos ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Da mesma forma, determinadas artérias exibem maior susceptibilidade à aterosclerose. Em relação à aorta, lesões ateroscleróticas podem ocorrer em todo seu trajeto, porém o segmento abdominal é o mais afetado. Cardoso & Mourão (1994), ao estudar a parede de aorta torácica e abdominal, não observaram diferenças significativas na composição e propriedades dos GAGs entre estes dois segmentos. Entretanto, o estudo limitou-se a áreas normais em amostras de adultos jovens. Portanto, não sabemos quais as influências que esses segmentos podem sofrer no decorrer do envelhecimento e da evolução das lesões ateroscleróticas. Desse modo, avaliamos se ocorrem alterações na concentração e na composição dos GAGs em lesões ateroscleróticas dos segmentos proximal, torácico e abdominal da aorta. Como podemos observar na Figura 10, as extrações correspondentes às áreas normais (grupo N) exibem concentrações de GAGs semelhantes ( $p > 0,5$ ) nos três segmentos aórticos,  $3,15 \pm 1,01$  ( $n=4$  extrações),  $2,11 \pm 0,46$  ( $n=3$  extrações) e  $2,22 \pm 0,40$  ( $n=3$  extrações)  $\mu\text{g HexUAc} / \text{mg}$  de tecido seco, para os segmentos proximal, torácico e abdominal, respectivamente. Em relação às áreas ateroscleróticas a concentração dos GAGs diminui de acordo com o grau da lesão (L e LL), indistintamente do segmento a que pertença. Os valores obtidos foram: grupo L:  $1,99 \pm 0,26$  ( $n=3$  extrações),  $1,79 \pm 0,56$  ( $n=4$  extrações),  $1,49 \pm 0,65$  ( $n=7$  extrações) e LL:  $1,01 \pm 0,40$  ( $n=4$  extrações),  $1,38 \pm 0,35$  ( $n=3$  extrações) e  $0,92 \pm 0,42$  ( $n=10$  extrações)  $\mu\text{g HexUAc}/\text{mg}$  de tecido seco, para os segmentos proximal, torácico e abdominal, respectivamente.



**Figura 10:** Concentração de GAG (teor de ácido hexurônico/mg tecido seco) no segmento proximal (A), torácico (B) e abdominal (C), referentes às áreas N, L e LL.

Da mesma forma, a composição relativa das espécies de GAGs sulfatados foi semelhante (Figura 11 A), independentemente do segmento da aorta, porém sendo observadas uma diminuição da proporção de HS e elevação de DS nas lesões ateroscleróticas (Figura 11 B).



**Figura 11:** Composição e concentração relativa dos GAGs sulfatados presentes nos diferentes segmentos e suas respectivas áreas. (A) Composição dos GAGs sulfatados no segmento proximal (SP), torácico (T) e abdominal (Abd), das áreas N, L e LL; (B) porcentagem de CS, DS e HS global estimada pela análise densitométrica das eletroforeses em gel de agarose referentes às áreas N, L e LL.

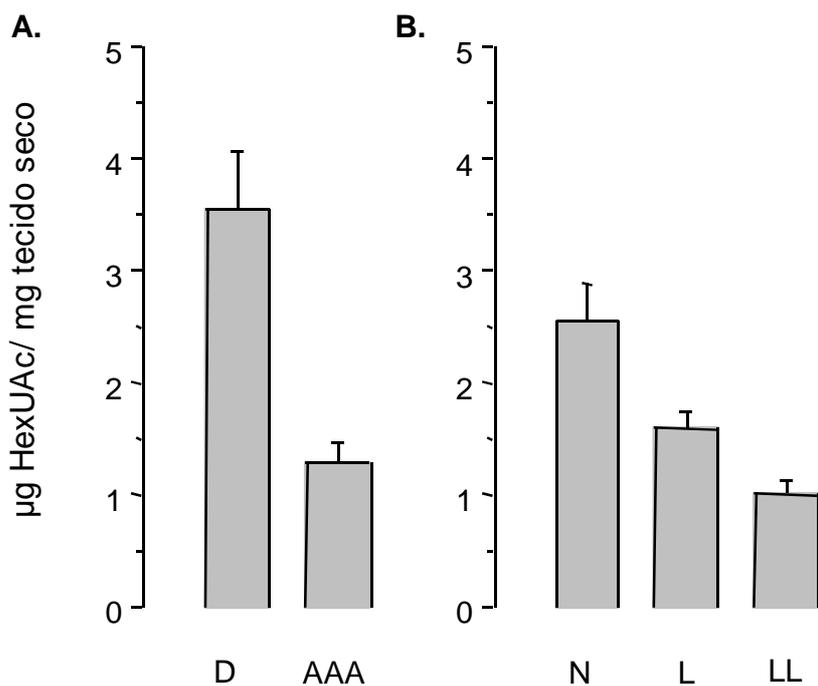
## **4.2. Comparação da concentração total e específica dos GAGs aórticos em função da idade e do tipo de lesão da parede arterial:**

A próxima etapa do trabalho foi comparar as alterações observadas com a idade e a lesão aterosclerótica com aquelas de AAA.

As amostras estudadas por Marinho (2008) correspondem ao segmento abdominal da aorta. No entanto, conforme descrito no item anterior, não observamos diferenças no conteúdo e composição dos GAGs dentro de um mesmo grupo entre os diferentes segmentos, e desse modo passamos a tratar as extrações de cada área em conjunto, independentemente a que segmento pertençam.

Marinho (2008) encontrou uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) do conteúdo de GAG total (em  $\mu\text{g}$  de ác. hexurônico por mg de tecido seco) nas amostras aneurismáticas ( $1,30 \pm 0,17$ ,  $n=11$ ) quando comparadas às de doadores cadáveres ( $3,55 \pm 0,51$ ,  $n=9$ ). Nas extrações correspondentes à área N, obtivemos  $2,56 \pm 0,32$   $\mu\text{g}$  HexUAc/mg tecido, referente às 10 extrações realizadas, que quando comparado aos resultados da área L ( $1,60 \pm 0,15$ , 14 extrações) e LL ( $1,00 \pm 0,13$ , 17 extrações), observamos uma diminuição do conteúdo de GAG total nas amostras ateroscleróticas,  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , para as áreas L e LL, respectivamente. Também na comparação entre as áreas L e LL foi observada uma diminuição do conteúdo de GAG total neste último,  $p < 0,05$ , portanto não podendo ser atribuída a variações do método. O resultado obtido para as áreas mais preservadas da aorta do indivíduo em estudo (78 anos) encontra-se dentro da faixa de variação do grupo de doadores (~37 anos) reportado por Marinho, enquanto os referentes às áreas exibindo lesões ateroscleróticas encontram-se dentro da faixa de variação do grupo de AAA (~ 74 anos). Desse modo não podemos descartar a possibilidade do resultado encontrado para o grupo AAA ser

devido ao comprometimento aterosclerótico dessas amostras. Por outro lado, o fator idade não parece estar contribuindo nesse caso. A Figura 12 (A e B) resume os resultados acima relatados.

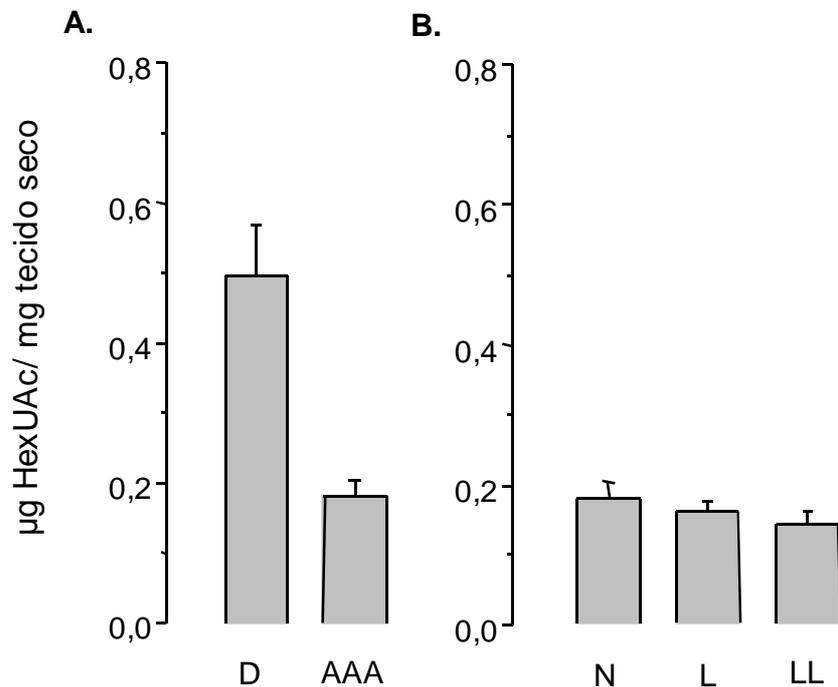


**Figura 12:** Concentração de GAG total, em teor de ácido hexurônico, nas diferentes amostras (D e AAA) (A) ou áreas (N, L e LL) (B).

A concentração absoluta das diferentes espécies de GAG na parede arterial pode ser avaliada pela determinação da concentração relativa de cada espécie no total de GAG extraído de cada amostra. No caso do ácido hialurônico (HA), sua concentração relativa nas amostras de GAG total pode ser obtida através de fracionamento por cromatografia de troca iônica, enquanto que as concentrações

dos GAGs sulfatados (HS, DS e CS) podem ser estimadas pela análise densitométrica da eletroforese em gel de agarose (Figura 11).

Devido à limitação de material, a cromatografia em coluna de troca iônica foi realizada com *pools* das amostras de cada grupo ou áreas estudadas (doadores, AAA, N, L e LL) e a concentração relativa do HA obtida em cada caso foi extrapolada para cada uma de suas respectivas amostras (AAA e D) ou extração (N, L e LL). Desse modo, estimamos o teor de HA nos diferentes grupos estudados: N-  $0,18 \pm 0,02$ ; L-  $0,16 \pm 0,01$ ; LL-  $0,14 \pm 0,02$   $\mu\text{g HexUAc/mg}$  tecido seco e confrontamos com os obtidos por Marinho (2008): D-  $0,50 \pm 0,07$ ; AAA-  $0,18 \pm 0,02$ , Figura 13. Os resultados apontaram para uma redução significativa do conteúdo de HA nas amostras de indivíduos idosos, independentemente da presença ou ausência de lesões ateroscleróticas, indicando que essa diminuição provavelmente está relacionada com o processo de envelhecimento, uma vez que a média dos resultados encontrados para as amostras de AAA encontra-se na mesma faixa do conteúdo de HA obtido para o indivíduo de 78 anos (N, L e LL). (D x AAA,  $p < 0,01$ ); (N x L ou LL e L x LL – n.s.).

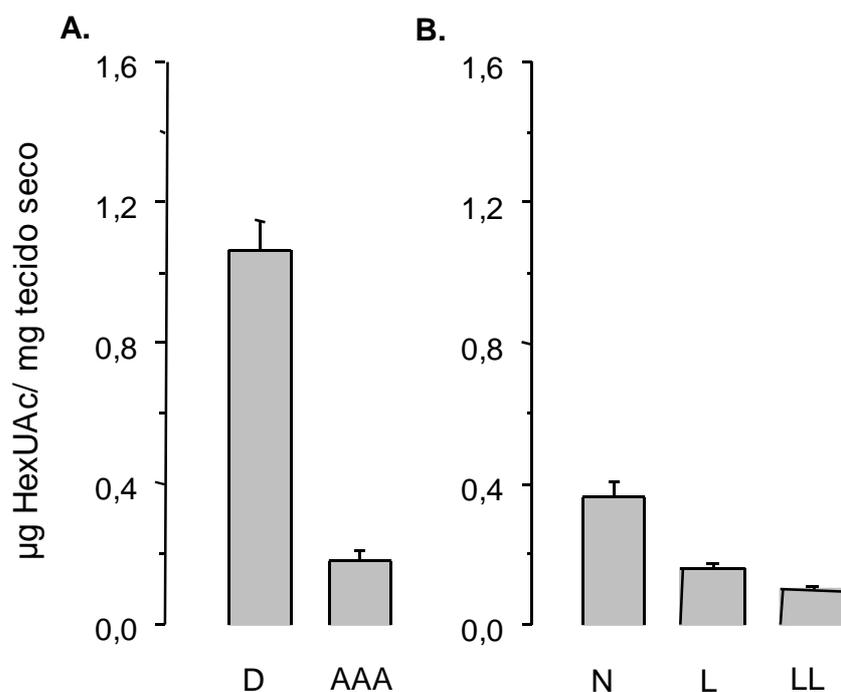


**Figura 13:** Concentração de HA, em teor de ácido hexurônico, nas diferentes amostras (D e AAA) (A) ou áreas (N, L e LL) (B).

Na determinação da concentração das espécies sulfatadas, foi deduzido do teor do GAG total a fração correspondente ao HA em cada amostra (AAA e D) ou extração (N, L e LL).

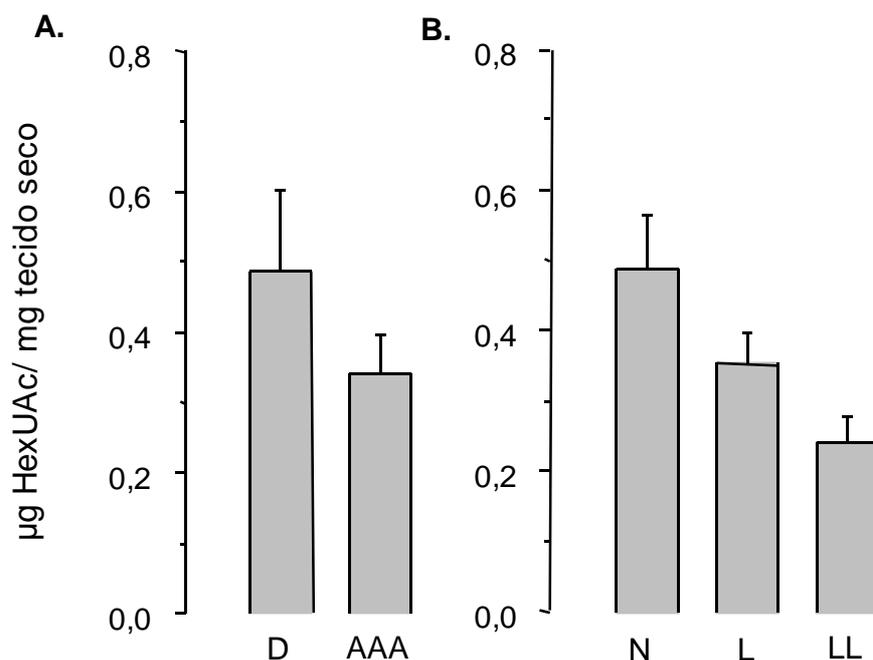
A concentração de HS reportada para as amostras de AAA foi de  $0,18 \pm 0,03$  µg HexUAc/mg tecido seco, significativamente inferior ao conteúdo encontrado para as amostras de doadores-  $1,06 \pm 0,08$ ,  $p < 0,001$ . Nas extrações correspondentes à área N observamos a média de  $0,36 \pm 0,04$  µg HexUAc / mg tecido seco, enquanto foi obtido  $0,16 \pm 0,02$  e  $0,10 \pm 0,01$  para as áreas L e LL, respectivamente. Na comparação entre esses três últimos, pudemos constatar uma redução significativa do conteúdo de HS nas lesões ateroscleróticas quando comparadas com áreas mais preservadas da parede aórtica ( $p < 0,001$ ) e até

mesmo entre os diferentes graus de lesão ( $p < 0,01$ , L x LL). No entanto o conteúdo de HS nas áreas mais preservadas da parede arterial do indivíduo de 78 anos (N) é bem inferior ao reportado para os de doadores. Por outro lado, o conteúdo de HS da área N é superior à faixa de variação encontrada para as amostras AAA. Este conjunto de dados aponta para alterações importantes da concentração de cadeias de HS causadas pelo envelhecimento e agravadas pelo processo aterosclerótico. Da mesma forma, no AAA não podemos descartar a influência do processo aterosclerótico nos resultados encontrados. A Figura 14 resume os dados acima mencionados.



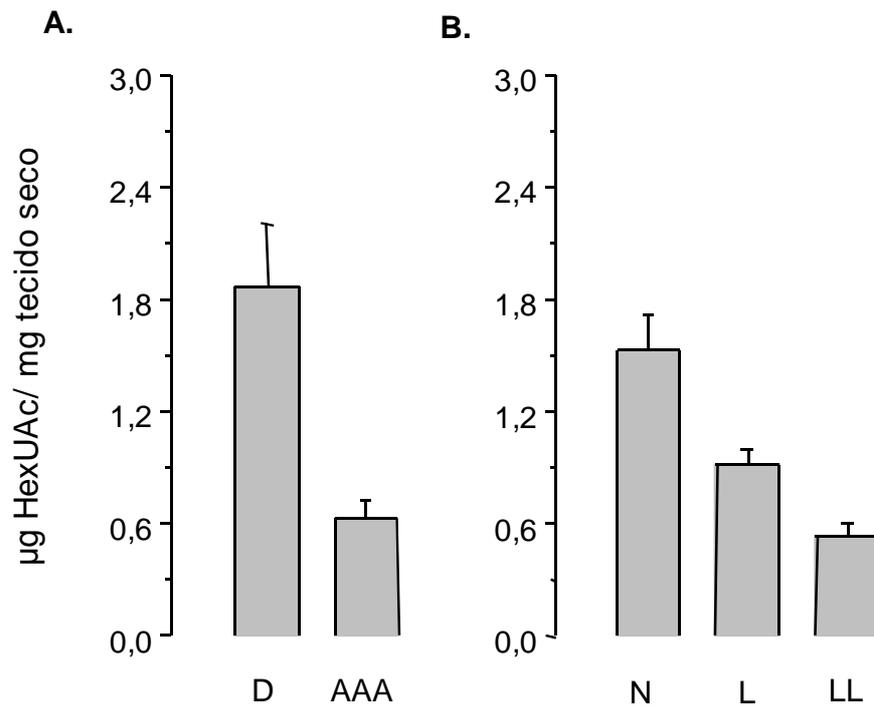
**Figura 14:** Concentração de HS, em teor de ácido hexurônico, nas diferentes amostras (D e AAA) (A) ou áreas (N, L e LL) (B).

Na determinação da concentração de DS (Figura 15) observamos menores alterações em função do processo aterosclerótico (N-  $0,49 \pm 0,08$ ; L-  $0,35 \pm 0,05$ ; LL-  $0,24 \pm 0,04$   $\mu\text{g HexUAc} / \text{mg tecido seco}$ ), onde análise estatística entre os grupos mostrou diminuição significativa de DS apenas nas lesões ateroscleróticas de grau mais avançado ( $p < 0,05$ , comparando N e LL). Nesta mesma avaliação Marinho (2008) encontrou  $0,48 \pm 0,12$  e  $0,34 \pm 0,05$   $\mu\text{g HexUAc} / \text{mg tecido seco}$ , para as amostras de doadores e AAA, respectivamente ( $p > 0,5$ , n.s.), estando de acordo com resultados reportados por Theocharis et al (1999). O valor obtido para as extrações das áreas N do indivíduo de 78 anos é semelhante ao encontrado para as amostras de doadores (~37 anos) indicando uma preservação dessas cadeias na parede arterial ao longo da vida, e confirmando resultados reportados por Tovar et al (1998).



**Figura 15:** Concentração de DS, em teor de ácido hexurônico, nas diferentes amostras (D e AAA) (A) ou áreas (N, L e LL) (B).

O teor de CS diminui significativamente nas amostras aneurismáticas ( $0,63 \pm 0,09$ ) quando comparado com as de doadores ( $1,87 \pm 0,33 \mu\text{g HexUAc/mg tecido seco}$ ),  $p < 0,05$  (Marinho, 2008). O mesmo foi observado nas extrações correspondentes às lesões ateroscleróticas (L-  $0,92 \pm 0,08$ ; LL-  $0,54 \pm 0,06 \mu\text{g HexUAc / mg tecido seco}$ ) quando comparadas às extrações da área N do indivíduo de 78 anos ( $1,52 \pm 0,19$ ),  $p < 0,05$  (N x L) e  $p < 0,001$  (N x LL). Na comparação entre as áreas L e LL também constatamos uma diminuição do teor de CS neste último,  $p < 0,01$ . O conteúdo de CS encontrado nas extrações referentes à área N do indivíduo de 78 anos encontra-se dentro da faixa de variação das de doadores sãos, enquanto os valores obtidos para as áreas apresentando lesões ateroscleróticas mais avançadas (LL) são semelhantes aos encontrados nas amostras aneurismáticas (Figura 16). Esses resultados estão de acordo com os relatados por Theocharis et al (1999), indicando uma diminuição da concentração de CS no AAA, e nas lesões ateroscleróticas (Theocharis et al, 2002).



**Figura 16:** Concentração de CS, em teor de ácido hexurônico, nas diferentes amostras (D e AAA) (A) ou áreas (N, L e LL) (B).

De todo modo, as alterações observadas por Marinho (2008) a respeito do conteúdo de GAG não podem ser dissociadas do processo aterosclerótico concomitante observado nas amostras de AAA. Por outro lado, os nossos dados apontam para uma provável influência do envelhecimento sobre o conteúdo de HA e HS na parede arterial.

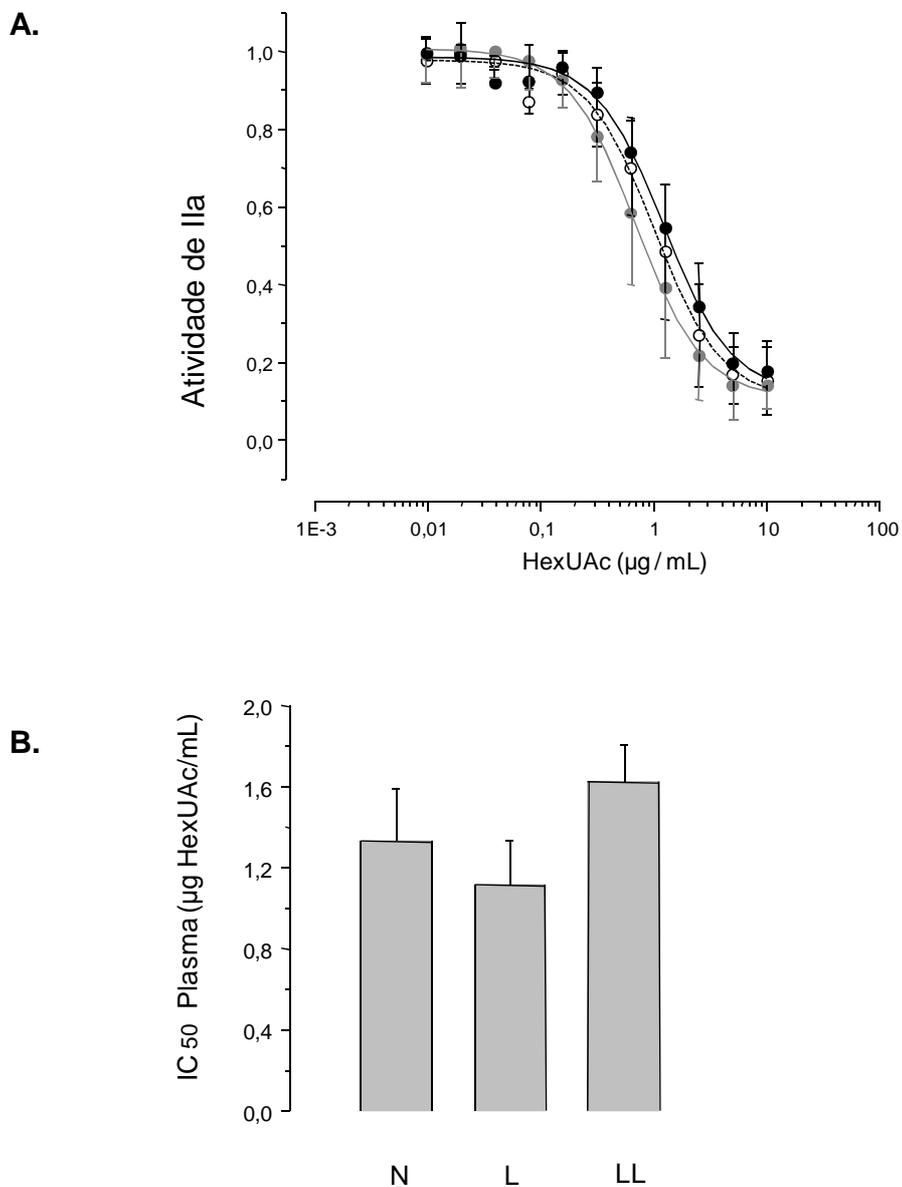
### **4.3. Implicações do processo aterosclerótico no potencial anticoagulante dos GAGs aórticos**

Os nossos resultados juntamente com os resultados de Marinho (2008) reportam alterações da concentração de determinadas espécies de GAG na parede da aorta aneurismática e aterosclerótica. Portanto, uma questão que se levanta é se as alterações observadas terão conseqüência na modulação de proteases da coagulação, e desta forma influenciar nas complicações da aterosclerose. Assim, além das alterações quantitativas das cadeias de GAGs anticoagulantes, eventuais modificações estruturais nestes polissacarídeos poderiam comprometer a eficiência do controle sobre essas proteases. Há relatos sobre diferenças estruturais de GAGs em lesões ateroscleróticas (Shirk et al, 2000; Theocharis et al, 2002). Deste modo, o principal objetivo desta dissertação foi avaliar o potencial anticoagulante dos GAGs presentes na lesão aterosclerótica.

Numa primeira abordagem este potencial foi avaliado utilizando GAG total, devido à limitação de material. Desta forma também descartamos eventuais perdas de frações de GAG que podem ocorrer durante o processo de fracionamento e purificação parcial das diferentes espécies de GAGs.

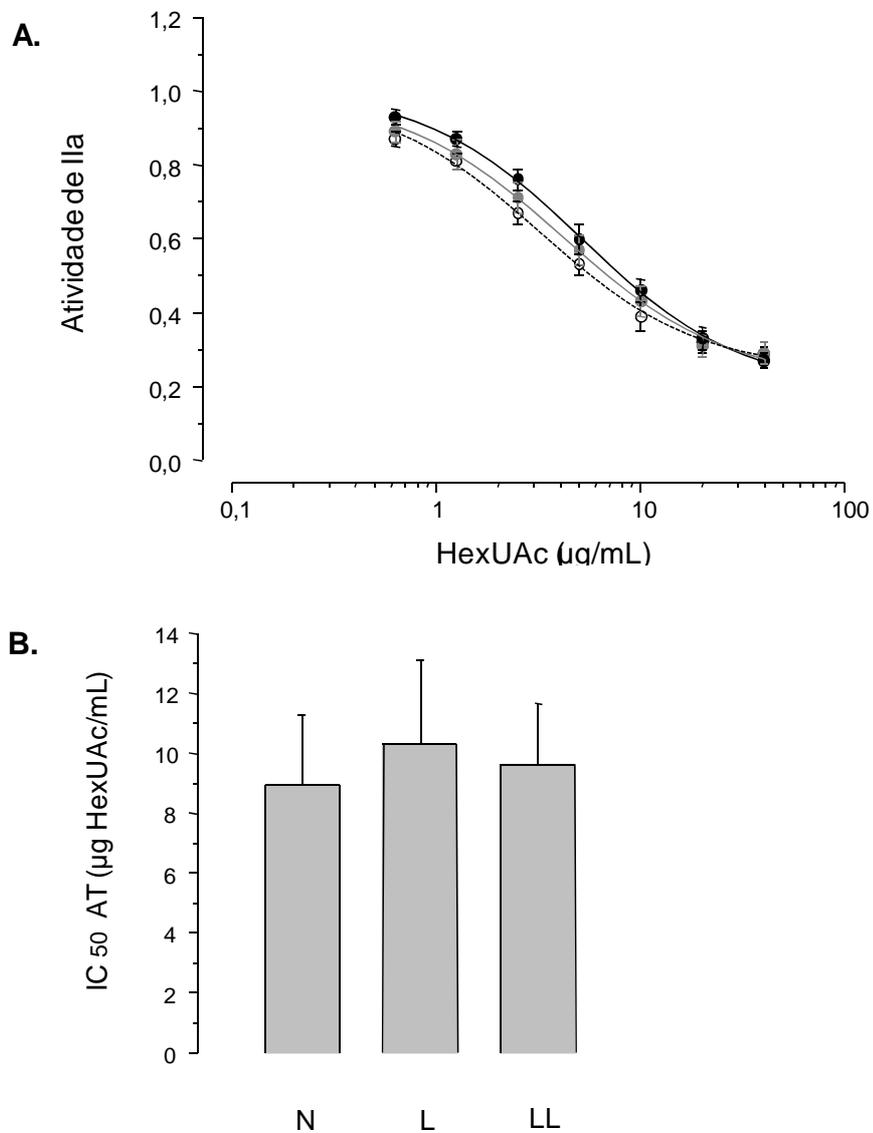
Com intuito de determinar a atividade anticoagulante global dos GAGs extraídos da aorta empregamos plasma humano como fonte das serpinas AT e HCII, na tentativa de mimetizar a situação que ocorre *in vivo*. Outras proteínas plasmáticas podem competir na interação das serpinas com os GAGs. A Figura 17 mostra os resultados obtidos. O painel A mostra a faixa de variação dos ensaios de inibição da trombina pelos GAGs aórticos obtidos nas diferentes extrações das áreas N, L e LL. No painel B está representada a concentração necessária dos GAGs (média  $\pm$  SEM) para inibir 50% da atividade desta protease. Podemos

verificar que os resultados das três diferentes áreas não diferiram muito entre si (Figura 17 A), não sendo observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na comparação dos valores de  $IC_{50}$  entre N x L ou LL,  $1,33 \pm 0,26$ ,  $1,12 \pm 0,22$  e  $1,62 \pm 0,18$   $\mu\text{g HexUAc/mL}$  para a área N, L e LL, respectivamente (Figura 17 B). No entanto, nesta mesma comparação entre as áreas L e LL, estes diferiram entre si ( $p < 0,05$ ). É importante ressaltar que esses ensaios traduzem a atuação da AT e HCII sobre a trombina, refletindo o potencial anticoagulante do HS e DS, respectivamente. Os resultados indicam que apesar da concentração dos GAGs estar significativamente diminuída nas lesões ateroscleróticas, a atividade anticoagulante desses compostos parece não estar alterada quando comparada aos GAGs obtidos de áreas normais. Marinho (2008) encontrou, neste mesmo tipo de ensaio, só que utilizando uma menor diluição de plasma humano (60 x), valores de  $IC_{50}$  de  $1,78 \pm 0,31$  e  $3,42 \pm 0,67$   $\mu\text{g HexUAc/mL}$  para as amostras de AAA e doadores, respectivamente. Interessante, que apesar de não apresentar diferença significativa ( $p > 0,05$ ), os GAGs das amostras de AAA exibem média de  $IC_{50}$  inferior a dos doadores, sinalizando senão para maior, pelo menos igual potencial anticoagulante. De todo modo, os resultados por nós encontrados são semelhantes aos relatados por Marinho (2008).



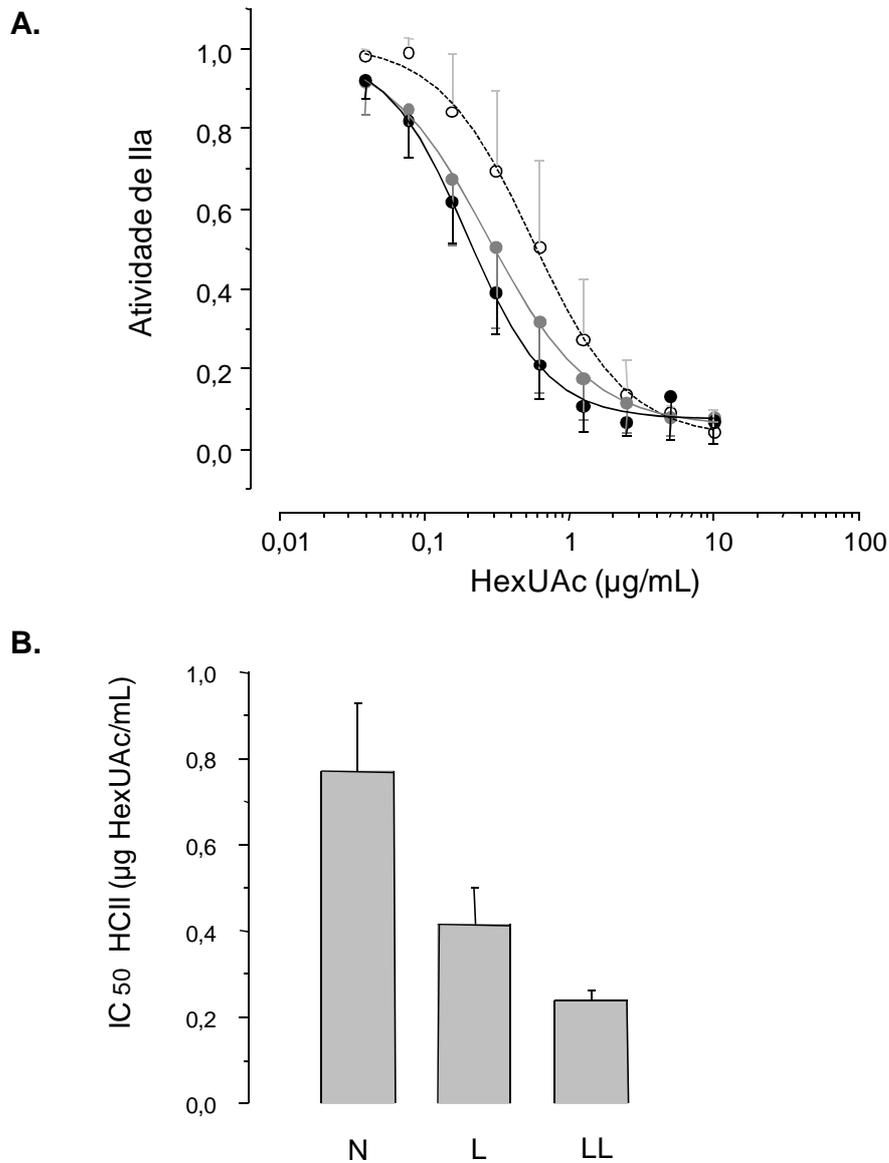
**Figura 17:** (A) Variação nos ensaios de inibição da trombina das extrações de GAG total das áreas N (○), L (●), e LL (●), utilizando plasma humano como fonte de AT e HCII; e (B) concentração de GAG total necessária (média ± SEM) para inibir em 50% a atividade da trombina (IC<sub>50</sub>) das extrações referentes às áreas N, L e LL.

A atividade anticoagulante mais especificamente associada às cadeias do HS nas amostras de GAG total das diferentes áreas foi avaliada através dos ensaios de inibição da trombina na presença de AT purificada. DS e CS não são capazes de potencializar a ação desta serpina sobre a protease. A Figura 18(A) está representada a faixa de variação dos resultados obtidos com o HS das áreas N, L e LL, enquanto o painel B mostra a concentração de GAG total necessária (média  $\pm$  SEM) para inibir 50% ( $IC_{50}$ ) a atividade da trombina. Novamente podemos observar uma semelhança entre as três áreas (Figura 18 A), onde o  $IC_{50}$  encontrado foi de  $8,96 \pm 2,33$ ,  $10,30 \pm 2,77$  e  $9,64 \pm 2,01$   $\mu\text{g/mL}$  para as extrações de N, L e LL, respectivamente ( $p > 0,05$ , Figura 18 B). Seria importante lembrar que o GAG total extraído das áreas ateroscleróticas apresentou diminuição significativa da proporção de HS em relação aos das áreas mais preservadas, o que nos faz pensar que as cadeias de HS das áreas ateroscleróticas exibem maior potencial anticoagulante. Da mesma forma, Marinho (2008) encontrou valores próximos ( $p > 0,05$ ) de  $IC_{50}$  para as amostras de AAA e de doadores,  $15,64 \pm 2,68$  e  $24,82 \pm 5,33$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, apesar da proporção de HS estar significativamente reduzida nas amostras de AAA, 16% contra 35% nas de doadores,  $p < 0,001$ . Portanto, a diminuição da concentração absoluta de HS nas lesões da parede aórtica (aterosclerótica ou por AAA) provavelmente ocorre por perda de populações de HS que exibem menor potencial anticoagulante.



**Figura 18:** (A) Variação nos ensaios de inibição da trombina das extrações de GAG total das áreas N (○), L (●), e LL (●), na presença de AT purificada; e (B) concentração de GAG total necessária (média ± SEM) para inibir em 50% a atividade da trombina (IC<sub>50</sub>) das extrações referentes às áreas N, L e LL.

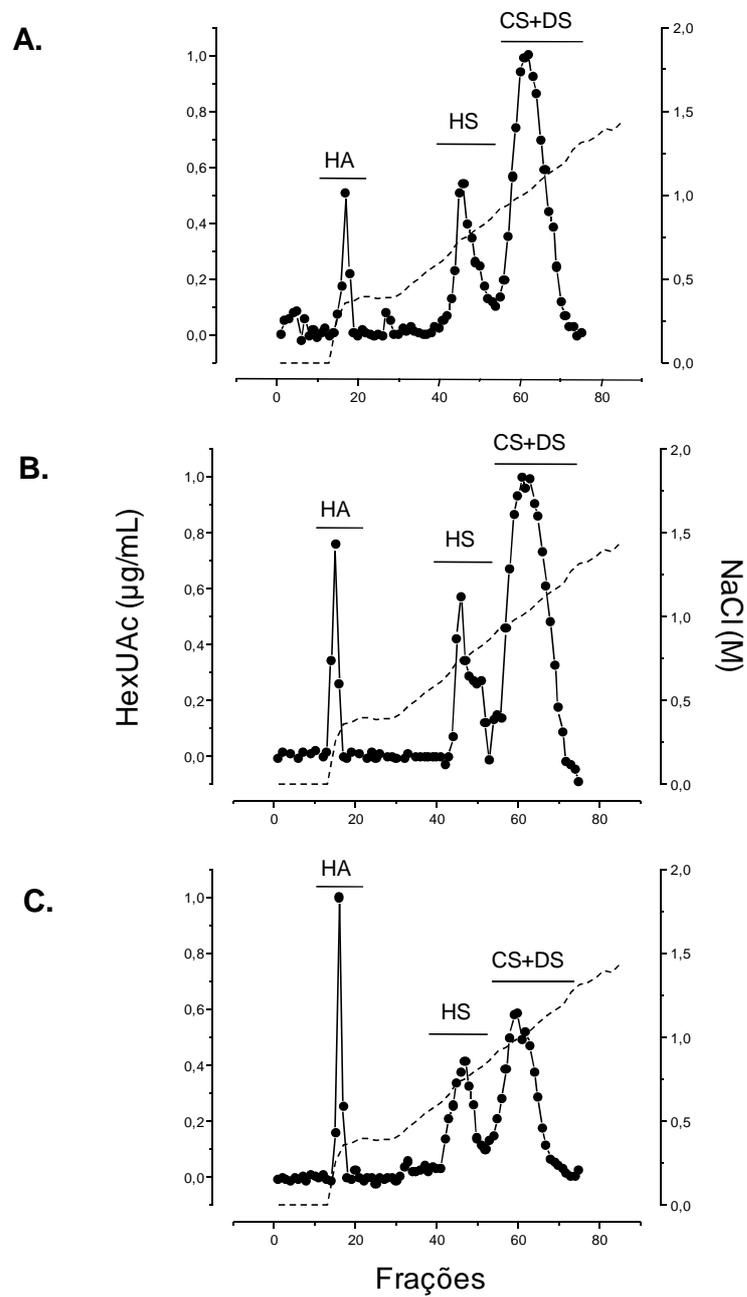
Nos ensaios de inibição da trombina onde substituímos o plasma pelo HCII, enfocamos uma maior participação das cadeias de DS, uma vez ser este o principal potencializador desta serpina. Conforme o esperado, as amostras de GAG total que apresentam maior proporção desta espécie de GAG tendem a exibir maior potencial anticoagulante nestes ensaios (Figura 19, A e B). Os valores de  $IC_{50}$  obtidos para as amostras das áreas N, L e LL foram  $0,77 \pm 0,16$ ,  $0,41 \pm 0,08$  e  $0,24 \pm 0,03$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Na comparação entre as áreas, observamos diferença significativa entre N e L ou LL,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, enquanto L e LL não diferiram entre si. Mais uma vez, resultados semelhantes foram encontrados por Marinho (2008), onde a concentração de GAG total necessária para inibir em 50% a atividade da trombina nesses ensaios foi significativamente ( $p < 0,001$ ) menor nas amostras aneurismáticas ( $1,05 \pm 0,21$ ) em relação às de doadores ( $7,19 \pm 2,08$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ ). A concentração relativa (%) de DS reportada por Marinho (2008) para as amostras aneurismáticas e de doadores foi  $28,99 \pm 1,68$  e  $13,42 \pm 1,87$ , respectivamente.



**Figura 19:** (A) Variação nos ensaios de inibição da trombina das extrações de GAG total das áreas N (○), L (●), e LL (●) na presença de HCII purificado; e (B) concentração de GAG total necessária (média ± SEM) para inibir em 50% a atividade da trombina (IC<sub>50</sub>) das extrações referentes às áreas N, L e LL.

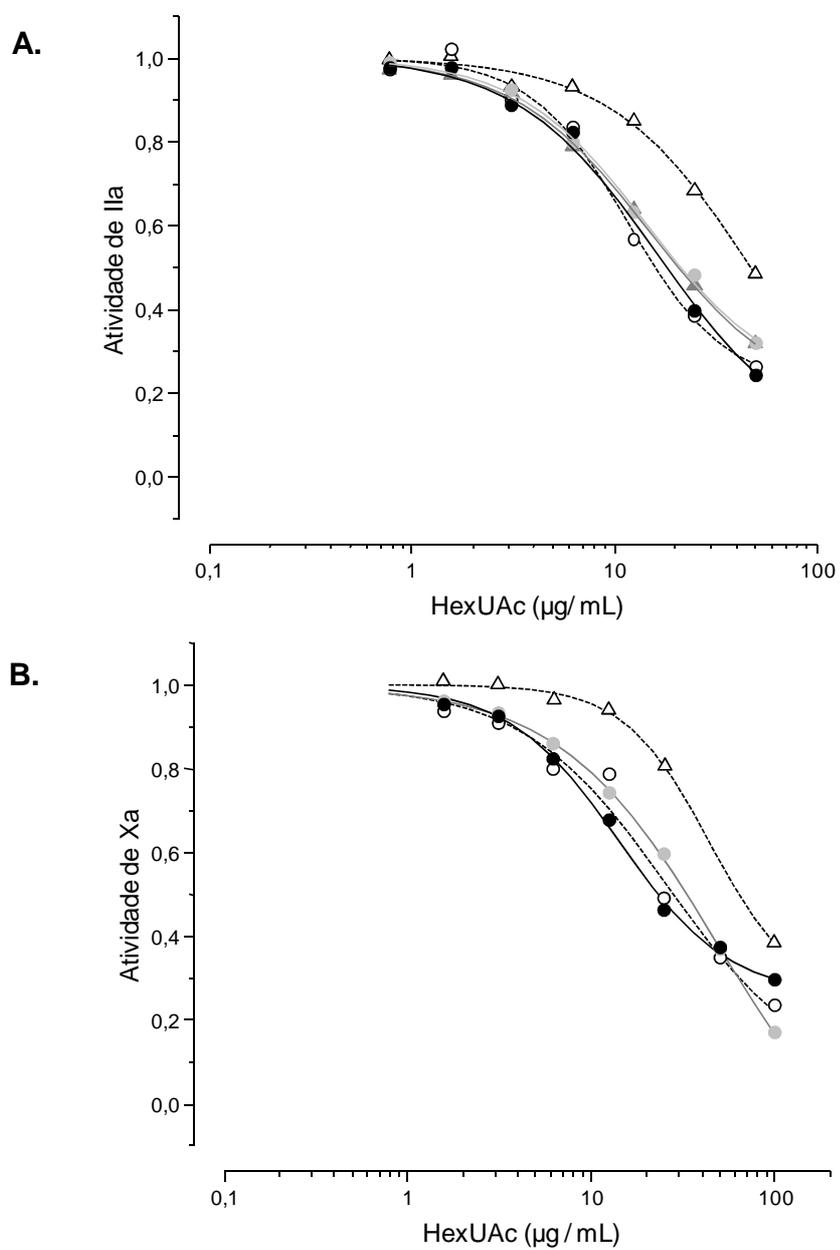
#### **4.4. Avaliação da atividade anticoagulante de frações enriquecidas em cadeias de HS e DS nas diferentes áreas**

Nos tópicos anteriores a atividade anticoagulante foi determinada utilizando amostras de GAGs totais, onde as concentrações relativas das diferentes espécies exibiam razoáveis variações entre as áreas. Para obter uma medida mais específica da atividade anticoagulante do HS e DS, realizamos o fracionamento dos GAG por cromatografia de troca iônica. O emprego desta metodologia permite a obtenção de frações enriquecidas em HS, que eluem com uma concentração menor de sal, e frações que contém quase que exclusivamente cadeias de CS e DS. Devido a limitação de material, este fracionamento foi feito em *pools* de GAGs das diferentes áreas, com o cuidado de agrupar a mesma proporção de GAG obtida das diferentes amostras. A Figura 20 mostra o perfil de eluição referente às áreas N (A), L (B) e LL (C). A composição das frações correspondentes aos três picos obtidos em cada cromatograma foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, revelando tratar-se de frações enriquecidas em HA, HS e uma mistura de CS e DS (Figura 24). O HA por não ser sulfatado, não apresenta propriedade metacromática e não é corado pelo azul de toluidina. Porém exibe coloração característica (azul turquesa) quando a lâmina é corada com *stains all* (*Sigma Aldrich*). O mesmo tipo de perfil foi obtido para *pool* das amostras de doadores e AAA (dado não mostrado).



**Figura 20:** Fracionamento por cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q de *pools* das extrações referentes às áreas N (A), L (B) e LL (C).

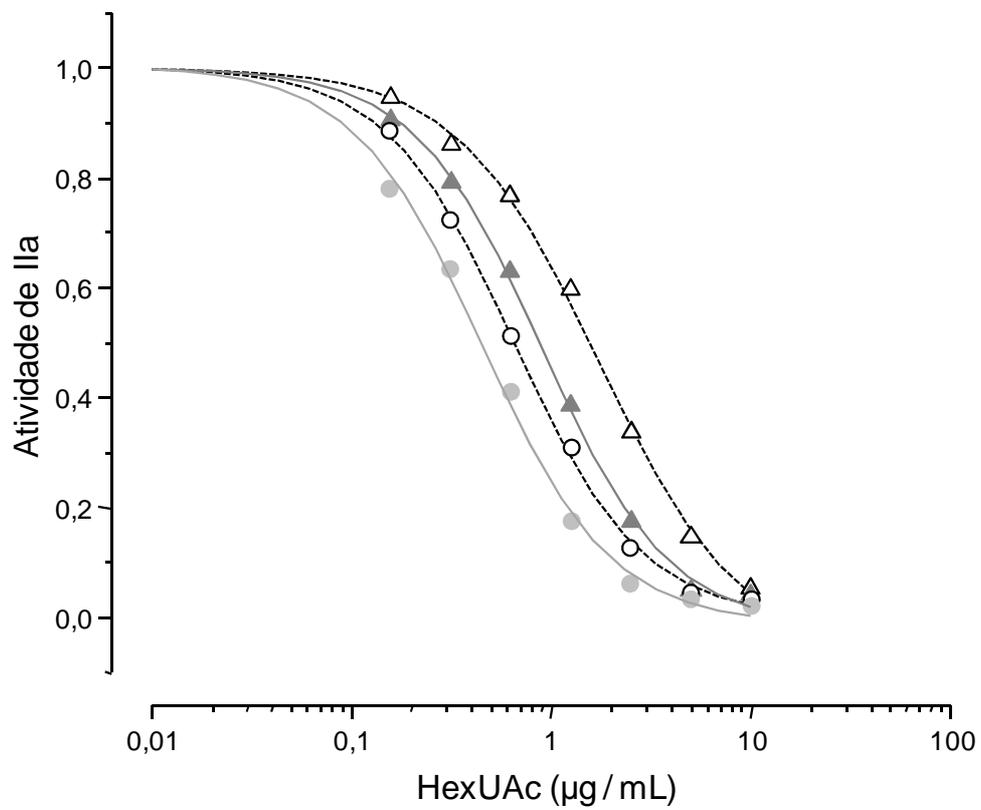
Na Figura 21 mostramos os ensaios de inibição da trombina (A) e do fator Xa (B) pela AT na presença das frações enriquecidas em HS das áreas N, L e LL. Também são mostrados os resultados por nós obtidos referentes às amostras de aneurisma e de doadores. Os valores de  $IC_{50}$  nos ensaios de inibição da trombina (A) foram 16,00; 21,46; 18,34 e 20,89  $\mu\text{g/mL}$  para as áreas N, L LL e grupo AAA, respectivamente, enquanto o HS obtido dos doadores mostrou um  $IC_{50}$  de 47,24  $\mu\text{g/mL}$ . Esta mesma tendência de resultado foi observada nos ensaios com Xa (Figura 21, B). Devido à limitação de material, não realizamos os ensaios de inibição do fator Xa com o HS do grupo AAA. Esses dados confirmam que as cadeias de HS extraídas das amostras aneurismáticas exibem um maior potencial anticoagulante que as de doadores, conforme sugerido pelo trabalho de Marinho (2008). Por outro lado, em relação às cadeias de HS das áreas N, L e LL, estas tiveram um comportamento semelhante às de aneurismas, independentemente do grau de lesão aterosclerótica. Desse modo, o conjunto desses dados sugere que o envelhecimento, e não a lesão aterosclerótica ou aneurismática, está associado a um aumento do potencial anticoagulante das cadeias de HS.



**Figura 21:** Ensaios de inibição da trombina (A) e do fator Xa (B) das frações de HS das áreas N (○), L (●), LL (●) e dos grupos de doadores (△) e AAA (▲), na presença de AT.

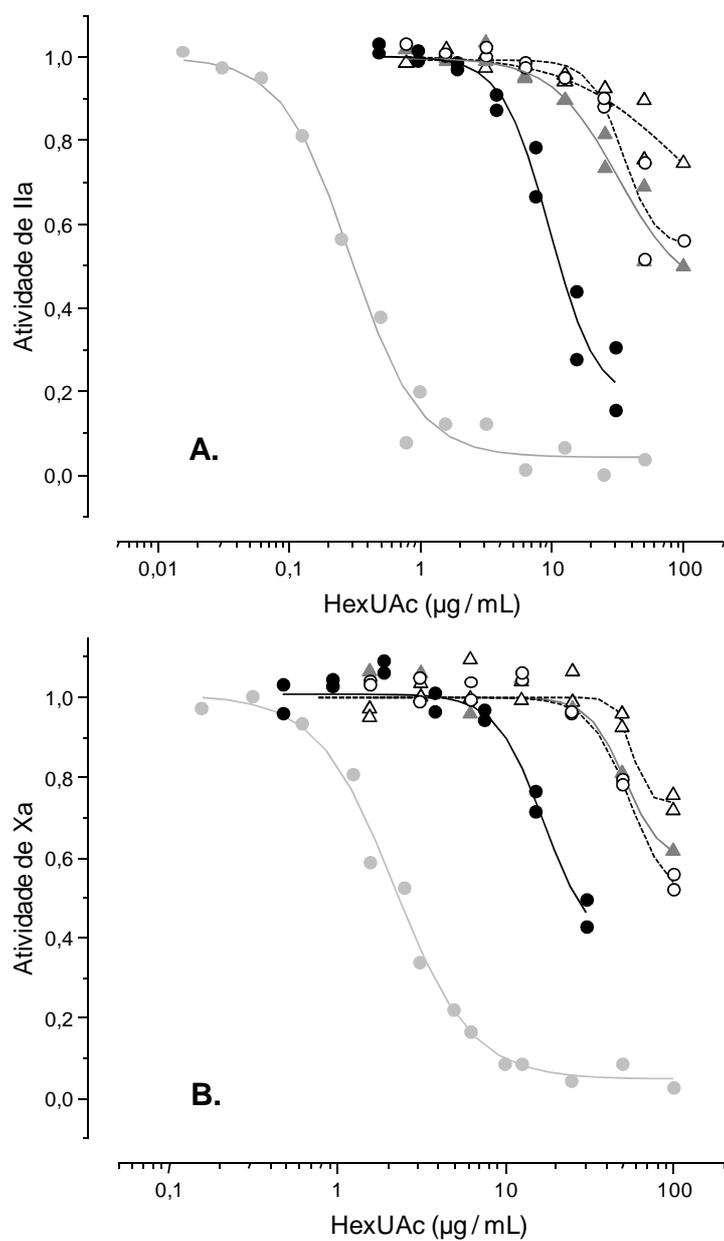
Nos ensaios de inibição da trombina, na presença de HCII utilizando misturas de CS e DS, obtivemos valores de IC<sub>50</sub> para o grupo N- 0,65; L- 0,45; AAA- 0,88 e doadores- 1,57 µg/mL (Figura 22). Esses valores são bem inferiores àqueles observados com o HS na presença de AT (Figura 21), confirmando dados prévios do nosso laboratório (Tovar, 2005 e de Mattos, 2008). Essas observações indicam que o DS é o GAG que exibe maior potencial anticoagulante na parede vascular, exercendo essa função via HCII. Novamente, de acordo com a avaliação feita com as amostras de GAG total, as amostras enriquecidas com DS e obtidas de indivíduos pertencentes a uma maior faixa etária (N, L e AAA) exibiram maior atividade anticoagulante quando comparado com o grupo de doadores.

Nestes ensaios, os resultados com as amostras retiradas de áreas exibindo grande número de lesões ateroscleróticas (área L e AAA) não sinalizaram para grande diminuição do potencial anticoagulante de suas cadeias de DS em relação às áreas mais preservadas (área N e doadores), diferentemente do proposto por Shirk et al (2000). Em todo caso, não podemos descartar completamente a possibilidade do comprometimento do potencial anticoagulante das cadeias de DS nas lesões ateroscleróticas, uma vez que os ensaios não foram realizados com cadeias purificadas desse espécime de GAG.



**Figura 22:** Ensaio de inibição da trombina das frações de CS+DS das áreas N (○) e L (●) e dos grupos de doadores (Δ) e AAA (▲), na presença de HCII.

Uma possibilidade que precisamos considerar é a contaminação por pequenas quantidades de cadeias de CS e/ou DS nas frações de HS e vice versa. É descrita a presença de cadeias de HS com maior densidade de cargas em outros tecidos (Werneck et AL, 2000). Esse tipo de HS pode ser eluído da coluna de troca iônica por concentrações mais elevadas de sal do que o HS preponderante de aorta. Para avaliar essa hipótese, realizamos ensaios de inibição da trombina e do Xa com as frações CS+DS na presença de AT (Figura 23). Verificamos que essas frações (CS+DS) obtidas da área N e das referentes às amostras de AAA e doadores apresentam atividade muito reduzida neste ensaio ( $IC_{50} \geq 90 \mu\text{g/mL}$ ), afastando a possibilidade de quantidade significativa de cadeias de HS com alto potencial anticoagulante estar presente nas mesmas. Porém, nas áreas L e LL, observamos uma atividade de inibição maior ou equivalente à fração de HS correspondente, com  $IC_{50}$  de 0,30 versus 21,46  $\mu\text{g/mL}$  na área L e de 13,59 versus 18,34  $\mu\text{g/mL}$  na área LL, para as frações CS+DS e HS, respectivamente, nos ensaios de inibição da trombina (Figura 23-A). Surpreendentemente, a eletroforese em gel de agarose não revela a presença de quantidade significativa de HS nas frações de CS+DS das áreas L e LL. Portanto, esses dados sugerem a presença de pequena quantidade de cadeias de HS *heparina-like*, que exibe alto potencial anticoagulante, nessas amostras. O mesmo resultado foi observado nos ensaios de inibição do fator Xa (Figura 23-B), indicando tratar-se realmente da presença de HS/heparina, uma vez que DS não potencializa a inibição de Xa.

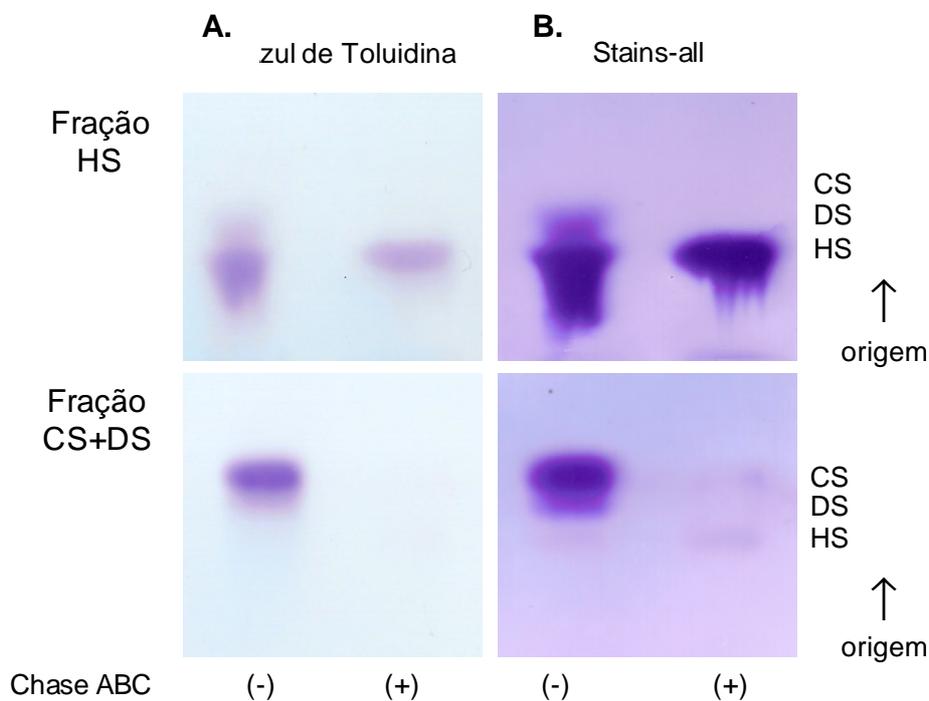


**Figura 23:** Ensaio de inibição da trombina (A) e do fator Xa (B) das frações de CS+DS das amostras N (○), L (●), LL (●), doadores (△) e AAA (▲), na presença de AT.

As frações correspondentes a indivíduos mais idosos (grupos N, L e LL e AAA), mesmo as menos ativas (N e AAA) exibem maior potencial anticoagulante em relação ao grupo de doadores.

Para afastarmos completamente a possibilidade da ação do CS ou DS sobre a AT nos ensaios descritos acima, tratamos as frações de HS e CS+DS com condroitinase ABC (Chase ABC), que degrada HA, CS e DS, mas preserva o HS.

Para avaliarmos a eficiência do tratamento com a Chase ABC, realizamos eletroforese em gel de agarose das frações de HS e CS+DS, obtidas por cromatografia de troca iônica, antes e após a digestão com a enzima. A Figura 24 mostra os géis referentes às frações da área L. Após coloração do gel com azul de toluidina, notamos a presença de discreta contaminação por cadeias de DS na fração correspondente ao HS, que desaparece completamente após o tratamento com a Chase ABC. Nessas mesmas condições, a fração CS+DS aparece livre de contaminação por cadeias de HS, sendo completamente degradada pela enzima. Para aumentar a sensibilidade de detecção de GAGs, o gel foi submetido a coloração posterior com *Stains All*. Geralmente utilizamos este tipo de coloração para identificarmos a presença de HA, mas esse procedimento também aumenta a intensidade de coloração dos outros GAGs. Nesta condição observamos uma tênue coloração dos GAGs que migram como HS/heparina, confirmando a presença de discreta quantidade desse composto nas frações de CS+DS. Para os demais grupos, não conseguimos visualizar esta contaminação, porém em todos eles pudemos comprovar a eficiência da digestão das cadeias de CS e DS pela Chase ABC.

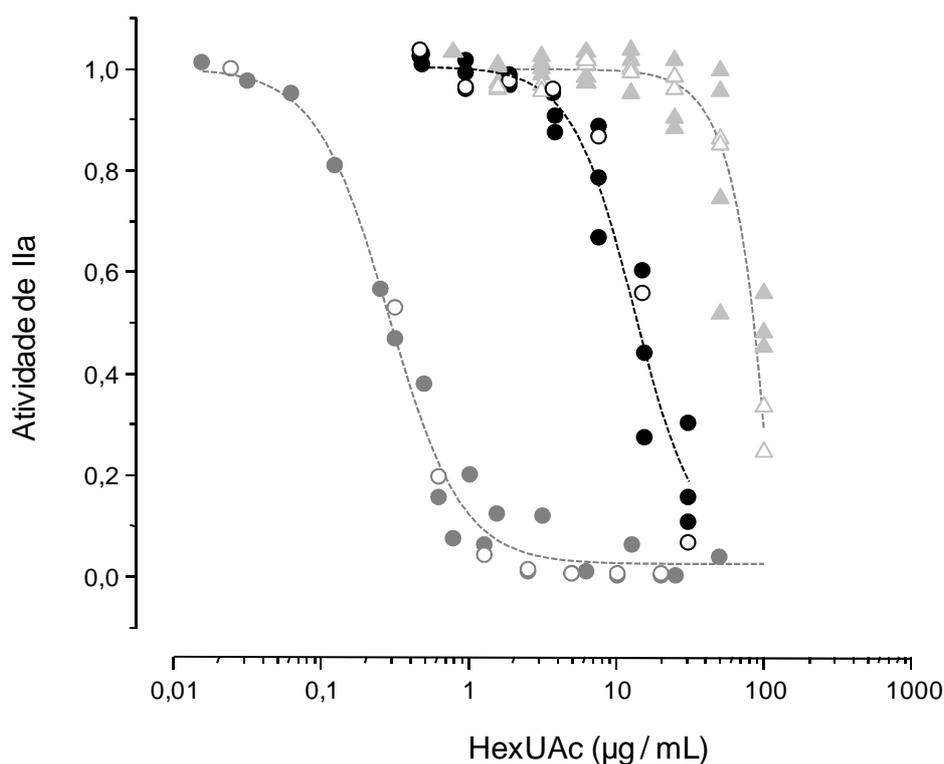


**Figura 24:** Eletroforese em gel de agarose de frações de HS e CS+DS obtidas por cromatografia de troca iônica da área L, antes e depois do tratamento com condroitinase ABC (Chase ABC). O gel foi corado com azul de toluidina (A) e com *stains all* (B).

A Figura 25 resume os resultados de inibição da trombina observados com as frações de CS+DS nas áreas N, L e LL. A digestão com Chase ABC não altera os ensaios de inibição, confirmando que são as cadeias de HS/heparina as responsáveis pela potencialização da AT nesses ensaios. O mesmo foi observado para as frações CS+DS de AAA e doadores.

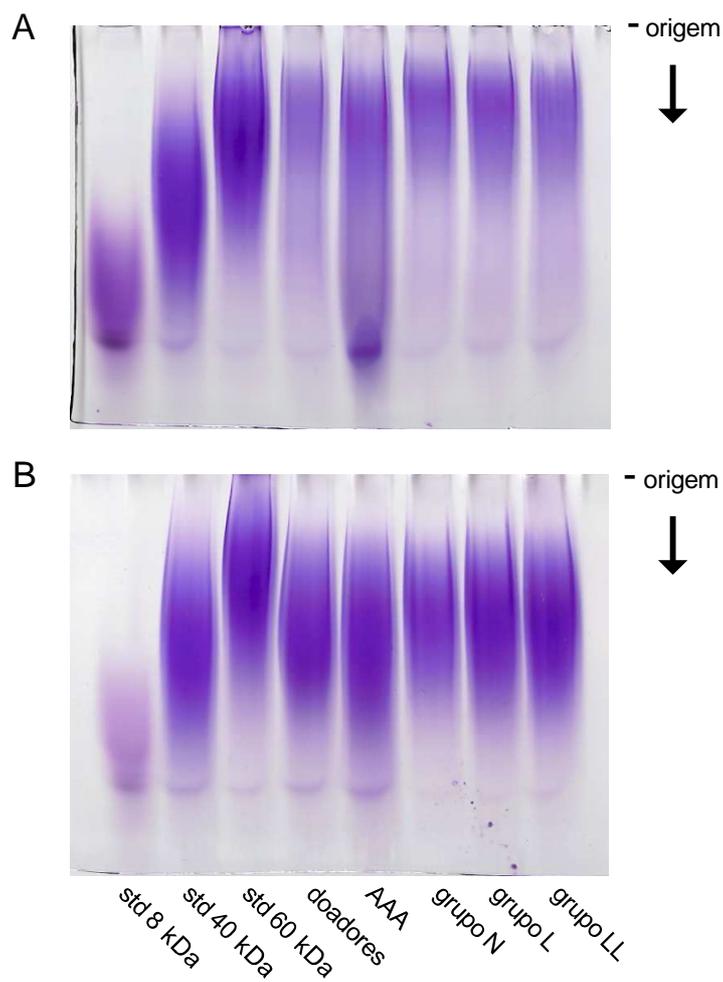
Os resultados acima, que apontam para a presença de um composto *heparina-like* no *pool* das extrações de áreas ateroscleróticas e estando praticamente ausente nas áreas mais preservadas, nos fazem questionar se este

fato não seria reflexo do processo inflamatório desencadeado pela aterogênese, estando mais associado à presença de mastócitos na lesão aterosclerótica. É descrita a migração deste tipo de leucócito para a parede arterial em determinadas etapas do processo aterogênico, que sofrendo degranulação libera uma série de componentes pré-formados, dentre eles  $\text{TNF-}\alpha$ , heparina e as serino-proteinases triptase e quimase, que podem modular a resposta vascular (Libby, 2002). A quantidade de mastócito pode variar de acordo com o momento do processo inflamatório, o que poderia explicar as diferenças encontradas nos nossos resultados.



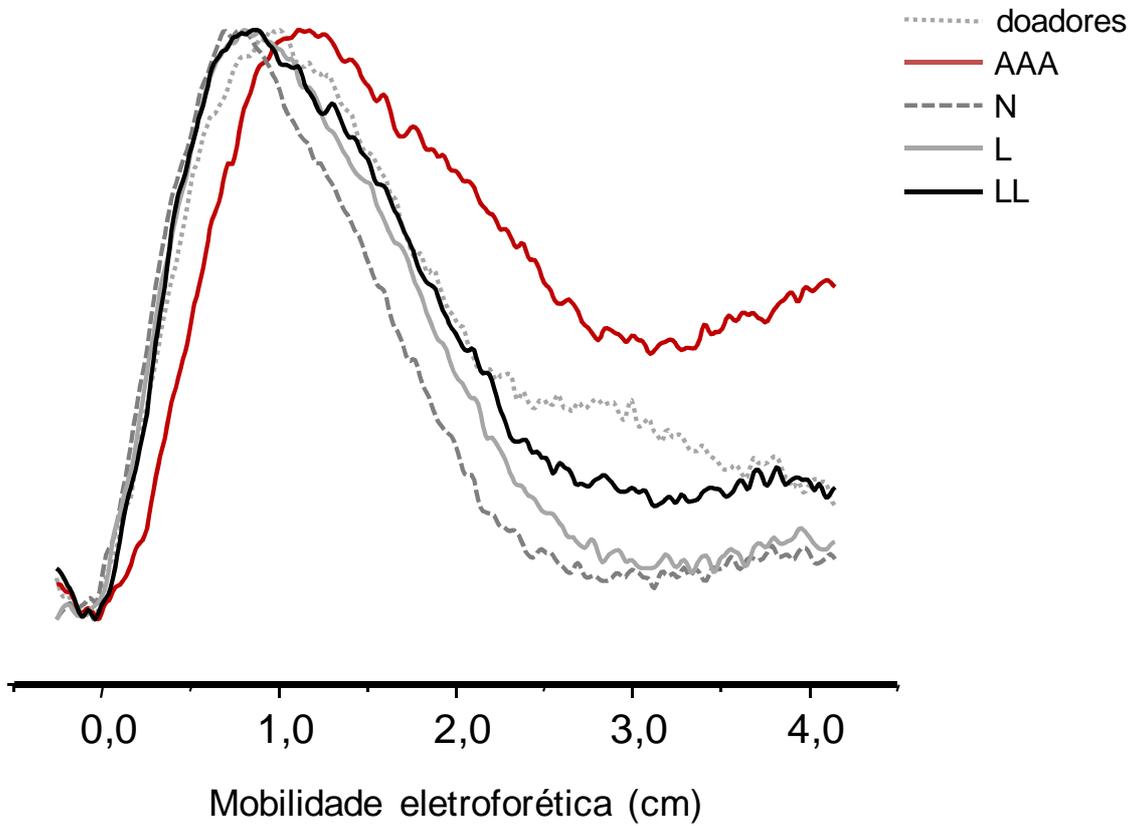
**Figura 25:** Ensaio de inibição da tromбина das frações CS+DS, antes ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\bullet$ ) e após tratamento com Chase ABC ( $\triangle$ ,  $\circ$ ,  $\circ$ ) das áreas N ( $\triangle$ ,  $\blacktriangle$ ), L ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) e LL ( $\circ$ ,  $\bullet$ ), na presença de AT.

Para finalizar, avaliamos o tamanho das cadeias nas frações enriquecidas em HS e CS/DS obtidas no fracionamento em coluna de troca iônica dos diferentes *pools* de amostras (Figura 26, A e B).



**Figura 26:** Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações HS (A) e CS+DS (B) obtidas da cromatografia de troca iônica dos *pools* de amostras de doadores e AAA e das áreas N, L e LL.

Podemos verificar que as frações enriquecidas em HS apresentam maior tamanho em relação às de CS+DS, onde o peso molecular médio das primeiras encontra-se na ordem de 60 kDa, enquanto o das frações CS+DS fica em torno de 40 kDa. Ainda em relação às cadeias de HS verificamos que no AAA, estas exibem um peso molecular menor em relação às dos demais grupos. A densitometria destas frações está representada na Figura 27, onde observamos que a distribuição das cadeias de HS do AAA encontra-se deslocada para região de mais baixo peso molecular. Também nas frações CS+DS às cadeias referentes ao AAA exibem uma maior dispersão. É descrito uma maior expressão de enzimas envolvidas na degradação de cadeias de GAGs no AAA (Kowalewski et al, 2006) o que estaria de acordo com os resultados por nós encontrados. Por outro lado, as cadeias correspondentes da área L e LL encontram-se ligeiramente deslocadas em relação às da área N, que nos faz pensar se também não seria devido à degradação em função do processo aterosclerótico. De todo modo, essas alterações do peso molecular não parecem estar associadas a modificações do potencial anticoagulante, pelo menos entre as amostras de indivíduos mais velhos (áreas N, L e LL e grupo AAA).



**Figura 27:** Densitometria da PAGE das frações HS (A) obtidas da cromatografia de troca iônica dos *pools* de amostras de doadores e AAA e das áreas N, L e LL.

## **VI. CONCLUSÕES:**

**6.1.** Modificações da concentração e composição dos GAGs aórticos relacionadas ao processo aterosclerótico independem da localização anatômica das lesões, uma vez que os resultados das análises das mesmas foram semelhantes em todos os segmentos aórticos por nós estudados.

**6.2.** O processo aterosclerótico está associado a uma diminuição do conteúdo total dos GAGs aórticos devida principalmente à diminuição da concentração de HS e CS nas lesões. Esses resultados confirmam dados previamente publicados por outros autores.

**6.3.** Os nossos resultados indicam que as alterações do conteúdo de GAG observadas no AAA são devidas ao processo aterosclerótico que acompanha esse tipo de alteração na parede de aorta abdominal.

**6.4.** O envelhecimento parece afetar o conteúdo de HA e HS, uma vez que a concentração dessas espécies encontra-se diminuída na aorta de indivíduo de idade mais avançada. Entretanto essas alterações não foram suficientes para alterar significativamente o conteúdo total de GAG da parede aórtica nesse indivíduo.

**6.5.** Os nossos resultados indicam que o processo aterosclerótico não compromete significativamente o potencial anticoagulante global dos GAGs aórticos. No entanto, foi observada a presença de cadeias *heparina-like* nas lesões ateroscleróticas.

**6.6.** As alterações do potencial anticoagulante das cadeias de HS no AAA são semelhantes às observadas no indivíduo idoso, independentemente da presença de lesão aterosclerótica.

**6.7.** Nossos resultados indicam que apesar da concentração de HS estar significativamente diminuída no indivíduo idoso, essas cadeias exibem maior atividade anticoagulante que às obtidas de indivíduos mais jovens.

## VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Além do infarto miocárdico e cerebral, o AAA também sempre foi considerado uma complicação clínica do processo aterosclerótico. Enquanto os primeiros, IAM e AVC, estão geralmente associados à formação de um trombo oclusivo no local da lesão, podendo levar ao óbito, o AAA está mais relacionado a um intenso remodelamento da parede da aorta abdominal, provocando um enfraquecimento e dilatação neste segmento aórtico que pode culminar numa ruptura de consequência igualmente fatal.

O aneurisma é definido como uma dilatação localizada e permanente de uma artéria tendo, no mínimo, um aumento de 50% do diâmetro quando comparado ao diâmetro normal desta artéria. O AAA é o tipo mais comum dentre os aneurismas verdadeiros, tem localização preferencial abaixo das artérias renais e invariavelmente apresenta trombo intra-luminal que no entanto mantém preservado um lúmen arterial relativamente normal. No AAA os dois principais fatores de risco são o tabagismo (85% dos pacientes) e hipertensão (60% dos pacientes), que são também fatores de risco da aterosclerose. No entanto, não existe nenhuma correlação efetivamente comprovada entre a hipercolesterolemia e mortalidade por AAA (Bengtsson et al, 1992).

O segmento aórtico abdominal é o mais comprometido pelo processo aterosclerótico, entretanto nem sempre este comprometimento resulta na formação de um AAA. Por muito tempo o AAA, por ser um processo degenerativo que acomete pacientes idosos e apresenta aterosclerose local grave, foi considerado como consequência do processo aterosclerótico. O AAA, embora ainda não tenha sua patogênese completamente elucidada, caracteriza-se por um processo inflamatório transmural, exibindo fragmentação das fibras elásticas e depleção da camada média de células musculares lisas, resultantes de um

processo de remodelamento destrutivo da parede arterial (Annanbhotla et al, 2008). Por outro lado, o processo inflamatório da aterosclerose acomete mais acentuadamente a íntima arterial.

São descritas várias alterações dos componentes da parede arterial no AAA, dentre eles os GAGs. No entanto, como dissociar esses achados do processo aterosclerótico frequentemente associado a este tipo de lesão?

O nosso grupo ao estudar o potencial anticoagulante dos GAGs aneurismáticos (Marinho, 2008), verificou que este potencial não se encontrava comprometido quando comparado com os GAGs obtidos da parede aórtica normal. Como há relatos de alteração estrutural de algumas espécies de GAG na lesão aterosclerótica, e que essas alterações estariam associadas a uma menor atividade anticoagulante dos mesmos, os resultados referentes ao potencial anticoagulante dos GAGs aneurismáticos mostraram-se surpreendentes, uma vez a forte associação do AAA com a aterosclerose. Este fato fica ainda mais reforçado em relação às cadeias de HS, que sinalizavam para uma maior atividade anticoagulante.

Esses achados nos motivaram a tentar elucidar a participação da aterosclerose nessas condições ou verificar se o que foi encontrado estaria mais especificamente associado à patogênese do AAA. Outro fator importante a ser considerado no estudo acima relatado foi a diferença de idade entre os indivíduos das amostras aneurismáticas e das utilizadas como controle.

Lembramos que as lesões de AAA e aterosclerose de grau extremamente avançado, observadas em humanos, correspondem a processos que levam décadas para atingir esse grau de complexidade e portanto difíceis de serem mimetizadas em modelo animal. Por outro lado, a dificuldade de conseguir amostras humanas é um fator limitante para este tipo de estudo, em decorrência do número reduzido de necropsias que são atualmente realizadas nos hospitais

universitários, os quais são os legalmente autorizados a recolher espécimes para a pesquisa.

Por todas essas considerações acima levantadas, o estudo realizado nesta dissertação utilizou um único espécime de aorta, obtido de indivíduo de 78 anos, exibindo numerosas lesões ateroscleróticas ao longo de seus segmentos, não sendo observada a presença de AAA. Tomamos o cuidado de realizar diversas extrações de áreas com diferentes graus de comprometimento aterosclerótico (áreas mais preservadas e diferentes tipos de lesões ateroscleróticas), na tentativa de validar os resultados encontrados, afastando variações intrínsecas às metodologias empregadas no estudo em questão. De todo modo, essa abordagem também exclui eventuais variações entre indivíduos que poderiam comprometer essas avaliações.

Apesar de termos estudado um único espécime de aorta humana, os nossos resultados em relação ao conteúdo e composição dos GAGs de áreas normais e ateroscleróticas estão de acordo com os reportados por vários autores, validando nossos dados referentes à avaliação do potencial anticoagulante dos GAGs aórticos nas lesões ateroscleróticas.

Concluimos que as alterações do potencial anticoagulante dos GAGs observadas nas amostras aneurismáticas não são intrínsecas à patogênese do AAA. A nossa abordagem também nos permitiu verificar que, independentemente do processo aterosclerótico ou aneurismático, existe uma manutenção da atividade anticoagulante das cadeias dos GAGs arteriais no idoso, destacando-se especialmente uma maior atividade anticoagulante das cadeias de HS nesses indivíduos quando comparados aos mais jovens. No entanto, é importante ressaltar que a concentração dessa espécie de GAG está particularmente comprometida nas lesões aneurismáticas e ateroscleróticas. Os nossos resultados também apontam para uma diminuição do HS no idoso. Portanto é possível pensarmos num provável prejuízo do controle das proteases da coagulação nos

indivíduos idosos e mais acentuadamente nas lesões ateroscleróticas, com implicações importantes nas complicações clínicas relacionadas ao processo aterosclerótico.

## VII. BIBLIOGRAFIA:

Abildgaard U, Larsen ML. *Assay of dermatan sulfate cofactor (heparin cofactor II) activity in human plasma.* Thromb Res. 35(3) (1984) 257-266.

Alves CS & Mourão PAS. *Interaction of high molecular weight chondroitin sulfate from human aorta with plasma low density lipoproteins.* Atherosclerosis 73 (1988) 113-124.

Annambhotla S; Bourgeois S; Wang X; Lin PH; Yao O; Chen C. *Recent advances in molecular mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation.* World J Surg 32 (2008) 976–986.

Aschoff L. *Lectures on Pathology.* New York (1924).

Becker RC. *Understanding the dynamics of thrombin in cardiovascular disease: pathobiology and biochemistry for the clinician.* Am Heart J 149 (1) (2005) S2-8.

Bengtsson H, Bergqvist D, Sternby NH. *Increasing prevalence of abdominal aortic aneurysms. A necropsy study.* Eur J Surg 158 (1992) 19-23.

Bick R & Murano G. *Physiology of hemostasis.* Clin Lab Med 14 (1994) 677.

Bitter T, Muir HM. *A modified uronic acid carbazole reaction.* Anal Biochem. 4 (1962) 330-334.

Bock SC. *Antithrombin III and Heparin Cofactor II.* Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice (2006) 5ª edição.

Bourin MC, Lindahl U. *Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation.* Biochem. J. 289 (1993) 313–330.

Bugge TH, Xiau Q, Kombrinck KW. *Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell associated initiator of blood coagulation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93 (1996) 6258–6263.

Camejo G, Hurt-Camejo E, Rosengren B, Wiklund O, Lopez F, Bondjers G. *Modification of copper-catalyzed oxidation of low density lipoprotein by proteoglycans and glycosaminoglycans.* J Lipid Res 32 (1991) 1983-1991.

Camejo G, Olofsson SO, Lopez F, Carlsson P, Bondjers G. *Identification of apo B-100 segments mediating the interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans.* Arteriosclerosis 8 (1988) 368-377.

Cardoso LEM, Mourão PAS. *Glycosaminoglycan fractions from human arteries presenting diverse susceptibilities to atherosclerosis have different binding affinities to plasma LDL.* Arteriosclerosis and Thrombosis 14 (1994) 115-124.

Cassaró CM, Dietrich CP. *Distribution of mucopolysaccharides in invertebrates.* J. Biol.Chem. 252 (1977) 2254-61.

Casu B, Lindahl U. *Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate.* Adv Carbohydr Chem Biochem 57 (2001) 159–206.

Chen M, Masaki T, Sawamura T. *Lox-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis.* Pharmacol Ther 95 (2002) 89-100.

Cherchi GM, Coinu R, Demuro P, Formato M, Sanna G, Tidore M, Tira ME, De Luca G. *Structural and functional modifications of human aorta proteoglycans in atherosclerosis.* Matrix. 10(6) (1990) 362-372.

Conrad HE. *Heparin Binding Proteins.* Academic Press, (1998) 254, San Diego.

Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells.* Proc Natl Acad Sci USA 87 (1990) 5134-5138.

Dahlback B. *Blood Coagulation.* Lancet. 355(9215) (2000) 1627–1635.

de Mattos DA, Stelling MP, Tovar AM, Mourão PA. *Heparan sulfates from arteries and veins differ in their antithrombin-mediated anticoagulant activity.* J Thromb Haemost. 6 (11) (2008) 1987-1990.

Fenster BE, Tsao PS, Rockson SG. *Endothelial dysfunction: Clinical strategies for treating oxidant stress.* Am Heart J 146 (2003) 218-226.

Francis C, Pellegrini V, Harris C et al. *Prophylaxis of venous thrombosis following total hip and total knee replacement using antithrombin III and heparin.* Biochim. Biophys. Acta 269 (1992) 287–297.

Fritze LM, Reilly CF and Rosenberg RD. *An antiproliferative heparan sulfate species produced by postconfluent smooth muscle cells.* The Journal of Cell Biology, 100 (1985) 1041-1049.

Fuchs H, Shiffman M & Pizzo S. *In vivo catabolism of alpha1-proteinase inhibitor-trypsin, antithrombin-thrombin and alpha2macroglobulin-methylamine.* Biochimica et Biophysica Acta 716 (1982) 151–157.

Funderburgh JL. *Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function.* Glycobiology 10 (2000) 951-958.

Gailani J & Broze Jr GR. *Factor XI activation in a revised model of blood coagulation.* Science 253 (1991) 909–912.

Gajdusek C, DiCorleto P, Ross R, Schwartz SM. *An endothelial cell-derived growth factor.* J Cell Biol. 85 (1980) 467-472.

Harrison – *Medicina Interna* Vol 1 – MacGraw Hill (2006) 11<sup>a</sup> ed., 1494-1498.

Harper P, Luddington R, Daly M et al. *The incidence of dysfunctional antithrombin variants: four cases in 210 patients with thromboembolic disease.* British Journal of Haematology 77 (1991) 360–364.

Haust MD. *The genesis of atherosclerosis in pediatric age-group.* Pediatr Pathol 10 (1990) 253-271.

He L, Giri TK, Vicente CP, Tollefsen DM. *Vascular dermatan sulfate regulates the antithrombotic activity of heparin cofactor II.* Blood 111 (2008) 4118-4125.

Hoffman M, Monroe DR. *A cell-based model of hemostasis.* Thromb Haemost 85 (2001) 958.

Hu FB, Willett WC. *Optimal Diets for Prevention of Coronary Heart Disease.* JAMA 288(20) (2002) 2569-2578.

Ihrcke NS, Wrenshall LE, Lindman BJ. *Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions.* Immunol. Today 14 (1993) 500-505.

Iverius PH. *The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans.* J Biol Chem 247 (1972) 2607-2613.

Iverius PH. *Possible role of glycosaminoglycans in the genesis of atherosclerosis. Atherogenesis: Initiating Factors.* Ciba Symposium no. 12. Elsevier North Holland Publishing Co., Amsterdam. 185 (1973).

Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. *Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes.* Physiol Rev 71 (1991) 481-539.

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.* Arteriosclerosis 6 (1987) 131-138.

Katsuda S, Boyd HC, Fligner C, Ross R, Gown AM. *Human atherosclerosis, part III: immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young adults.* Am J Pathol. 140 (1992) 907-914.

Kauffman R, Veltkamp J, van Tilburg N & van Es L. *Acquired antithrombin III deficiency and thrombosis in the nephritic syndrome.* American Journal of Medicine 65 (1978) 607–613.

Kierszenbaum, AL. *Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à Patologia.* Editora Elsevier, 2ª edição (2008).

Kjellen L, Lindahl U. *Proteoglycans: structures and interactions.* Annu Rev Biochem 60 (1991) 443–475.

Kowalewski R, Sobolewski K, Małkowski A, Wolanska M, Gacko M. *Evaluation of Enzymes Involved in Proteoglycan Degradation in the Wall of Abdominal Aortic Aneurysms.* J Vasc Res 43 (2006) 95–100.

Laron Z. *Atherosclerosis starts in childhood: fact, myth or insinuation?* Z Gerontol 24 (1991) 70-72.

Libby P, Ross R. *Cytokines and growth regulatory molecules.* In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editors. *Atherosclerosis and coronary artery disease, vol.1.* Philadelphia: Lippincott-Raven (1996) 585-594.

Libby P. *Inflammation in atherosclerosis.* Nature 420 (2002) 868-874.

Lopez Y, Paloma MJ, Rifon J et al. *Measurement of prethrombotic markers in the assessment of acquired hypercoagulable states.* Thrombosis Research 93 (1999) 71–78.

Mann KG. *Thrombosis: theoretical considerations.* Am J Clin Nutr 65(5 Suppl) (1997) 1657S-1664S.

Marinho, Ana Cristina de Oliveira. *Análise comparativa do potencial anticoagulante dos glicosaminoglicanos da parede de aorta abdominal normal e aneurismática.* Rio de Janeiro: UFRJ, 2008. 52 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina, Cirurgia Geral, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Mathews MB. *Connective tissue: Macromolecular structure and evolution.* Mol. Biol. Biochem. Biophys 19 (1975) 1-318.

Meijers JCM, Tekelenburg WLH, Bouma BN et al. *High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis.* New England Journal of Medicine 342 (2000) 696–701.

Morrissey JH. *Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor.* Thrombosis and Haemostasis 86 (2001) 66–74.

Munro JM, van der Walt JD, Munro CS, Chalmers JA, Cox EL. *An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks.* Hum Pathol. 18 (1987) 375-380.

Murray CJL, Lopez AD. *Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease.* Lancet 349 (2007).1269-1276.

Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. *Early Human Atherosclerosis. Accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 27 (2007) 1159-1165.

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. *Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions.* J Clin Invest 100 (1997) 2680-2690.

Oörni K, Kovanen PT. *PLA2-V: a real player in atherogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 27 (3) (2007) 445-447.

Oörni K, Pentikäinen MO, Annala A, Kovanen PT. *Oxidation of low density lipoprotein particles decreases their ability to bind to human aortic proteoglycans. Dependence on oxidative modification of the lysine residues.* J Biol Chem 272 (1997) 21303-21311.

Pomin, VH & Mourão, PAS. *Carboidratos: de adoçantes a medicamentos.* Ciência Hoje 39 (2006) 24-31.

Radhakrishnamurthy B, Eggen DA, Kokatnur M, Jirge S, Strong JP, Berenson GS. *Composition of connective tissue in aortas from rhesus monkeys during regression of diet-induced fatty streaks.* Lab Invest. 33 (2) (1975) 136–140.

Register TC, Wagner WD. *Heterogeneity in glycosylation of dermatan sulfate proteoglycan core proteins isolated from human aorta.* Connect Tissue Res. 25 (1990) 35-48.

Rosenberg RD, Aird WC. *Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states.* N Engl J Med. 340 (20) (1999) 1555–1564.

Ruoslahti, E. *Proteoglycans in cell regulation.* J Biol Chem 264 (1989) 13369–13372.

Ruoslahti E. *Brain extracellular matrix.* Glycobiology 6 (1996) 489-92.

Sambandam T, Baker JR, Christner JE, Ekborg SL. *Specificity of the low density lipoproteins-glycosaminoglycan interaction.* Arterioscler. Thromb. 11 (1991) 561-568.

Schmidt A, Yoshida K, Buddecke E. *The antiproliferative activity of arterial heparan sulfate resides in domains enriched with 2-O-sulfated uronic acid residues.* J Biol Chem 267 (1992) 19242-19247.

Seppo L, Karjala K, Nevala R, et al. *A long-term fish diet modifies the toxic properties of human partially oxidized LDL on vascular preparations in vitro.* J Physiol Pharmacol 51 (2000) 251-265.

Shirk RA, Parthasarathy N, San Antonio JD, Church FC, Wagner WD. *Altered dermatan sulfate structure e reduced heparin cofactor II-stimulating activity of Biglycan and Decorin from human atherosclerotic plaque.* 275 (2000) 18085-18092.

Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, Boren J. *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis.* Nature 417 (2002) 750-754.

Smith SC Jr, Jackson R, Pearson TA. *Principles for National and Regional Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention A Scientific Statement From the World Heart and Stroke Forum.* Circulation 109 (2004) 3112-3121.

Sтары HC. *Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries.* Basic Res Cardiol 89 (1994) 17-32.

Sтары HC. *Composition and classification of human atherosclerotic lesions.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 421 (1992) 277-290.

Sтары HC. *Evolution of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults.* Atherosclerosis 9 (suppl I) (1989) 19-32.

Sтары HC. *Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children.* Atherosclerosis 64 (1987) 91-108.

Sтары HC. *Natural history of the human atherosclerotic lesion.* XIth International Symposium on Atherosclerosis. Abstracts, Atherosclerosis 134 (1997) 10-11.

Sтары HC. *The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life.* Eur Heart J. 11 (suppl E) (1990) 3-19.

Steinberg D. *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance.* J Biol Chem 272 (1997) 20963-20966.

Stelling, Mariana Paranhos. *Atividade anticoagulante dos glicosaminoglicanos das diferentes camadas da veia umbilical.* Rio de Janeiro: UFRJ, 2007. 95 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. *T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein.* Proc Natl Acad Sci USA 92 (1995) 3893-3897.

Stevens RL, Colombo M, Gonzales JJ, Hollander W, Schimidt K. *The glycosaminoglycans of the human artery and their changes in atherosclerosis.* J Clin Invest. 58 (1976) 470-481.

Sugahara K, Mikami T, Uyama T, Mizuguchi S, Normura K, Kitagawa H. *Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate.* Curr. Opin. Struct. Biol. 13 (2003) 612-620.

Theocharis AD, Theocharis DA, De Lica G, Hjerpe A, Karamanos NK. *Compositional and structural alterations of chondroitin and dermatan sulfates during the progression of atherosclerosis and aneurysmal dilatation of the human abdominal aorta.* Biochimie 84 (2002) 667-674.

Theocharis AD, Tsolakis I, Tseggenidis T, Karamanos NK. *Human abdominal aortic aneurysm is closely associated with compositional and specific structural modifications at the glycosaminoglycan level.* Atherosclerosis 145 (1999) 359-368.

Tollefsen DM, Pestka CA, Monafó WJ. *Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate.* J. Biol. Chem. 258 (1983) 43-59.

Tollefsen D, Zhang L. *Heparin and vascular proteoglycans.* In: Colman R, Marder V, Clowes A, George J, Goldhaber S, editors. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* 5ª edição. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins (2006). pp. 271–283.

Toole BP. *Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue.* Nat. Rev. Cancer 4 (2004) 528-539.

Tovar AMF, Cesar DC, Leta GC e Mourão PAS. *Age-related changes in populations of aortic glycosaminoglycans: species with low affinity for plasma low-density lipoproteins, and not species with high affinity, are preferentially affected.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 18 (4) (1998) 604-614.

Tovar AMF, Mourão PAS, Leta GC et al. *Dermatan Sulfate is the predominant antithrombotic glycosaminoglycan in vessel walls: implications for a possible physiological function of heparin cofactor II.* Bioch. Bio. Acta 1740 (2005) 43-53.

Tovar AMF, Pecly IMD, Range EP, Melo-Filho NM, Mourão PAS, Leite Jr M. *Experimentally induced metabolic acidosis in rabbits modulates the interaction of aortic glycosaminoglycan with plasma low-density lipoprotein—An interesting observation about the association of acidosis and atherosclerosis.* Atherosclerosis 192 (2007) 33-39.

Turnbull JE, Fernig DG, Ke Y, Wilkinson MC, Gallagher JT. *Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate.* J Biol Chem 267 (1992) 10337-10341.

Turnbull J, Powell A, Guimond S. *Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator.* Trends Cell. Biol. 11 (2001) 75-82.

Tyrrell DJ, Ishihara M, Rao N, Horne A, Kiefer MC, Stauber GB, Lam LH, Stack RJ. *Structure and biological activities of a heparin-derived hexasaccharide with high affinity for basic fibroblast growth factor.* J Biol Chem 268 (1993) 4684-4689.

Van der Wal AC, Das, PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE. *Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response.* Lab Invest 61 (1989) 166-170.

Vicente CP, He L, Tollefsen DM. *Accelerated atherogenesis and neointima formation in heparin cofactor II-deficient mice.* Blood 110 (2007) 4261-4267.

Vicente CP, He L, Pavão MS, Tollefsen DM. *Antithrombotic activity of dermatan sulfate in heparin cofactor II-deficient mice.* Blood 104 (13) (2004) 3965-3970.

Vidal F, Colome C, Martínez-González J, Badimon L. *Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric oxide synthase mRNA and protein levels in endothelial cells.* Eur J Biochem 252 (1998) 378-384.

Vijayagopal P, Srinivasan SR, Jones KM, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. *Complexes of low-density lipoproteins and arterial proteoglycan aggregates promote cholesteryl ester accumulation in mouse macrophages.* Biochim Biophys Acta 837 (1985) 251-261.

Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. *Specific inhibition of type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon.* Biochem J 223 (1984) 587-597.

Wagner WD, Salisbury BG. *Aortic total glycosaminoglycan and dermatan sulfate changes in atherosclerotic rhesus monkeys.* Lab Invest. 39 (1978) 322-328.

Wagner WD, Salisbury GJ, Rowe HA. *A proposed structure of chondroitin 6-sulfate proteoglycan of human normal and adjacent atherosclerotic plaque.* Atherosclerosis 6 (1986) 407-417.

Werneck CC, Cruz MS, Silva LCF, Villa-Verde DMS, Savino W, Mourão PAS. *Is there a glycosaminoglycan-related heterogeneity of the thymic epithelium?* J Biol Chem 270 (1995) 9043-9051.

Wight TN. *The extracellular matrix and atherosclerosis.* Curr Opin Lipidol. 6(5) (1995) 326-34.

Wight TN, Ross R. *Proteoglycans in primate arteries. I. Ultrastructural localization and distribution in the intima.* J. Cell Biol. 67 (1975) 660-674.

WHO. *The World Health Organization report 2004 – changing history.* Geneva (2004).

Wodarz A., Nusser R. *Mechanisms of Wnt signaling in development.* Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. 14 (1998) 59-88.

[www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)

Yurt RW., Leid RW., Austen KF., Silbert JE. *Native heparin from rat peritoneal mast cell.* J.Biol. Chem. 252 (1977) 518-521.

Zinserling WD. *Untersuchungen uber atherosclerose, 1: Uber die aortaverfettung bei kinder.* Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med 255 (1925) 677-705.

## **CURRICULUM VITAE**

Nome: Lisandra Antonia Castro Teixeira

Nascimento: 11/06/1983

Naturalidade: Rio de Janeiro

### **⇒ Formação Acadêmica**

**2003 - 2007**      Graduação em Ciências Biológicas - Modalidade Médica - Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

**2007 - 2009**      Mestrado em Química Biológica no Departamento de Bioquímica Médica – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ.

### **⇒ Orientação de Monografia**

“A presença de um polissacarídeo sulfatado com atividade anticoagulante na rodofícea *Solieria filiformis*”.

Bruno Cunha Vairo, monografia apresentada no Departamento de Biologia Marinha – Instituto de Biologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### **⇒ Comunicação em Congresso**

- 5 comunicações em congressos nacionais.
- 1 comunicação em congresso internacional.

# 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](#)