

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA
NÍVEL MESTRADO

Angélica Maciel Gomes

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES DO
HEPARAM SULFATO DO MOLUSCO *NODIPECTEN
NODOSUS***

Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Angélica Maciel Gomes

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E
PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES DO
HEPARAM SULFATO DO MOLUSCO *NODIPECTEN
NODOSUS***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Biológica).

Orientador: Mauro Sergio Gonçalves Pavão

Rio de Janeiro

2010

Gomes, Angélica Maciel

Caracterização Estrutural e Propriedades Anticoagulantes do heparam sulfato do molusco *Nodipecten nodosus* / Angélica Maciel Gomes. -- Rio de Janeiro: UFRJ / IBqM, 2010.

xiv 85 f. : il. ; 29,7 cm.

Orientadores: Mauro Sergio Gonçalves Pavão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, 2010.

Referências Bibliográficas: f. 65-86.

1. Glicosaminoglicanos. 2. Heparan sulfato. 3. Anticoagulante. 4. Antitrombótica – Dissertação. I. Pavão, Mauro Sergio Gonçalves. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica. III. Título.

Angélica Maciel Gomes

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES
DO HEPARAM SULFATO DO MOLUSCO *NODIPECTEN NODOSUS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Rio de Janeiro, abril de 2010.

Prof. Dr. Mauro Sergio Gonçalves Pavão – IBqM/UFRJ
(orientador)

Prof. Dr. Robson Queiroz Monteiro – IBqM/UFRJ
(revisor e membro suplente da banca examinadora)

Prof. Dr. Aurélio Vicente Graça de Souza – IBqM/UFRJ
(membro titular da banca examinadora)

Prof^a. Dr^a. Eliana Barreto Bergter – IMPPG/UFRJ
(membro titular da banca examinadora)

Prof. Dr. Guilherme Ianzi Sasaki – UFPR
(membro titular da banca examinadora)

Dr^a. Adriana Regina Todeschini – IBCCF/UFRJ
(membro suplente da banca examinadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a oportunidade de viver. Obrigada por tudo que me proporciona. Obrigada por iluminar o meu caminho e por estar sempre comigo. Sou muito grata a ti.

A minha linda família que sempre me apoiou e que sempre esteve ao meu lado me incentivando. Agradeço a minha mãe por me ajudar e rezar por mim nos momentos que eu precisei, me confortando. Agradeço ao meu pai por toda sabedoria e ensinamentos. Agradeço aos meus irmãos por serem meus companheiros ao longo de todo o meu caminho, obrigada por serem especiais. Vózinha linda, obrigada por ter cuidado de mim em vários momentos. Obrigada ao meu padrinho que sempre valorizou o estudo e me ensinou ser assim. Agradeço a todos os meus familiares que não dá para citar aqui pois minha família é imensa, amo vocês!

Ao meu querido Orientador Mauro que sempre confiou em mim e me deu todas as oportunidades necessárias para o meu crescimento e desenvolvimento ao longo desse caminho. Obrigado por estar sempre disponível. Admiro muito sua mente inovadora, inteligência, seu vasto conhecimento e a preocupação que tem com seus alunos. Parabéns pela sua incontestável competência.

Á minha amada Orientadora Eliene que me ensinou e me ensina até hoje mesmo a distância o necessário. Obrigada por estar sempre ao meu lado em todos os momentos que precisei. Obrigada por todos os ensinamentos. Obrigada pelos

puxões de orelha. Obrigada por ter me ensinado a ser perseverante. Obrigada por ser como é, um exemplo a ser seguido por quem quer ser um pesquisador de verdade. Sinto-me honrada em olhar para trás e ver que meus primeiros passos na Ciência devo a você

À Prof.^a Ana Tovar pela disponibilidade, paciência e pelo banho de conhecimento que joga sobre nós quando é solicitada. Pela alegria de sempre em ajudar. Obrigada pelas reflexões despertadas pelos seus questionamentos.

Ao Prof. Paulo Mourão pelo conhecimento extenso a respeito do mundo da glicobiologia e por muitas vezes proporcionar as condições de trabalho ideais.

Aos professores Luiz Claudio, Ana Cristina e Mariana por acrescentarem a minha formação cada um do seu jeitinho.

Ao Prof. Robson, pela revisão desta dissertação e participação na banca examinadora. Muito obrigado pela atenção, disponibilidade, pelos ensinamentos. Obrigada por ceder o espaço do seu laboratório quando preciso. Agradeço também aos integrantes do seu laboratório (Andreia, Andrea, Danizinha, Angélica, Luize) que sempre me acolheram e me ajudaram quando precisei.

Ao querido Carlos Eduardo por ter servido de exemplo em vários aspectos para mim e por ter me encaminhado ao lugar que estou hoje.

Aos meus alunos Christiano e Juliana por confiarem em mim e por estarem ao meu lado somando com suas peculiaridades e convivência.

Aos. Prof. Aurélio, Eliana e Guilherme por terem gentilmente aceitado fazer parte da banca examinadora desta dissertação.

Ao IED-BIG, em especial ao Zaganelli pelo apoio que dá a nossa pesquisa. Muito obrigada pelos coquilles e pela recepção calorosa em Angra. Sem a sua ajuda o trabalho teria sido muito mais difícil.

A minha “irmã” de laboratório e amiga Christiane pela amizade e companheirismo. Obrigada por tomar conta de mim e por estar ao meu lado em momentos tristes e alegres. Obrigada também por acrescentar nessa dissertação com suas dicas e discussões. Obrigada por me aturar no seu quarto e por ter me dado força nos preparativos da viagem para Londres e Paris

Ao meu querido Raio (Celso) por todo apoio e amizade durante momentos de instabilidade em minha vida. Agradeço também por deixar os nossos dias mais alegres no laboratório. Obrigada por me ouvir quando precisei e pelas inúmeras caronas. Sei que poderei contar muito com você no doutorado aproveitando seus conhecimentos do campo da inflamação.

Ao meu querido amigo Robertino (e seus filhotes, Sthephan e Gustavo) por ter me ensinado os experimentos *in vivo* realizados nessa dissertação e por todas as

outras conversas super esclarecedoras. Obrigada também pela amizade e pelas nights!

Ao querido Bruninho por estar sempre disponível e pela amizade em momentos de que precisei.

À a minha querida amiga Lizandra por ser linda e por ter um coração puro e inigualável. Obrigada pelo companheirismo em momentos que necessitei de carinho. Obrigada também pelos momentos de diversão nos quais nos acabamos de dançar e de rir.

Obrigada a Cintia Maria por ter me passado com toda paciência seus conhecimentos histológicos. Muito obrigada pelo ombro amigo e amizade. Aproveito aqui para agradecer a Prof^a Silvana, Ana e aos integrantes do laboratório pelo apoio.

À Ashley, Carolaine e Xiseleeee por contribuírem com suas agradáveis companhias e tornarem o dia a dia mais alegre. Ao mais novo integrante do laboratório Athos pela disponibilidade em ajudar sempre que foi solicitado.

À Gabi pelo companheirismo até tarde nos experimentos do laboratório, pela amizade e pelas inúmeras caronas que são sempre bem vindas.

À querida Thaianne e Ingrid pela convivência e por todas as discussões e ensinamentos. Muito obrigada por despertarem o meu interesse e por me ajudarem a dar meus primeiros passos no mundo inflamatório.

Aos integrantes do Laboratório de Tecido Conjuntivo (Leo, Mitch, Bianca...) que embora não estejam todos aqui citados certamente cada um contribuiu e continua a contribuir de alguma forma para o meu desenvolvimento pessoal e acadêmico-científico. Agradeço também aos ex-integrantes como Amandinha, Polinha dentre outros.

Ao meu lindo e amado namorado Carlos Alberto por ser um homem de valor, princípios e por atender o que eu sempre esperei de um companheiro. Obrigada pelo carinho, atenção, compreensão, amor e por estar comigo em todos os momentos que escrevi essa dissertação. Sem você o caminho teria sido muito mais longo e difícil. Obrigada também pelo apoio durante a preparação para seleção do doutorado. Agradeço por todas as inúmeras ajudas. Obrigada por ser tudo de bom e por ser meu. TE AMO. Aproveito também a oportunidade para agradecer aos integrantes do Laboratório LTPV que me aturam diariamente com carinho (Cris, Nat, Shanita, Pat, Guilherme, Theo, “Daniel Reynaldo”, Daniel, Tuane, Mari, Vanessa, Rafael, Val, Vivian, Marcela, Prof. Andre e Pro^a Andréa)

Às minhas amigas Aline e Raquel pela amizade e apoio nos momentos que precisei. Obrigada por tudo que acrescentam em minha vida, vocês são essenciais. Obrigada por entenderem minha ausência em alguns momentos. Agradeço também aos amigos não citados de todos os lados da minha vida (graduação, colégio, amigos do break...).

RESUMO

Caracterização Estrutural e Propriedades Anticoagulantes do Heparan Sulfato do Molusco *Nodipecten nodosus*

Glicosaminoglicanos do tipo heparina apresentando alta atividade anticoagulante vêm sendo descritos em várias famílias de moluscos marinhos. O presente trabalho visou à caracterização estrutural de um novo heparan sulfato (HS) isolado do molusco *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) e a determinação das suas propriedades anticoagulantes e antitrombóticas. Os polissacarídeos totais foram extraídos do molusco e fracionados por precipitação em etanol. O principal componente (>90%) foi identificado como um HS, representando 4.6 mg/g de tecido seco. O HS do molusco resiste à degradação por heparinase I porém é clivado por ácido nitroso. Análises do HS do molusco por espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensional e bidimensional revelaram resíduos de ácido glucurônico e glucosamina N-acetilada. Sinais correspondentes aos prótons anoméricos de ácido glucurônico 0, 2 e 3 sulfatado, bem como glucosamina N e/ou 6 sulfatada, também foram observados. O HS do molusco apresentou atividade anticoagulante de 36 IU/mg, sendo cerca de 5 vezes menor que a da heparina de mamífero (180 IU/mg), conforme quantificada pelo ensaio de tempo parcial de tromboplastina ativada. O HS também inibe o fator Xa com IC(50) de 0,84 µg/mL e trombina com o IC(50) de 9,3 µg/mL, na presença de antitrombina. Ensaio *in vivo* demonstraram que na dose de 1 mg/kg, o HS do molusco inibiu o crescimento do trombo em artérias após lesão fotoquímica do endotélio. Na dose antitrombótica, o HS do molusco não produziu sangramento, atividade de calicreína mediada por fator XII ou efeito tóxico em fibroblastos.

ABSTRACT

Structural Characterization and Anticoagulant Properties of heparan sulfate from the mollusk *Nodipecten nodosus*

Heparin-like glycans with diverse disaccharide composition and high anticoagulant activity have been described in several families of marine mollusks. The present work focused on the structural characterization of a new heparan sulfate (HS)-like polymer isolated from the mollusk *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) and on its anticoagulant and antithrombotic properties. Total glycans were extracted from the mollusk and fractionated by ethanol precipitation. The main component (>90%) was identified as HS-like glycosaminoglycan, representing approximately 4.6 mg g⁽⁻¹⁾ of dry tissue. The mollusk HS resists degradation with heparinase I but is cleaved by nitrous acid. Analysis of the mollusk glycan by one-dimensional (1)H, two-dimensional correlated spectroscopy, and heteronuclear single quantum coherence nuclear magnetic resonance revealed characteristic signals of glucuronic acid and glucosamine residues. Signals corresponding to anomeric protons of nonsulfated, 3- or 2-sulfated glucuronic acid as well as N-sulfated and/or 6-sulfated glucosamine were also observed. The mollusk HS has an anticoagulant activity of 36 IU mg⁽⁻¹⁾, 5-fold lower than porcine heparin (180 IU mg⁽⁻¹⁾), as measured by the activated partial thromboplastin time assay. It also inhibits factor Xa (IC₅₀ = 0.835 µg/mL) and thrombin (IC₅₀ = 9.3 µg/mL) in the presence of antithrombin. In vivo assays demonstrated that at the dose of 1 mg/kg, the mollusk HS inhibited thrombus growth in photochemically injured arteries. No bleeding effect, factor XIIa-mediated kallikrein activity, or toxic effect on fibroblast cells was induced by the invertebrate HS at the antithrombotic dose.

LISTA DE ABREVIATURAS

aPTT – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

AT - antitrombina

BHK-21 – Célula de rim de hamster sírio

Chase AC – condroitinase AC

CS – Condroitim sulfato

CSOS – Condroitim sulfato *oversulfatado*

CPC – Cloreto de cetil-piridina

DS – Dermatam sulfato

EDTA – Ácido etilenediamino tetra-acético

GAG – Glicosaminoglicano

HCII – Cofator II da heparina

HS – Heparam sulfato

IED-BIG - Instituto de Ecodesenvolvimento da Baía de Ilha Grande

LMWH – Heparina de baixo peso molecular

Nodipecten nodosus – *N. nododus*

NS – N sulfato

PG – Proteoglicano

SERPINS – Inibidores de serino-proteases.

TF – Fator Tecidual

TFPI – Inibidor da via do fator tecidual

vWF – Fator de von-willebrand

SUMÁRIO

	Pág.
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Hemostasia	1
1.2 – Trombose	6
1.2.1 – Glicosaminoglicanos	10
1.2.2 – O uso da heparina na trombose	15
1.2.3 – O uso clínico da heparina	18
1.2.4 – Contaminação da heparina: Crise Mundial	19
1.3 – O Molusco <i>Nodipecten nodosus</i> (Linnaeus, 1758) como uma fonte de análogos da heparina	22
2 – OBJETIVOS	26
3 – MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 – Coleta	27
3.2 – Histoquímica dos Tecidos do Molusco	27
3.3 – Extração dos Polissacarídeos Sulfatados	27
3.4 – Fracionamento dos Polissacarídeos Sulfatados	28
3.5 – Eletroforese em Gel de Agarose	28
3.6 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	29
3.7 – Tratamento Enzimático e Químico	29
3.8 – Dosagem de Ácido Hexurônico	30
3.9 – Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear	30
3.10 – Ensaio de Atividade Anticoagulante <i>in vitro</i>	31
3.11 – Inibição da Trombina ou Fator Xa por AT ou HCII na Presença de Glicosaminoglicanos	31

3.12 – Ativação do Fator XII na Presença de Polissacarídeos Sulfatados	32
3.13 – Ensaio de Atividade Antitrombótica no Modelo de Lesão Fotoquímica do Endotélio Arterial.....	33
3.14 – Efeito Hemorrágico	34
3.15 – Ensaio de Viabilidade Celular.....	34
3.16 – Análise Estatística.....	35
4 – RESULTADOS	36
4.1 – Localização Tecidual dos Glicosaminoglicanos no <i>N.nodosus</i>	36
4.2 – Isolamento e Identificação dos Glicosaminoglicanos Presentes em <i>N.nodosus</i>	38
4.3 – Fracionamento dos Polissacarídeos Sulfatados e Caracterização Inicial do Heparinóide.....	41
4.4 – Caracterização Estrutural através Ressonância Magnética Nuclear.....	42
4.5 – Atividade anticoagulantes do HS presente no <i>N.nodosus</i>	49
4.6 – Inibição de trombina e fator Xa mediada por antitrombina e cofator II da heparina.....	50
4.7 – Efeito antitrombótico do HS do <i>N.nodosus</i>	53
4.8 – Efeito do HS do <i>N.nodosus</i> no tempo de sangramento.....	54
4.9 – Ativação do fator XII na presença de polissacarídeos sulfatados	55
4.10 – Ensaio de citotoxicidade do HS do <i>N.nodosus</i>	56
5 – DISCUSSÃO	57
6 – REFERÊNCIAS	64
7- ANEXOS.....	73

INTRODUÇÃO

1.1 Hemostasia

O fluxo sanguíneo e a manutenção da integridade do sistema vascular são essenciais à vida pois, além do transporte de oxigênio, nutrientes e hormônios para células-alvo, também encaminham os restos metabólicos para as vias de excreção. Nesse contexto, o sistema hemostático, composto pela coagulação sanguínea e as plaquetas, constitui-se em um mecanismo fisiológico fundamental (Mackman e cols., 2007).

A hemostasia é um processo fisiológico que controla a fluidez do sangue e tem o potencial de, diante de uma lesão vascular, induzir rapidamente um tampão hemostático de fibrina e plaquetas que mantem o fluxo do sangue (coagulação sanguínea). O conceito moderno de coagulação foi proposto em 1964 como um modelo de cascata composto por duas vias independentes (Davie & Ratnoff, 1964; Macfarlane, 1964). Neste modelo complexo, a ativação de cada fator sanguíneo da coagulação leva à ativação de um fator subsequente, culminando com a formação de trombina (Figura 1, A). Os números atribuídos a cada fator representam a ordem cronológica com que eles foram descobertos e não o seu ponto de atuação na cascata, dificultando o seu entendimento.

Embora complexo, o modelo da cascata trouxe um avanço significativo no entendimento da coagulação, que tem sido reconhecida como um mecanismo de defesa sofisticado, capaz de detectar qualquer dano vascular e prevenir sangramentos excessivos. O modelo pôde explicar muitos fenômenos observados *in vitro*, mas apresenta muitas falhas no que se refere às observações *in vivo*. Por exemplo, embora deficiências na quantidade de cininogênio de alto peso molecular, pré-caliceína e fator XII prolonguem o tempo parcial de tromboplastina (aPTT), elas

não causam sangramento *in vivo* (Andrew & Vine, 2009). Por outro lado, a deficiência de fator IX causa um grave distúrbio hemorrágico, a hemofilia B (Vine, 2009).

Entretanto, o modelo da cascata não pode explicar por que a ativação do fator X pela via extrínseca, não compensa a perda do fator VIII (hemofilia A) ou do fator IX (hemofilia B). Por estes motivos, inferiu-se que a via intrínseca, ou sistema de contato, não apresenta um papel fisiológico real na hemóstase (Seligsohn, 2007).

Uma descoberta importante foi a de que a trombina é o ativador fisiológico do fator XI, contornando as ativações iniciais induzidas pelo sistema de contato (Gailani & Broze, 1993). Outra observação importante é a de que o complexo fator tecidual/fator VII, iniciador da via extrínseca, pode, também, ativar o fator IX da via intrínseca. Estes achados levaram à conclusão de que a ativação do complexo fator tecidual/fator VII é o principal evento iniciador das reações da coagulação sanguínea (Hoffman & Monroe, 2001).

Apesar do fator XII, do cininogênio de alto peso molecular e da pré-caliceína não desempenharem função essencial na hemóstase, o fator XI é fundamental na amplificação da geração de trombina. Com base nestes dados, um modelo celular de hemostase foi proposto (Hoffman & Monroe, 2001), no qual a hemostasia acontece em três fases interrelacionadas: iniciação, amplificação e propagação (Figura 1, B).

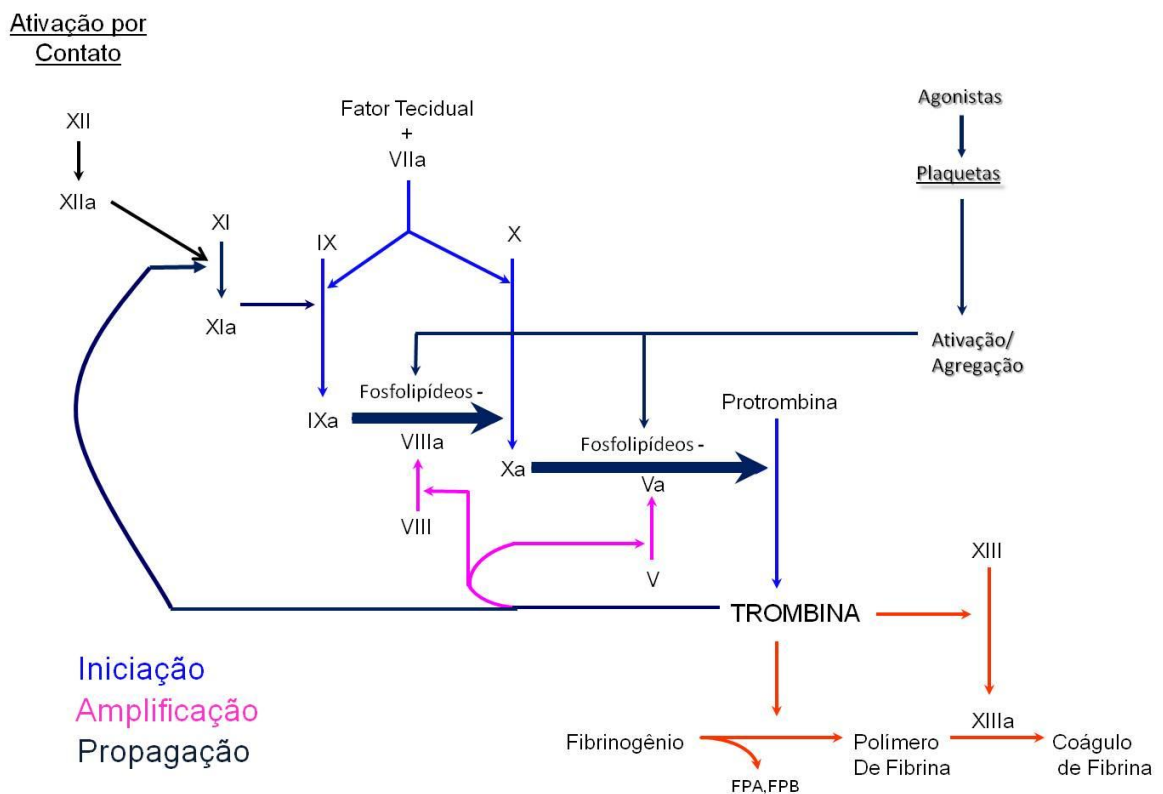


Figura 1. Sistema de coagulação sanguínea. A fase de iniciação da coagulação ocorre após uma lesão vascular e exposição do fator tissual ao sangue. A fase de amplificação (azul marinho) pode ser disparada quando a trombina é gerada, ativando assim o fator XI. As duas vias convergem na formação do fator Xa.

O processo da coagulação sanguínea tem início quando os componentes do sangue entram em contato com células localizadas no espaço sub-endotelial, como fibroblastos e células musculares lisas, que expressam a proteína fator tecidual. No estado inflamatório, o endotélio ativado e monócitos também podem expressar fator tecidual. Um número cada vez maior de evidências tem mostrado que o fator tecidual está presente em micropartículas derivadas de membrana celular de plaquetas, leucócitos e endotélio que são liberadas na corrente sanguínea (Ardoin e cols., 2007). A presença de fator tecidual dentro da vasculatura contribui para eventos trombóticos associados a diversos estados patológicos, uma vez que o fator VII circulante rapidamente se liga ao fator tecidual e ativa a coagulação.

O complexo fator tecidual-fator VII ativa o fator X e o fator IX. O fator Xa pode ser inativado pela antitrombina e pelo inibidor da via do fator tecidual (do inglês, TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*). Quando a exposição ao fator tecidual é suficientemente alta a ponto de sobrepor as ações inibitórias, o fator Xa ativa o fator V que, em conjunto, convertem uma pequena quantidade de protrombina em trombina (0,1-1,0 nM). Todo o processo, desde a exposição ao fator tecidual até a geração de trombina, é chamado de **fase de iniciação**.

A pequena quantidade de trombina gerada na fase de iniciação amplifica o processo, ativando as plaquetas via seus receptores ativados por protease PAR-1 e -4 (do inglês, PAR, *protease-activated receptor*) (Coughlin, 1999). Esta etapa é chamada de **fase de amplificação**. As plaquetas também podem ser ativadas pela adesão ao colágeno subendotelial. A interação plaquetas-colágeno é mediada por um receptor plaquetário específico, denominado de glicoproteína (GP) Ia/IIa e Fator de von Willebrand (vWF, do inglês, vWF, *von Willebrand Factor*), que formam pontes entre as plaquetas e as fibras de colágeno (Sakariassen e cols., 1979)

Uma vez ativadas, as plaquetas exercem um papel central nos processos subsequentes da coagulação, como, por exemplo, a ativação do fator XI via glicoproteína GPIb. Além disso, as plaquetas ativadas também liberam o conteúdo dos seus grânulos α , como fator V parcialmente ativado (Veldman e cols., 2003), que é integralmente ativado por trombina e fator Xa. Desta forma, as plaquetas apresentam os fatores Va, VIIIa e XIa ligados a sua superfície.

A fase de propagação é caracterizada pela rápida produção de trombina através da formação de dois complexos na superfície de plaquetas ativadas: o complexo tenase e o complexo protrombinase. O complexo tenase é formado quando o fator IXa deixa a célula ou micropartícula contendo TF, onde ele foi

ativado, e se liga a um receptor na superfície plaquetária. O complexo ativa uma maior quantidade de fator X, que se complexa com o fator Va para formar o complexo protrombinase.

O complexo protrombinase produz uma enorme quantidade de trombina que, então, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina e também ativa um fator estabilizador, fator XIII, que irá participar na formação do tampão hemostático (Muszbek e cols., 1996).

Em indivíduos saudáveis, a hemostase é cuidadosamente controlada por diversos mecanismos anticoagulantes, incluindo o TFPI, proteína C, proteína S, antitrombina e cofator II da heparina, que se contrapõem aos eventos pró-coagulantes, prevenindo a ocorrência inapropriada de coagulação sanguínea vascular (Segers e cols., 2007).

O inibidor inicial da coagulação iniciada pelo TF é o TFPI, que se liga e inibe o complexo TF-fator VIIa (Crawley & Lane, 2008) e assegura que um pequeno estímulo pró-coagulante não promova um aumento exagerado na formação de trombina.

Um outro mecanismo importante de regulação da coagulação é a via da proteína C. A trombina complexada com a trombomodulina (seu receptor endotelial), ativa a proteína C, que, em combinação com a proteína S, degrada os fatores Va e VIIIa, que são importantes para sustentar a geração de trombina na coagulação.

Por fim, a antitrombina (AT) e o cofator II da heparina (HCII) são inibidores de serino-proteases (SERPIN, do inglês *serine protease inhibitor*). A AT é o principal inibidor de fatores da coagulação ativados, incluindo trombina, fator IXa e fator Xa. Já, o cofator II da heparina, encontrado em concentrações plasmáticas micromolares inibe, especificamente, a trombina.

Células endoteliais expressam glicosaminoglicanos (GAGs) em sua superfície celular, como, por exemplo, o heparan sulfato, que funciona como um potencializador fisiológico da AT e HCII. Recentemente, polímeros de heparan sulfato extraídos de aorta e de veia cava foram analisados quanto à estrutura e à atividade inibitória de antitrombina. Foi observado que as células endoteliais de cada tipo de vaso, veia ou artéria, sintetizam heparan sulfato com estrutura e atividade anticoagulante diferentes. Este dado sugere que a síntese do heparan sulfato pelas células endoteliais pode estar relacionada com os mecanismos de resposta de cada tipo de vaso ao estímulo pró-coagulante (de Mattos e cols., 2008).

A ligação da antitrombina aos GAGs da superfície endotelial é crucial para a rápida inativação da trombina. Em circunstâncias normais, há uma leve prevalência de forças anticoagulantes (Dahlback, 2000), mas este equilíbrio dinâmico entre fatores pró- e anticoagulantes pode ser rapidamente mudado em favor da coagulação, diante de uma necessidade de se reduzir a perda de sangue. Portanto, qualquer perturbação no equilíbrio hemostático poderá resultar tanto em um aumento da tendência de sangramento (estado hemorrágico), quanto em uma maior tendência para desenvolver trombose (estado pró-trombótico).

1.2 Trombose

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo. Estima-se que um em cada três adultos americanos apresente um ou mais tipos de doenças cardiovasculares. Especula-se, também, que os custos diretos e indiretos com doenças cardiovasculares em 2008 foram de US\$ 475,3 bilhões. O gráfico abaixo (Figura 2) nos mostra a incidência de mortes em casos de doenças cardiovasculares e nos leva a refletir sobre a

importância de geração de conhecimento acerca desse assunto e a necessidade da busca de novos compostos para o tratamento dessas doenças (American Heart Association, 2009). Dentre tais patologias, a trombose se destaca como uma das principais.

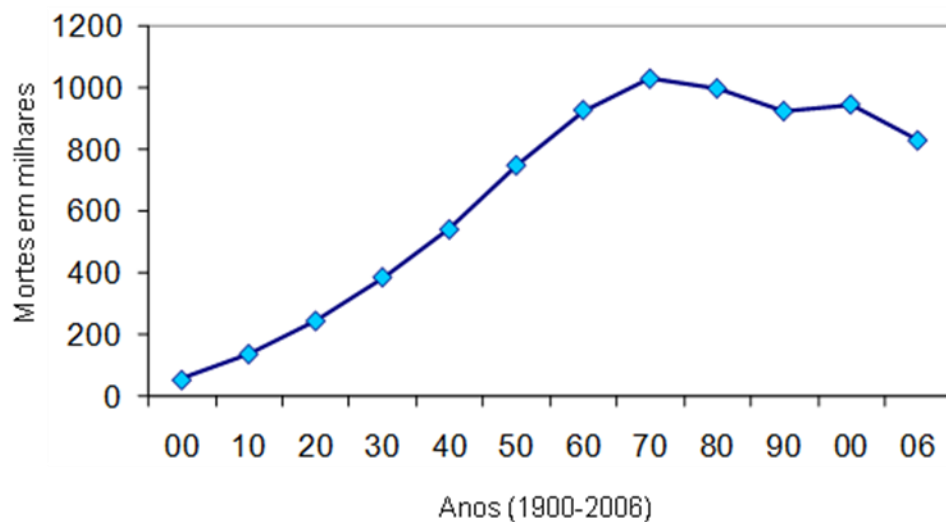


Figura 2: Número de casos de morte provocados por doenças cardiovasculares nos Estados Unidos no período de 1900 a 2006. Adaptado de American Heart Association, 2009.

A trombose – ocorrência de coágulo intravascular – pode ocorrer tanto na circulação venosa quanto na arterial. O patologista alemão Rudolf Virchow, pioneiro nos estudos da hemostasia, postulou que três causas principais contribuem para a trombose: mudanças na parede vascular (trauma), na composição do sangue (hipercoabilidade) ou no fluxo sanguíneo (estase) (Virchow, 1856).

As patofisiologias da trombose arterial e da trombose venosa são diferentes. A trombose arterial é primariamente iniciada com a ruptura de uma placa aterosclerótica, gerando um trombo rico em plaquetas (Fig. 3). Com o rompimento do ateroma, plaquetas são recrutadas através de receptores específicos de colágeno e fator de von Willebrand (Denis & Wagner, 2007).

Após a adesão à parede do vaso, ocorre recrutamento de mais plaquetas, resultando em um rápido crescimento do trombo. Além disso, plaquetas também são ativadas por trombina via receptores PAR-1, liberando, assim, o conteúdo de seus grânulos, fenômeno que amplifica o recrutamento, adesão, agregação e ativação plaquetária (Mackman, 2008). Dessa forma, a trombose arterial é geralmente tratada, mais frequentemente, com agentes antiplaquetários, como inibidores de ciclo-oxigenase, e antagonistas de receptores de ADP.

A trombose arterial aguda é a principal causa da maioria dos casos de infarto agudo do miocárdio e de, aproximadamente, 80% dos acidentes vasculares (Mackman, 2008). Estimativas indicam que, em 2020, as doenças aterotrombóticas serão as causas de morte de maior frequência em todo mundo (Lloyd-Jones e cols., 2010). No Brasil, em 2002, as doenças cardíacas foram responsáveis por 139.601 mortes, enquanto 129.172 pessoas morreram devido a acidentes vasculares cerebrais.

A trombose venosa inferior e a embolia pulmonar são referidas como tromboembolismo. A trombose venosa ocorre mais frequentemente nas grandes veias das pernas. Já, a embolia pulmonar é uma complicação da trombose venosa e pode ocorrer se parte de um trombo solto se alojar em uma artéria pulmonar, resultando na interrupção do fluxo sanguíneo no pulmão.

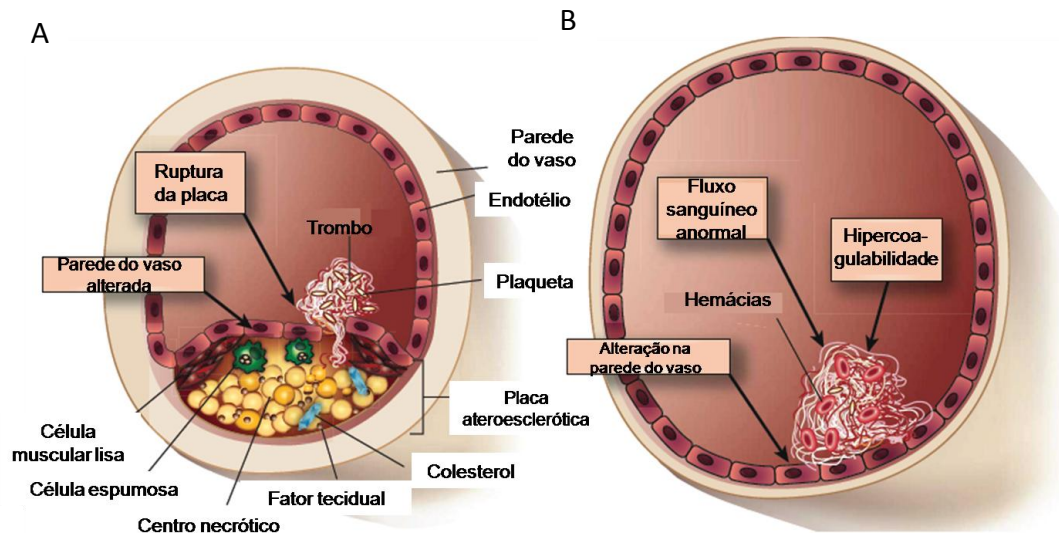


Figura 3: Iniciadores da trombose venosa e arterial. A) A trombose arterial é disparada com o rompimento de um ateroma, levando à exposição de constituintes do interior da placa ao sangue. B) Na trombose venosa, ocorrem alterações no endotélio, no fluxo sanguíneo e nos componentes sanguíneos. Adaptado de Mackman, 2008.

Os trombos formados nas veias são ricos em fibrina e eritrócitos, sendo chamados de coágulo vermelho. Os trombos arteriais, ricos em plaquetas, são chamados de coágulo branco. A trombose venosa ocorre, principalmente, em função de modificações na composição sanguínea (estado de hipercoagulabilidade), modificações no fluxo sanguíneo (estase) e/ou mudanças na parede do vaso (Virchow, 1856). Fatores genéticos e ambientais podem aumentar o risco de tromboembolismo (Cushman, 2007). O tromboembolismo hereditário pode ser causado por um aumento na atividade ou dos níveis das proteínas da coagulação. Por exemplo, uma mutação pontual específica no gene codificador do fator V (presente em 5% dos caucasianos), resulta em um fator V variante que é resistente à inativação pela proteína C e, portanto, leva a uma coagulação aumentada. Certos fatores que aumentam o risco de tromboembolismo venoso incluem a obesidade, cirurgias com longos períodos de repouso e o câncer.

Ambos os tipos de trombose envolvem a ativação da coagulação sanguínea e, por isso, o uso de anticoagulantes e/ou antiplaquetários tem sido uma ferramenta útil na profilaxia dessas doenças.

1.2.2 Glicosaminoglicanos

Os GAGs são macromoléculas de natureza glicídica que interagem com inúmeras proteínas e modulam diversos processos biológicos, como desenvolvimento, angiogênese, crescimento axonal, progressão do câncer, patogênese microbiana, hemostase, dentre outros (Sasisekharan e cols., 2006). Os GAGs estão presentes na superfície celular de todas as células animais e na matriz extracelular.

Esses polímeros são heteropolissacarídeos lineares formados, na maioria das vezes, por unidades dissacarídicas repetitivas de um ácido hexurônico e uma hexosamina. Os GAGs podem conter grupamentos sulfato em diferentes posições da molécula que, em conjunto com os grupamentos carboxila, resultam em um forte caráter aniônico, o que permite a interação com diversas moléculas, como citocinas, fatores de crescimento, enzimas e proteínas plasmáticas, como citado anteriormente (Conrad, 1998; Wodarz & Nusser, 1998).

Os diferentes tipos de GAGs podem ser classificados de acordo com o tipo do ácido urônico (ácido glucurônico ou ácido idurônico), pelo tipo da hexosamina (glucosamina ou galactosamina), pelo tipo de ligação glicosídica e pelo padrão de substituição das unidades dissacarídicas com sulfato (Figura 4).

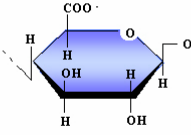
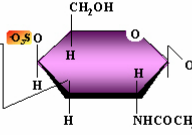
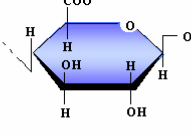
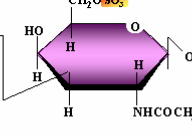
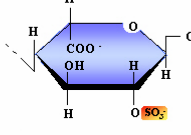
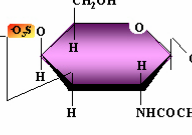
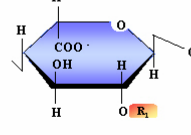
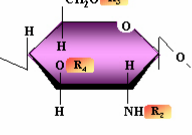
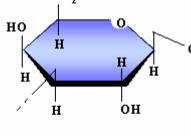
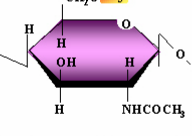
Glicosaminoglicano	Ácido Hexurônico	Hexosamina	Ligação O-glicosídica
Condroitim-4-sulfato	 Ácido Glucurônico (GlcUA)	 N-Acetil-Galactosamina (GalNAc)	GlcUA 1→3 GalNAc
Condroitim-6-sulfato	 Ácido Glucurônico (GlcUA)	 N-Acetil-Galactosamina (GalNAc)	GlcUA 1→3 GalNAc
Dermatam sulfato	 Ácido Idurônico (IdUA)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

Figura 4: Unidades dissacarídicas presentes nos GAGs. Os GAGs são formados por uma hexosamina e um ácido hexurônico. O queratam sulfato apresenta galactose no lugar do ácido hexurônico, ao passo que o ácido hialurônico não apresenta grupamentos sulfato.

O ácido hialurônico é o glicosaminoglicano mais simples, formado por unidades dissacarídicas de ácido glucurônico e N-acetilglucosamina. Este é o único GAG não sulfatado. Ele é encontrado na matriz extracelular de diversos tecidos e amplamente distribuído na natureza.

Com exceção do ácido hialurônico, os glicosaminoglicanos são sintetizados ligados, covalentemente, a proteínas formando os proteoglicanos (PG). Nos PGs, cada cadeia de GAG é sintetizada a partir de um tetrassacarídeo de ligação, que está aderido à um resíduo de serina ou treonina na cadeia polipeptídica através de ligação O-glicosídica. Os proteoglicanos são glicoconjugados muito complexos por apresentarem variações na cadeia polipeptídica, no tipo e na quantidade de cadeias de GAG ligadas (Figura 5). O queratam sulfato pode ainda estar N-ligado a um resíduo de asparagina na cadeia polipeptídica (Funderburgh, 2002).

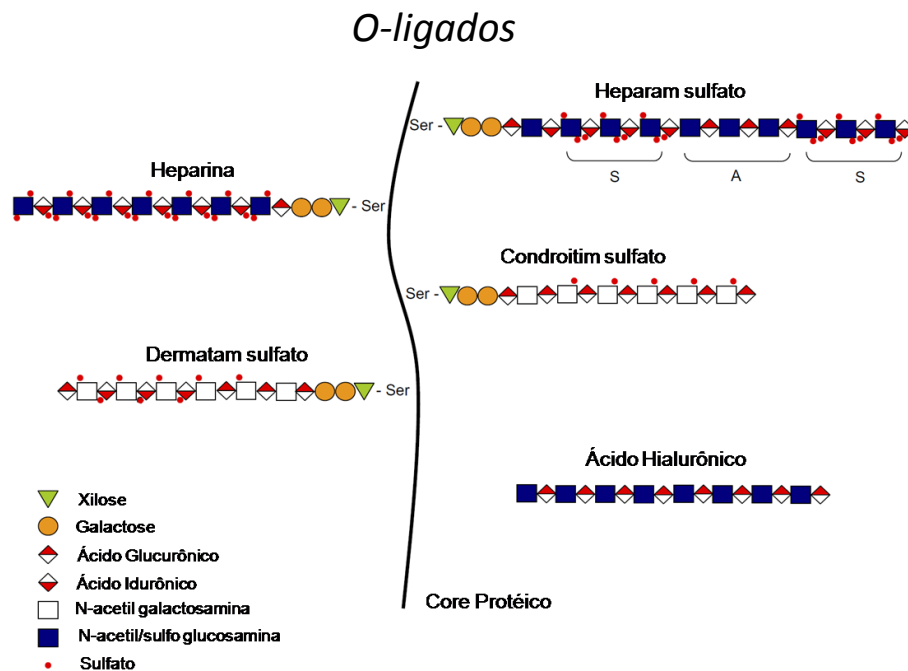


Figura 5: Representação esquemática de um proteoglicanos e cadeias de GAG. As cadeias de GAG se inserem no *core* protéico em resíduos de serina. Existe ainda um tetrassacarídeo de ligação formado por xilose, duas galactoses e um ácido glucurônico. Adaptado de Imberty e cols., 2006.

No queratam sulfato, identificado em 1939 em extratos de córnea (Suzuki, 1939), as unidades dissacarídicas são formadas por galactose e N-acetilgalactosamina (Funderburgh, 2000).

O condroitim sulfato (CS) é formado por unidades dissacarídicas de N-acetil-galactosamina e ácido glucurônico. O CS pode estar presente na superfície celular, matriz extracelular e no meio intracelular (Sugahara e cols., 2003). Já foram descritos diversos tipos de CS, que são diferentes entre si pelo grau e posição de sulfatação (Tabela 1).

Tabela 1. Tipos de condroitim sulfato

Tipo de condroitim sulfato	Unidade Dissacarídica Principal	Fonte	Referência
A	GlcA β 1-3GalNAc4S	cartilagem e outros tecidos	Levene, 1925
C	GlcA β 1-3GalNAc6S	cartilagem e outros tecidos	Levene, 1925
D	GlcA2S β 1-3GalNAc6S	cartilagem de tubarão, cérebro	Suzuki, 1960
E	GlcA β 1-3GalNAc4,6diS	lula, grânulos de mastócitos	Saito, 1968
K	GlcA3S β 1-3GalNAc4S	caranguejo	Send, 1962

O dermatam sulfato (DS), também chamado de condroitim sulfato B, possui principalmente ácido idurônico e N-acetil galactosamina e é abundante na pele e no tendão. DSs altamente sulfatados foram encontrados também em invertebrados marinhos (Pavão e cols., 1995 e 1998).

Semelhante à heparina, o heparam sulfato (HS) é um glicosaminoglicano formado por unidades dissacarídicas de ácido urônico e glucosamina unidos por uma ligação glicosídica 1 \rightarrow 4. O HS está presente sob a forma de PG na superfície celular de todas as células animais e na matriz extracelular. As cadeias de HS presentes na superfície celular podem estar ligadas a proteínas transmembrânicas, formando os proteoglicanos de

Sindecans, ou à proteínas ancoradas por glicosilfostatidilinositol, constituindo os Glipicans (Iozzo, 2001).

Tanto o ácido idurônico quanto ácido glucurônico estão presentes no HS e ambos podem ser sulfatados na posição 2. A glucosamina pode estar N-sulfatada ou N-acetilada e O-sulfatada na posição 6 ou 3 em menores proporções. No entanto, o HS possui um grau de sulfatação menor (0,6 – 1,5 sulfatos por dissacarídeo) quando comparado à heparina (2,3 - 2,8 sulfatos por dissacarídeo) (Dreyfuss e cols., 2009).

O HS apresenta um grande número de dissacarídeos não sulfatados do tipo GlcA-GlcNAc, os quais não são comuns em cadeias de heparina. O padrão de sulfatação do HS varia de acordo com sua localização (matriz extracelular ou superfície celular), tipo celular e grau de diferenciação da célula (Molist e cols., 1998).

As cadeias de HS são organizadas em três diferentes domínios como citado anteriormente na molécula de heparina. A grande diferença é que a região NS está presente em menores proporções no HS quando comparado à heparina. Essa grande diversidade estrutural permite inúmeras interações com diferentes moléculas, gerando, então, a possibilidade de modular vários processos biológicos. De todos os membros da família de GAGs, o HS é o que apresenta maior variabilidade estrutural, principalmente devido às diferenças nos padrões de sulfatação de suas cadeias. Além disso, seu peso molecular pode variar de 5 a 70 kDa (Turnbull e cols., 2001).

1.2.1 O uso da heparina na trombose

A heparina foi descoberta em 1916 e seu uso clínico teve início em 1935 (Rodén, 1989). Este GAG é formado por unidades de ácido idurônico-(1→4)-D-glucosamina que se repetem ao longo do polímero. O polímero de heparina possui padrões variáveis de substituição, podendo apresentar grupos com N-sulfato, O-sulfato e/ou N-acetil, o que possibilita a formação de um grande número de sequências complexas. A estrutura desse polissacarídeo tem sido extensamente investigada, associada ao estudo de sua atividade anticoagulante. Devido à grande diversidade estrutural, a heparina interage com diferentes ligantes. Por este motivo, muitos trabalhos têm relatado o efeito da heparina em inúmeros processos biológicos, como a liberação de lipoproteína lipase e lipase hepática, inibição da ativação do sistema complemento, inibição da angiogênese e do crescimento tumoral entre outros (Rabenstein, 2002).

Entre as atividades biológicas da heparina, a atividade anticoagulante é a mais estudada. Por muito tempo, a propriedade anticoagulante deste GAG foi associada à uma sequência presente em maior proporção no polissacarídeo. Porém, descobriu-se que a atividade anticoagulante é fortemente dependente de um pequeno domínio de ligação à antitrombina, composto por um pentassacarídeo, que está presente em não mais do que um terço das cadeias das heparinas utilizadas na clínica.

Os principais domínios estruturais da heparina estão mostrados na figura 6. O domínio 1 (ácido idurônico-2-O-sulfatado - glucosamina 6-O- e N-dissulfatada) é prevalente na heparina (>70%), enquanto que os domínios 3 (ácido glucurônico - glucosamina N-acetilada) e 2 são menos abundantes. A menor sequência, porém a mais importante para a atividade anticoagulante da heparina, é o pentassacarídeo

que possui alta afinidade por antitrombina. Os grupos sulfato destacados na estrutura 4 são essenciais para a ligação de alta afinidade à antitrombina. Assim como os grupamentos sulfato, o ácido glucurônico central é fundamental para a interação heparina-antitrombina (Bourin & Lindahl, 1993).

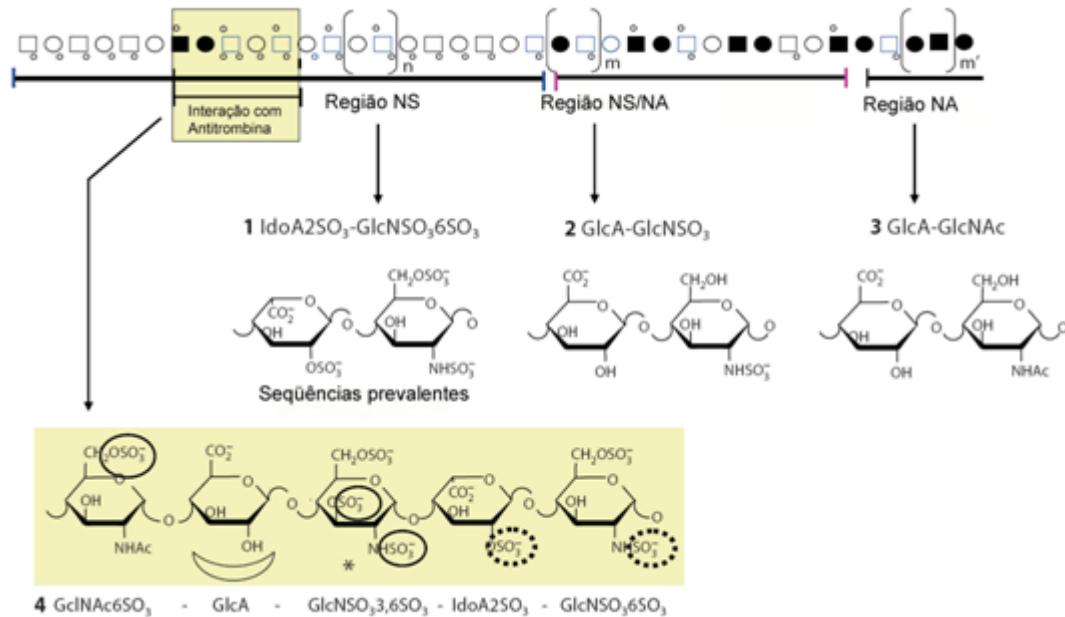


Figura 6. Representação de uma cadeia de heparina constituída de domínios de N-sulfatação (Região NS, 1), N-sulfatação e N-acetilação (NS/NA, 2), N-acetilação (Região NA, 3) e do domínio de ligação com a antitrombina (4). As fórmulas representam as principais sequências dissacarídicas de cada domínio (1-4). Os quadrados fechados representam unidades de glucosamina N-acetilada; os círculos fechados representam ácido glucurônico; os quadrados abertos designam glucosamina N-sulfatada e os círculos abertos, unidades de ácido idurônico 2-O-sulfatados. Os pequenos círculos representam grupos sulfato. Adaptado de Casu e cols., 2007.

O mecanismo pelo qual a heparina inibe a trombina, via antitrombina, envolve a formação de um complexo ternário. A ligação da heparina à antitrombina promove uma mudança conformacional no inibidor, que culmina na exposição de uma alça reativa, deixando seu sítio ativo mais exposto à enzima-alvo. Sabe-se, também, que a cadeia de heparina atua como uma ponte, facilitando a aproximação molecular entre o inibidor e a protease (Bourin e Lindahl, 1993). Por este motivo, é necessário um tamanho mínimo de 18 monossacarídeos para que a heparina possa inibir a trombina via

antitrombina. No entanto, na inibição do fator Xa pela antitrombina, apenas a sequência pentassacarídica da heparina é importante.

A AT é uma glicoproteína composta por 432 aminoácidos (Johnson e cols., 2006), com peso molecular de 58 kDa, sendo sintetizada pelos hepatócitos. Sua concentração no plasma é de 150 µg/mL e possui meia de vida de três dias. A AT é o principal inibidor fisiológico da trombina, apesar de inibir também os fatores IXa, Xa, XIa e XIIa. Essa inibição ocorre pela formação de um complexo irreversível entre o inibidor e a protease que irá ser metabolizado no fígado. Porém, a trombina que está ligada à fibrina ou ao coágulo não é passível de inibição (Hogg & Jackson, 1989). A AT, por si só, apresenta uma baixa atividade de inibição de trombina. A taxa de inibição é elevada em três ordens de magnitude na presença de heparina.

Outro inibidor plasmático da coagulação, que tem sua atividade potencializada pela heparina, é o cofator II da heparina (HCII), uma glicoproteína com peso molecular de 66,5 kDa, presente no plasma em uma concentração de 80 µg/mL e com meia vida de 2 a 3 dias. O HCII inibe a trombina através da formação de um complexo equimolar estável com a enzima, onde o sítio ativo da protease é bloqueado (Tollefsen & Blank, 1981). Ao contrário da antitrombina, o HCII é muito mais específico, inibindo apenas a trombina. Não há descrição de nenhuma região específica na heparina para ligação ao HCII. No entanto, sabe-se que uma cadeia com, no mínimo, 24 monossacarídeos é essencial para a potencialização do inibidor (Liaw e cols, 1999). A figura 7 ilustra o mecanismo de inibição da trombina via AT e HCII na presença de GAGs.

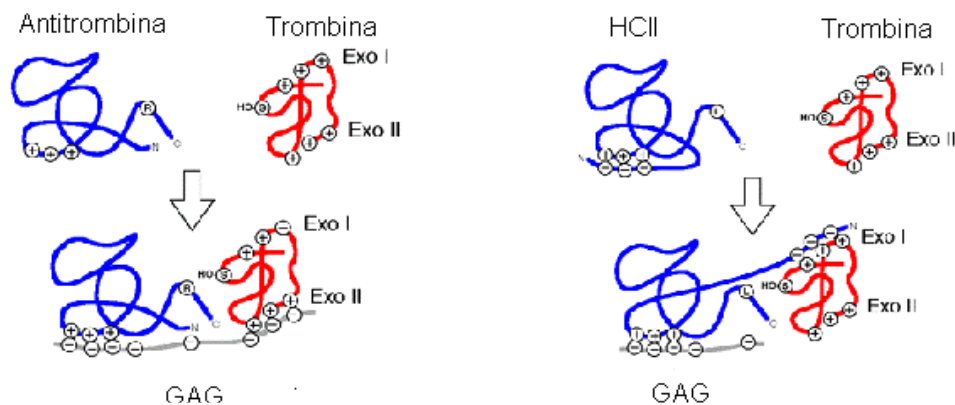


Figura 7: Comparação entre os mecanismos propostos de inibição da trombina pelo HCII e pela AT na presença de GAGs. Note que o glicosaminoglicano atua como uma ponte entre a AT e a trombina. Esse fenômeno não é observado no caso do HCII. Adaptado de Tollefsen, 1994

Apesar da grande utilização da heparina como anticoagulante, esse não é o seu papel fisiológico, visto que este GAG não se encontra disponível na corrente sanguínea. Em 1999, Humphries e colaboradores desenvolveram camundongos deficientes na enzima N-desacetilase/N-sulfotransferase, importante na biossíntese da heparina, e observaram que esses animais apresentavam deficiência no armazenamento de certas proteases no interior de grânulos de mastócitos, sugerindo ser este um possível papel fisiológico da heparina.

1.2.3 O uso clínico da heparina

Apesar da heparina ser o segundo agente terapêutico natural mais utilizado no mundo, não é considerada segura, pois seu uso prolongado está associado com inúmeros efeitos colaterais, como hemorragia, diminuição no número de plaquetas, osteoporose e metabolismo lipídico alterado.

Atualmente, a heparina utilizada na clínica é isolada da mucosa intestinal de porco e representa uma mistura de polímeros com pesos moleculares distintos contendo 200-300 monossacarídeos. A depolimerização desse composto resulta em

fragmentos menores, chamados heparina de baixo peso (do inglês, *low molecular weight heparin*, LMWH). A LMWH vem sendo amplamente utilizada por apresentar inúmeras vantagens em relação à heparina não-fracionada tais como: maior biodisponibilidade, menor interação com plaquetas, apresentando menos risco de indução de trombocitopenia, menor incidência de sangramento, meia-vida plasmática longa, dentre outras. A principal desvantagem é o seu alto custo (Weitz, 1997).

A heparina, mesmo a LMWH, é um carboidrato que interage com diversas proteínas plasmáticas gerando, assim, diferenças nas doses-reposta para cada indivíduo, o que exige, na maioria das vezes, acompanhamento hospitalar durante a sua utilização. Somado ao fato do aumento da incidência de doenças trombóticas, existe hoje a necessidade de desenvolvimento de novos compostos mais apropriados e específicos para diferentes condições clínicas e que apresentem efeitos adversos menores.

1.2.4 Contaminação da heparina: Crise Mundial

No início de 2008, vários casos de efeitos adversos associados com a heparinoterapia foram relatados. Esses efeitos incluíam desmaios, taquicardia, urticárias, náuseas e, em alguns casos, sintomas mais severos. Mais de 100 mortes foram relatadas nos Estados Unidos. Alguns países da Europa e Ásia relataram o mesmo problema, fazendo com que esse fenômeno atingisse escala mundial. Os primeiros casos relatados envolviam pacientes que foram submetidos à diálise. Autoridades americanas iniciaram investigações e observaram que a hipersensibilidade relatada estava associada com lotes de heparina produzidos pela Companhia *Baxter*

Healthcare (Rockville, 2008), resultando na retirada de nove lotes de heparina do mercado.

Relatos de reações alérgicas continuaram ocorrendo, incluindo alguns casos de morte não só em pacientes que passaram por diálise, mas também em pacientes que foram submetidos à cirurgia cardiovascular. Por isso, no fim de fevereiro de 2008, a *Baxter Healthcare* retirou todos os lotes de heparina do mercado para posterior análise. Em março de 2008, lotes de heparina foram retirados do mercado também na Alemanha, devido a mais relatos de reações adversas. Então, a *Food and Drug Administration* (FDA) recomendou que todas as empresas distribuidoras de heparina analisassem seus lotes. Tal procedimento revelou uma contaminação na heparina em, pelo menos, doze países.

Guerrini e colaboradores, em 2008, através de análises de ressonância magnética nuclear, identificaram que o contaminante presente nas preparações de heparina se tratava de um condroitim sulfato *oversulfatado* (OSCS), contendo quatro sulfatações por dissacarídeo. Até o presente momento, não houve relato algum sobre a presença deste composto na natureza.

A partir de então, um esforço envolvendo vários laboratórios em diferentes partes do mundo foi realizado com o objetivo de se determinar os efeitos provocados pelo OSCS. Os estudos mostraram que o OSCS era capaz de induzir a formação de proteínas do sistema complemento como C3a e C5a, levando então a possível choque anafilático (Kishimoto e cols., 2008). Além disso, foi possível observar a ativação do sistema cinina-calicreína, resultando na produção de bradicinina, um potente vaso mediador, gerando

hipotensão (Figura 8). A ativação de pré-caliceína em caliceína é mediada pelo fator XII, que pode ser ativado por superfícies carregadas negativamente, como fosfolípidos e células endoteliais lesadas.

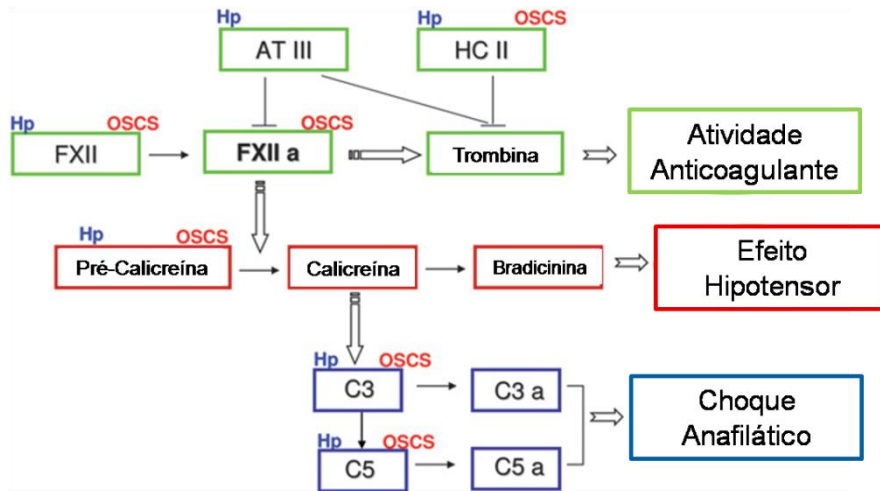


Figura 8: Mecanismos de ação que se relacionam com a toxicidade apresentada pelo OCS. O OCS ativa C3a e C5a, podendo resultar em choque anafilático. Por outro lado, induz a formação de bradicinina, que gera hipotensão. Adaptado de Liu e cols., 2009.

Os acontecimentos recentes, relacionados à contaminação, podem ser o resultado do aumento na demanda mundial de heparina, ilustrando assim um quadro de crise na produção desse composto. Estima-se que em 2008, aproximadamente 20 milhões de pessoas sofreram de episódios tromboembólicos e 200 milhões de porcos foram necessários para atender essas demandas (Melo e cols., 2008). Além disso, o aumento da produção de heparina de baixo peso molecular elevou o consumo de heparina em cerca de 10% a 20% ao ano. Devido a esses fatores, torna-se cada vez mais evidente a necessidade de obtenção de fontes alternativas de heparina.

Diversos autores já relataram a presença de análogos da heparina em diferentes invertebrados marinhos, como crustáceos, ascídias e moluscos

(Tabela 2). No presente trabalho, um análogo da heparina foi isolado do molusco *Nodipecten nodosus* (*N.nodosus*).

Tabela 2: Características de heparinas presentes em moluscos bivalves marinhos

Classe	Ordem	Família	Espécie	Peso Molecular (Da)	Atividade Anticoagulante (IU mg ⁻¹)	Unidade Dissacarídica Principal	Referência	
Bivalvia	Veneroidea	Arctiidae	<i>Cyprina islandica</i>	ND	165	ND	Burson e cols., 1956.	
		Donacidae	<i>Donax striatus</i>	20,000	180	[UA-GlcNS6S] / [UA2S-GlcNS6S]	Dietrich e cols., 1989.	
		Galatheoidea	<i>Tagelus gibbus</i>	24,000	< 5	[UA-GlcNS6S]	Nader e cols., 1984.	
		Mactridae	<i>Spisula solidissima</i>	ND	155	ND	Burson e cols., 1956.	
		Tridacnidae	<i>Tridacna maxima</i>	ND	75	ND	Arumugam e cols., 2004.	
		Veneridae	<i>Anomalocardia brasiliana</i> **	32,000	320	[UA2SGlcNS6S] / [UAGlcNS3S6S]	Pejler e cols., 1987; Dietrich e cols., 1989.	
				18,000	< 5	[UA-GlcNS6S]	Nader e cols., 1984.	
				<i>Callista chione</i>	10,950	97	[UA-GlcN2S6S] / [UA-GlcNAc6S]	Luppi e cols., 2005.
	Ostreoidea			<i>Katelsysia opina</i>	31,000	160	ND	Vijayabaskar e cols., 2008.
				<i>Mercenaria mercenaria</i>	18,000	363	[UA-GlcN3S]	Jordan & Marcum, 1986.
				<i>Tapes philippinarum</i>	13,600	358	[UA2SGlcN2S6S]	Cesaretti e cols., 2004
				<i>Tivela mactroides</i>	25,000	220	[UAGlcNS3S6S] / [UA-GlcNS6S]	Pejler e cols., 1987; Dietrich e cols., 1989.
			Pectinidae	<i>Amussium pleuronectus</i>	7,000	95	ND	Saravanan & Shanmugam, 2009.
		<i>Nodipecten nodosus</i>	27,00	36	[UA-GlcNAc]	Gomes e cols., 2010		
	Mytilidae	<i>Perna viridis</i>	ND	54	ND	Arumugam e cols., 2004		

1.3) O Molusco *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) como uma fonte de análogos da heparina

O invertebrado marinho *Nodipecten nodosus* pertence ao filo Mollusca, classe Bivalvia, ordem Ostreoidea, família Pectinidae e gênero *Nodipecten*. Esse animal é o maior pectinídeo encontrado no Brasil, sendo muito

apreciado pela beleza de sua concha e pelo delicioso sabor do seu músculo e gônadas (Figura 9). Ele é conhecido como coquille Saint-Jacques, vieira ou leque do mar.

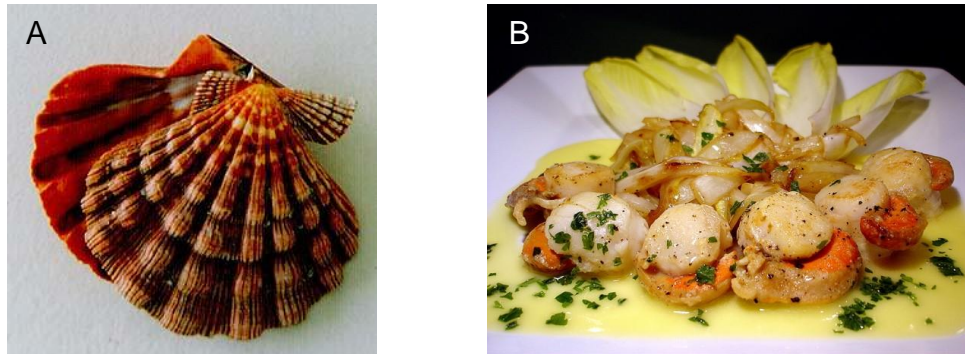


Figura 9: A) A espécie *Nodipecten nodosus* é recoberta por uma concha formada por duas valvas. Já foram encontrados espécimes com conchas de até 160 mm. B) Apetitoso prato preparado com coquille.

Nos últimos anos, a aquicultura mundial tem ganhado destaque no setor de produção animal. O crescimento dessa atividade é ainda mais evidente quando comparado ao aumento da produção de carne. No período de 2000 a 2004, a aquicultura cresceu em média 6% ao ano, enquanto que a produção de carne cresceu apenas 1,8% no mesmo período. Os moluscos contribuíram com 22,5% desse crescimento ficando abaixo apenas dos peixes de água doce (Borghetti e cols., 2003).

A família Pectnidae, além da importância ecológica e como grupo zoológico, tem grande importância econômica. Em países como Estados Unidos, França, Canadá, Inglaterra, Japão e Espanha, algumas espécies de pectínídeos são consideradas verdadeiras iguarias, atingindo um alto valor comercial e movimentando, de forma intensa, as indústrias de pesca e aquicultura. Isso explica a razão pela qual estes animais têm sido alvo de muitos estudos e importantes revisões científicas. As vieiras estão entre os

dez produtos aquícolas mais cultivados no mundo, sendo, a China, o maior produtor, contribuindo com 80% do total produzido (Rupp & Parson, 2006).

A espécie *N.nodosus* apresenta um grande potencial para maricultura brasileira, já que possui um elevado valor de comercialização, rápido crescimento e excelente receptividade no mercado. Por isso, essa espécie vem sendo pesquisada nessa área desde a década de 1980. O Instituto de Ecodesenvolvimento da Baía de Ilha Grande (IED-BIG), organização não-governamental patrocinada pela Eletrobrás e Petrobras, desenvolve o cultivo de *N.nodosus* desde 1991. Esse cultivo inclui a produção de larvas e pós-larvas em laboratório e cultivo em fazendas marinhas. Outros países da América do Sul, como Venezuela e Colômbia, também promovem o cultivo dessa espécie. Essa espécie pode ser encontrada no Caribe, Venezuela, sul das Grandes Antilhas, Colômbia, costa oeste da África tropical, Brasil, parte da América Central e costa leste do Panamá. Sua distribuição batimétrica vai de 10 a 150 metros.

O *N.nodosus* é uma espécie hermafrodita, sendo a parte masculina da gônada branca e a feminina alaranjada. As gônadas se situam no interior da cavidade palial, na parte anterior ao músculo adutor. Esses animais são filtradores, removendo o plâncton e nutrientes em suspensão através de suas brânquias bem desenvolvidas. Além disso, as brânquias são utilizadas para trocas gasosas, graças às correntes inalantes e exalantes provocadas pelo batimento de seus cílios.

Uma das características mais conhecidas dessa família é a capacidade de natação através de jatos d'água que saem de dentro de suas valvas. Acredita-se que essa habilidade evoluiu da necessidade de limpeza da

cavidade palial existente em seus ancestrais que viviam fixados ao substrato através do bisso (Yonge, 1936).

Devido aos problemas relacionados à utilização de heparina, nosso laboratório busca a identificação de novos compostos, do tipo heparina, em fontes alternativas como invertebrados marinhos. Existem muitas descrições sobre a presença de análogos de heparina em diversos moluscos (Tabela 2). O *N.nodosus* é cultivado em fazendas marinhas para consumo como iguaria. No entanto, apenas o músculo e a gônada são aproveitados para esse fim e todo resto do animal é descartado, não apresentando nenhuma finalidade. Por isso, nos questionamos se essas vísceras descartadas não seriam uma possível fonte desses compostos, já que esse bivalve pode ser cultivado em larga escala. Além disso, por serem animais marinhos, seu cultivo não apresentaria nenhum dano significativo ao meio ambiente, visto que não seria necessário o desmatamento de nenhuma área verde, como no caso da criação de porcos e bois.

2) OBJETIVOS

O objetivo geral dessa dissertação foi determinar a estrutura do HS presente nas vísceras do molusco *N.nodosus*, caracterizar suas propriedades anticoagulantes e antitrombóticas

Objetivos específicos

- Isolamento e purificação do heparam sulfato presente no molusco *N.nodosus*;
- Determinação da estrutura do heparam sulfato do molusco;
- Identificação dos mecanismos de atividade anticoagulante do heparam sulfato do molusco;
- Determinação da atividade antitrombótica do heparam sulfato do molusco em um modelo experimental de trombose arterial e seus efeitos sobre a tendência de sangramento;
- Avaliação do efeito do heparam sulfato do molusco sobre o fator XII;
- Investigação da citotoxicidade do heparam sulfato do molusco

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Coleta

Os espécimes de *N.nodosus* foram fornecidos pelo IEDBIG, responsável pelo cultivo da espécie em fazendas marinhas no município de Angra dos Reis, RJ.

3.2) Histoquímica dos Tecidos do Molusco

A histologia foi desenvolvida em dois órgãos principais: o manto e a brânquia. Os órgãos foram fixados por duas horas à temperatura ambiente em uma solução composta por: formaldeído 5%, glutaraldeído 2,5%, tampão cacodilato de sódio 0,1M solubilizados em água do mar artificial. Posteriormente à fixação, os órgãos foram lavados com tampão cacodilato em água do mar artificial. A desidratação e clarificação dos tecidos foram realizadas por gradiente de etanol e xilol. A inclusão dos tecidos foi feita em Para-plast na temperatura de 55,6 °C. Fatias longitudinais de 7 µm de espessura foram obtidas em um micrótomo Spencer. A coloração foi feita com ácido periódico de Schiff (PAS) e com azul de alcian em HCl 0,1 M, antes e após incubação dos cortes com condroitinase AC e ácido nítrico, por duas horas. As lâminas dos cortes foram observadas em um microscópio de luz Axioplan da Zeiss, acoplado à uma câmera (Media Cybernetics, model Evolution™MP) que possibilitou a aquisição de imagens digitais dos tecidos estudados.

3.3) Extração dos Polissacarídeos Sulfatados

Os tecidos foram cortados em pequenos pedaços, imersos em acetona por 24 horas, a 4 °C, e secos em estufa, a 60 °C, para a obtenção do pó cetônico. O material seco foi submetido a uma digestão proteolítica com papaína (20

g/100 g de peso seco), em tampão 0,1 M de acetato de sódio (pH 5,5), contendo 5 mM de EDTA e 5 mM de cisteína, por 24 horas a 60 °C. O produto da incubação foi centrifugado e o precipitado submetido a uma nova digestão. Aos sobrenadantes das extrações foi adicionado cloreto de cetilpiridina (CPC) na concentração final de 0,5% e mantidos à temperatura ambiente por 24 horas. O precipitado formado foi lavado com água destilada para retirar o excesso de CPC e ressuspendido em NaCl 2M:etanol (100:15 v/v). Em seguida, 2 volumes de etanol absoluto foram adicionados a essa solução e mantidos *overnight* a 4 °C. Após centrifugação (3200 rpm), o precipitado foi lavado com etanol absoluto, seco e ressuspendido em água destilada para análises posteriores.

3.4) Fracionamento dos Polissacarídeos Sulfatados

Os polissacarídeos totais, isolados de acordo com a metodologia descrita no parágrafo anterior, foram fracionados por precipitação em diferentes concentrações de etanol. Primeiramente, os polissacarídeos foram precipitados com etanol 40% a 4°C, por 18 horas. O precipitado formado (P1) foi recolhido por centrifugação e seco à 60 °C. Ao sobrenadante, foi acrescentado etanol na concentração final de 47%. O precipitado (P2) foi coletado e seco em estufa. Ao sobrenadante foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto. O precipitado (P3) foi recuperado e seco em estufa. Após secagem, todos os precipitados foram ressuspendidos em água destilada.

3.5) Eletroforese em Gel de Agarose

Alíquotas dos polissacarídeos sulfatados contendo, aproximadamente, 20 µg foram aplicadas em um gel de agarose 0,5% em tampão 1,3 diaminopropano (pH

9,0) e submetidos a uma corrida eletroforética por, aproximadamente, 1 hora a 100 V. Foi utilizado como padrão de GAGs uma mistura contendo CS, DS e heparina (~10 µg de cada). Após a corrida, os GAGs foram fixados no gel com uma solução de 0,1% de cetavlon por 12 h. Em seguida, o gel foi seco e corado com azul de toluidina 0,1% em etanol 50% (v/v), contendo ácido acético 1% e descorado em uma solução de ácido acético 1% em etanol 50% (v/v).

3.6) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

O peso molecular do HS do molusco foi estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida. A amostra foi aplicada em um gel de poliacrilamida 7,5% em tampão barbital 0,06 M (pH 8,6). A corrida foi feita a 100V por 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1%. Os padrões de peso molecular utilizados foram dextram sulfato 500 (500 kDa), condroitim 4 sulfato (60 kDa), condroitim 6 sulfato (40 kDa) e dextram sulfato (8 kDa).

3.7) Tratamento Enzimático e Químico

Os polissacarídeos sulfatados totais e purificados foram incubados com 0,01 U de condroitinase ABC e AC em 0,1 mL de tampão Tris-HCl (pH 8,0), contendo 15 mM de acetato de sódio (pH 6,0). O tratamento enzimático com 100 µL de queratanase 0,005 U em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) foi realizado a 37°C. O ácido nitroso (HNO₂) com pH 1,5 foi produzido pela reação de nitrito de bário 1N com ácido sulfúrico 1N na proporção de 1:1 v/v. Alíquotas dos polissacarídeos sulfatados, contendo, aproximadamente, 20 µg foram incubadas com o HNO₂ (na proporção de 1:1 v/v) à temperatura ambiente, por 2 horas. O HS

do molusco foi incubado com heparinase I (0,005 U) em tampão 100 mM de acetato de sódio, contendo 10 mM de acetato de cálcio, por 18 horas a 37°C. Após os tratamentos, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

3.8) Dosagem de Ácido Hexurônico

A concentração de GAGs foi estimada pelo conteúdo de ácido urônico, através do método do carbazol. Aproximadamente, 20 µg do HS purificado do molusco foram avolumados a 200 µL e acrescidos de 1 mL de ácido sulfúrico + borato e incubados a 100°C por 12 min. Em seguida, foram adicionados 40 µL de carbazol, incubando-se a 100 °C por 10 min. Assim, a absorbância foi lida a 530 nm.

3.9) Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear

O espectro unidimensional de ^1H -RMN e os bidimensionais do HS de *N.nodosus* foram realizados usando um magneto Bruker 400 MHz com um *probe* de tripla ressonância e os espectros foram processados usando o *software* Bruker Top Spin. Os espectros unidimensionais de ^1H -RMN foram obtidos em diferentes tempos com 4 *scans* cada. Os espectros 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY e $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC foram realizados usando estado de incrementação de fase proporcional ao tempo ("*states-TPPI*") para detecção por quadratura na dimensão indireta. Os espectros heteronucleares $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC foram realizados com 1.024 x 256 pontos e GARP ("*globally optimized alternating phase rectangular pulses*") para desacoplamento. Cerca de 5 mg de cada amostra foram dissolvidos em 0,5 mL de D_2O 99,9% (Cambridge Isotope Laboratory) em um tubo de 5 mm de RMN. Todos os espectros foram realizados a 50°C com supressão de sinais HOD por pré-saturação. Os deslocamentos químicos foram

ajustados para 0 ppm, relacionados com os padrões externos ácido trimetilsilil-propiónico para a escala de 1H e metanol para a escala de 13C.

3.10) Ensaio de Atividade Anticoagulante *in vitro*

Após consentimento, plasma humano de doadores sadios foi coletado em uma solução de citrato de sódio 3,8%, na proporção de 9:1 e analisado pelo Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT) (Anderson e cols., 1976). Resumidamente, 90 µL de um “*pool*” de plasma foram incubados por 1 min a 37 °C com 10 µL de soluções com diferentes concentrações de HS do molusco ou heparina (de porco, *Sigma*). Posteriormente, 100 µL de cefalina ativada (Reagent Celite, Biolab, Mérieux) foram adicionados à mistura, que foi incubada por mais 2 min. Em seguida, 100 µL de CaCl₂ 0,25 M foram acrescentados e o tempo de coagulação foi registrado em um microcoagulômetro da Amelung (Alemanha), modelo KC4A. Plasmas depletados em AT e HCII foram obtidos da Affinity Biologicals (Ancaster, ON, Canadá).

3.11) Inibição da Trombina ou Fator Xa por AT ou HCII na Presença de Glicosaminoglicanos

As incubações foram realizadas em placas de 96 poços. As concentrações finais dos reagentes foram AT, 10 nM ou HCII, 15 nM, 2 nM de trombina ou fator Xa, diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados em 40 µL de tampão Tris/PEG (Tris/HCl 0,02 M, NaCl 0,15 M e 1,0 mg/mL de polietileno glicol 8.000, pH 7,4) e 100 µM de substrato cromogênico. A trombina ou o fator Xa foi adicionado no início da reação. Depois de 60 segundos de incubação com os GAGs e com os inibidores a 37°C, 25 µL de substrato cromogênico S-2238 para trombina ou S-2765

para fator Xa (Chromogenix, MA, EUA) foram adicionados e a absorbância a 405 nm foi registrada por 120 segundos. As taxas de variações na absorbância foram proporcionais à atividade da trombina ou do fator Xa remanescentes na incubação. Não houve inibição nos experimentos controle nas quais a trombina ou fator Xa foram incubados com AT ou HCII na ausência de polissacarídeos sulfatados. Além disso, nenhuma inibição foi observada quando a trombina ou fator Xa foram incubados somente com polissacarídeos sulfatados ao longo das concentrações testadas. Foi considerado 100% da atividade da trombina um controle usando os reagentes sem a adição de polissacarídeos sulfatados e os resultados expressos como IC_{50} , concentração de polissacarídeos sulfatados suficiente para conseguir 50% da inibição da atividade da trombina ou fator Xa.

3.12) Ativação do Fator XII na Presença de Polissacarídeos Sulfatados

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

3.13) Ensaio de Atividade Antitrombótica no Modelo de Lesão Fotoquímica do Endotélio Arterial.

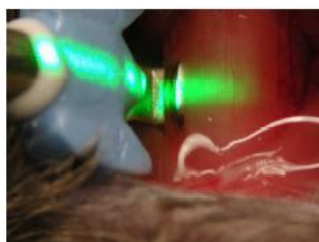
A trombose na artéria carótida foi induzida utilizando um método modificado de Eitzman e colaboradores, 2000. Primeiramente, ratos (ambos os sexos, ~200 g de peso) foram anestesiados com uma injeção intramuscular de ketamina (Cristália, São Paulo, Brasil) na dose de 100 mg/kg e 16 mg/kg de xilazina (Bayer SA, São Paulo, Brasil) e colocados em posição supina. A carótida direita foi isolada através de uma incisão mediana cervical, e uma sonda de ultra-som foi aplicada (modelo MAO,7PSB; Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, EUA). Rosa de bengala (90 mg/kg; Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ, EUA) foi injetado na veia cava inferior e, imediatamente depois, o laser foi irradiado (1,5 mW, 540 nm) na carótida direita à distância de 5 cm. O fluxo da artéria foi monitorado até a oclusão completa (Figura 10). Nos animais tratados, os GAGs foram injetados na veia cava inferior 5 minutos antes da administração do corante.



1) Isolamento da artéria carótida



2) Posicionamento do medidor de fluxo



3) Iluminação da artéria por um feixe de raio laser e injeção do corante "rosa de bengala"

Figura 10: Esquema ilustrando o modelo de trombose arterial, no qual a artéria carótida é lesionada através da formação de oxigênio singlete pelo contato do corante com o laser.

3.14) Efeito Hemorrágico

Ratos Wistar (~200 g de peso corporal) foram anestesiados com uma combinação de ketamina e xilazina, como descrito anteriormente. Uma cânula foi inserida na artéria carótida direita para a administração intravascular de HS do *N. nodosus* ou heparina. Após 5 minutos de circulação da amostra, um segmento de 3 mm da cauda do rato foi cortado e, logo após, a cauda foi inserida cuidadosamente numa proveta contendo 40 mL de água destilada. A perda sangüínea foi determinada após 60 minutos, mensurando o nível de hemoglobina dissolvida na água pelo método espectrofotométrico descrito por Herbert e colaboradores em 1992. O volume de sangue perdido foi determinado através de uma curva padrão baseada na absorbância a 540 nm.

3.15) Ensaio de Viabilidade Celular

A toxicidade do HS do *N. nodosus* para células BHK-21 (células de rim de hamster sírio) foi avaliada por meio do ensaio de redução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio) (Mosmann, 1983). O MTT é reduzido por células viáveis, por meio da atividade de redutases mitocondriais, em um composto denominado formazana, que pode ser quantificado por medidas espectrofotométricas (Mosmann, 1983). Resumidamente, monocamadas celulares em placa de 96 poços foram incubadas com diferentes concentrações de HS do *N. nodosus* e heparina a 37°C por 48 horas, sendo, subsequentemente, adicionado ao meio o MTT a uma concentração final de 250 µg/mL. Após 4 horas de incubação a 37°C, os cristais de formazana gerados foram solubilizados em uma solução de lise (DMF 50% e SDS 20%, pH 4,8) e a viabilidade celular determinada analisando-se a absorbância das amostras a 570 nm.

3.16) Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Diferenças nos valores da média foram analisadas usando o teste Mann-Whitney U. Quando mais de um grupo foi comparado com um controle, a significância foi avaliada usando a análise de variância pelo ANOVA. $P < 0.01$ foi considerada estatisticamente significativa.

4) RESULTADOS

4.1) Localização Tecidual dos GAGs no *N.nodosus*

Compostos do tipo heparina/HS já foram descritos em órgãos internos de diversas espécies de moluscos bivalves (Tabela 2). A primeira questão abordada no nosso trabalho foi verificar qual a localização dos GAGs nos tecidos do *N.nodosus*. Para isso, diferentes órgãos foram analisados por histoquímica, antes e depois ao tratamento enzimático com condroitinase (chase) AC e químico com ácido nitroso. A coloração com azul de alcian em pH 1,0 evidencia, em azul, os polissacarídeos ácidos sulfatados enquanto que o ácido periódico de Schiff cora, em rosa, polissacarídeos neutros.

Nas brânquias, duas regiões foram coradas fortemente: a membrana basal do epitélio e a parte interna da matriz extracelular com aparência fibrilar (Fig. 11 B). O tratamento com condroitinase AC (Fig. 11 C) atuou, principalmente, na matriz extracelular, resultando em uma leve diminuição na intensidade de coloração. Por outro lado, o tratamento com ácido nitroso (Fig. 11 D) aboliu, quase que completamente, a coloração azul na membrana basal do epitélio e na matriz extracelular.

No manto do animal, a coloração azul ficou restrita a matriz extracelular (Fig. 11 E). Após tratamento com ácido nitroso, a coloração foi drasticamente perdida. Esses resultados sugerem que o heparinóide está presente na membrana basal do epitélio da brânquia e disperso na matriz extracelular da brânquia e do manto. CS também está presente em pequenas quantidades na matriz extracelular da brânquia.

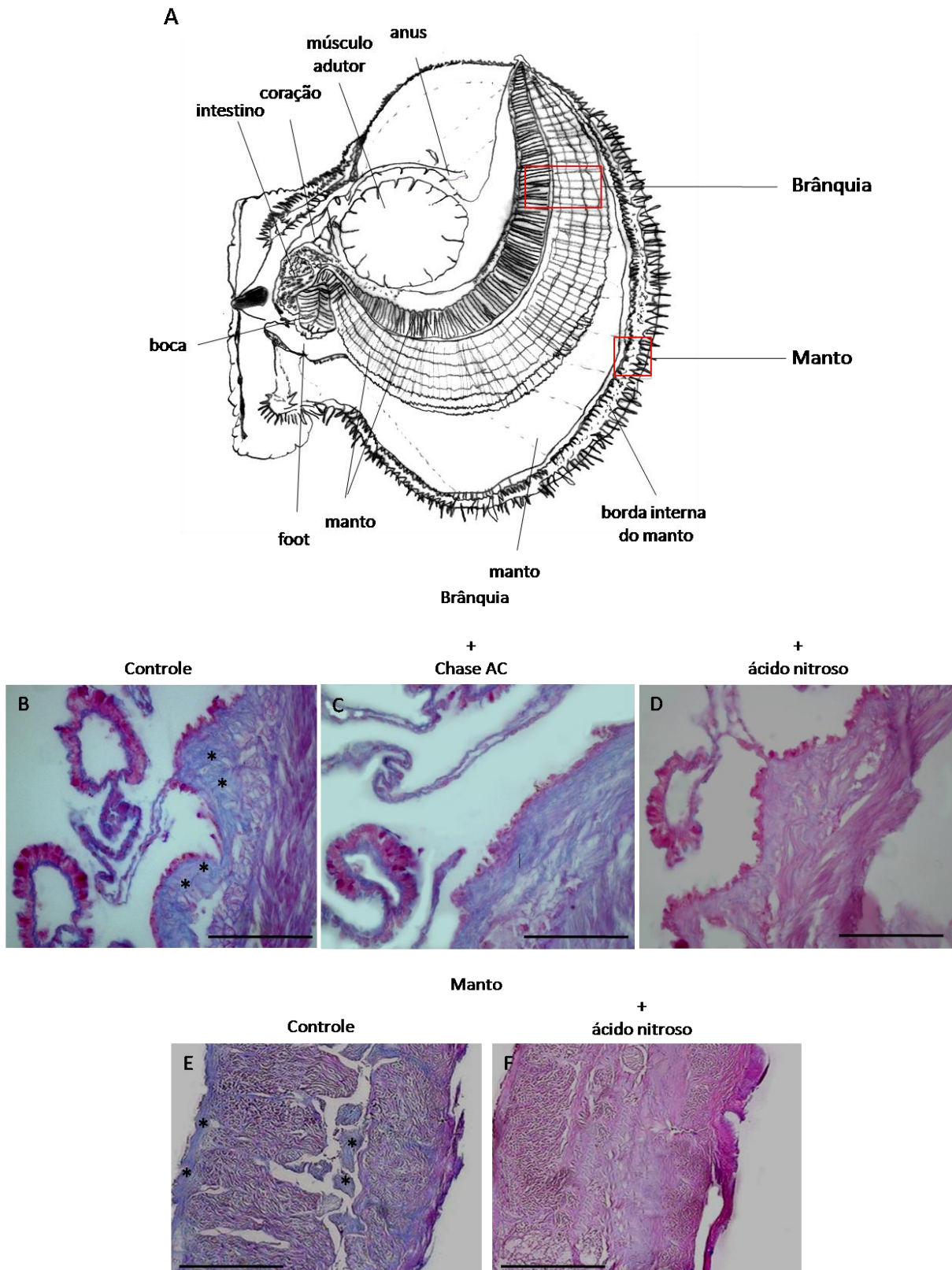


Figura 11: Análise histológica dos cortes dos órgãos do *N.nodosus* corados com azul de alcian. A) Esquema ilustrativo mostrando a anatomia interna do animal. Cortes histológicos da brânquia (B-D) e do manto (E-F) corados com azul de alcian e PAS antes (B e E) e depois do tratamento com chase AC (C) ou ácido nitroso (D e F). * indica coloração positiva para GAG na matriz extracelular.

4.2) Isolamento e Identificação dos GAGs Presentes em *N.nodosus*

Como primeira abordagem bioquímica, buscamos verificar a presença dos GAGs no músculo adutor, principal órgão apreciado como iguaria, e nos órgãos normalmente rejeitados para consumo (manto, brânquia, trato digestivo e coração). Para isso, os polissacarídeos sulfatados foram extraídos após quatro digestões proteolíticas consecutivas com papaína. Após precipitação com CPC e etanol, o rendimento em GAGs desse procedimento foi de 5,13 mg/g de víscera seca, determinado pela dosagem de ácido urônico, pelo método de carbazol. Com a metodologia de extração empregada, não foi detectada a presença de polissacarídeos sulfatados no músculo adutor (Fig. 12).

A análise por eletroforese em gel de agarose revelou a presença de uma banda metacromática que migra como heparina padrão, correspondendo a, aproximadamente, 90% dos polissacarídeos extraídos. Outras duas bandas metacromáticas de menor intensidade também foram observadas.

Os polissacarídeos sulfatados extraídos do molusco foram submetidos a tratamentos enzimáticos com condroitinase ABC, que quebra cadeias de CS e DS, com condroitinase AC que quebra CS e queratanase que quebra cadeias de queratam sulfato. O tratamento químico com ácido nitroso em pH 1,5, que quebra a ligação glicosídica de glucosamina N-sulfatada, presentes em grande número em cadeias de heparina/HS, também foi realizado. Após aos tratamentos, as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel de agarose (Fig. 12 C). Uma banda metacromática que migra como heparina padrão, correspondendo a, aproximadamente 90% dos polissacarídeos extraídos, foi degradada pelo tratamento químico com ácido nitroso, indicando a presença de heparina/HS. A banda com maior mobilidade eletroforética, migrando entre DS e CS padrão, foi susceptível ao

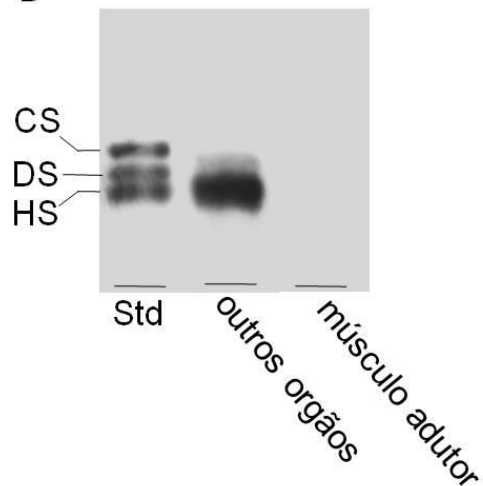
tratamento com condroitinase AC e ABC, mostrando, dessa forma, tratar-se de um CS. É possível notar, ainda, a presença de uma banda com menor mobilidade eletroforética que não foi quebrada por nenhum dos tratamentos. Esses resultados indicam que um composto do tipo heparina/HS é o GAG majoritário e que CS e um polissacarídeo sulfatado não identificado estão presentes em menores proporções nas vísceras de *N.nodosus*.

A

Distribuição dos GAGs no *N.nodosus*

Orgão	Ácido Urônico (mg g ⁻¹)	Porcentagem
Músculo Adutor	0.003	0.1
Outros órgãos (brânquia, manto, intestino, coração)	5.13	99.9

B



C

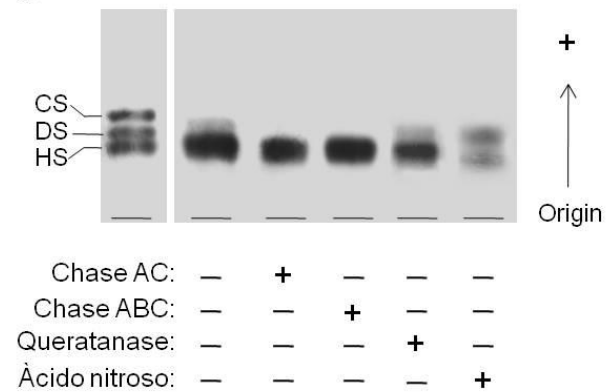


Figura 12: Distribuição e caracterização inicial dos GAGs no *N.nodosus*. A) os GAGs foram detectados nos órgãos pela dosagem de ácido urônico realizada pela reação com carbazol. B) eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos isolados do músculo adutor e das vísceras. C) eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos antes e depois do tratamento com chase AC, chase ABC, queratanase e ácido nítrico.

4.3) Fracionamento dos Polissacarídeos Sulfatados e Caracterização Inicial do Heparinóide

Após a extração dos polissacarídeos sulfatados totais foi realizada a purificação da fração de interesse (heparina/HS) para análises posteriores. O fracionamento foi facilmente obtido através dos diferentes graus de solubilidade que os polissacarídeos apresentam em etanol (Fig. 13 A). A fração (P-1), que precipitou com uma concentração final de 40% de etanol, é composta por uma mistura de heparina/HS e do polissacarídeo não identificado. Com a subsequente adição de etanol até a concentração final de 47%, foi possível a obtenção de heparina/HS pura (P-2). Na última etapa do fracionamento, observou-se a presença de uma mistura contendo heparina//HS e CS (P-3).

Numa análise inicial, o heparinóide foi submetido à eletroforese em gel de agarose antes e após ao tratamento com heparinase I e ácido nitroso. A enzima heparinase I cliva, preferencialmente, as cadeias em regiões de IdoA2S-GlcNS6S, dissacarídeo presente em altas proporções na heparina, por isso considera-se que a heparinase I cliva cadeias de heparina. A clivagem desaminativa com ácido nitroso revelou uma nova banda com maior mobilidade no gel, mostrando que o heparinóide do molusco não é totalmente sensível a esse tratamento (Fig. 15 B). Por outro lado, o tratamento com heparinase I não foi eficiente.

A fim de se obter uma caracterização adicional, o peso molecular do heparinóide do molusco foi estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 15 C). Baseado na mobilidade eletroforética de marcadores de peso molecular, concluímos que esse heparinóide apresenta peso molecular de, aproximadamente, 27 kDa.

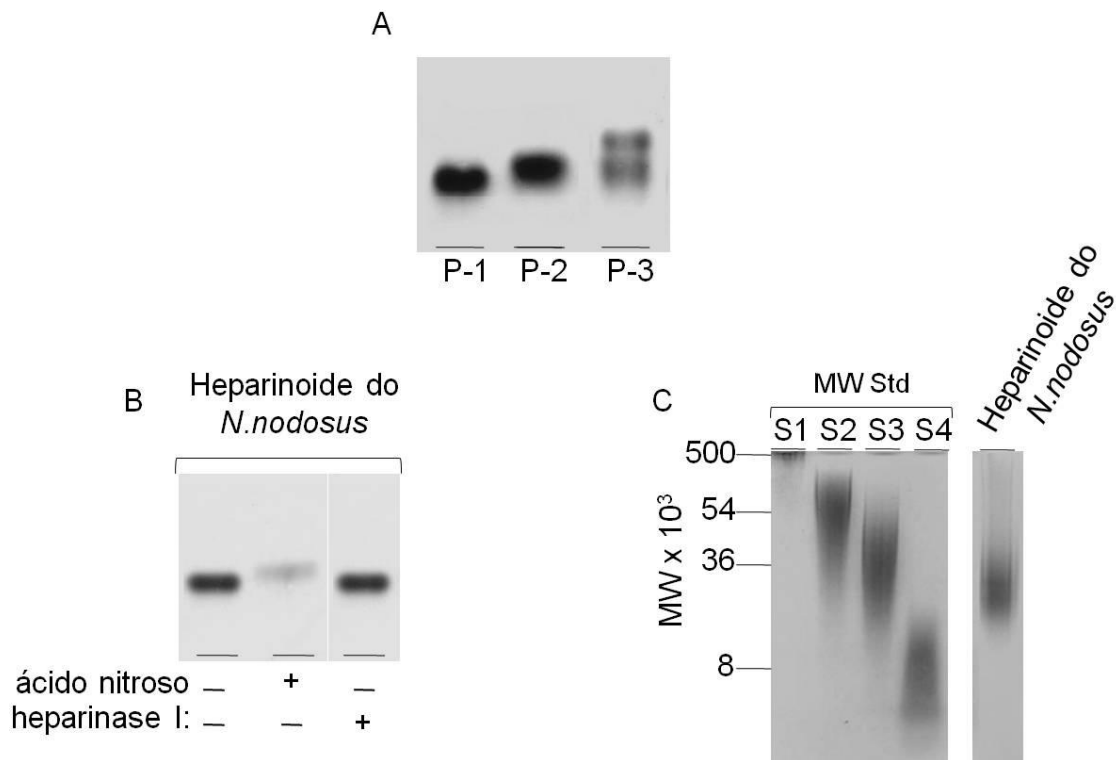


Figura 13: Fracionamento e caracterização inicial do heparinoide do *N.nodosus*. A) Os polissacarídeos totais foram fracionados com concentrações crescentes de etanol - P-1 (40%), P-2 (47%) e P-3 (95%) - e analisados por eletroforese em gel de agarose. B) O heparinoide purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose antes e depois da clivagem desaminativa com ácido nitroso e incubação com heparinase I. C) O heparinoide purificado foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida e seu peso molecular foi comparado com padrões de peso dextram sulfato de 500 kDa (S1), condroitim 6 sulfato de 54 kDa (S2), condroitim 4 sulfato de 40 kDa (S3), dextram sulfato de 8 kDa (S3).

4.4) Caracterização Estrutural através de Ressonância Magnética Nuclear

As principais características estruturais do HS do *N.nodosus* foram reveladas por experimentos de espectroscopia de RMN. Observamos que o HS do *N.nodosus* apresenta uma estrutura com características únicas, como, por exemplo, alto grau de N-acetilglucosamina, ausência de ácido idurônico e presença de unidades de ácido glucurônico 2- e 3-sulfatados. Essas características são totalmente distintas dos outros HSs comumente presentes em mamíferos e moluscos (Tabela 2).

O espectro unidimensional de próton do HS do molusco (Figura 14) mostrou alto nível de homogeneidade da amostra (somente sinais de RMN equivalente ao HS), além de quantidades equivalentes de prótons anoméricos de resíduos de

glucosamina (A) e ácido glucurônico (G). Essa é a principal evidência de que o glicosaminoglicano do *N.nodosus* se trata de um HS e não de uma heparina que possui predominância de prótons α -anoméricos.

Encontramos, também, quantidades consideráveis de ^1H -anoméricos (δH 5,56 – 5,44 ppm, Tabela 3) relacionados às unidades de N-acetilglucosamina que correspondem a, aproximadamente, 60% de todos os resíduos α -ligados do composto. Tal fato demonstra que o HS do *N.nodosus* apresenta mais domínios N-acetilados do que heparosans comuns e suporta que o polissacarídeo do *N.nodosus* é um HS, visto que a heparina possui em média 10-15% de resíduos N-acetilados (Guerrini e cols., 2005).

O espectro 1D – ^1H revela quantidades consideráveis ^1H -anoméricos de ácido glucurônico com ésteres de sulfato localizados em posições pouco comuns, nos carbonos 2 e 3 (G2S δH 4,73 – 4,8 ppm e G3S δH 4,61 – 4,72 ppm, Tabela 3). Para determinar a porcentagem de cada resíduo presente na molécula, foram desenvolvidos cálculos baseados nas áreas dos picos presentes no espectro unidimensional. Assim, observamos que a porcentagem de resíduos de ácido glucurônico não sulfatado e resíduos 2- e 3-sulfatados são respectivamente 46,2, 28,4 e 20,8 % (Figura 16).

O assinalamento do espectro de ^1H -RMN foi possível devido à utilização do espectro 2D COSY que correlaciona prótons vicinais (Figura 15 A). Esses sinais químicos de ^1H , em conjunto com os sinais químicos de ^1H do ácido glucurônico (G) e da glucosamina (A) dos HSs descritos por Guerrini e colaboradores em 2005 facilitam o assinalamento da maioria dos picos cruzados no espectro $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC (Figura 15 B) e complementam a Tabela 2 com os sinais químicos do ^{13}C desse novo composto. Os sinais de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ RMN estão de acordo com os sinais químicos

de outros HSs descritos na literatura, cujas estruturas apresentam as mesmas características do HS presente nesse invertebrado.

Levando em consideração todos os dados obtidos com a utilização de RMN e também os valores relativos às integrais dos picos dos ^1H anoméricos, foi possível a determinação da unidade repetitiva dissacarídica principal do HS do molusco (Figura 16).

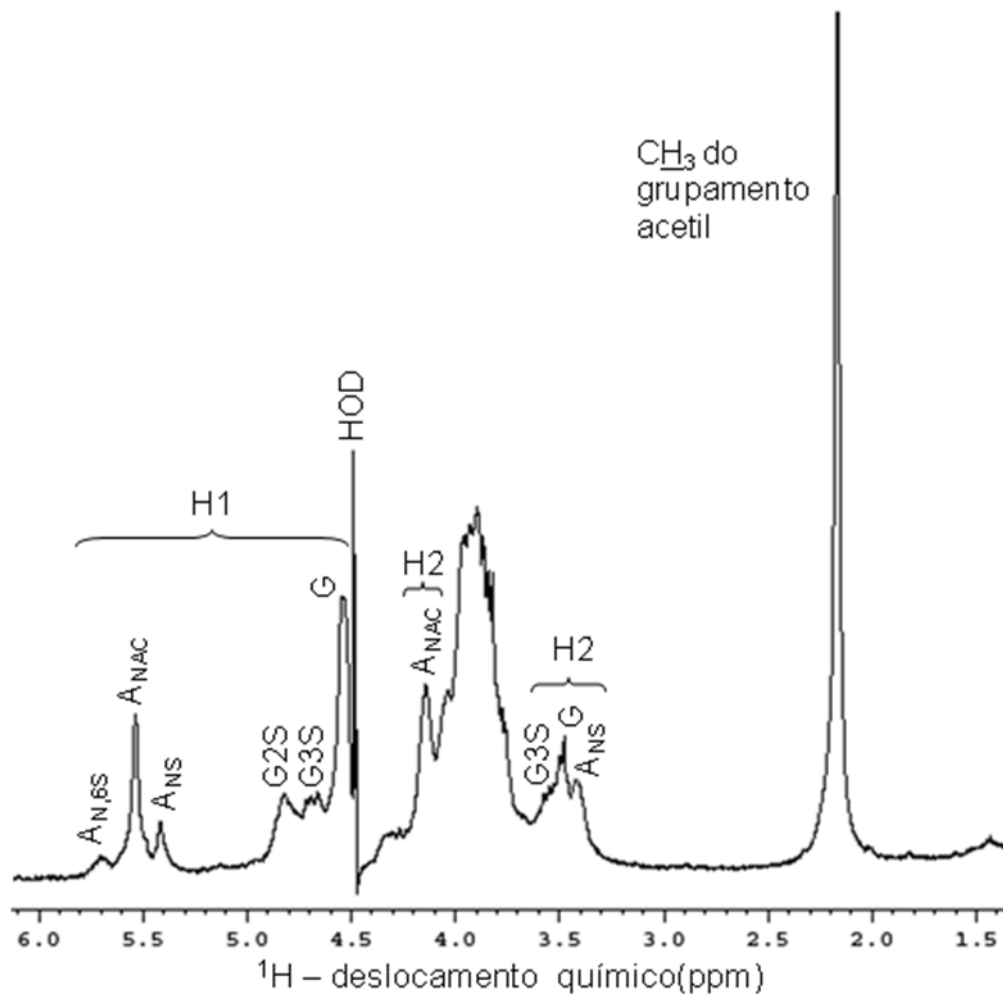


Figura 14: Espectro unidimensional de hidrogênio do heparinóide presente no *N.nodosus*. Cerca de 5 mg de amostra foram dissolvidos em 0,5 mL de D_2O e o espectro unidimensional de ^1H -RMN foi realizado a 50°C . O sinal residual da água foi suprimido por pré-saturação. Os deslocamentos químicos foram ajustados para 0 ppm relacionado com o padrão externo de ácido trimetilsilil-propiónico. Os sinais H1 correspondem ao próton anomérico α e β em δ_{H} 5,8-5,3 e δ_{H} 4,9-4,5 ppm, respectivamente. Os sinais H2 denotam os prótons da posição 2 do anel. As abreviaturas são: $\text{A}_{\text{N},6\text{S}}$: glucosamina 6-O- e N-dissulfatada, A_{NAC} : glucosamina N-acetilada, A_{NS} : glucosamina N-sulfatada, $\text{G}_{2\text{S}}$: ácido glucurônico-2-O-sulfatado, $\text{G}_{3\text{S}}$: glucurônico-3-O-sulfatado, G: ácido glucurônico.

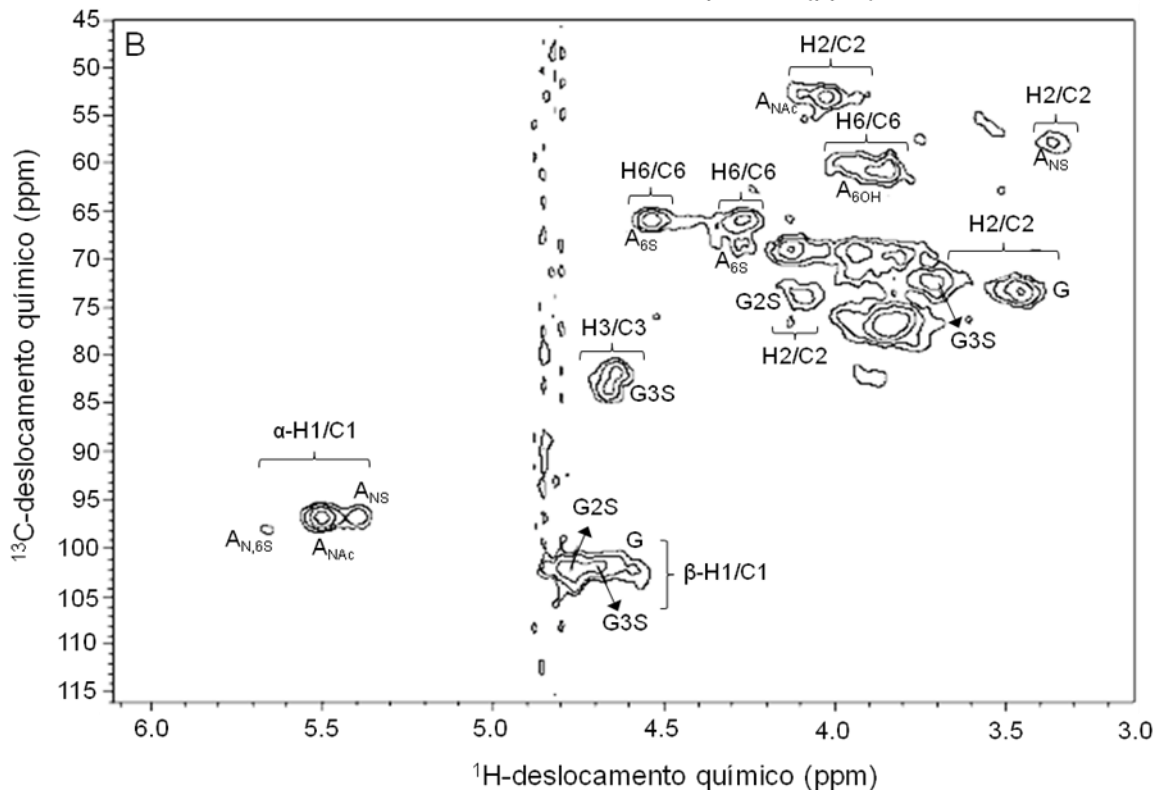
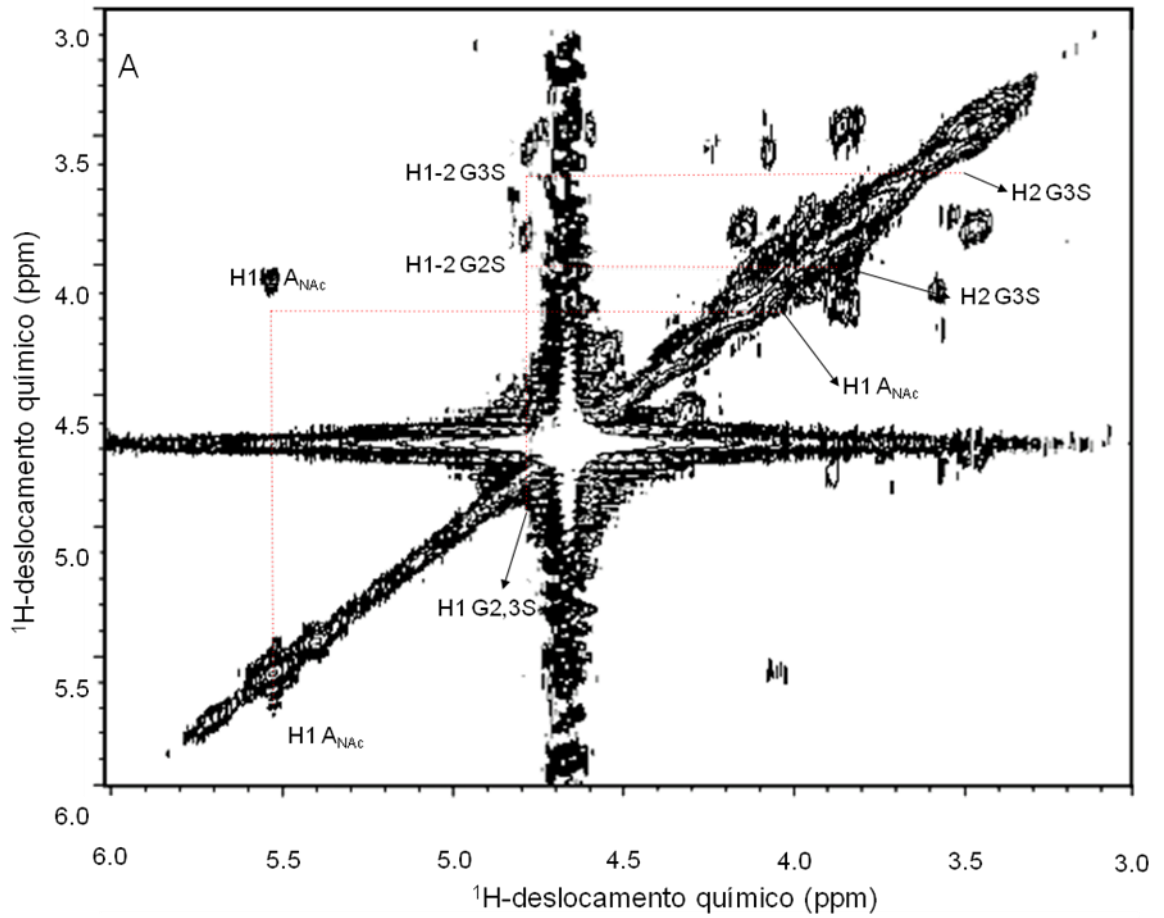


Figura 15: Espectro homonuclear $1\text{H}/1\text{H}$ COSY (A) e espectro heteronuclear $1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC (B) do HS presente no *N.nodosus*. Cerca de 5 mg de amostra foram dissolvidos em 0,5 mL de D_2O e os espectros 2D-RMN foram realizados a 50°C . O sinal residual da água foi suprimido por pré-saturação. Os deslocamentos químicos foram ajustados para 0 ppm relacionado com o padrão externo de ácido trimetilsilil-propiónico. Os sinais H1 correspondem ao próton anomérico α e β em δ_{H} 5,8-5,3 e δ_{H} 4,9-4,5 ppm, respectivamente. Os números do lado direito de H (A) ou H/C (B) significam a posição do núcleo no anel. As abreviaturas são: $\text{A}_{\text{N},6\text{S}}$: glucosamina 6-O- e N-dissulfatada, A_{NAC} : glucosamina N-acetilada, A_{NS} : glucosamina N-sulfatada, G2S: ácido glucurônico-2-O-sulfatado, G3S: ácido glucurônico-3-O-sulfatado, G: ácido glucurônico.

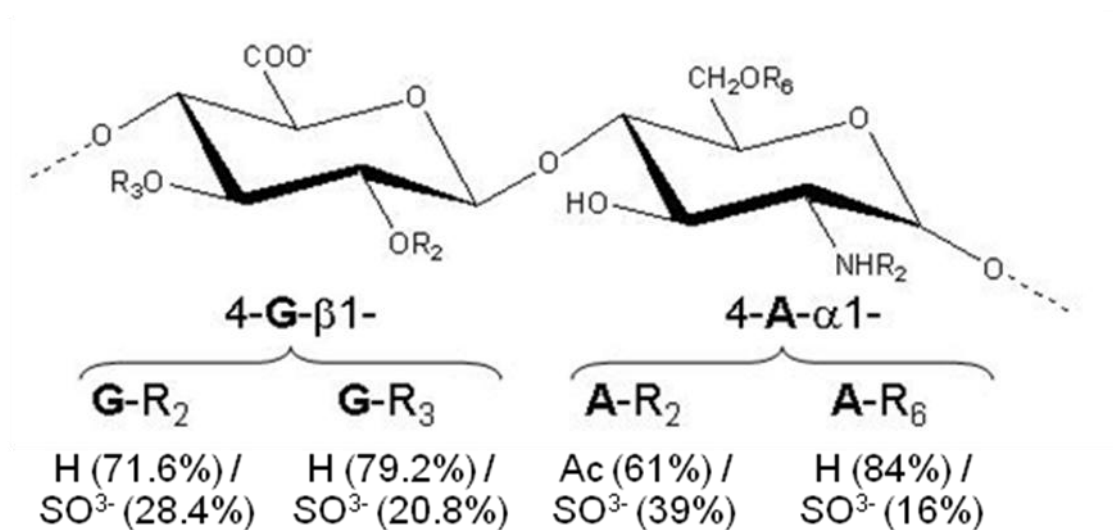


Figura 16: Estrutura sugerida da unidade dissacarídica principal do HS *N.nodosus*. As porcentagens dos radicais foram baseadas nos valores das integrais dos sinais presentes no 1H -1D RMN. G representa ácido glucurônico e A representa glucosamina. R representa os radicais, com seus respectivos grupamentos químicos listados abaixo, onde os números significam a posição no anel.

Tabela 3. Deslocamentos químicos (ppm) dos ^1H -prótons e ^{13}C -carbono do ácido glucurônico (G) e glucosamina (A) do *N.nodosus*

Núcleo	G	G _{2S}	G _{3S}	A _{NAc}	A _{NS}
H1	4.61-4.45	4.8-4.73	4.72-4.61	5.56-5.44	5.43-5.35
C1	105.1- 102.0	105.0- 100.9	103.2- 101.0	98.2-95.3	98.1-95.9
H2	3.57-3.38	4.15-4.02	3.8-3.67	4.14-3.95	3.42-3.3
C2	74.8-70.2	75.3-72.0	73.0-70.5	54.8-51.5	59.0-56.2
H3	3.99-3.72	n.a. ^b	4.73-4.58	3.87-3.78	3.99-3.89
C3	77.3-72.9	n.a.	85-80.4	69.8-67.0	69.0-67.2
H4	3.99-3.72	3.99-3.72	n.a	n.a	3.9-3.86
C4	77.3-72.9	77.3-72.9	n.a	n.a	82.8-81
H5	3.99-3.72	3.99-3.72	n.a	4.0-3.88	69.9-61.2
C5	77.3-72.9	77.3-72.9	n.a	71.8-66.9	4.19-4.03
6S - H6				4.31-4.22	4.57-4.45
6S - C6				66.9-64.5	65.9-65.1
6OH - H6				4.02-3.68	
6OH - C6				62.1-58.9	

4.5) Atividade anticoagulantes do HS presente no *N.nodosus*

A atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados é facilmente determinada por vários ensaios *in vitro*. Entre eles, o aPTT é um dos mais usados e fornece uma indicação da potência anticoagulante do composto. O aPTT avalia principalmente o efeito do composto sobre o sistema de propagação da coagulação. Por isso, esse foi o primeiro ensaio de coagulação a ser realizado. O HS proveniente do *N.nodosus* foi testado em diferentes doses e comparando com a curva de heparina padrão. Assim, foi possível perceber que o HS do *N.nodosus* aumenta, de forma dose-dependente, o tempo de coagulação do plasma humano (Figura 17). Com os dados obtidos a partir da curva de heparina padrão pôde-se avaliar que a atividade anticoagulante do HS presente no *N.nodosus* é de 36 IU/mg

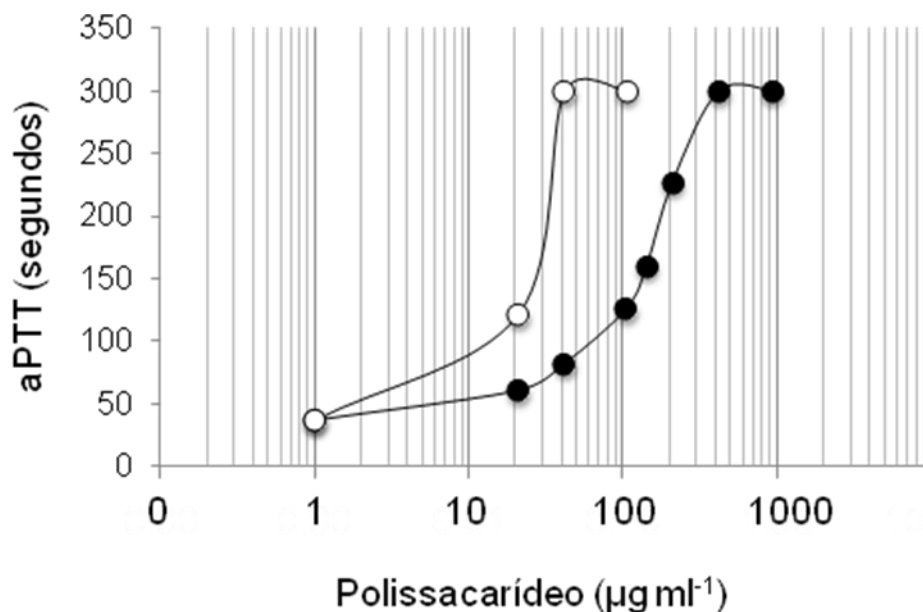


Figura 17: Atividade anticoagulante do HS do *N.nodosus*. Plasma humano citratado foi incubado com diferentes concentrações de polissacarídeos. Em seguida, cefalina foi adicionada e, 120 segundos depois, CaCl_2 foi utilizado para disparar a coagulação. O tempo de coagulação foi quantificado em um coagulômetro Amelung. (-○-) heparina de mamífero, (-●-) HS do *N.nodosus*.

Como mencionado anteriormente, o efeito anticoagulante da heparina é mediado por antitrombina e/ou cofator II da heparina. Dessa forma, a próxima questão analisada foi determinar qual o mecanismo de ação da atividade anticoagulante do HS do molusco. Para isso, avaliamos a atividade anticoagulante do composto em um plasma depletado de antitrombina e cofator II da heparina. Foi possível observar uma drástica redução na atividade anticoagulante do HS do molusco, indicando um mecanismo anticoagulante dependente de *SERPINS*.

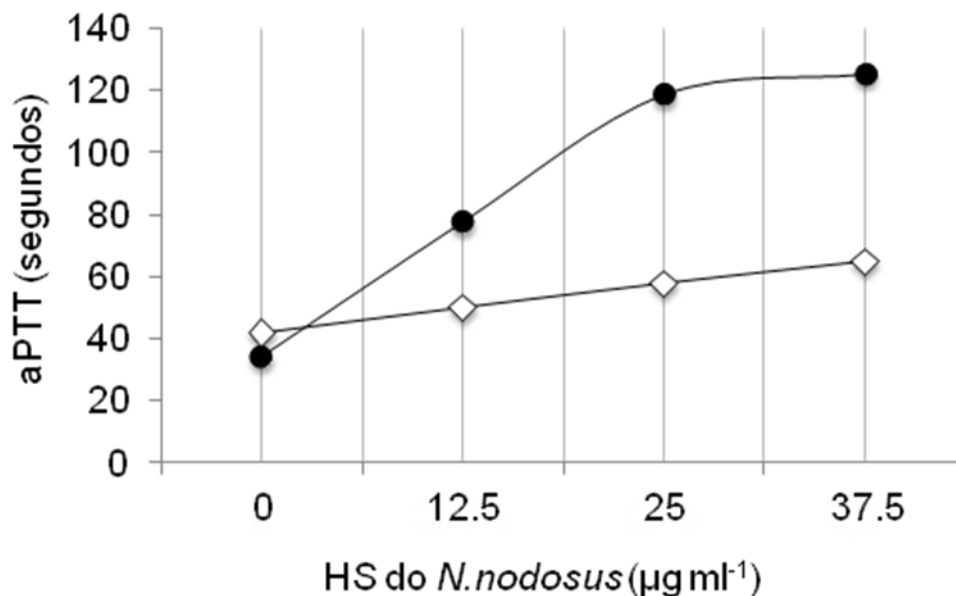


Figura 18: Atividade anticoagulante dependente de *SERPINS* do HS do *N.nodosus*. Plasma humano normal (-●-) e plasma depletado de HCII e AT (-◇-) foram incubados com HS do *N.nodosus* (0-37,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e o tempo de coagulação foi quantificado em um coagulômetro Amelung.

4.6) Inibição de trombina e fator Xa mediada por antitrombina e cofator II da heparina

Nosso objetivo seguinte foi confirmar o mecanismo de ação anticoagulante do HS de *N.nodosus* em um sistema controlado, contendo AT ou HCII, proteases da

coagulação purificados, a amostra a ser testada e um substrato das proteases que emite cor ao ser clivado. Portanto, se o polissacarídeo estiver, por exemplo, inibindo a trombina via antitrombina, o substrato não será clivado e não emitirá cor. A variação de cor foi monitorada em um leitor de microplacas.

Com essa metodologia foi possível revelar que o HS de *N.nodosus* inibe trombina e fator Xa, na presença de antitrombina com 12,5 e 6 vezes menos potência que a heparina padrão, respectivamente (Figura 19 e Figura 20). Como esperado, o tratamento com ácido nitroso aboliu, totalmente, a inibição da trombina via antitrombina mediada por heparina. No entanto, esse tratamento não eliminou totalmente a inibição da trombina na presença de antitrombina mediada pelo HS do *N.nodosus*. Provavelmente, algum produto da degradação desse composto apresenta alguma atividade anticoagulante. A incubação com ácido nitroso reduziu completamente a atividade inibitória da antitrombina mediada pela heparina e pelo HS *N.nodosus* sobre o fator Xa.

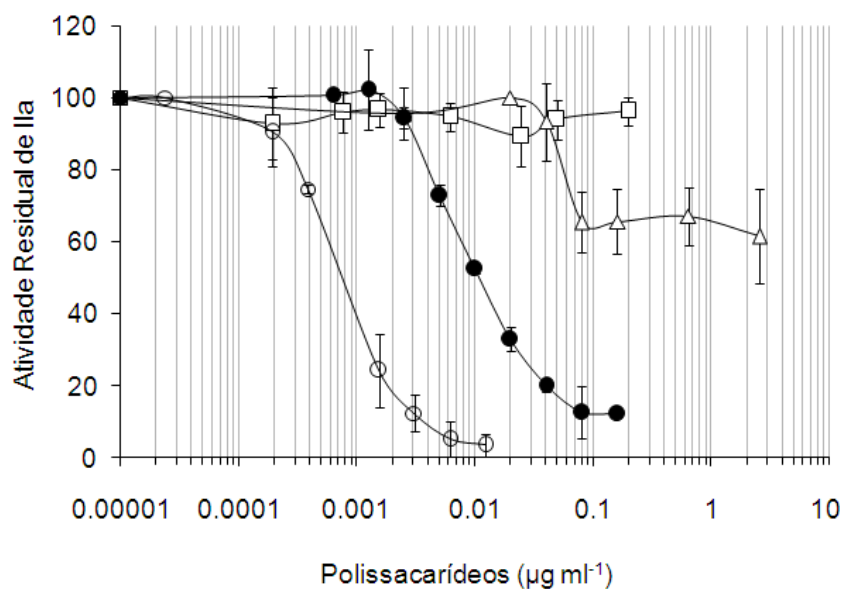


Figura 19: Inibição da trombina via antitrombina na presença do HS do *N.nodosus*. Antitrombina foi incubada com trombina purificada na presença de várias concentrações de GAGs. Após 60 segundos, a atividade residual de trombina foi determinada através da clivagem de um substrato cromogênico (A_{405} nm/min). (○) heparina de mamífero, (●) HS do *N.nodosus*, (□) heparina de mamífero tratada com ácido nitroso, (△) HS do *N.nodosus* tratado com ácido nitroso.

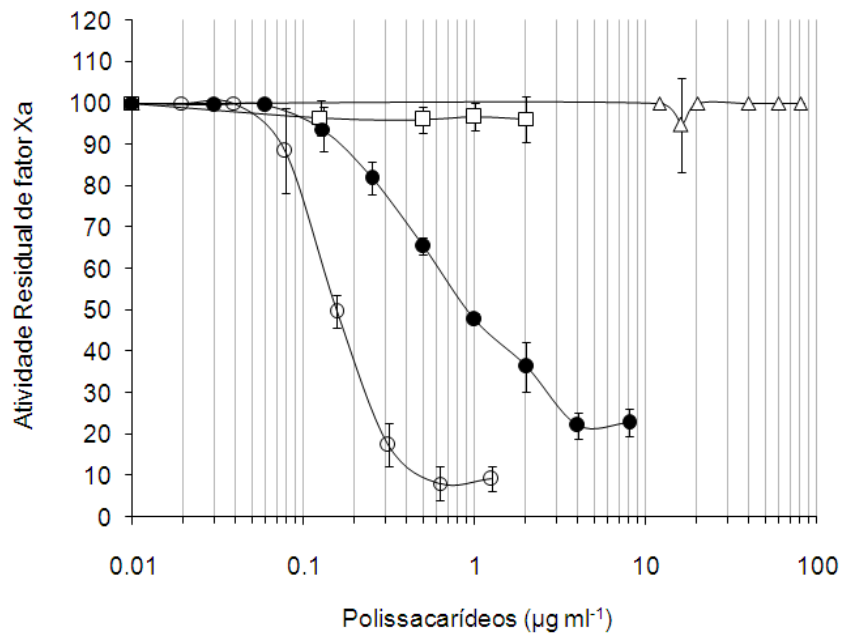


Figura 20: Inibição do fator Xa via antitrombina na presença do HS do *N.nodosus*. Antitrombina foi incubada com fator Xa purificado na presença de várias concentrações de GAGs. Após 60 segundos, a atividade residual de fator Xa foi determinada através da clivagem de um substrato cromogênico (A_{405} nm/min). (-○-) heparina de mamífero, (-●-) HS do *N.nodosus*, (-□-) heparina de mamífero tratada com ácido nítrico, (-△-) HS do *N.nodosus* tratado com ácido nítrico.

O ensaio descrito no parágrafo anterior foi repetido substituindo-se a antitrombina pelo cofator II da heparina. Observamos que o HS de *N.nodosus* também foi capaz de inibir a trombina pelo cofator II da heparina. Nesse caso, o tratamento com ácido nítrico também foi capaz de abolir totalmente o efeito inibitório sobre a trombina (Figura 21).

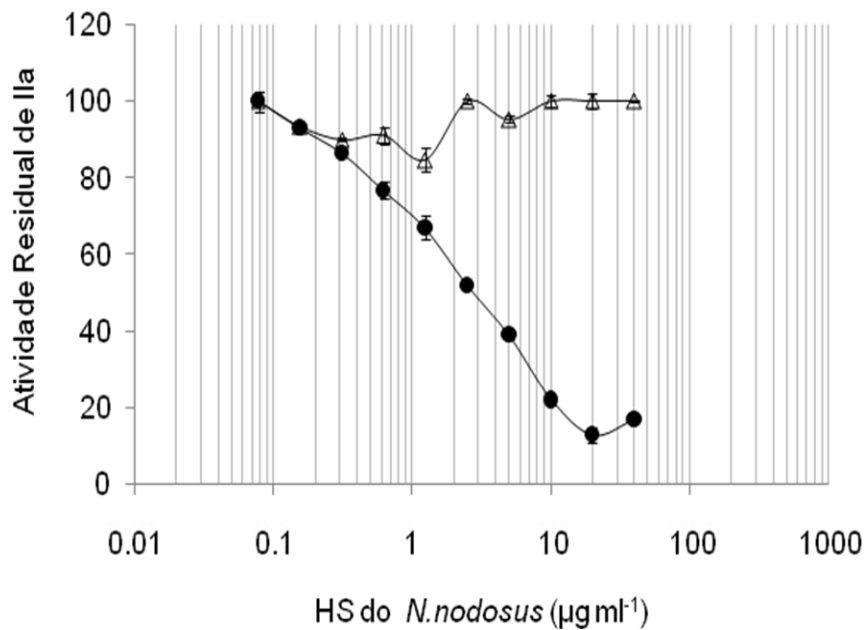


Figura 21: Inibição da trombina via cofator II da heparina na presença do HS do *N.nodosus*. Cofator II da heparina foi incubado com trombina purificada na presença de várias concentrações de GAGs. Após 60 segundos a atividade residual de trombina foi determinada através da clivagem de um substrato cromogênico (A_{405} nm/min). (●) HS do *N.nodosus*, (\triangle) HS do *N.nodosus* tratado com ácido nitroso.

4.7) Efeito antitrombótico do HS do *N.nodosus*

Após verificar o efeito anticoagulante do HS do *N.nodosus* e determinar o seu mecanismo de ação *in vitro*, o próximo passo foi verificar se o composto apresentaria habilidade de inibir a formação de trombo *in vivo*. Para isso, utilizamos um modelo de trombose arterial. Nesse modelo, o estímulo trombótico utilizado foi o corante rosa de bengala (possui alta eficiência fotoquímica e baixa toxicidade sistêmica) e um feixe de laser com comprimento de onda de 543 nm. Ao entrar em contato com o laser, o corante é degradado gerando espécies reativas de oxigênio (oxigênio singlete), que são capazes de lesar o endotélio e disparar o sistema de coagulação na região do vaso iluminada pelo laser. O presente modelo foi escolhido por ser um dos mais aceitos e utilizados entre os modelos de trombose existentes. Sabe-se que

espécies reativas de oxigênio contribuem significativamente para o dano do endotélio arterial e subsequente formação do trombo (Danenberg e cols., 2003), por isso acredita-se que esse modelo mimetize de forma adequada condições fisiopatológicas.

O HS de *N.nododus* foi administrado por via intravenosa 5 minutos antes do estímulo trombótico. Assim, pode-se observar que o GAG apresenta efeito antitrombótico de maneira dose-dependente (Figura 22). Na dose de 1 mg/kg, o tempo de oclusão aumentou 4 vezes em relação ao controle. Baixas doses de heparina (0,1 mg/kg) foram suficientes para ter o mesmo efeito.

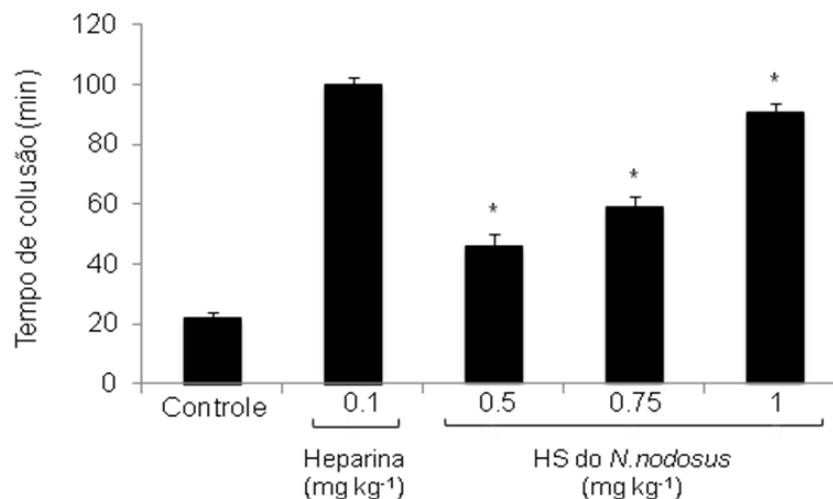


Figura 22: Efeito antitrombótico *in vivo* do HS do *N.nododus*. Os GAGs foram administrados nas doses indicadas. Após, 5 min a lesão endotelial foi iniciada pela injeção do corante rosa de bengala, seguida de iluminação com o laser. O tempo de oclusão foi monitorado através de uma sonda com um medidor de fluxo. As barras de erro representam o desvio padrão da média. * $P \leq 0,002$ em relação ao controle. No mínimo, 5 animais foram usados por dose.

4.8) Efeito do HS do *N.nodosus* no tempo de sangramento

Um dos efeitos colaterais mais importantes da heparina é o risco elevado de sangramento. Dessa forma, investigamos se a administração intravenosa do HS do *N.nodosus* aumentaria o sangramento. O modelo experimental utilizado foi o de descrito por Leadley (2000), e consiste em produzir um corte de 3 mm no segmento distal da cauda do rato, que é então imersa numa proveta contendo água destilada. A perda sangüínea é avaliada após 60 minutos, medindo-se o teor de hemoglobina dissolvida na água através da absorbância a 540 nm.

Como mostrado na Figura 23, na dose de 1 mg/kg, na qual o maior efeito antitrombótico é observado, o HS do molusco induziu apenas uma leve alteração no sangramento, quando comparado com os animais controles. Nessa mesma dose, a heparina de mamífero, induziu uma grande perda de sangue (5 vezes mais que o controle). Quando o HS do *N.nodosus* foi administrado numa dose 4 vezes maior que a dose antitrombótica, o sangramento aumentou 2,7 vezes em relação ao controle.

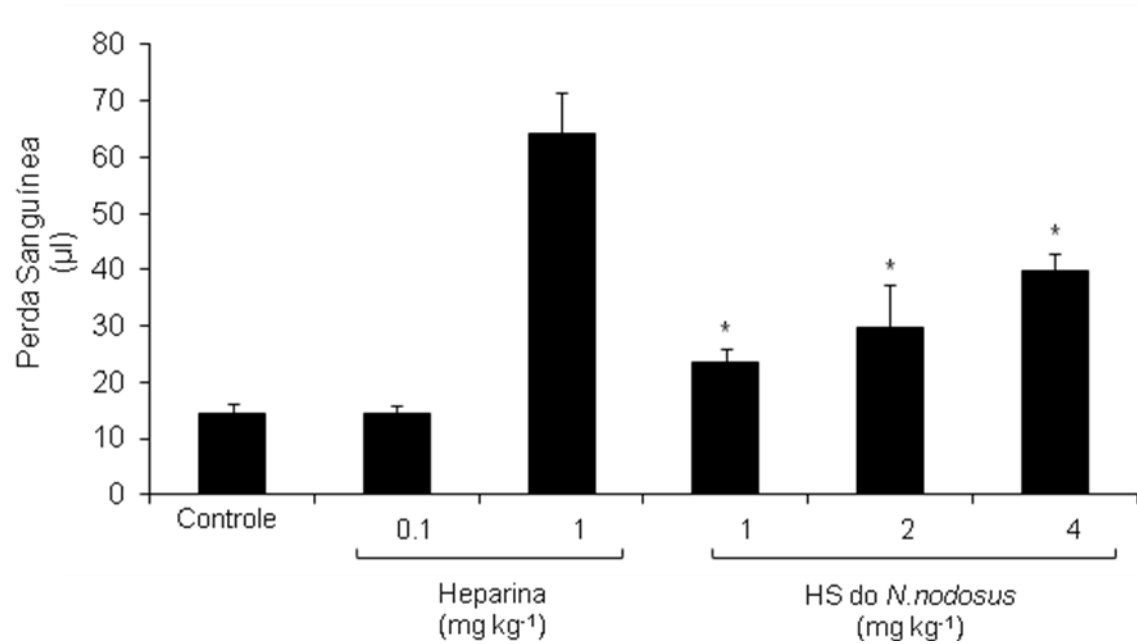


Figura 23: Efeito do HS do *N.nodosus* no modelo do tempo de sangramento. Diferentes doses de polissacarídeos foram administradas a ratos via intravenosa. Então, 5 minutos depois, a parte distal da cauda foi cortada e imersa em água destilada. A quantidade de hemoglobina presente na água foi detectada no espectrofotômetro com uma leitura a 540 nm. As barras de erro representam o desvio padrão da média. * $P \leq 0,002$ em relação ao controle. No mínimo, 5 animais foram usados por dose.

4.9) Ativação do fator XII na presença de polissacarídeos sulfatados

Em 2008, vários episódios clínicos relacionados com preparações de heparina contaminada com CSOS foram relatados. Os efeitos colaterais graves do contaminante estavam relacionados com a ativação do fator XII, que resulta na produção de bradicinina e ativação de proteínas do sistema complemento levando à hipotensão e choque anafilático. Dessa forma, realizamos um ensaio com plasma humano, substrato cromogênico para calicreína (a pré-calicreína é ativada pelo XIIIa) e diferentes concentrações de polissacarídeo (OSCS foi usado como controle positivo). O resultado desse experimento está ilustrado na Figura 24. Como esperado, o OSCS foi capaz de ativar a calicreína em baixas doses, tais como 0,6 e

0,8 $\mu\text{g/ml}$, ao passo que o HS do molusco apresenta o mesmo efeito apenas numa dose 15 vezes maior, 15 $\mu\text{g/ml}$.

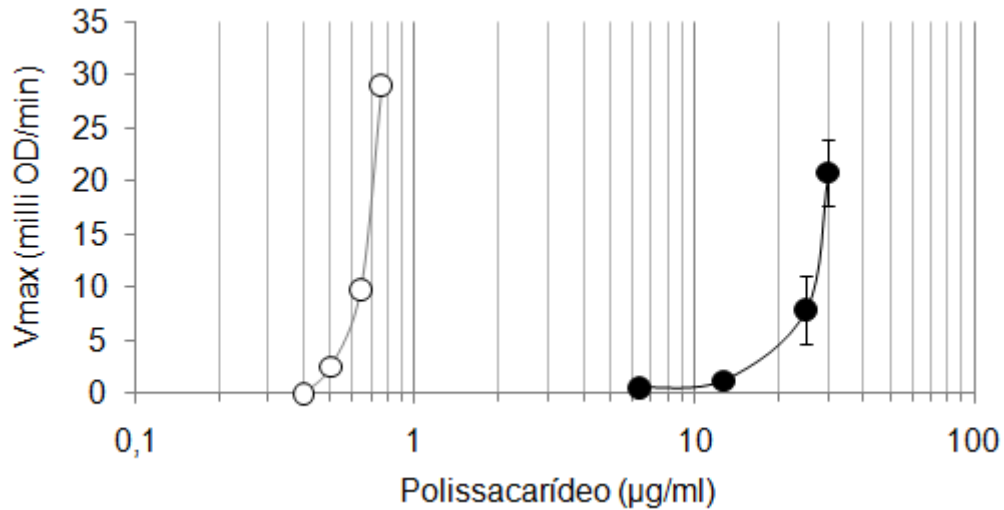


Figura 24: Ativação do fator XII pelos polissacarídeos sulfatados. *Pool* de plasma humano foi incubado por 60 segundos a 37°C com diferentes concentrações de polissacarídeos, e, após esse tempo, substrato cromogênico para caliceína foi adicionado. O aumento na absorvância a 405 nm foi expressa em densidade óptica/min (média \pm SEM, n=3). (-O-) OPCS, (-●-) HS do *N.nodosus*.

4.10) Ensaio de citotoxicidade do HS do *N.nodosus*

As análises de RMN revelaram que o HS do molusco apresenta uma estrutura rara devido à presença de ácido glucurônico-3-O-sulfatado, dentre outras características. Como esse resíduo está presente em grandes quantidades no OPCS, tal fato levantou questões em relação a uma possível toxicidade desse composto. Dessa forma, realizamos o ensaio de viabilidade celular por MTT com fibroblastos da linhagem BHK-21, que foram incubados com o HS do molusco por 48 horas. Como visto na Figura 25, a incubação com o HS do molusco não gerou efeito citotóxico até a dose de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Na dose de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, a viabilidade celular foi reduzida em 35%. Entretanto, não foi observada diferença significativa em

relação ao controle na viabilidade celular na concentração que possui o máximo efeito antitrombótico.

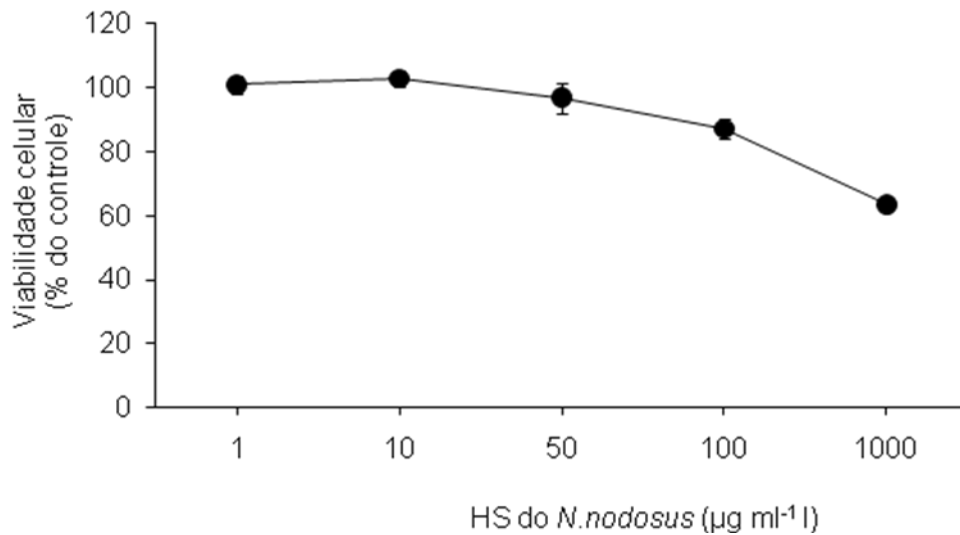


Figura 25: Viabilidade Celular na presença do HS do *N.nodosus*. Células BHK-21 foram incubadas com diferentes concentrações do HS do molusco por 48 horas. As porcentagens de células viáveis foram determinadas com a adição do MTT e posterior leitura a 570 nm. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

5) DISCUSSÃO

A heparina não fracionada é a principal droga anticoagulante usada na cirurgia cardiovascular e na prevenção de trombose venosa e arterial (Mackman, 2008). O consumo mundial da heparina vem aumentando constantemente, cerca de 100 toneladas por ano, devido, parcialmente, ao crescente uso da heparina de baixo peso molecular (Melo e cols., 2008). Entretanto, a fonte de heparina farmacêutica é muito restrita, sendo extraída, principalmente, de intestino de porco (Liu e cols., 2009). A heparina pode, também, ser obtida a partir de pulmão bovino. No entanto, com o aparecimento da encefalopatia espongiiforme bovina, a utilização desses animais como fonte de heparina foi abolida na maioria dos países desenvolvidos.

Para atender a demanda atual de heparina, acredita-se que são necessários 200 milhões de porcos (Melo e cols., 2008). Portanto, existe uma necessidade urgente de se obter fontes alternativas de heparina.

Polímeros do tipo heparina apresentando atividade anticoagulante significativa foram descritos em diversos moluscos bivalves (Tabela 2). Quatorze espécies de oito famílias da classe Bivalvia sintetizam heparina com diferentes composições dissacarídicas e pesos moleculares. A atividade anticoagulante desses compostos se encontra na faixa de < 5 a 365 IU mg^{-1} . Dentre esses bivalves, espécies da família Pectinidae vêm sendo cultivadas com sucesso em diferentes partes do mundo devido ao seu alto valor comercial. Em 2007, aproximadamente 3 toneladas de coquille foram produzidos por laboratórios de cultura de larva e pós-larva no Brasil (www.epagri.sc.gov.br). Deste modo, esta espécie se mostra uma interessante fonte de polímeros análogos da heparina para estudos dos efeitos em doenças cardiovasculares.

No presente estudo, uma molécula do tipo HS foi identificada nas vísceras do molusco bivalve *N.nodosus*. A análise histoquímica com azul de alcian revelou que esse composto está presente na matriz extracelular do manto e da brânquia e também na membrana basal do epitélio da brânquia. Detectamos a presença de CS na matriz extracelular de ambos os órgãos.

Alguns PGS de vertebrados são secretados e localizam-se na membrana basal, como o agrim, o perlecam e o bamacam. Dentre esses, o agrim é o único que apresenta exclusivamente cadeias de HS ligadas ao seu cerne protéico. O PG perlecam apresenta cadeias de HS e de CS, ao passo que o bamacam possui apenas molécula do tipo CS (Iozzo, 1998). Portanto, considerando que CS não foi encontrado na membrana basal e fazendo analogia com vertebrados, o HS do

N.Nodosus pode estar presente em PG do tipo perlecam e agrim. Entretanto, isso é apenas uma hipótese que será investigada em um próximo estudo.

A extração dos polissacarídeos sulfatados do molusco apresentou um elevado rendimento. A partir de 1g de vísceras secas (sem músculo adutor e gônadas), foram isolados 5,13 mg de GAGs. Dessa massa de GAGs, aproximadamente 4 mg correspondem ao HS. Esse rendimento é superior daquele obtido após a extração de GAGs da ascídia *Styela plicata* (0,26% de rendimento) da mucosa intestinal de porco (0.022% de rendimento) (Linhardt e cols., 1992).

CS e um polissacarídeo sulfatado não identificado são componentes que se encontram em menor quantidade nos órgãos de *N.nodosus*, sendo facilmente removidos no procedimento de precipitação seletiva com etanol. O HS do molusco foi obtido, livre de contaminantes, por precipitação com de etanol na concentração de 47%. Surpreendentemente, com a metodologia de extração utilizada, nenhuma quantidade significativa de GAGs foi detectada no músculo adutor, parte principal do corpo do animal na utilização como iguaria. O HS de *N.nodosus* é restrito aos órgãos que são descartados durante a preparação do molusco para comercialização..

Uma estimativa do peso molecular foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida. Assim, avaliamos que esse polímero possui peso molecular médio de 27 kDa. Esse peso é maior que o de cadeias de heparina de mamífero. Considerando que o peso molecular do dissacarídeo de heparina/HS é de 486, concluímos que as cadeias de HS do *N.nododus* possuem, em média, 55 dissacarídeos.

Analisando os resultados obtidos pelas análises bioquímicas e por RMN, podemos inferir que o HS do bivalve se trata de uma molécula híbrida, possuindo

características de heparina e HS. Assim, esse polímero não é susceptível à incubação com heparinase I, que cliva preferencialmente a ligação glicosídica entre o ácido idurônico-2-O-sulfatado e glucosamina, regiões comumente encontradas na heparina. Estes dados indicam que, o HS do *N.nodosus* não contém monossacarídeos do tipo ácido idurônico-2-O-sulfatado, como confirmado pelas análises espectroscópicas de RMN.

Os espectros de RMN obtidos foram similares a espectros de polímeros de HS. Essas análises indicam que o HS do molusco apresenta, aproximadamente, 60% de glucosamina N-acetilada. A presença elevada de resíduos N-acetilados pode explicar a resistência de algumas partes da molécula ao tratamento com ácido nitroso no pH 1,5, pois nestas condições, o ácido nitroso quebra apenas as cadeias de heparina/HS em regiões N-sulfatadas.

As análises de RMN mostraram que a sulfatação ocorre em alguns resíduos de ácido glucurônico e de glucosamina N-sulfatada (39% da molécula). Provavelmente, esses resíduos de glucosamina são susceptíveis ao tratamento com ácido nitroso, mostrando a presença de uma região do tipo heparina na molécula. A presença dessas regiões pode explicar a atividade anticoagulante do HS do molusco nos ensaios usando plasma e inibidores e proteases da coagulação.

O HS do molusco apresentou unidades de ácido glucurônico monossulfatadas (G2S ou G3S) e quantidades insignificantes de unidades dissulfatadas de ácido glucurônico. As sulfatações nas posições 2 e 3 do ácido glucurônico são raras, e foram confirmadas através do assinalamento dos espectros bidimensionais. O primeiro dado que suporta essa sulfatação é a presença de picos de correlação (H2/C2 e H3/C3) bem resolvidos no espectro heteronuclear (Figura 15 B). Esses picos apresentam sinais químicos de próton e carbono ressonando nas frequências

de δ_H/δ_C 4,15-4,02/75,3-72,0 e 4,73-4,58/85-80,4, respectivamente. Os picos presentes no espectro HSQC são bem distintos e separados e não podem ser confundidos com outros resíduos do HS do molusco. Cabe, ainda ressaltar que esses picos particulares confundidos com os sinais químicos de HSs descritos até o dado momento (Chavante e cols., 2000), indicando que o HS do molusco apresenta uma estrutura peculiar.

Uma outra evidência que confirma as raras sulfatações no ácido glucurônico do HS do molusco são os sinais químicos presentes no espectro homonuclear COSY. Apesar da presença de um sinal forte de água, esse espectro revela sinais de correlação devido ao acoplamento escalar entre prótons anoméricos do ácido glucurônico 2- e 3-sulfatado e os respectivos hidrogênios 2 (H2). O H2 do ácido glucurônico 3-sulfatado ressona com um deslocamento químico de campo baixo mais acentuado (0,55 ppm) do que o deslocamento químico do H2 do ácido glucurônico 2-sulfatado, como assinalado no HSQC. Esses dados indicam que o assinalamento químico desses sinais foram feitos de maneira consistente e que essas unidades raras estão indiscutivelmente presentes nas cadeias de HS do molusco.

Após determinação estrutural do composto, investigamos as propriedades anticoagulantes dessa molécula. As análises realizadas indicaram que a atividade anticoagulante do HS do *N.nodosus* é mediada principalmente por antitrombina e cofator II da heparina. Este dado foi confirmado de forma clara e concisa quando realizamos ensaios com plasma depletado dessas SERPINS e observamos uma drástica redução da atividade anticoagulante (Figura 18). Entretanto, percebemos que alguma atividade permanece, sugerindo que um mecanismo anticoagulante independente de SERPINS pode estar presente em pequena proporção.

O HS do *N.nodosus* inibiu, eficientemente, a formação do trombo em um modelo de trombose arterial, que envolve dano endotelial por reação fotoquímica. Nesse modelo, a trombose é iniciada pela aderência de plaquetas ao espaço subendotelial, e a ativação das plaquetas e da coagulação contribuem para formação do trombo (Hirsh e cols., 2001). Portanto, esse modelo mimetiza a patofisiologia da maioria dos ataques cardíacos e de muitos infartos que são iniciados por trombose secundária e ruptura da placa aterosclerótica. A utilização de heparina não fracionada na dose de 0,1 mg/kg inibiu totalmente a formação de trombo nesse modelo. Para produzir o mesmo efeito, é necessário uma dose dez vezes maior do HS do bivalve. Entretanto, um efeito antitrombótico significativo é alcançado na dose de 0,5 mg/kg e, nessa dose, não foi observado efeito de sangramento. Na dose de 1 mg/kg, o HS do *N.nodosus* induziu apenas um leve sangramento quando comparado ao controle negativo.

O HS descrito nesse estudo apresenta pequenas, porém significativas quantidades de grupos sulfatado em posições que não foram descritos, até o momento, nos GAGs de mamíferos. Isso nos chamou a atenção para a possibilidade da existencia de um possível efeito tóxico, principalmente diante de fatos recentes envolvendo a contaminação de heparina com OSCS (Kishimoto e cols., 2008; Liu e cols., 2008). Foi mostrado que os efeitos tóxicos do contaminante da heparina eram devido à ativação de calicreína, mediada pela a ativação do fator XIIa e produção de proteínas do sistema complemento, induzida pela calicreína gerada. Como mostrado na Figura 24, o HS do molusco começou a ativar a produção de calicreína pelo fator XII apenas na faixa de concentração de 20 e 30 µg/mL. Esta concentração corresponde a uma dose de 20 a 30 vezes maior que a dose equivalente necessária a inibição máxima de formação de trombo *in vivo* (1 µg/mL – concentração estimada

de acordo com a quantidade de massa de HS do molusco que é aplicada no animal e a quantidade de sangue média que esse animal possui). Adicionalmente, verificamos que o efeito citotóxico do HS do molusco na linhagem celular BHK-21 acontece apenas na faixa de 100 a 1000 µg/mL.

O HS do molusco é isolado com rendimento razoáveis, através de processos semelhantes aos já utilizados na preparação de heparina para uso farmacêutico. Diversas espécies de moluscos, incluindo aqueles que possuem altas quantidades de análogos da heparina, têm sido cultivadas com sucesso em diferentes partes do mundo. O cultivo desses moluscos emprega tecnologias desenvolvidas pela aquicultura capazes de produzir toneladas de matéria prima (Helm & Bourne, 2004). Por exemplo, em 1999, foram produzidas aproximadamente 73.000 toneladas de vieiras (Lem, 2005). Baseado nisso, pode-se ressaltar que as condições críticas necessárias para utilização de invertebrados marinhos como fonte natural de compostos terapêuticos já foram estabelecidas. O que é fundamental nesse momento é um esforço cooperativo de cientistas de áreas relacionadas para adaptar especificamente as metodologias atuais de cultivo.

Por fim, o presente estudo contribui de forma significativa para aumentar o conhecimento de fontes potenciais de novos análogos de heparina. O estudo dos efeitos de novos GAGs em modelos de trombose que mimetizam as condições patofisiológicas podem contribuir para o desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos que não apresentem muitos efeitos colaterais e que atuem de maneira efetiva nas diversas condições do paciente.

5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMAD, S.S., RAWALA-SHEIKH, R., WALSH, P.N., 1992. Components and assembly of the factor X activating complex. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 18: 311-323.

American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics – 2009 Update. Dallas, Texas: American Heart Association; 2009.

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

VINE, A.K., 2009. Recent Advances in Haemostasis and Thrombosis. *Retina* 29: 1-7.

ARUMUGAM, M., SHANMUGAM, A., 2004. Extraction of heparin and heparin-like substance from marine mesogastropod mollusc *Turritella attenuata* (Lamarck, 1779). *Indian journal of experimental biology* 42: 529-532.

BORGHETTI, N.R.B., OSTRENSKY, A., BORGHETTI, J.R., 2003. Aquicultura: uma visão sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. *Curitiba: Grupo Integrados Aquicultura e Estudos Ambientais* p. 128.

BOURIN, M.C., LINDAHL, U., 1993. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochemical Journal* 289: 313-330.

BURSON Jr, S. L., FAHRENBACH, M. J., FROMMHAGEN, L. H., RICCARDI, B. A., BROWN, R. A., BROCKMAN, J. A., LEWRY, H. V., STOKSTAD, E. L. R., 1956. Isolation and Purification of Mactins, Heparin-like Anticoagulants from Mollusca. *Journal of the American Chemical Society* 78: 5874-5878.

CESARETTI, M., LUPPI, E., MACCARI, F., VOLPI, N., 2004. Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from the clam *Tapes philippinarum*: evidence for the presence of a high content of antithrombin III binding site. *Glycobiology* 14: 1275-1284.

CASU, B., 1989 in *Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications*, Ed: D. A. Lane and U. Lindahl, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, p. 25.

CHAVANTE, S.F., SANTOS, E.A., OLIVEIRA, F.W., GUERRINI, M., TORRI, G., CASU, B., DIETRICH, C.P., NADER, H.B., 2000. A novel heparan sulfate with high degree of N-sulphation and high heparin cofactor II activity from the brine shrimp *Artemia franciscana*. *International Journal of Biological macromolecules*.27: 49-57.

CONRAD, H.E. 1998 in *Heparin Binding Proteins*. ed. Academic Press, San Diego, CA.

COUGHLIN, S.R., 1999. Protease-activated receptors and platelet function. *Thrombosis and Haemostasis* 82:353–6.

CRAWLEY, J.T., LANE, D.A., 2008 The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28: 233–242.

CUSHMAN, M., 2007. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Seminars in Hematology*. 44: 62-69.

DANENBERG, H.D., SZALAI, A.J., SWAMINATHAN, R.V., PENG, L., CHEN, Z., SEIFERT, P., FAY, W.P., SIMON, D.I., EDELMAN, E.R., 2003. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation*; 108: 512–515.

DAVIE, E.W., RATNOFF, O.D., 1964. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145:1310 –1312.

DAHLBACK, B., 2000. Blood coagulation. *Lancet* 355:1627–1632.

DAHLBACK, B., 2004. Progress in understanding of protein C anticoagulant pathway. *International Journal of Hematology* 79:109-16

DE MATTOS, D.A., STELLING, M.P., TOVAR, A.M., MOURÃO, P.A., 2008. Heparan sulfates from arteries and veins differ in their antithrombin-mediated anticoagulant activity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6: 1987-1990.

DENIS, C.V. & WAGNER, D.D., 2007. Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 728–739

DIETRICH, C.P., NADER, H.B., DE PAIVA, J.F., SANTOS, E.A., HOLME, K.R., PERLIN, A.S., 1989. Heparin in molluscs: chemical, enzymatic degradation and ¹³C and ¹H n.m.r. spectroscopical evidence for the maintenance of the structure through evolution. *International Journal of Biological Macromolecules*. 11: 361-366.

DREYFUSS, J.L., REGATIERI, C.V., JARROUGE, T.R., CAVALHEIRO, R.P., SAMPAIO, L.O., NADER, H.B., 2009. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 81: 409-429.

EITZMAN D.T., WESTRICK R.J., NABEL, E.G., GINSBURG, D., 2000. Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice. *Blood* 95: 577- 580.

ESKO, J.D., LINDAHL U., 2001. Molecular diversity of heparan sulfate. *The Journal of Clinical Investigation*. 108: 169-173.

FUNDERBURGH, J.L., 2002. Keratan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life* 54:187–194.

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

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

GUERRINI, M., NAGGI, A., GUGLIERI, S., SANTATARSIERO, R., and TORRI, G., 2005. Complex glycosaminoglycans: profiling substitution patterns by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analytical biochemistry* 337: 35-47.

HE, L. VICENTE, P.C., WESTRICK, R.J., EITZMAN, D.T., TOLLEFSEN, D.M., 2002. Heparin cofactor II inhibits arterial thrombosis after endothelial injury. *The Journal of Clinical Investigation* 109:213-219

HEBERT, J.M., BERNAT A., MAFFRANDJ.P., 1992. Importance of platelets in experimental venous thrombosis in rats. *Blood* 80: 2281-2286.

HELM, M.M., BOURNE, N., 2004 in *The hatchery culture of bivalves: a practical manual* (Lovatelli, A. ed.) pp. 201, FAO, Rome

HIRSH, J., ANAND, S.S., HALPERIN, J.L., FUSTER, V., 2001. Guide to anticoagulant therapy: heparin. *Circulation* 103: 2994-3018.

HOGG, P.J., JACKSON, C.M. 1989. Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin III: implications for heparin efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86:3619-3623.

HOFFMAN, M., MONROE, D.M., 2001. A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* 85:958 –965.

HUMPHRIES, D.E., WONG, G.W., FRIEND, D.S., GURISH, M.F., QIU, W.T., HUANG, C., SHARPE, A.H., STEVENS, R.L., 1999. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* 400: 769-772.

IOZZO, R.V., 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annual review of biochemistry* 67:609-652.

IOZZO, R.V., 2001. Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *The Journal of Clinical Investigation*. 108:165-167.

JOHNSON, D.J., LANGDOWN, J., LI, W., LUIS, S.A., BAGLIN, T.P., HUNTINGTON J.A., 2006. Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 35478-35486.

JORDAN, R. E., MARCUM, J. A., 1986. Anticoagulant active heparin from clam (*Mercenaria mercenaria*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 248: 690-695.

LEADLEY, JR. R.J., CHI, L., REBELLO, S.S., GAGNON, A., 2000. Contribution of in vivo models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 43: 101-16.

LEM, A. 2005. *International trade in aquaculture products*. Topics Fact Sheets. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* (online, <http://www.fao.org/fishery/topic/14884/en>).

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

LINHARDT, R. J., AMPOFO, S. A., FARRED, J., HOPPENSTEADT, D., MULLIKEN, J. B., FOLKMAN, J., 1992. Isolation and characterization of human heparin. *Biochemistry* 31: 12441-12445.

LIU, H., ZHANG, Z., LINHARDT, R.J., 2009. Lessons learned from the contamination of heparin. *Natural Product Reports* 26: 313-321.

LLOYD-JONES, D., ADAMS, R.J., BROWN, T.M., CARNETHON, M., DAI, G., DE SIMONE, G., FERGUSON, T.B., FORD, E., FURIE, K., GILLESPIE, H., GO, A., GREENLUND, K., HAASE, N., HAILPERN, S., HO, P.M., HOWARD, V., KISSELA, B., KITTNER, S., LACKLAND, D., LISABETH, L., MARLLI, A., MCDERMONT, M.M., MEIGS, J., MOZAFFARIAN, D., MUSSOLINO, M., NICHOL, G., ROGER, V., ROSAMMOND, W., SACCO, R., SORLIE, P., STAFFORD, R., THOM, T., Wasserthiel-Smoller, S., WONG, N.D., Wylie-Rosett, J., 2010. Heart Disease and Stroke Statistics_2010 Update. A Report From the American Heart Association. *Circulation* 121: 1-170.

LUPPI, E., CESARETTI, M., VOLPI, N., 2005. Purification and Characterization of Heparin from the Italian Clam *Callista chione*. *Biomacromolecules* 6: 1672-1678.

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

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

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

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

Melo, I.E, Pereira, M.S., Cunha, R.S., Sá, M.P.L., Mourão, P.A.S., 2008. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 23: 69-74.

MOLIST, A., ROMARÍS, M., LINDAHL, U., VILLENA, J., TOUAB, M., BASSOLS A., 1998. Changes in glycosaminoglycan structure and composition of the main heparin sulphate proteoglycan from human colon carcinoma cells (perlecan) during cell differentiation. *European Journal of Biochemistry* 254: 371-377.

MOSMANN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.

MUSZBEK, L., ADANY, R., MIKKOLA, H., 1996. Novel aspects of blood coagulation factor XIII. I. Structure, distribution, activation and function. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 33: 357-421.

NADER, H.B., FERREIRA, T.M.P.C., PAIVA, J.F., MEDEIROS, M.G.L., JERÔNIMO, S.M.B., PAIVA, V.M.P., and DIETRICH, C.P., 1984. Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three species of molluscs. *The Journal of Biological Chemistry* 259: 1431-1435.

PAVÃO, M.S.G, MOURÃO, P.A.S., MULLOY, B., TOLLEFSEN, D.M., 1995. A Unique Dermatan Sulfate-like Glycosaminoglycan from Ascidian: Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 31027–31036.

PAVÃO, M.S.G., AIELLO, K.R., WERNECK, C.C., SILVA, L.C., VALENTE A-P., MULLOY, B., COLWELL, N.S., TOLLEFSEN, D.M., 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from Ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. *The Journal of Biological Chemistry* 273:27848–27857.

PEJLER, G., DANIELSSON, A., BJORKJ, I., LINDAHL, U., NADER, H. B., DIETRICH, C. P., 1987. Structure and antithrombin-binding properties of heparin isolated from the clams *Anomalocardia brasiliiana* and *Tivela mactroides*. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 11413-11421.

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

ROCKVILLE, M.D., 2008. Acute allergic-type reactions among patients undergoing hemodialysis — multiple states, 2007–2008. Information on adverse event reports and heparin. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 57: 124-125.

RODÉN, L., in *Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications*, ed. D. A. Lane and U. Lindahl, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1989, p. 1.

RUPP, G.S., PARSON, G.J., 2006. Scallop aquaculture and fisheries in Brazil in *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Ed: S.E. Shumway, G.J. Parsons. Elsevier, Oxford, p. 1225-1245.

SAITO, H., YAMAGATA, T., SUZUKI, S., 1968. Enzymatic Methods for the Determination of Small Quantities of Isomeric Chondroitin Sulfates. *The Journal of Biological Chemistry* 243:1536-1542.

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

SARAVANAN, R., SHANMUGAM, A., 2009. Preventive Effect of Low Molecular Weight Glycosaminoglycan from *Amussium pleuronectus* (Linne) on Oxidative Injury and Cellular Abnormalities in Isoproterenol-Induced Cardiotoxicity in Wistar Rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology* Epub ahead of print.

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

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

SELIGSOHN, U., 2007. Factor XI in hemostasis and thrombosis: past present, and future. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 98:84–89

SEND, N., MURAKAMI, K., 1982. Structure of disulfated disaccharides from chondroitin polysulfates, chondroitin sulfate D and K. *Carbohydrate Research* 103: 190-194.

SUGAHARA K., MIKAMI T., UYAMA T., MIZUGUCHI S., NORMURA K., KITAGAWA H., 2003. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology* 13: 612-620.

SUZUKI, M., 1939. Prosthetic group of cornea mucoid. *Journal of Biochemistry* 30: 185-191.

SUZUKI, S., 1960. Isolation of Novel Disaccharides from Chondroitin Sulfates. *The Journal of Biological Chemistry* 235: 3580-3588.

TOLLEFSEN, D.M., BLANK, M.K., 1981. Detection of new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *The Journal of Clinical Investigation* 68: 589-596.

TURNBULL J., POWELL A., GUIMONND S., 2001. Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends in Cell Biology* 11: 75-82.

VELDMAN, A., HOFFMAN, M., EHERENFORTH, S., 2003. New insights into the coagulation system and implications for new therapeutic options with recombinant factor VIIa. *Current Medicinal Chemistry* 10: 797–811.

VIJAYABASKAR, P., BALASUBRAMANIAN, T., SOMASUNDARAM, S.T., 2008. Low-Molecular Weight Molluscan Glycosaminoglycan from Bivalve *Katelysia opima* (Gmelin). *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology* 30: 175-180.

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

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

WRIGHT, I.S. 1962 The nomenclature of blood clotting factors. *Canadian Medical Association Journal* 86: 373-374

WODARZ A., NUSSER, R., 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14: 59-88.

YONGE, C.M. 1936. The evolution of swimming habitat in the Lamellibranchia. *Mémoires du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique* 3: 77-100.

ANEXOS

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento dessa dissertação de mestrado foram agrupados sob a forma de um manuscrito e aceitos para publicação na revista *The Journal of Biological Chemistry*.

Unique Extracellular Matrix Heparan Sulfate from the Bivalve *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) Safely Inhibits Arterial Thrombosis after Photochemically Induced Endothelial Lesion*

Received for publication, December 3, 2009. Published, JBC Papers in Press, January 6, 2010, DOI 10.1074/jbc.M109.091546

Angélica M. Gomes[‡], Eliene O. Kozłowski[‡], Vitor H. Pomin^{§1}, Cintia Monteiro de Barros[‡], José L. Zaganeli[¶], and Mauro S. G. Pavão^{‡2}

From the [‡]Laboratório de Tecido Conjuntivo, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Glicobiologia and Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Brasil, the [§]Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens, Georgia 30602, and the [¶]Instituto de Ecodesenvolvimento da Baía da Ilha Grande, Rua M, casa 5, Angra dos Reis, RJ CEP 23905-000, Brasil

Heparin-like glycans with diverse disaccharide composition and high anticoagulant activity have been described in several families of marine mollusks. The present work focused on the structural characterization of a new heparan sulfate (HS)-like polymer isolated from the mollusk *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) and on its anticoagulant and antithrombotic properties. Total glycans were extracted from the mollusk and fractionated by ethanol precipitation. The main component (>90%) was identified as HS-like glycosaminoglycan, representing ~4.6 mg g⁻¹ of dry tissue. The mollusk HS resists degradation with heparinase I but is cleaved by nitrous acid. Analysis of the mollusk glycan by one-dimensional ¹H, two-dimensional correlated spectroscopy, and heteronuclear single quantum coherence nuclear magnetic resonance revealed characteristic signals of glucuronic acid and glucosamine residues. Signals corresponding to anomeric protons of nonsulfated, 3- or 2-sulfated glucuronic acid as well as *N*-sulfated and/or 6-sulfated glucosamine were also observed. The mollusk HS has an anticoagulant activity of 36 IU mg⁻¹, 5-fold lower than porcine heparin (180 IU mg⁻¹), as measured by the activated partial thromboplastin time assay. It also inhibits factor Xa (IC₅₀ = 0.835 μg ml⁻¹) and thrombin (IC₅₀ = 9.3 μg ml⁻¹) in the presence of antithrombin. *In vivo* assays demonstrated that at the dose of 1 mg kg⁻¹, the mollusk HS inhibited thrombus growth in photochemically injured arteries. No bleeding effect, factor XIIa-mediated kallikrein activity, or toxic effect on fibroblast cells was induced by the invertebrate HS at the antithrombotic dose.

Heparin is an effective anticoagulant in the treatment and prevention of venous thrombosis. It is also used to prevent mural thrombosis after myocardial infarction, to treat patients with unstable angina, and, in the absence of aspirin, is the drug of choice to treat acute arterial thrombosis after coronary thrombolysis (1, 2). The anticoagulant activity of heparin is due to the occurrence of various antithrombin binding sequences including the well known pentasaccharide sequence GlcNAc(6S)-GlcA-GlcNS(3S)-IdoA(2S)-GlcNS(6S) (3–5). In the presence of heparin, the rates of inhibition of thrombin, factor IXa, and factor Xa by AT are increased ~1,000-fold so that inhibition is essentially instantaneous (1, 6).

Currently, commercial heparin preparations are obtained from mammalian sources, either from porcine or bovine intestine or bovine lung (7). However, because of the higher anticoagulant activity of porcine mucosa heparin (8) and the appearance of bovine spongiform encephalopathy, the production of bovine heparin has been almost abolished. Nonanimal sources of heparin for pharmaceutical use are currently not available. However, several authors reported the occurrence of heparin in different classes of invertebrate animals, such as crustaceans (9–11), ascidians (12), and mollusks (13–16). Heparin-like glycans with diverse disaccharide composition and anticoagulant activities varying from <5 up to 363 IU mg⁻¹ (see Table 1) are present in marine bivalve mollusks from six families of the order Veneroidea and two families from the order Pectinoidea.

Species of the Pectinidae family of marine bivalve mollusks have great economical importance in countries such as Canada, the United States of America, the United Kingdom, France, Spain, and Japan where they are highly prized and sustained by strong fishery and aquaculture industries (17). The commercial value of these animals results from the presence of a central adductor muscle, called scallop, which is highly appreciated in both Eastern and Western cooking. In Brazil, since 1991, the species *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) has been successfully cultured throughout the production of larva and post-larva.

The occurrence of anticoagulant heparins and the availability of methods to allow a sustainable production prompt us to study the glycans from the pectinidae *N. nodosus*. Here, we

* The work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, and the Mizutani Foundation for Glycoscience (to M. S. G. P.).

¹ Supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Postdoctoral Fellowship PDE 201019/2008-6.

² Research Fellow from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. To whom correspondence should be addressed: Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rua Rodolpho Paulo Rocco 255, 4º andar, sala 4A-08, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, CEP 21941-913 Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: 55-21-2562-2093; E-mail: mpavao@hucff.ufrj.br.

describe the structure, the anticoagulant and antithrombotic properties, as well as the toxic effects of a unique heparan sulfate (HS)³ isolated from the mollusk. In addition, the localization of the glycan in the tissues of the invertebrate is also described. The mollusk glycan prevents thrombus growth in the carotid artery by a mechanism involving a serpin-mediated inhibition of plasma coagulation proteases. This effect occurs without inducing any significant bleeding, factor XIIa-mediated kallikrein formation, and cellular toxicity. HS was located in the extracellular matrix of the mantle and gills. No glycans were detected in the adductor muscle of the mollusk.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Heparan sulfate from human aorta was extracted and purified as described previously (18). Chondroitin 4-sulfate from whale cartilage, dermatan sulfate, and heparin from porcine intestinal mucosa (180 IU mg⁻¹), twice-crystallized papain (15 units mg⁻¹ protein), and keratanase from *Pseudomonas sp.* (EC 3.2.1.103), sulfated dextran 500 and sulfated dextran 8 were purchased from Sigma; chondroitin AC lyase (EC 4.2.2.5) from *Arthrobacter aurenses*, chondroitin ABC lyase (EC 4.2.2.4) from *Proteus vulgaris* and heparinase I (EC 4.2.2.7) from *Flavobacterium heparinum* were from Seikagaku America Inc. (Rockville, MD). Agarose (standard low M_n) was obtained from Bio-Rad; toluidine blue and alcian blue were from Fisher; human antithrombin, human factor Xa, and thrombin were from Hematologic Technologies Inc.; thrombin chromogenic substrate tosyl-Gly-Pro-Arg-*p*-nitroanilide acetate (Chromozyn TH) and factor Xa chromogenic substrate *N*-methoxycarbonyl-D-norleucyl-glycyl-L-arginine-4-nitranylacetate were from Amersham Biosciences. Human plasmas immunodepleted of heparin cofactor II and/or antithrombin were obtained from Affinity Biologicals (Ancaster, Canada).

Histochemistry

Adult specimens of the bivalve mollusk *N. nodosus* (Linnaeus, 1758) were collected from Baía da Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil. For histochemical preparations, *N. nodosus* viscera was carefully isolated and fixed in 5% formaldehyde, 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3) diluted in artificial sea water for 2 h at room temperature. After fixation, the viscera was washed with cacodylate buffer in artificial sea water, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylol, and embedded in Para-plast (melting point 55.6 °C). Approximately 7- μ m sections were cut longitudinally on a Spencer microtome. The sections were counterstained with periodic acid-Schiff and stained with alcian blue in 0.1 M HCl for 50 min, before or after incubation with chondroitin ABC lyase in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), containing 5 mM EDTA and 15 mM sodium acetate for 2 h at room temperature or with nitrous acid for 2 h at room temperature. The sections were observed under a Zeiss Axioplan light microscope

equipped with a CCD color camera (Media Cybernetics, model EvolutionTM MP), and digital images were obtained.

Extraction of the Sulfated Glycans

The bodies of the animals were removed from the shell, and the adductor muscles were separated from the viscera. These tissues were cut in small pieces, immersed in acetone, and kept for 24 h at 4 °C. The dried materials (~25 g) were separately suspended in 500 ml of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5) containing 5 g of papain, 5 mM EDTA, and 5 mM cysteine and incubated at 60 °C overnight. The incubation mixture was then centrifuged (2000 \times g for 10 min at room temperature), the supernatant was separated, and the precipitate was incubated with papain. This procedure was repeated three more times, as described above. The clear supernatants from the four extractions were combined and mixed with a solution of cetylpyridinium chloride (final concentration, 0.5%) overnight at room temperature. The precipitate formed was washed with cetylpyridinium chloride (final concentration, 0.05%) and suspended with 2 M NaCl in 95% ethanol (100:15, v/v). The solution was mixed with 2 volumes of 95% ethanol and kept overnight at 4 °C. The precipitate formed (containing the total glycans) was collected by centrifugation (2000 \times g for 10 min at room temperature), dried, and dissolved in 50 ml of distilled water.

Fractionation of the Sulfated Glycans

The sulfated glycans extracted from the viscera were fractionated by differential precipitation with ethanol. Briefly, the aqueous solution of the total sulfated glycans was mixed with absolute ethanol to achieve a final concentration of 35.6% and kept at 4 °C overnight. The precipitate formed (glycan P-1) was collected by centrifugation, and the supernatant was mixed with absolute ethanol to achieve a final concentration of 70%. The precipitate formed (glycan P-2) was collected by centrifugation, and the supernatant was mixed with absolute ethanol to achieve a final concentration of 95%. The precipitate was collected by centrifugation and named glycan P-3. The glycans P-1, P-2, and P-3 were dried and suspended in distilled water.

Electrophoretic Analysis

Agarose Gel—The crude or purified glycans from the viscera of *N. nodosus* (1.5 μ g of uronic acid), before or after incubation with specific glycosaminoglycan lyases, or deaminative cleavage with nitrous acid were analyzed by agarose gel electrophoresis, as described previously (19). Briefly, the glycans and a mixture of standard glycosaminoglycans containing chondroitin sulfate, dermatan sulfate, and heparan sulfate (1.5 μ g of uronic acid of each) were applied to a 0.5% agarose gel in 0.05 M 1,3-diaminopropane/acetate (pH 9.0) and run for 1 h at 110 mV. After electrophoresis, the glycans were fixed with aqueous 0.1% cetylmethylammonium bromide solution and stained with 0.1% toluidine blue in acetic acid/ethanol/water (0.1:5:5, v/v/v).

Polyacrylamide Gel—The molecular mass of the purified mollusk glycan was estimated by polyacrylamide gel electrophoresis. The samples (~10 μ g) were applied to a 1-mm-thick 6% polyacrylamide slab gel, and after electrophoresis at 100 V

³ The abbreviations used are: HS, heparan sulfate; COSY, correlated spectroscopy; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; aPTT, activated partial thromboplastin time; CS, chondroitin sulfate.

Safe Antithrombotic Mollusk Heparan Sulfate

for ~1 h in 0.06 M sodium barbital (pH 8.6), the gel was stained with 0.1% toluidine blue in 1% acetic acid. After staining, the gel was washed overnight in 1% acetic acid. The molecular mass markers used were: dextran 500 Sigma Aldrich (S1) (average molecular weight, 500,000), chondroitin 6-sulfate from shark cartilage (S3) (average molecular weight, 54,000); chondroitin 4-sulfate from whale cartilage (S2) (average molecular weight, 36,000); and dextran 8 (S4) (average molecular weight, 8,000).

Enzymatic Treatments

Chondroitin Lyases—Crude *N. nodosus* glycans (~50 μg) were incubated with 0.01 unit of chondroitin AC or ABC lyases in 0.1 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 5 mM EDTA and 15 mM sodium acetate. After incubation at 37 °C for 12 h, the mixtures were analyzed by agarose gel electrophoresis, as described earlier.

Keratanase—Approximately 50 μg (as dry weight) of crude *N. nodosus* glycan was incubated with 0.005 unit of keratanase in 100 μl in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) overnight at 37 °C. At the end of the incubation period, the mixtures were analyzed by agarose gel electrophoresis, as described earlier.

Heparinase—Approximately 50 μg (as dry weight) of the purified *N. nodosus* glycan was incubated with 0.005 unit of heparinase I in 100 μl of 100 mM sodium acetate buffer (pH 7.0) containing 10 mM calcium acetate for 17 h at 37 °C. At the end of the incubation period, the mixtures were analyzed by agarose gel electrophoresis, as described earlier.

NMR Experiments and Chemical Structure Design

^1H and ^{13}C one- and two-dimensional spectra of the *N. nodosus* HS were recorded using a Bruker DRX 400 MHz apparatus with a triple resonance probe, and the spectra were processed using the Bruker software TopSpin, as detailed previously (20). Approximately 5 mg of the purified sample were dissolved in 0.5 ml of 99.9% deuterium oxide (Cambridge Isotope Laboratory, Cambridge, MA) inside a 5-mm-diameter NMR tube. The one-dimensional ^1H NMR spectrum was recorded with 16 scans. The two-dimensional $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC spectra were recorded using state-time proportion phase incrementation for quadrature detection in the indirect dimension. The $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC spectrum was run with 1024×256 points and globally optimized alternating phase rectangular pulses for decoupling. Chemical shifts are displayed relative to external trimethylsilylpropionic acid at 0 ppm for ^1H and relative to methanol for ^{13}C at 50 °C. The chemical structure of the bivalve HS was drawn using the Chemoffice 2002 software package (version 7.0) from CambridgeSoft.

Anticoagulant Effect Measured by Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT)

Activated partial thromboplastin clotting time assays were carried out as follows: normal human plasma (100 μl) or antithrombin/heparin cofactor II-free plasma was incubated with 10 μl of a solution of mammalian heparin or purified *N. nodosus* HS (0.001–100 μg) at 37 °C for 1 min. Then 100 μl of aPTT reagent (Celite; Biolab) were added and incubated at 37 °C. After 2 min of incubation, 100 μl of 0.25 M CaCl_2 were added to

the mixtures, and the clotting time was recorded in a coagulometer (Amelung KC4A).

Inhibition of Thrombin or Factor Xa by Antithrombin or HCII in the Presence of Mammalian Heparin or Mollusk Heparan Sulfate

The inhibition of thrombin or factor Xa by antithrombin or heparin cofactor II were evaluated by the assay of amyolytic activity of thrombin, using chromogenic substrate, as described (12). The incubations were performed in disposable UV semi-microcuvettes. The final concentrations of reactants included 50 nM antithrombin, 68 nM HCII, 15 nM thrombin, 20 nM factor Xa, and 0–100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ mammalian heparin or purified *N. nodosus* heparan sulfate in 100 μl of 0.02 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, and 1.0 mg ml^{-1} polyethylene glycol (pH 7.4) (TS/PEG buffer). Thrombin or factor Xa was added last to initiate the reaction. After 60 s of incubation at room temperature, 500 μl of 100 μM chromogenic substrate Chromogenix TH or *N*-methoxycarbonyl-D-norleucyl-glycyl-L-arginine-4-nitranillide-acetate in TS/PEG buffer was added, and the absorbance at 405 nm was recorded for 100 s. The rate of change of absorbance was proportional to the thrombin or factor Xa activity remaining in the incubation. No inhibition occurred in control experiments in which thrombin or factor Xa was incubated with antithrombin or HCII in the absence of heparin. Nor did inhibition occur when thrombin or factor Xa was incubated with heparin alone over the range of concentrations tested.

Animal Procedures

All of the animal work was carried out in accordance with the Brazilian Animal Protection Law and followed the institutional guidelines for animal care and experimentation (authorization number IBQM 012).

Photochemically Induced Carotid Artery Lesion

The carotid artery thrombosis was induced as described previously (21). Briefly, adult male and female rat (body weight, 200 g) were anesthetized with an intramuscular injection of 100 mg kg^{-1} of ketamine (Cristália, São Paulo, Brazil) and 16 mg kg^{-1} of xylazine (Bayer AS, São Paulo, Brazil), supplemented as needed, secured in the supine position, and placed under a dissecting microscope. The right common carotid artery was isolated through a midline cervical incision, and an ultrasonic flow probe (model 0.5 VB; Transonic Systems, Ithaca, NY) was applied. A 1.5-mW, 540-nm laser beam (Melles Griot, Carlsbad, CA) was applied to the artery from a distance of 5 cm. The injury was initiated by injection into the vena cava of rose bengal (90 mg kg^{-1} of body weight; Fisher) dissolved in phosphate-buffered saline, and flow was monitored until complete and stable (5 min) occlusion occurred. Mammalian heparin or *N. nodosus* heparan sulfate was dissolved in 0.15 M NaCl and injected intravenously into the vena cava 15 min before the injection of rose bengal, and the occlusion time was determined by a flow meter. The total volume of material injected intravenously did not exceed 10% of the estimated blood volume of the rat. At least five animals were used per group. The time to arterial occlusion was determined in minutes.

TABLE 1

Characteristics of heparin-like glycans found in marine bivalve mollusk

ND, not determined.

Class	Order	Family	Genus and species	Average molecular mass	Anticoagulant activity	Major disaccharide units	Reference		
				<i>Da</i>	<i>IU mg⁻¹</i>				
Bivalvia	Veneroida	Arctiidae	<i>Cyprina islandica</i>	ND	165	ND	29		
			<i>Donax striatus</i>	20,000	180	[UA-GlcNS6S]/[UA2S-GlcNS6]	30		
		Galatheoidea	<i>Tagelus gibbus</i>	24,000	<5	[UA-GlcNS6S]	31		
			<i>Spisula solidissima</i>	ND	155	ND	29		
		Tridacnidae	<i>Tridacna maxima</i>	ND	75	ND	15		
		Veneridae	<i>Anomalocardia brasiliiana</i> ^a	32,000	320	[UA2SGlcNS6S]/[UAGlcNS3S6S]	14,30		
				18,000	<5	[UA-GlcNS6S]	31		
			<i>Callista chione</i>	10,950	97	[UA-GlcN2S6S]/[UA-GlcNAc6S]	32		
			<i>Katelysia opina</i>	31,000	160	ND	33		
			<i>Mercenaria mercenaria</i>	18,000	363	[UA-GlcN3S] ^b	34		
			<i>Tapes philippinarum</i>	13,600	358	[UA2SGlcN2S6S]	35		
			<i>Tivela mactroides</i>	25,000	220	[UAGlcNS3S6S]/[UA-GlcNS6S]	14,30		
			Pectinoidea	Pectinidae	<i>Amussium pleuronectus</i>	7,000	95	ND	36
					<i>N. nodosus</i>	27,000	36	[UA-GlcNAc]	This work
					<i>Perna viridis</i>	ND	54	ND	15

^a This mollusk contains two compounds: a 32-kDa heparin-like and a 18-kDa HS-like glycan.^b 3-O-Sulfated GlcN-containing disaccharides.

Bleeding Effect

For evaluation of the bleeding effect, Wistar rats (both sexes; body weight, ~200 g) were anesthetized with a combination of xylazine and ketamine, as described above. A cannula was inserted into the right carotid artery for administration of mammalian heparin (0.1 and 1.0 mg kg⁻¹) or *N. nodosus* heparan sulfate (1.0, 2.0, or 4.0 mg kg⁻¹). The polysaccharide was allowed to circulate for 5 min, and the rat tail was cut 3 mm from the tip. The tail was carefully immersed in 40 ml of distilled water at room temperature. Blood loss was determined 60 min later by measurement of the hemoglobin content in the water solution using a spectrophotometric method, as described (22). The volume of blood was deduced from a standard curve based on absorbance at 540 nm. At least five animals were used per group.

Hexuronic Acid

The hexuronic acid content was estimated by the carbazole reaction (23).

Deaminative Cleavage with Nitrous Acid

Deamination by nitrous acid was performed at pH 1.5. The crude or the purified glycan extracted from *N. nodosus* (~20 μg) was incubated with 5 μl of freshly generated HNO₂ at room temperature for 1.5 h. The reaction mixtures were then neutralized with 1.0 M Na₂CO₃. Intact and nitrous acid-degraded glycans were analyzed by agarose gel electrophoresis.

Activation of Factor XII in the Presence of Sulfated Glycans

Activation of factor XII assay was carried out in 96-well plates. Normal human plasma was diluted with 3 volumes in TS/PEG buffer, and the samples (40 μl) were incubated with different concentrations of *N. nodosus* HS or a chemically oversulfated CS with a structure similar to the oversulfated CS found in heparin preparations (30 μl). After 60 s of incubation at 37 °C, 30 μl of 0.3 mM S-2302 (Chromogenix AB, Mondal, Sweden) was added, and the absorbance at 405 nm recorded for 300 s (Plate reader Thermo-max, America Devices). The S-2302 is a chromogenic substrate for plasma kallikrein, which

is activated from its precursor prekallikrein by the action of active factor XII. The method for the determination of activity is based on the difference in absorbance between the *p*-nitroanilide formed and the original substrate. The rate of *p*-nitroanilide formation, *i.e.* the increase in absorbance/s at 405 nm, is proportional to the enzymatic activity. No activation occurred in control experiments in the absence of sulfated glycan.

Citotoxic Effect of the Mollusk HS

BHK 21 cells were seeded in 96-well plates at a density of 1 × 10³ cells/well and treated for 48 h with various concentration of mollusk HS (0, 1, 10, 50, 100, and 1000 μg ml⁻¹). The cell viabilities were determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-based colorimetric assay. The values were described as percentages of the control.

Statistical Analysis

The results are expressed as the means ± standard deviation. The difference between two groups was tested using the *t* test.

RESULTS

Localization of Glycosaminoglycans in *N. nodosus*—Heparin-like compounds have been described in the internal organs of several species of bivalve mollusks (Table 1). We sought to determine the location of sulfated glycosaminoglycans in *N. nodosus* by histochemistry with alcian blue, before or after incubation with chondroitinase AC or treatment with nitrous acid, in sections of two organs, the gills and the mantle (Fig. 1A). Two major regions of the gills were highly stained, the basement membrane of the gill epithelium (Fig. 1B, arrows) and the extracellular matrix of the internal part of the gill, which has a fibrillar appearance (Fig. 1B, asterisks). The staining at the basement membrane resisted chondroitinase AC (Fig. 1C, arrow-head) but completely disappeared after treatment with nitrous acid (Fig. 1D, dashed arrows). The extracellular fibrillar material at the interior of the gills was partially degraded with chondroitinase AC, as indicated by the slight reduction in the intensity of the staining (Fig. 1C, stars), but was almost completely degraded by nitrous acid treatment, as indicated by a drastic

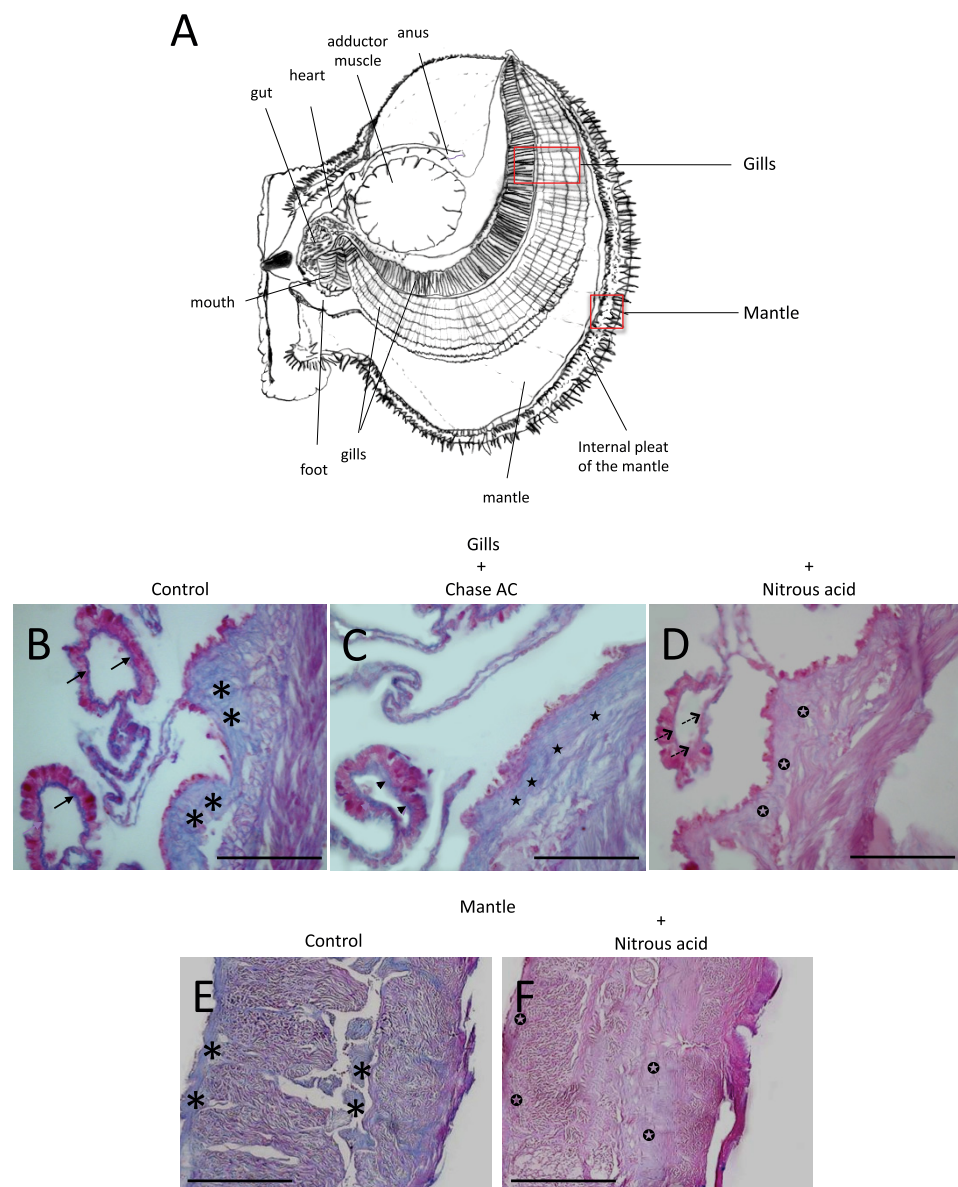


FIGURE 1. Histological analysis of sections from *N. nodosus* stained with alcian blue. A, schematic drawing of *N. nodosus* showing the internal organs. The sections from the gills (A–D) and mantle (E and F) were stained with alcian blue before (B and E) or after incubation with chondroitinase AC (C) or nitrous acid treatment (D and F). The arrows indicate alcian blue staining of the basement membrane. Arrowheads indicate alcian blue staining of the basement membrane after chondroitinase AC treatment. The dashed arrows indicate alcian blue staining of the basement membrane after nitrous acid treatment. The asterisks indicate alcian blue staining at the extracellular matrix. The black stars indicate alcian blue staining at the extracellular matrix after chondroitinase AC treatment. The white stars in black circles indicate alcian blue staining at the extracellular matrix after nitrous acid treatment. Bars, 200 μm .

reduction in the intensity of the staining (Fig. 1D, white stars in black circles). In the mantle, the alcian blue staining was restricted to the extracellular matrix (Fig. 1E, asterisks) and was completely abolished after nitrous acid treatment (Fig. 1F, white stars in black circles). Overall, these results suggest that a heparin-like glycosaminoglycan occurs at the basement membrane of the gills epithelium and dispersedly throughout the extracellular matrix of the gills and mantle, along with chondroitin sulfate (CS).

Isolation and Characterization of *N. nodosus* Glycans—The glycans were extracted separately from the adductor muscle and viscera (gills, digestive tract, heart, and mantle) of *N. nodosus*

with four consecutive digestions with proteolytic enzyme. After cetylpyridinium chloride and ethanol precipitation, the crude glycans were recovered from the supernatant, yielding $\sim 5.13 \text{ mg g}^{-1}$ of dry organs. No significant amount of glycans was detected in the material extracted from the adductor muscle, as indicated by the content of uronic acid (Fig. 2A) and agarose gel electrophoresis (Fig. 2B). Densitometry of the agarose gel revealed the presence of a major ($> 90\%$, based on densitometry units) metachromatic band migrating as standard HS. This band resists incubation with chondroitinases AC/ABC and keratanase but disappears after treatment with nitrous acid, revealing another tenuous metachromatic band with a slightly lower mobility in the agarose gel (Fig. 2C). This band resists incubation with chase AC/ABC, keratanase, and nitrous acid (not shown). A minor band displaying slower mobility in the agarose gel, migrating between standard dermatan sulfate and CS, was also observed. This material resists keratanase and nitrous acid treatment but completely disappears after incubation with chondroitinase AC or ABC (Fig. 2C). These results indicate that a heparinoid is the preponderant glycan present in the *N. nodosus*. CS and an unidentified glycan are also present as minor components.

Fractionation of *N. nodosus* Glycans—The crude glycans from the viscera were easily fractionated by precipitation with different ethanol concentrations, as described under “Experimental Procedures” (Fig. 3A). The material precipitated with

35.6% ethanol contains a mixture of the low mobility unidentified glycan and mollusk HS (P-1). HS ($\sim 59\%$ of the starting material) free of contaminating glycans was precipitated with 70% ethanol (P-2), and a mixture containing HS and CS was precipitated with 95% ethanol (P-3).

The purified mollusk HS (P-2) was analyzed by agarose gel electrophoresis before or after deaminative cleavage with nitrous acid or incubation with heparinase I (Fig. 3B). The deaminative cleavage with nitrous acid gives rise to a degradation product displaying a higher mobility in the gel, when compared with the intact glycan. Heparinase I, on the other hand, was clearly ineffective.

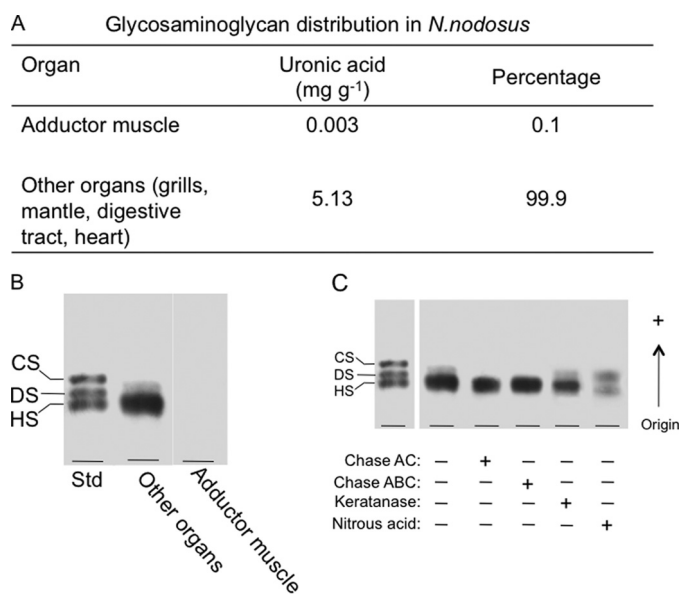


FIGURE 2. Distribution and initial characterization of glycosaminoglycans in *N. nodosus*. *A*, glycosaminoglycans were detected in the organs by the amount (mg g⁻¹) of uronic acid, determined by the carbazole reaction (23). *B*, agarose gel electrophoresis of the glycans isolated from adductor muscle and viscera (pool of different organs: gills, mantle, digestive tract, and heart). *C*, agarose gel electrophoresis of the total glycans from the organs before (-) or after (+) incubation with chondroitinase AC (*Chase AC*), chondroitinase ABC (*Chase ABC*), keratanase, and nitrous acid. *DS*, dermatan sulfate.

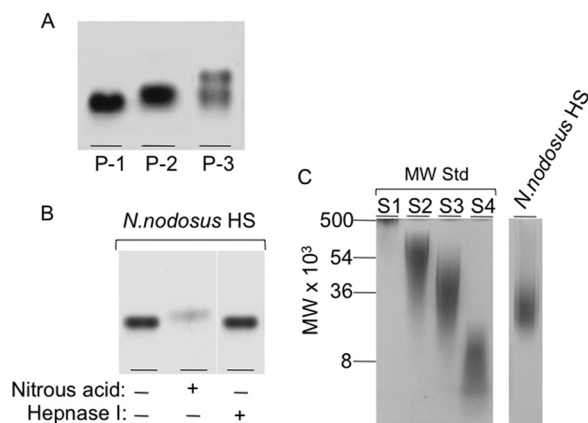


FIGURE 3. Fractionation and electrophoretic analysis of the *N. nodosus* glycans. *A*, Total glycans isolated from the viscera of *N. nodosus* were precipitated with increasing concentrations of ethanol, 35.6% (P-1), 70% (P-2), and 95% (P-3) and analyzed by agarose gel electrophoresis. *B*, the purified HS obtained in the 70% precipitate (P-2) was analyzed by agarose gel electrophoresis before (-) or after (+) deaminative cleavage with nitrous acid or incubation with heparanase I. *C*, the purified mollusk HS was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis along molecular weight standard glycans: dextran 500 (S1) (average molecular weight, 500,000); chondroitin 6-sulfate from shark cartilage (S2) (average molecular weight, 54,000); chondroitin 4-sulfate from whale cartilage (S3) (average molecular weight, 36,000); and dextran 8 (S4) (average molecular weight, 8,000).

Polyacrylamide gel electrophoresis in barbital buffer was used to estimate the molecular weight of the mollusk HS (P-2) (Fig. 3C). Based on comparison with the electrophoretic motilities of molecular mass markers, the *N. nodosus* heparinoid has a molecular mass of ~27,000 Da.

NMR Structural Characterization of the Heparinoid from *N. nodosus*—Attempts to determine the main structural features of the *N. nodosus* heparinoid were successfully accomplished by

a combination of multiple NMR experiments. Through this kind of structural analysis, largely employed for structural characterization of glycosaminoglycans, we observed that the mollusk glycan possesses a novel structure with unique features, such as a high degree of *N*-acetyl- α -D-glucosamine residues, a lack of α -iduronate residues, and the occurrence of 2- and 3-sulfated β -glucosaminyl units. These characteristics are less commonly found among mammalian and mollusk heparinoids (Table 1), described so far.

The one-dimensional ¹H spectrum of the *N. nodosus* heparinoid (Fig. 4) shows, besides a reasonable level of sample homogeneity (only NMR signals of HS), equivalent amounts of anomeric protons of α -glucosamine (A) and β -glucuronic acid (G) residues, respectively. This is the major evidence indicating, unequivocally, that the *N. nodosus* glycan is a HS rather than a heparin-like compound with the preponderance of α -anomeric protons. In addition, we observed considerable amounts of ¹H-anomerics (δ_H 5.56–5.44 ppm; Table 2) attributable to *N*-acetyl- α -D-glucosaminyl units, which comprise ~60% of all α -residues of the mollusk glycan (Fig. 4, *A_{NAC}*). This demonstrates that the mollusk HS contains more *N*-acetylated (*A_{NAC}*) domains than regular heparosans and provides additional evidence supporting that the invertebrate glycan is a HS, because heparins usually possess an average of 10–15% of *A_{NAC}* residues (24). Moreover, the one-dimensional ¹H spectrum reveals considerable amounts of ¹H-anomeric of glucuronic acid residues with sulfate esters located at the less common 2- and 3-positions (G2S at δ_H 4.73–4.8 ppm and G3S at δ_H 4.61–4.72 ppm; Table 2). Based on ¹H-anomeric integral values, the percentages of nonsulfated, 2-sulfated, and 3-sulfated glucuronic acid residues in the mollusk HS backbone are 25.4, 14.2, and 10.4%, respectively (Fig. 4).

The ¹H NMR assignment of the invertebrate HS (Fig. 4 and Table 2) was feasible because of the establishment of ¹H-¹H connectivities for vicinal protons in the COSY spectrum (Fig. 5A) where the most intense auto- and cross-peaks are labeled. These ¹H chemical shifts together with standard ¹H chemical shifts of β -glucuronic acids and α -glucosamines from the heparan sulfates described previously (24) facilitated unequivocal assignment for the majority of the cross-peaks in the ¹H/¹³C HSQC spectrum (Fig. 5B) and subsequently fill out Table 2 with the respective ¹³C chemical shifts of the novel HS from *N. nodosus*. These ¹H/¹³C NMR signals show suitable agreement with the chemical shifts of other heparan sulfates from the literature with these same structural characteristics (24).

Taking into account all of the NMR data (Figs. 4 and 5 and Table 2), as well as the respective relative integral values of the ¹H-anomerics, a chemical structure for the major repeating disaccharide unit of the *N. nodosus* HS can therefore be suggested (Fig. 6). Certainly, a more extensive structural analysis can be carried out to determine whether there are some specific clusters (such as NA, NA/NS, and NS domains, and/or G-, G2S-, or G3S-enriched regions) throughout the chain of the mollusk HS.

Anticoagulant Properties of *N. nodosus* HS—The anticoagulant properties of the *N. nodosus* HS was evaluated by the aPTT assay using human plasma and by measuring the inhibition of thrombin or factor Xa by AT in the presence of increasing concentrations of the mollusk glycan (Fig. 7). Using a parallel

Safe Antithrombotic Mollusk Heparan Sulfate

standard curve based on the aPTT activity of a heparin containing 180 IU mg⁻¹, the anticoagulant activity of the mollusk HS was estimated in ~36 IU mg⁻¹ (Fig. 7A). When antithrombin/heparin cofactor II-free plasma replaced normal plasma in the aPTT assay, a drastic reduction in the anticoagulant activity of

the mollusk HS was observed, indicating a serpin-mediated anticoagulant mechanism (Fig. 7B).

Assays with purified serpins (antithrombin and heparin cofactor II) and proteases (thrombin and Factor Xa) showed that the *N. nodosus* HS inhibits thrombin (Fig. 7C) and factor Xa (Fig. 7D) in the presence of antithrombin, with 12.5- and 6-fold less potency than porcine heparin, respectively (Table 3). Nitrous acid treatment completely abolished thrombin inhibition by porcine heparin in the presence of antithrombin but only partially abolished thrombin inhibition by the mollusk HS (Fig. 7C). Nitrous acid treatment completely abolishes the inhibitory activity of antithrombin by porcine heparin and *N. nodosus* HS (Fig. 7D), when thrombin is replaced by Factor Xa.

The mollusk HS also inhibits thrombin in the presence of heparin cofactor II, with a concentration >1000-fold higher than that of porcine heparin required to achieve the same inhibitory activity. Nitrous acid completely abolishes the HCII activity of the mollusk HS (Fig. 7E and Table 3).

Antithrombotic Activity of *N. nodosus* HS—The effects of mammalian heparin and *N. nodosus* HS on arterial thrombosis *in vivo* were investigated in the carotid artery after a photochemical lesion, as described under “Experimental Procedures.” Mammalian heparin or *N. nodosus* HS was injected intravenously into the vena cava 15 min before the injection of rose bengal, and the occlusion time was determined by a flow meter. The interval between endothelial injury and total thrombotic occlusion of the carotid

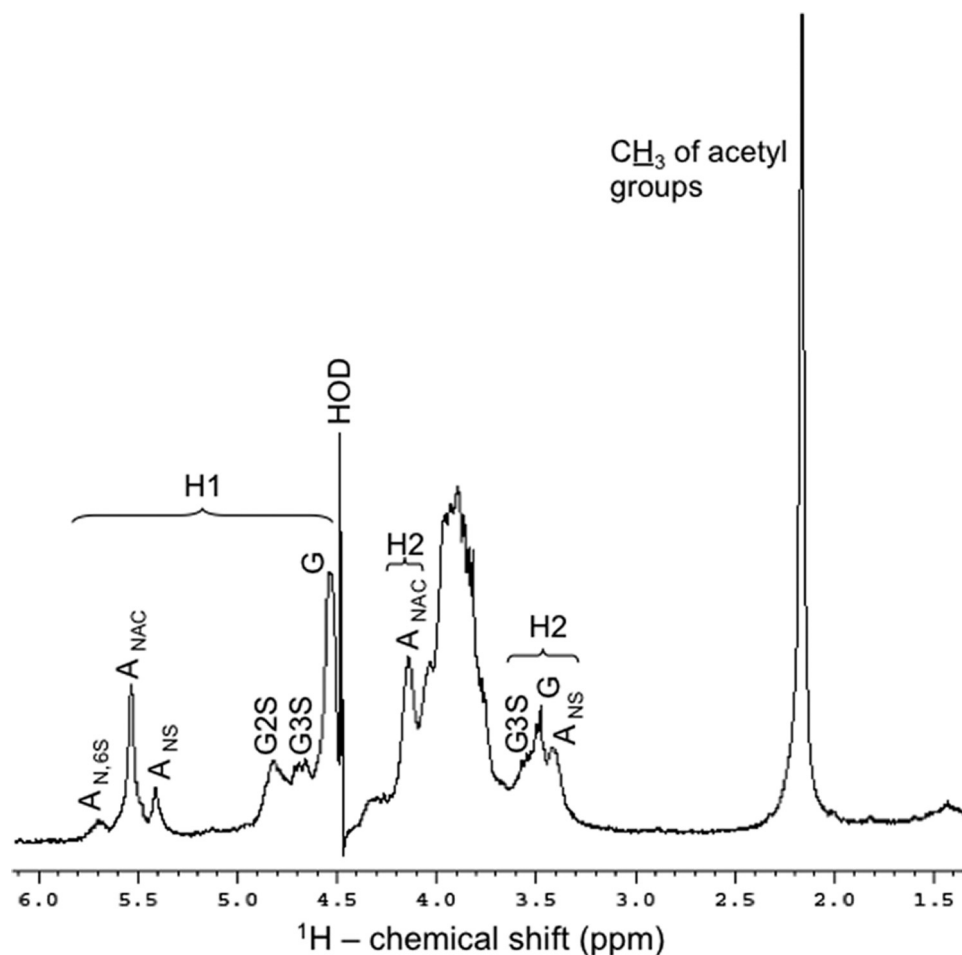


FIGURE 4. ¹H NMR spectrum of the *N. nodosus* HS. Approximately 5 mg of the purified sample were dissolved in 0.5 ml of D₂O, and the one-dimensional NMR spectrum was recorded at 50 °C. The residual water signal was suppressed by presaturation. Chemical shifts are relative to external trimethylsilylpropionic acid at 0 ppm. The H1 signals correspond to the both α- and β-anomeric protons at δ_H 5.8–5.3 and δ_H 4.9–4.5 ppm, respectively. The H2 signals denote protons at the 2-position in the sugar rings. A_{N,6S}, N,6-di-sulfated-D-glucosaminyl; A_{NAC}, N-acetyl-D-glucosaminyl; A_{NS}, N-sulfated-D-glucosaminyl; G_{2S}, 2-sulfated-glucuronate; G_{3S}, 3-sulfated glucuronate; G, glucuronate. The percentages (relative integral values of all α-glucosamine residues) of the A_{N,6S}, A_{NAC}, and A_{NS} signals are 16:61:23, respectively. The percentages (also based on relative integral values of ¹H-anomeric) of the different types of glucuronates are 50.7:28.42:20.81, respectively for G, G_{2S}, and G_{3S}.

TABLE 2

¹H and ¹³C chemical shifts of glucuronic acid and glucosamine units from *N. nodosus* HS

Chemical shifts are relative to external trimethylsilylpropionic acid to 0 ppm for ¹H, and methanol for ¹³C at 50 °C. G, glucuronic acid; A, glucosamine; NA, not assigned.

Nucleus	G	G _{2S}	G _{3S}	A _{NAC}	A _{NS}
H1	4.61-4.45	4.8-4.73	4.72-4.61	5.56-5.44	5.43-5.35
C1	105.1-102.0	105.0-100.9	103.2-101.0	98.2-95.3	98.1-95.9
H2	3.57-3.38	4.15-4.02	3.8-3.67	4.14-3.95	3.42-3.3
C2	74-8-70.2	75.3-72.0	73.0-70.5	54.8-51.5	59.0-56.2
H3	3.99-3.72	NA	4.73-4.58	3.87-3.78	3.99-3.89
C3	77.3-72.9	NA	85-80.4	69.8-67.0	69.0-67.2
H4	3.99-3.72	3.99-3.72	NA	NA	3.9-3.86
C4	77.3-72.9	77.3-72.9	NA	NA	82.8-81
H5	3.99-3.72	3.99-3.72	NA	4.0-3.88	69.9-61.2
C5	77.3-72.9	77.3-72.9	NA	71.8-66.9	4.19-4.03
6S-H6				4.31-4.22	4.57-4.45
6S-C6				66.9-64.5	65.9-65.1
6OH-H6				4.02-3.68	
6OH-C6				62.1-58.9	

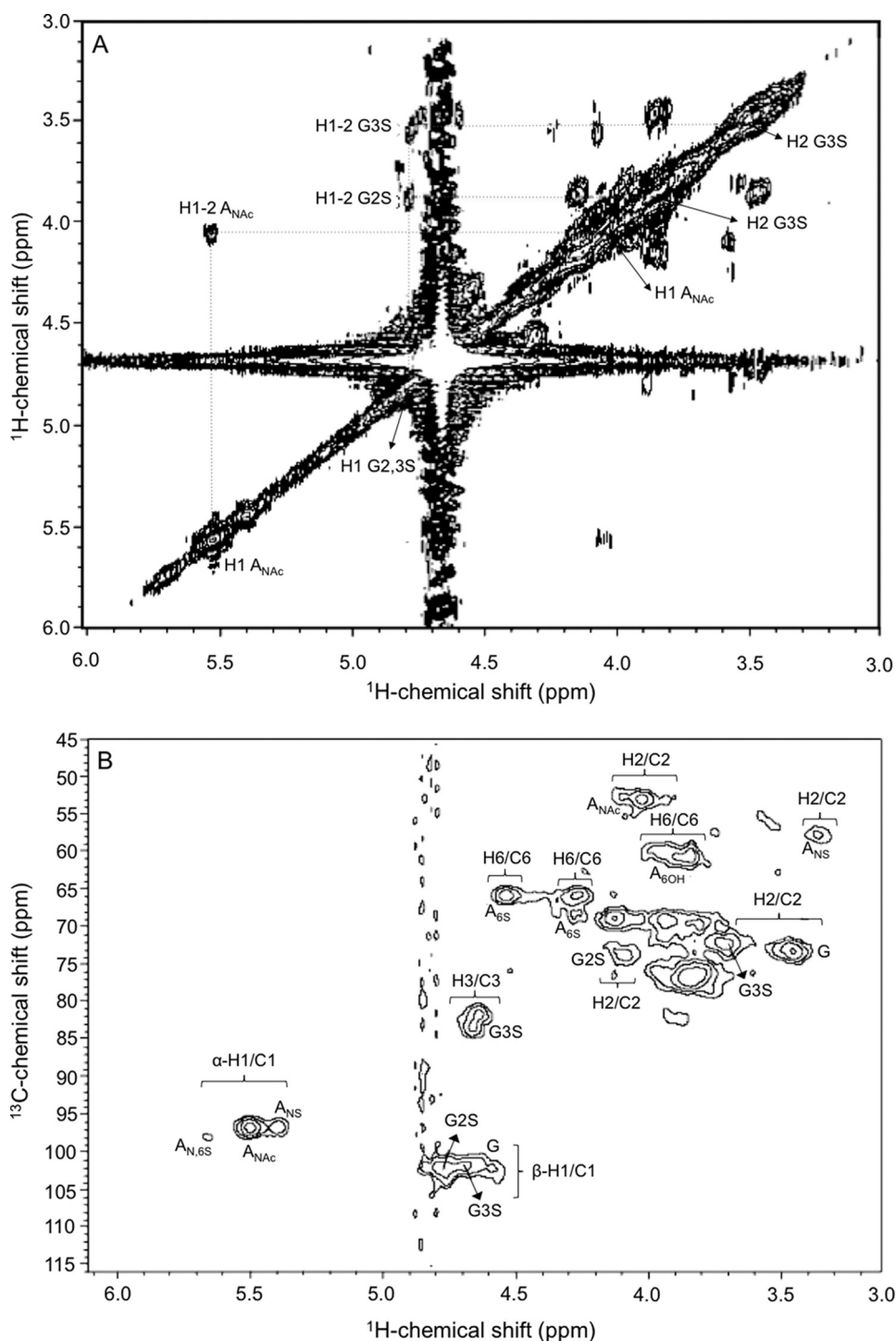


FIGURE 5. $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY (A) and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC (B) NMR spectra of the *N. nodosus* HS. Approximately 5 mg of the purified sample were dissolved in 0.5 ml of D_2O , and the two-dimensional NMR spectra were recorded at 50°C . The residual water signal was suppressed by presaturation. Chemical shifts are relative to external trimethylsilylpropionic acid at 0 ppm for ^1H and relative to methanol for 0 ppm of ^{13}C . The H1 signals correspond to the both α - and β -anomeric protons at δ_{H} 5.8–5.3 and δ_{H} 4.9–4.5 ppm, respectively. The numbers at the right side of H (A) or H/C (B) indicate the positions of the nuclei in the sugar rings. $A_{N,6S}$, N,6-di-sulfated-D-glucosaminyl; $A_{N,Ac}$, N-acetyl-D-glucosaminyl; $A_{N,S}$, N-sulfated-D-glucosaminyl; G2S, 2-sulfated-glucuronate; G3S, 3-sulfated glucuronate; G, glucuronate.

artery in animals not treated with any of the glycans was ~ 22 min. Administration of the mollusk HS increased the occlusion time in a dose-dependent manner, up to ~ 5 times the base-line value at a dose of 1.0 mg kg^{-1} (Fig. 8A). Doses lower than 0.5 mg kg^{-1} did not change the occlusion time. Mammalian heparin at

a dose of 0.1 mg kg^{-1} prolonged the occlusion time to the same value obtained with 1.0 mg kg^{-1} of the mollusk HS.

Hemorrhagic Effect of *N. nodosus* HS—The hemorrhagic effect of mammalian heparin or *N. nodosus* HS was assessed based on blood loss from a cut rat tail after intravascular administration. At the dose of 1 mg kg^{-1} , which induced the maximum antithrombotic effect, mollusk HS increased blood loss only 1.7-fold (Fig. 8B). The same dose of mammalian heparin resulted in a blood loss ~ 5 -fold higher. No bleeding was observed at the dose of 0.1 mg kg^{-1} of mammalian heparin. Administration of mollusk HS at doses up to four times that required for higher antithrombotic effect produced a maximum blood loss of 2.7 times the base-line value.

Factor XIa-mediated Kallikrein Activity—To examine the ability of *N. nodosus* HS to activate the amidolytic activity of kallikrein in human plasma, different concentrations of the mollusk HS or a chemically oversulfated CS (as positive control) were incubated in human plasma, and kallikrein activity was determined as described above. As shown in Fig. 9A, potent activation of kallikrein occurred with oversulfated chondroitin sulfate at 0.6 – $0.8 \mu\text{g ml}^{-1}$ but not with *N. nodosus* HS. Activation of kallikrein by the mollusk glycan was observed only at 11.5 – $12 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Citotoxic Effect—To examine the effect of HS extracted from the *N. nodosus* on BHK 21 cell viability, the cells were incubated with various concentration of mollusk HS for 48 h. As shown in Fig. 9B, glycan treatment began to significantly decreased BHK 21 cell viability at $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. At $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$, cell viability was reduced in $\sim 35\%$. However, no significant change in cell viability was observed at the concentration, which causes the higher antithrombotic effect ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$).

DISCUSSION

Unfractionate heparin is the main anticoagulant drug used for cardiovascular surgery and for the prevention of arterial or

Safe Antithrombotic Mollusk Heparan Sulfate

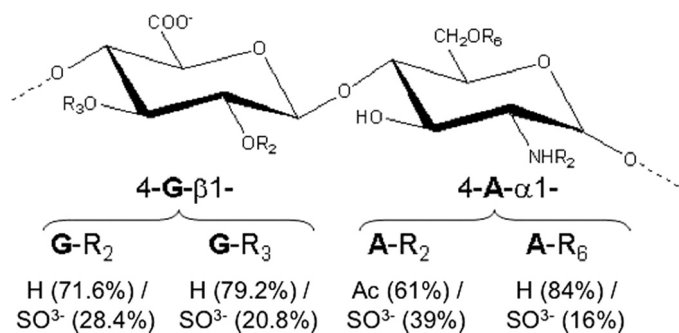


FIGURE 6. Suggested structure of the major disaccharide unit of the *N. nodosus* HS. The percentages of the radicals are based in integral values of the NMR signals (Fig. 3 and 4). The residues denoted with G and A are glucuronate and D-glucosamine, respectively. *R_i* represents the radicals, where their respective chemical groups are down listed, and where the respective subscript numbers correspond to the positions in the sugar ring.

venous thrombosis (2). The worldwide consumption of heparin has been augmented to 100 tons/year, partially because of an increasing use of low molecular weight heparin (25). However, the source of pharmaceutical heparins is very limited, because it is primarily obtained from porcine intestine (7). It was estimated that in 2008 ~20 million people suffered from thromboembolic diseases, and 200 million pigs were needed to meet this demand (25). Therefore, there is an urgent necessity to find alternative sources of heparin.

Heparin-like polymers with significant anticoagulant activity have been extensively described in mollusks (Table 1). Fourteen species from eight families of bivalve mollusks contain heparins with different disaccharide compositions, molecular weights, and anticoagulant activities ranging from <5 to 365 IU mg⁻¹. Among them, mollusk species from the Pectinidae family have been successfully cultivated in different parts of the world because of the high value of its meat. In 2007, ~3 tons of the pectinidae *N. nodosus* was produced by laboratory culture of larvae and post-larvae in Brazil. Thus, this species provides an interesting subject for a prospective study of the antithrombotic properties of the mollusk glycans.

In the present work, a HS was identified in the viscera of *N. nodosus*. Histochemistry using alcian blue showed that the mollusk HS was localized at the extracellular matrix of the gills and mantle. In the gills it was also present at the epithelial basement membrane. CS was also detected in these organs, but its occurrence is restricted to the extracellular matrix. Perlecan, Agrin, and Bamacan are vertebrate extracellularly secreted proteoglycans found in basement membranes. Among them, Agrin is the only exclusively glycanated with HS chains. Perlecan proteoglycan with the addition of HS also contains CS chains, whereas Bamacan is a CS proteoglycan (28). Therefore, considering that CS was not detected in the basement membrane and by analogy with vertebrates, *N. nodosus* HS would most likely be linked to an Agrin- or Perlecan-like proteoglycan. However, presently this is only a hypothesis, which will be investigated in future work.

A very simple procedure using sequential ethanol precipitation was employed to successfully purify the mollusk HS in a high yield. One gram of the mollusk viscera (without the adductor muscle) yielded 5.13 mg of crude glycans from which ~3.03 mg is the heparinoid. This recovery (0.9%) is higher than that

obtained in the isolation of heparin from the ascidian *Styela plicata* (0.26%) (26) and much higher than that from pig intestinal mucosa (~0.022%) (27). CS and an unidentified sulfated glycan are minor components that can be easily removed from the major HS component by a straightforward precipitation method with ethanol. HS is obtained in the 70% ethanol fraction free of contaminating glycans. The adductor muscle, which is the part of the mollusk that is most appreciated for consumption, is free of glycans. The HS is restricted to organs commonly discarded during preparation for commercialization, which increases the potential value of the mollusk.

The average molecular mass of the mollusk HS, estimated by polyacrylamide gel, is ~27,000 kDa, which is higher than that of mammalian heparin. Considering the average molecular weight of heparin/HS disaccharides to be 486, the average length of the mollusk HS is ~55 disaccharides long.

The mollusk HS contains characteristics found both in HS and heparin. Thus, the polymer resisted the action of heparinase I, which cleaves the glycosidic bond between hexosamine and 2-O-sulfated iduronic acid, commonly found in heparin; the NMR analysis, provided a clear ¹H spectrum characteristic of HS, suggesting that ~60% of the mollusk HS contains non-sulfated, N-acetylated disaccharides. However, the glycan was partially degraded by nitrous acid at low pH (Fig. 3B), which cleaves glycosidic bond of N-sulfated glucosamine. The NMR analysis showed that sulfation occurs in smaller percentage of the disaccharide units, either in the glucuronic acid or in the glucosamine; ~39% of the glucosamine residues are N-sulfated and are therefore susceptible to deaminative cleavage with nitrous acid. This indicates the occurrence of heparin-like region in the mollusk HS, which might account for the anticoagulant activity of the polymer, observed in experiments using plasma and purified coagulation proteases and inhibitors.

The mollusk HS shows mostly mono-sulfated GluA (G2S or G3S) and insignificant amounts of 2,3-di-O-sulfated GluA. Even though 2- and 3-sulfated GluA residues are rare in nature, the combination of COSY and ¹³C HSQC spectra support their presence in the mollusk glycan. The first supporting evidence is the presence of very well resolved H2/C2 and H3/C3 cross-peaks in the heteronuclear spectrum (Fig. 5B). These peaks have proton and carbon chemical shifts of δ_H/δ_C 4.15–4.02/75.3–72.0 and 4.73–4.58/85–80.4, respectively. These HSQC peaks are quite distinct, well separated, and cannot be misassigned as other resonances from HS units. These particular peaks are also not easily found in the spectrum of regular HS described so far (10), meaning they are from a particular structure. The second point consists of the assigned peaks in the COSY spectrum. Even though it contains an intense water peak, this homonuclear spectrum shows the right ¹H-¹H connectivities between the anomeric protons of G2S and G3S with their respective ¹H2s, where ¹H2 of G3S units are more downfield-shifted (0.55 ppm) than ¹H2 of G2S units, as assigned in the HSQC (Fig. 5A). Therefore, these two resonances are consistent with those from 2- and 3-sulfated GluA.

The anticoagulant activity of the *N. nodosus* HS is mainly mediated by antithrombin and heparin cofactor II, because the absence of these inhibitors drastically reduces anticoag-

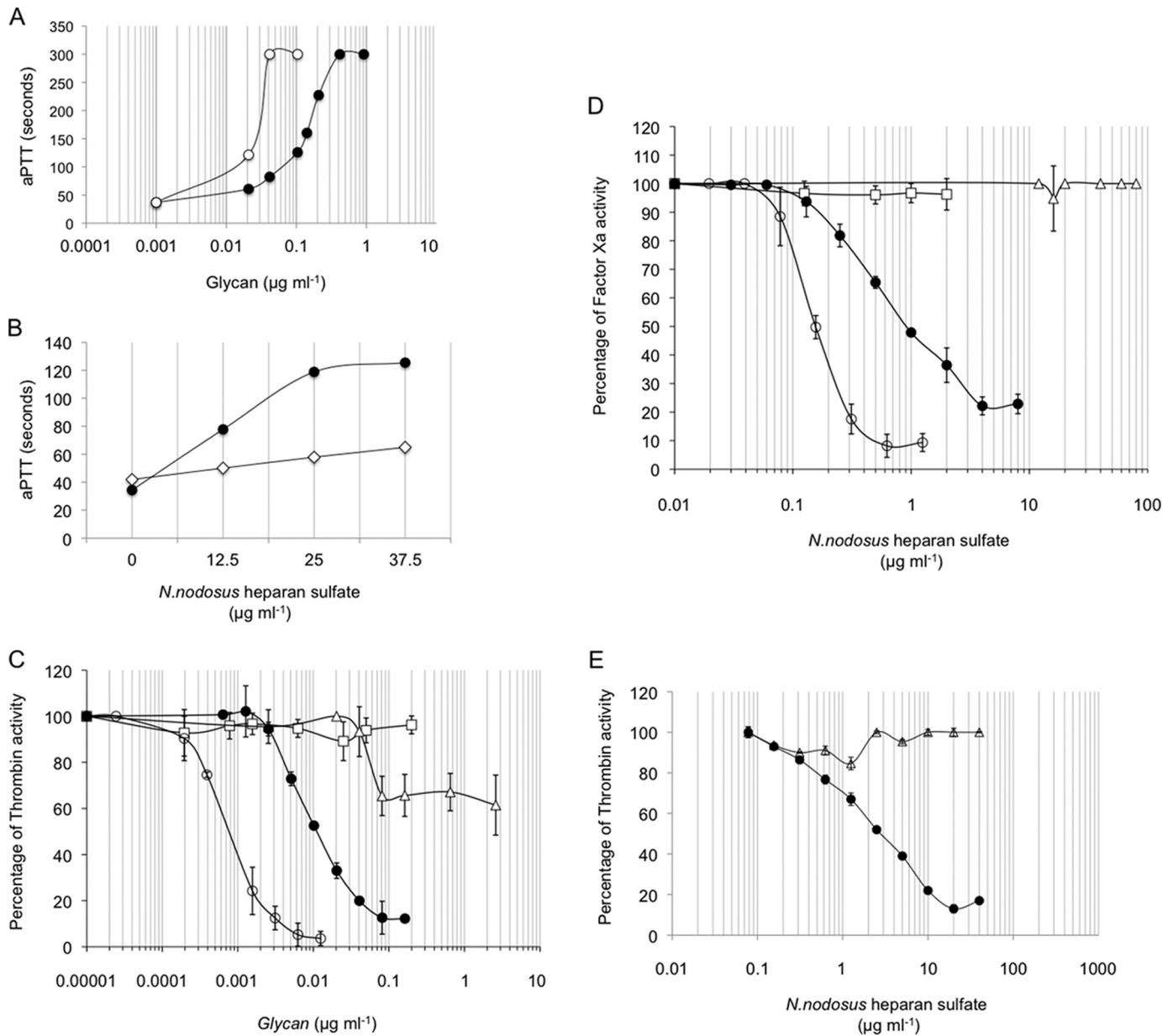


FIGURE 7. Anticoagulant properties of *N. nodosus* HS. Measurement of the aPTT was carried according to the manufacturer's specifications (Biolab-Merieux AS, Rio de Janeiro, Brazil). Normal human (A) was incubated with mammalian heparin (○) or purified *N. nodosus* HS (●) (0.001–100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) at 37 °C for 1 min. Then 100 μl of APTT reagent (Celite; Biolab) were added and incubated at 37 °C. After 2 min of incubation, 100 μl of 0.25 M CaCl_2 were added to the mixtures, and the clotting time was recorded in a coagulometer (Amelung KC4A). B, normal (●) or antithrombin/heparin cofactor II-free plasma (◇) was incubated with purified *N. nodosus* HS (0–37.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$), and the clotting time recorded in a coagulometer (Amelung KC4A), as described above. C–E, inhibition of thrombin (C) or factor Xa (D) activity by AT or HCII (E) in the presence of intact (○) or nitrous acid-treated (□) mammalian or intact (●) or nitrous acid-treated (△) *N. nodosus* HS. AT (50 nM) or HCII (68 nM) was incubated with thrombin (15 nM) or factor Xa (20 nM) in the presence of various concentrations of glycans. After 60 s, the remaining thrombin or factor Xa activity was determined with a chromogenic substrate ($\Delta A_{405}/\text{min}$). The results are expressed as percentages of thrombin activity.

ulant activity (Fig. 6B). However, some activity remains even in the absence of the two inhibitors (Table 3), suggesting that a minor additional serpin-independent anticoagulant mechanism might be present.

The mollusk HS efficiently inhibited thrombus formation in a model of arterial thrombosis, which involves endothelial damage by a photochemical reaction. In this model, thrombosis is initiated by platelet adherence to the subendothelial space, and both activation of platelets and coagulation contribute to thrombus formation (1). Therefore, the model mimics the pathophysiology of most heart attacks and many strokes that

are triggered by thrombosis secondary to disrupted atherosclerotic plaques. Doses of mammalian heparin as low as 0.1 mg kg^{-1} drastically inhibit arterial thrombus formation in this model. Mollusk HS requires a dose 10-fold higher to produce the same effect. However, a significant antithrombotic effect is observed with only 0.5 mg kg^{-1} of the HS. At this dose no bleeding effect was observed, and at the full antithrombotic dose (1 mg kg^{-1}), the bleeding increased only slightly.

The HS described in the present study contains small but significant amounts of sulfated groups that do not exist in mammalian glycosaminoglycans. This fact raises concerns

Safe Antithrombotic Mollusk Heparan Sulfate

TABLE 3

Anticoagulant activity of mammalian and mollusk heparinoids

ND, not determined.

Heparin/heparan sulfate	Anticoagulant activity by aPTT		Antithrombin activity		IC ₅₀ protease inhibition		
	Plasma		Anti-IIa	Anti-Xa	Antithrombin		HCII (IIa)
	Normal	Serpin-free			IIa	Xa	
	<i>IU mg⁻¹</i>		<i>IU mg⁻¹</i>		<i>μg ml⁻¹</i>		
Mammalian							
Porcine intestinal mucosa heparin ^a	180	ND	180	180	0.001 ^d	0.18 ^d	0.001 ^e
Bovine lung heparin^b	139	ND	136	135	ND	ND	ND
Bovine pancreas heparan sulfate ^c	1	ND	ND	4	ND	ND	ND
Mollusk							
<i>N. nodosus</i>	38.3	7.6	16	36	0.012	0.9	4

^a Sigma-Aldrich, lot 032K1498. The values are from this work.

^b 2nd International Standard. The values are from Ref. 8.

^c The values are from Ref. 10.

^d The values are from this work (Fig. 7).

^e The values are from Ref. 12.

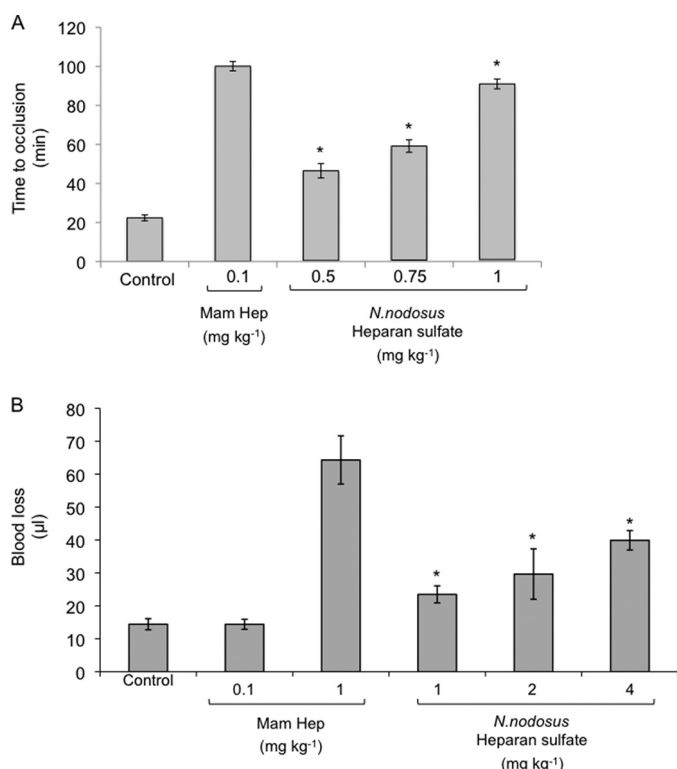


FIGURE 8. In vivo antithrombotic and bleeding effect of *N. nodosus* HS. *A*, antithrombotic effect. Mammalian or *N. nodosus* HS was administered intravenously at the doses indicated. Then 15 min later, vascular injury was initiated by injection of rose bengal, and the time to thrombotic occlusion was determined. The error bars represent the means \pm S.D. Five animals were used per dose. *, $p \leq 0.002$ versus control (no glycan). *B*, bleeding effect. Mammalian or *N. nodosus* HS were infused into rats at the doses indicated and allowed to circulate for 5 min. The rat tail was cut 3 mm from the tip and immersed in 40 ml of distilled water at room temperature. Blood loss was determined 60 min later by measuring the hemoglobin in the water. The error bars represent the means \pm S.D. Five animals were used per dose. *, $p \leq 0.002$ versus control (no glycan).

about the toxic effect of the mollusk glycan, especially in view of recent facts involving the contamination of heparin preparations with oversulfated chondroitin sulfate (37). It has been shown that the acute toxic effects of contaminated heparin were the result of factor XII-dependent kallikrein production and complement pathway activation by the oversulfated chondroitin sulfate (37). As shown in Fig. 9A, *N. nodosus* HS started

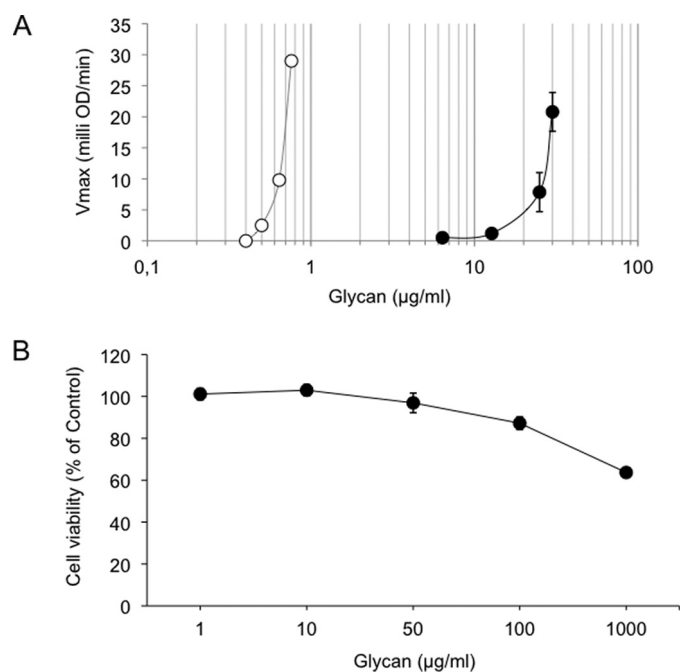


FIGURE 9. Effect of glycans on factor XII activation and cell viability. *A*, factor XII activation. Normal human plasma was incubated with increasing concentrations of oversulfated chondroitin (○) or purified *N. nodosus* HS (●). After 60 s of incubation at 37 °C, 0.3 mM of chromogenic substrate for plasma kallikrein was added. The increase in absorbance at 405 nm was expressed by milli optical density min⁻¹ (means \pm S.E., $n = 3$). *B*, cell viability. The cells were treated with the indicated concentration of purified *N. nodosus* HS for 24 h. The percentage of viable cells was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. The data representative of three independent experiments are expressed as the means \pm S.E.

to activate factor XII-mediated kallikrein production in the concentration range of 20–30 $\mu\text{g ml}^{-1}$, which is 20–30-fold higher than the equivalent dose required for complete inhibition of arterial thrombosis *in vivo* (1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Fig. 8A). In addition, the toxic effects of the mollusk HS in cells is only observed at 100–1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

The critical question related to therapeutics from natural sources, in addition to toxic matters, is the technical and economic possibility of obtaining very large quantities of the compounds in a constant and ecologically correct manner. Overall, the mollusk HS is isolated at reasonable yields, by procedures

similar to those already employed in the preparation of pharmaceutical heparin. Several species of mollusks, including those containing high quantities of heparin analogs, have been successfully cultivated in different parts of the world. The culture employs developed aquaculture technologies capable to produce ton quantities of starting material (38–41). For example, in 1999, ~73,000 tons of scallops (41) were produced. Therefore, the critical conditions required to use marine invertebrates as a source of natural therapeutic compounds have already been established. What is necessary now is a cooperative effort from scientists of related areas to specifically adapt current methodologies.

Overall, the present work contributes to increasing the knowledge of potential sources of new heparin analogs. The study of the effects of new glycosaminoglycans on thrombosis models that mimic different pathophysiological conditions may contribute to the discovery of new antithrombotic agents that are safe and effective in specific thrombotic conditions.

Acknowledgment—We thank Carlos Alberto Marques de Carvalho for helping with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay.

REFERENCES

- Hirsh, J., Anand, S. S., Halperin, J. L., and Fuster, V. (2001) *Circulation* **103**, 2994–3018
- Mackman, N. (2008) *Nature* **451**, 914–918
- Lindahl, U., Bäckström, G., Thunberg, L., and Leder, I. G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 6551–6555
- Casu, B., Oreste, P., Torri, G., Zoppetti, G., Choay, J., Lormeau, J. C., Petitou, M., and Sinäy, P. (1981) *Biochem. J.* **197**, 599–609
- Choay, J., Lormeau, J. C., Petitou, M., Sinäy, P., and Fareed, J. (1981) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **370**, 644–649
- Jordan, R. E., Oosta, G. M., Gardner, W. T., and Rosenberg, R. D. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 10073–10080
- Liu, H., Zhang, Z., and Linhardt, R. J. (2009) *Nat. Prod. Rep.* **26**, 313–321
- Mulloy, B., Gray, E., and Barrowcliffe, T. W. (2000) *Thromb. Haemost.* **84**, 1052–1056
- Dietrich, C. P., Paiva, J. F., Castro, R. A., Chavante, S. F., Jeske, W., Fareed, J., Gorin, P. A., Mendes, A., and Nader, H. B. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* **1428**, 273–283
- Chavante, S. F., Santos, E. A., Oliveira, F. W., Guerrini, M., Torri, G., Casu, B., Dietrich, C. P., and Nader, H. B. (2000) *Int. J. Biol. Macromol.* **27**, 49–57
- Demir, M., Iqbal, O., Dietrich, C. P., Hoppensteadt, D. A., Ahmad, S., Daud, A. N., and Fareed, J. (2001) *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **7**, 44–52
- Cavalcante, M. C., Allodi, S., Valente, A. P., Straus, A. H., Takahashi, H. K., Mourão, P. A., and Pavão, M. S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 36189–36196
- Dietrich, C. P., de Paiva, J. F., Moraes, C. T., Takahashi, H. K., Porcionatto, M. A., and Nader, H. B. (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* **843**, 1–7
- Pejler, G., Danielsson, A., Björk, I., Lindahl, U., Nader, H. B., and Dietrich, C. P. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 11413–11421
- Arumugam, M., and Shanmugam, A. (2004) *Indian J. Exp. Biol.* **42**, 529–532
- Hovingh, P., and Linker, A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 9840–9844
- Maeda-Martinez, A. N., Abarca, A., Avendaño, M., Barracco, M. A., Blanco, I., Cáceres-Martinez, I., Cantillanez, M., Freitas, L., Ibarra, A. M., Lodeiros, C., Merino, G., Mendo, J., Navarte, M., Vargas-Albores, E., Pena, J., Roman, C., Stolz, W., Uriarte, J., and von Brand, E. (2001) in *Los Moluscos Pectinidos de Iberoamerica: Ciencia y Acuicultura* (Maeda-Martinez, A. N., ed) 1st Ed., pp. 469–476, Editorial Limusa, Mexico City, Mexico
- Cardoso, L. E., and Mourão, P. A. (1994) *Arterioscler. Thromb.* **14**, 115–124
- Pavão, M. S., Aiello, K. R., Werneck, C. C., Silva, L. C., Valente, A. P., Mulloy, B., Colwell, N. S., Tollefsen, D. M., and Mourão, P. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27848–27857
- Pomin, V. H., Valente, A. P., Pereira, M. S., and Mourão, P. A. (2005) *Glycobiology* **15**, 1376–1385
- Vicente, C. P., He, L., Pavão, M. S., and Tollefsen, D. M. (2004) *Blood* **104**, 3965–3970
- Herbert, J. M., Héroult, J. P., Bernat, A., van Amsterdam, R. G., Vogel, G. M., Lormeau, J. C., Petitou, M., and Meuleman, D. G. (1996) *Circ. Res.* **79**, 590–600
- Bitter, T., and Muir, H. M. (1962) *Anal. Biochem.* **4**, 330–334
- Guerrini, M., Naggi, A., Guglieri, S., Santarsiero, R., and Torri, G. (2005) *Anal. Biochem.* **337**, 35–47
- Melo, E. I., Pereira, M. S., Cunha, R. S., Sá, M. P., and Mourão, P. A. (2008) *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* **23**, 169–174
- Santos, J. C., Mesquita, J. M., Belmiro, C. L., da Silveira, C. B., Viskov, C., Mourier, P. A., and Pavão, M. S. (2007) *Thromb. Res.* **121**, 213–223
- Linhardt, R. J., Ampofo, S. A., Fareed, J., Hoppensteadt, D., Mulliken, J. B., and Folkman, J. (1992) *Biochemistry* **31**, 12441–12445
- Iozzo, R. V. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 609–652
- Burson, S. L., Jr., Fahnenbach, M. J., Frommshagen, L. H., Riccardi, B. A., Brown, R. A., Brockman, J. A., Lewry, H. V., and Stokstad, E. L. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5874–5878
- Dietrich, C. P., Nader, H. B., de Paiva, J. F., Santos, E. A., Holme, K. R., and Perlin, A. S. (1989) *Int. J. Biol. Macromol.* **11**, 361–366
- Nader, H. B., Ferreira, T. M., Paiva, J. F., Medeiros, M. G., Jerônimo, S. M., Paiva, V. M., and Dietrich, C. P. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 1431–1435
- Luppi, E., Cesaretti, M., and Volpi, N. (2005) *Biomacromolecules* **6**, 1672–1678
- Vijayabaskar, P., Balasubramanian, T., and Somasundaram, S. T. (2008) *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **30**, 175–180
- Jordan, R. E., and Marcum, J. A. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **248**, 690–695
- Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F., and Volpi, N. (2004) *Glycobiology* **14**, 1275–1284
- Saravanan, R., and Shanmugam, A. (2010) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 791–799
- Kishimoto, T. K., Viswanathan, K., Ganguly, T., Elankumaran, S., Smith, S., Pelzer, K., Lansing, J. C., Sriranganathan, N., Zhao, G., Galcheva-Gargova, Z., Al-Hakim, A., Bailey, G. S., Fraser, B., Roy, S., Rogers-Cotrone, T., Buhse, L., Whary, M., Fox, J., Nasr, M., Dal Pan, G. J., Shriver, Z., Langer, R. S., Venkataraman, G., Austen, K. F., Woodcock, J., and Sasisekharan, R. (2008) *N. Engl. J. Med.* **358**, 2457–2467
- Chantal, C. (2004) in *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management* (Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J. F., and Mercier, A., eds) pp. 439, FAO, Rome, Italy
- Helm, M. M., and Bourne, N. (2004) in *The Hatchery Culture of Bivalves: A Practical Manual* (Lovatelli, A., ed) pp. 201, FAO, Rome, Italy
- Bourne, N. F. (2000) *Aquaculture Int.* **8**, 113–122
- Lem, A. (2005) in *FAO Fisheries and Aquaculture Department*, FAO, Rome, Italy

CURRICULUM VITAE

Nome: Angélica Maciel Gomes

Nascimento: 07/03/1985

Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica

- Ciências Biológicas (Licenciatura) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, março de 2004 a fevereiro de 2008.

- Mestrado em Química Biológica – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientações de Estudante

- Juliana Fabricia Borges – Iniciação Científica, desde de agosto de 2009.

Comunicações em Congressos

8 em congressos nacionais

3 em congressos internacionais

Publicações

GOMES, A. M. ; Kozlowski, E. O. ; Pomin, V. H. ; de Barros, C. M. ; Zaganeli, J. L. ; PAVAO, M. S. G. . Unique Extracellular Matrix Heparan Sulfate from the Bivalve *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) Safely Inhibits Arterial Thrombosis after Photochemically Induced Endothelial Lesion. *The Journal of Biological Chemistry*. 285, p. 7312-7323, 2010.

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](#)