

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

João Victor Gerheim da Silva

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA E
O EFEITO NA SÍNTESE DE HEPARAN SULFATO ENDOTELIAL DE
DERMATAN SULFATO DE DIFERENTES ORIGENS.**

Juiz de Fora - MG

2021

JOÃO VICTOR GERHEIM DA SILVA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA E
O EFEITO NA SÍNTESE DE HEPARAN SULFATO ENDOTELIAL DE
DERMATAN SULFATO DE DIFERENTES ORIGENS.**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Genética e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Co-orientador: Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar

Juiz de Fora - MG

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gerheim da Silva, João Victor.
EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE
ANTITROMBÓTICA E O EFEITO NA SÍNTESE DE HEPARAN
SULFATO ENDOTELIAL DE DERMATAN SULFATO DE
DIFERENTES ORIGENS. / João Victor Gerheim da Silva. -- 2022.
122 f.

Orientador: Carlos Magno da Costa Maranduba
Coorientador: Jair Adriano Kopke de Aguiar
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz
de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética,
2022.

1. Coagulação. 2. Anticoagulantes. 3. Glicosaminoglicanos. 4.
Polissacarídeos. 5. Glicobiologia. I. da Costa Maranduba, Carlos
Magno, orient. II. Kopke de Aguiar, Jair Adriano, coorient. III. Título.

João Victor Gerheim da Silva

"EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA E O EFEITO NA SÍNTESE DE HEPARAN SULFATO ENDOTELIAL DE DERMATAN SULFATO DE DIFERENTES ORIGENS"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia, Genética e Biotecnologia.

Aprovada em 20 de janeiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar

Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno da Costa Maranduba, Professor(a)**, em 20/01/2022, às 17:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jair Adriano Kopke de Aguiar, Professor(a)**, em 21/01/2022, às 13:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Lanzi Sassaki, Usuário Externo**, em 26/01/2022, às 06:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo de Oliveira Santos, Professor(a)**, em 26/01/2022, às 13:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0628862** e o código CRC **9ECA0A06**.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Valéria e ao meu avô, que com amor e dedicação, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Aos meus professores e orientadores Carlos Magno da Costa Maranduba e Jair Adriano Kopke de Aguiar, pela oportunidade de fazer parte do programa e por abrirem as portas dos laboratórios para mim laboratório, e não medirem esforços para a conclusão deste trabalho.

As professoras Vera Maria Peters e Marta do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), a professora Yara Michelacci da FAPESP e toda as suas equipes que deram todo apoio e permitiram que parte dos meus experimentos fossem desenvolvidos nos seus laboratórios.

A todos os membros e pessoas próximas do Laboratório de Análise de Glicoconjugados pelo trabalho em conjunto e pelos bons momentos compartilhados.

Agradeço também as agências de fomento à pesquisa, assim como, todos que de alguma forma apoiam e incentivam a ciência no Brasil.

RESUMO

Dermatam sulfato (DS) é um polissacarídeo, linear e estruturalmente complexo pertencente à classe dos glicosaminoglicanos (GAG), encontrado em uma ampla variedade de tecidos, estando em muitas espécies ligadas a uma proteína central como proteoglicanos (PG). Os DS-PGs têm sido implicados em vários processos celulares e interações das células com a matriz extracelular. As cadeias DS também podem influenciar o processo de coagulação, ligando-se às proteínas séricas e inibindo a trombina, pela interação com o cofator II da heparina (HCII). Este estudo teve como objetivo extrair GAGs de diferentes tecidos e investigar os efeitos do DS na hemostasia. Os GAGs foram extraídos por proteólise, precipitados, dessalinizados, liofilizados, submetidos à caracterização preliminar através de eletroforese em gel de agarose e dosagens químicas (hexosamina, ácido urônico). GAGs de pele suína (PS) e córnea bovina (BC) foram, ainda, purificados por cromatografia de troca aniônica e caracterizados por eletroforese em gel de agarose, massa molecular, quimicamente (hexosamina, ácido urônico e conteúdo de sulfato) e espectroscopicamente (IR, RAMAN e RMN). Os polissacarídeos purificados foram avaliados em modelos experimentais de animais para trombose e na estimulação da síntese de proteoglicanos de heparam sulfato por células endoteliais em cultura. Diferentes GAGs podem ser extraídos de vários tecidos com alto rendimento. Os polissacarídeos purificados de CB e PS têm uma estrutura polimérica distinta. O BC-DS apresentou a maior massa molecular e menor razão sulfato:hexosamina (DS-BC = 0,802, DS-PS = 1,189), este também parece ter o maior teor de IdoA quando comparado com PS-DS (GlcAC /HEX: DS -BC = 0,619, DS-PS = 1,109). Embora a análise espectroscópica dos carboidratos purificados tenha mostrado espectros semelhantes, é possível encontrar algumas diferenças sutis que podem ser influenciadas pelo ambiente químico em cada uma de suas estruturas poliméricas. Nenhum outro contaminante foi identificado nas amostras. DS-CB e DS-PS mostraram efeitos semelhantes na coagulação, com DS-CB cessando a formação de trombos com uma dose mais baixa (50 µg / g) em comparação com DS-PS (75 µg / g). Ambos os GAGs foram capazes de estimular a síntese de HS-PG endotelial secretado para o meio. Destacamos os achados sobre as propriedades antitrombóticas do DS de PS e BC, e apresentamos um novo resultado em relação às suas propriedades na parede celular endotelial,

estimulando a síntese de HS, que foram encontrados para promover respostas angiogênicas das células endoteliais além de suas propriedades antitrombóticas.

Palavras-chave: Glicobiologia, trombose, glicosaminoglicanos, Dermatan Sulfato, Proteoglicanos, coagulação.

ABSTRACT

Dermatan sulfate (DS) is an anionic, linear, and structurally complex polysaccharide belonging to the glycosaminoglycans (GAG) class, found in a wide variety of tissues in many species attached to a core protein as proteoglycans (PG). DSPGs have been implicated in various cellular processes and cell-matrix interactions. DS chains may also influence the coagulation process, binding to serum proteins and inhibiting thrombin (interacting with HCII). This study aimed to extract GAGs from different tissues, and investigate DS effects upon coagulation hemostasis. GAGs were extracted by proteolysis, precipitated, desalted, lyophilized, submitted to agarose gel electrophoresis and chemical dosages (hexosamine, uronic acid). GAGs from porcine skin (PS) and bovine cornea (BC) were, further, purified by anion exchange chromatography and characterized by agarose gel electrophoresis, molecular mass, chemically (hexosamine, uronic acid, and sulfate contents), and spectroscopically (IR, RAMAN, and RMN). The purified polysaccharides were evaluated in experimental animal models of thrombosis and the stimulation of heparan sulfate proteoglycan synthesis by endothelial cells in culture. Different GAGs could be extracted from various tissues with high yields. The purified polysaccharides from CB and PS have a distinct polymeric structure. BC-DS showed the highest molecular mass and lower sulfate: hexosamine ratio (DS-BC=0,802, DS-PS=1,189), also it seems to have the highest content of IdoA when compared with PS-DS (GlcAC/HEX: DS-BC=0,619, DS-PS=1,109). Although the spectroscopical analysis of the purified carbohydrates showed similar spectra, it is possible to find some subtle differences that might be influenced by the chemical environment on each of their polymeric structure. No other contaminants were identified on the samples. DS-BC and DS-PS showed similar effects on coagulation, with BC-DS ceasing thrombi formation with a lower dose (50µg/g) compared to DS-PS (75µg/g). Both GAGs were capable of stimulating the synthesis of endothelial HSPG secreted to the medium. We highlight the findings on antithrombotic properties of DS from PS and BC, and presented a new result regarding its properties on the endothelial cell wall, stimulating the synthesis of HS, which have been found to promote angiogenic responses of endothelial cells beyond its antithrombotic properties.

Keywords: Glycobiology, thrombosis, glycosaminoglycans, Dermatan Sulfate, Proteoglycans, coagulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Modelo da cascata de coagulação (Fonte: DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991)	24
Figura 2- Esquema proposto para a hemóstase, fase de iniciação, propagação e amplificação (HOFFMAN, 2003).	28
Figura 3 – Esquema para classificação de PGs. (Fonte: IOZZO; SCHAEFER, 2015).	37
Figura 4- Representação esquemática dos PGs de superfície celular (Fonte: IOZZO; SCHAEFER, 2015)	39
Figura 5- Representação dos principais locais de interação dos GAGs com proteínas no vaso sanguíneo (GAG). (Fonte:próprio autor).....	39
Figura 6- Esquema da composição típica de diferentes famílias de glicosaminoglicanos. Fonte: (LINDAHL et al., 2017).	43
Figura 7- Estrutura do DS e das conformações do ácido L-Idurônico. (Fonte: THELIN et al., 2013).....	45
Figura 8 Esquema de ligação do HCII com a trombina e o GAG (TOLLEFSEN, DOUGLAS M., 2010).....	48
Figura 9- Modelo de inibição da trombina pelo HCII e sua interação com os GAGs (TOLLEFSEN, DOUGLAS M., 2010)	48
Figura 10- Representação esquemática do processo de extração, purificação e caracterização dos GAGs.....	57
Figura 11 Modos de vibração molecular. Fonte: Próprio autor.....	62
Figura 12- Eletroforese em gel de agarose de GAGs obtidos de diferentes tecidos (Fonte: Próprio autor).....	69
Figura 13- Eletroforese em gel de agarose de extratos de CS obtidos de diferentes fontes após corado com azul de toluidina pH 4.3.	70

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose de extratos brutos de córnea bovina, pele suína e amostras após cromatografia de troca iônica corado com Azul de toluidina.....	77
Figura 15- Eletroforese em gel de agarose dos extratos brutos de pele suína e amostras após cromatografia de troca iônica.	78
Figura 16 – (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida e (B) equação da reta utilizada para determinação da molecular modal dos GAGs extraídos e purificados de córnea bovina e pele suína determinação da massa molecular modal das amostras.....	81
Figura 17 – Espectro infravermelho dos GAGs purificados de córnea bovina e pele suína..	83
Figura 18 – Espectro infravermelho da região digital das moléculas de GAGs extraídos de CB e PS.....	84
Figura 19- Espectro infravermelho da centrada em 1248 cm^{-1} atribuído a região de estiramento de sulfato para as estruturas purificadas de CB e PS.	85
Figura 20 - Espectro Raman dos GAGs purificados de CB e PS.	87
Figura 21 - Espectro NRM-HSQC da amostra CB-0.5M.....	89
Figura 22 - Espectro NRM-HSQC da amostra CB-1M	90
Figura 23 - Espectro NRM-HSQC da amostra PS-1M.....	91
Figura 24 - Espectro NRM-HSQC da amostra CB-2M.	94
Figura 25 – Ensaio de atividade anticoagulante <i>in vitro</i>, tempo de ativação parcial da trombina.....	97
Figura 26 - Ensaio de atividade anticoagulante <i>in vitro</i>, tempo de trombina.....	98
Figura 27 - Ensaio de atividade anticoagulante <i>in vitro</i>, fibrinogênio.	99
Figura 28 – Síntese de heparam sulfato por células endoteliais de coelho. ...	102

Figura 29 - Síntese de heparam sulfato liberado por celulares endoteliais de coelho para o meio de cultura.....	103
Figura 30 - Ensaio de atividade anticoagulante <i>in vivo</i>, usando o modelo de ligadura da veia cava.....	105
Figura 31 - Ensaio de atividade anticoagulante <i>in vitro</i>, tempo de trombina (PT) dos ratos.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Rendimento de GAG de diferentes tecidos.....	74
Tabela 2- Dosagens químicas dos materiais brutos obtidos pós proteólise de diferentes origens e razões molares de GlcA / GlcNAc.....	75
Tabela 3: Dosagens químicas das amostras purificadas em cromatografia de troca iônica.....	79
Tabela 4: Massa molecular modal estimada dos GAGs presentes em CB e PS após a purificação.	82
Tabela 5- Valores da literatura para os espectros de Ácido Hialurônico	89
Tabela 6- ¹ H e ¹³ C-Chemical Shifts (ppm) dos sinais identificados espectro 2D NMR encontrados para diferentes dissacarídeos na literatura ^(a,b,c)	92
Tabela 7 – ¹ H e ¹³ C-Chemical Shifts (ppm) dos sinais identificados espectro 2D NMR das frações de Córnea Bovina 1M.....	92
Tabela 8 – ¹ H e ¹³ C-Chemical Shifts (ppm) dos sinais identificados espectro 2D NMR das frações de Pele Suína 1M.....	93
Tabela 9- ¹ H e ¹³ C-Chemical Shifts (ppm) dos sinais identificados espectro 2D NMR das frações de CB-0,5M comparadas com dados da literatura.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ Di0S	Dissacarídeo insaturado não sulfatado (2-acetamido-2-deoxi-3-O-(ácido β -D-gluco-4-enepiranosil urônico) -D-galactose, ou dissacarídeo insaturado não sulfatado)
Δ Di4S	Dissacarídeo insaturado 4-sulfatado
Δ Di6S	Dissacarídeo insaturado 6-sulfatado
Δ Di2,6S	Dissacarídeo insaturado 2,6-dissulfatado
AMAC	2-Aminoacridona
CS	Condroitim sulfato
C4S	Condroitim 4-sulfato
C6S	Condroitim 6-sulfato
Cetavlon	Brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio
COX	Ciclooxigenase
DS	Dermatam Sulfato
FACE	Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis
GAG	Glicosaminoglicano
Gal	Galactose
GlcA	Ácido β -D-glucurônico
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
HÁ	Ácido Hialurônico (Hyaluronic Acid)
HS	Heparam Sulfato
kDa	quiloDaltons
KS	Queratam Sulfato
M	Molar
MEC	Matriz Extracelular
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PDA	Diamino Propano-Acetato
PGs	Proteoglicanos
TCA	Ácido Tricloroacético

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
SUMÁRIO	16
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 JUSTIFICATIVA	19
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1.2.1 Coagulação sanguínea	22
1.2.2 Modelo celular da coagulação sanguínea	25
1.2.3 Heparinas e seu papel na terapêutica	33
1.3 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS: CONSIDERAÇÕES GERAIS	36
1.3.1 Proteoglicanos	36
1.3.2 Glicosaminoglicanos	41
1.4 DERMATAM SULFATO	44
1.4.1 DS e sua interação com o Cofator II da heparina.....	45
2. OBJETIVOS	50
2.1 OBJETIVO GERAL	50

2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1.	MATERIAIS.....	51
3.1.1.	Tecidos animais	51
3.1.2.	Animais	51
3.1.3.	Padrões de Carboidratos	52
3.1.4.	Purificação de GAGs.....	52
3.1.5.	Dosagens químicas	52
3.1.6.	Eletroforese.....	53
3.1.7.	Reagentes em geral.....	54
3.1.8.	Equipamentos.....	54
3.2.	MÉTODOS.....	56
3.2.1.	Extração de GAGs	56
3.2.2.	Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA).....	58
3.2.3.	Dosagens químicas	59
3.2.4.	Purificação dos extratos brutos por cromatografia de troca-iônica (Q-Sepharose Fast Flow)	61
3.2.5.	Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)	61
3.2.6.	Caracterização espectroscópica	62
3.2.7.	Atividade antitrombótica <i>in vitro</i>	63
3.2.8.	Quantificação do HS sintetizado por células endoteliais em cultura de células de aorta de coelho.....	65

3.2.9.	Atividade antitrombótica <i>in vivo</i> - ensaio de ligadura da veia cava em ratos winstar.....	66
3.2.10.	Tratamento estatístico	67
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS OBTIDOS DE DIFERENTES TECIDOS	68
4.1.1.	Extração e Caracterização dos GAGs de diferentes origens	68
4.1.2.	Purificação de GAGs de pele suína (PS) e córnea bovina (CB)	76
4.1.3.	Caracterização físico-química dos GAGs obtidos após cromatografia.....	79
4.1.4.	Determinação da massa molecular.....	80
4.1.5.	Análise espectroscópica de absorção no infravermelho	82
4.1.6.	Análise espectroscópica Raman	85
4.1.7.	Análise espectroscópica RMN- HSQC.....	88
4.2.	ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA <i>IN VITRO</i> DOS DS PURIFICADOS DE CÓRNEA BOVINA E PELE SUÍNA	96
4.2.1.	Tempo de tromboplastina parcial (APTT).....	96
4.2.2.	Tempo de trombina (PT).....	98
4.2.3.	Fibrinogênio.....	99
4.2.4.	Síntese de heparam sulfato antirombótico	100
4.3.	ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA <i>IN VIVO</i> DOS DS PURIFICADOS DE CÓRNEA BOVINA E PELE SUÍNA	105
5.	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	110

1. INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA

Doenças Cardiovasculares (DC) é um grupo de desordens que afetam o sistema cardiovascular (coração e vasos sanguíneos) e estima-se que sejam a causa da morte de 17,9 milhões de pessoas/ano, sendo estas, a principal causa de mortes no mundo (31% do total de mortes). Essas doenças geram um impacto direto na economia, principalmente em países de baixa e média renda como o Brasil, onde ocorrem mais de três quartos das mortes por doenças cardiovasculares de todo mundo (WHO, 2020).

Entre as desordens que fazem parte das DC estão: as doenças coronarianas, cerebrovasculares, arterial periférica, cardíaca reumática, cardíaca congênita, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. Essas doenças, e suas complicações, são caracterizadas por eventos agudos causados principalmente por um bloqueio que impede o fluxo correto do sangue para o coração ou cérebro, o que pode levar à morte ou morbidade do indivíduo (MACKMAN, 2008).

A formação do trombo pode ocorrer tanto em artérias quanto nas veias. Nas artérias essas condições, na maioria das vezes, são geradas pelo aumento de depósito de gordura nas paredes dos vasos sanguíneos o que pode acarretar um bloqueio local do mesmo ou causar um distúrbio da hemostasia com consequente disseminação e formação de trombos, levando a complicações como o infarto do miocárdio e AVC (MACKMAN, 2008). Em países desenvolvidos, cerca de 85% dos AVC's são de forma isquêmica devido a um tromboembolismo, sendo o restante gerado por derrame hemorrágico. Já nos em países em desenvolvimento, a taxa para AVC's gerados por derrame hemorrágico é de 50%, muito devido à uma detecção e tratamento tardio dos riscos cardiovasculares principalmente hipertensão (CHAN; WEITZ, 2019; KYRLE; EICHINGER, 2005). Já nas veias os trombos podem ser formados de diferentes maneiras, tais como, um fluxo de sangue mais lento ou até ausência deste, propriedades do sangue alteradas como trombofilia, e alterações no endotélio vascular (MACKMAN *et al.*, 2020). Esses trombos podem então, se deslocar

e atingir pulmões ou mesmo o cérebro, gerando um processo chamado de trombose venosa profunda, sendo esta a terceira maior causa de acidentes cardiovasculares, atrás apenas do infarto e do acidente vascular cerebral (CHAN; WEITZ, 2019; KYRLE; EICHINGER, 2005; MACKMAN *et al.*, 2020; WENDELBOE; RASKOB, 2016). Pessoas com doenças cardiovasculares ou que apresentam alto risco cardiovascular (devido à presença de um ou mais fatores, como hipertensão, diabetes, hiperlipidemia ou doenças já estabelecidas) precisam de detecção e tratamento precoces por meio de aconselhamento e medicamentos apropriados. Dentre os medicamentos utilizados, os denominados como antitrombóticos, podem ser divididos em, agentes anticoagulantes, agentes fibrinolíticos e agentes antiagregantes (AFONSO *et al.*, 2016; CHAN; WEITZ, 2019).

As drogas anticoagulantes em sua maioria irão atuar na cascata de coagulação ou na ativação das plaquetas exercendo seus efeitos de forma geral de quatro possíveis maneiras: 1) inibição ou potencialização da ação de inibidores naturais da trombina, como os derivados da hirudina, bivalrudina e derivados da L-arginina, que atuam inibindo a trombina; ou a heparina e heparina de baixo peso molecular, que potencializam o efeito da antitrombina III e HCII, ou até mesmo inibindo o fator Xa (rivaroxabana) impedindo assim a ativação da trombina (AFONSO *et al.*, 2016; MACKMAN, 2008; MACKMAN *et al.*, 2020). 2) Antagonistas da vitamina K impedindo assim a formação completa de alguns fatores de coagulação (como a warfarina). 3) Drogas do tipo fibrinolíticas, atuam aumentando a ativação do plasminogênio em plasmina, sendo esta responsável pela desintegração do trombo. Drogas desse tipo não são usadas como profilaxia da formação do trombo, porém, são usadas em processos trombóticos agudos. Como exemplo comercial temos a estreptoquinase, uroquinase e alteplase (forma recombinante da TPA, efeito fibrinolítico específico) ((AFONSO *et al.*, 2016; MACKMAN, 2008; MACKMAN *et al.*, 2020). 4) Já as drogas antiagregantes (ou antiplaquetárias), atuam impedindo a agregação das plaquetas, sendo muitas vezes usadas em casos de profilaxia, principalmente nos casos de trombos em artérias. Como exemplos dessas drogas temos: os inibidores irreversíveis da COX-1 (ácido acetil salicílico), os antagonistas dos receptores da ADP P2Y12 – ticlopidina, clopidogrel, prasugrel, ticagrelor, cangrelor e elinogrel; os inibidores da Gp IIIb/IIa – abciximab, eptifibatide e tirofiban; os antagonistas do recetor da trombina – vorapaxar, atopaxar, e os inibidores do TxA2:

picotamida, ridogrel, ramatroban (KYRLE; EICHINGER, 2005; MACKMAN, 2008) (AFONSO et al., 2016; KYRLE; EICHINGER, 2005; MACKMAN, 2008).

Tendo em vista o impacto na saúde do indivíduo, as implicações sociais e econômicas geradas pelo descontrole da hemostasia e formação de trombos, além de eventuais falhas na terapêutica atual, que incluem efeitos adversos, como hemorragias, trombocitopenia, reações anafiláticas e até mesmo o desenvolvimento de tolerância ao fármaco devido ao uso por longos períodos dos medicamentos (KYRLE; EICHINGER, 2005). Faz-se assim, de vital importância a compreensão dos mecanismos envolvidos na hemostasia. Assim como a busca por novos fármacos que possam atuar no controle e prevenção dessas condições. Como exemplo desses fármacos, podemos citar os carboidratos complexos provenientes de diferentes fontes. Como os provenientes de algas e glicosaminoglicanos de origem animais. Esses carboidratos, tem sido através de anos, utilizados na terapêutica e tem se mostrado uma importante linha de estudo da coagulação. Uma vez que, possuem uma estrutura extremamente complexa, heterogênea e afetam de diferentes maneiras a hemostasia. Tendo em vista o seu potencial inibitório da coagulação e possíveis alterações nos vasos sanguíneos resultantes da exposição ao GAG. Dessa forma, o presente trabalho terá como objetivo geral a extração de diferentes glicosaminoglicanos do tipo dermatam sulfato. Assim como, seu impacto na hemostasia, e o seu uso em potencial como um agente terapêutico.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Coagulação sanguínea

A coagulação sanguínea é uma sequência complexa de reações bioquímicas que resultam na formação do coágulo de fibrina, é parte essencial do fenômeno de hemostasia, sendo este um mecanismo fisiológico essencial, e cujo objetivo é a manutenção da circulação e fluidez do sangue dentro dos vasos sanguíneos. Sendo, a hemostasia, portanto, um mecanismo dependente de um delicado balanço entre processos pro coagulantes e anticoagulantes que geralmente descreve uma série de eventos no qual levam ao término do sangramento após uma lesão vascular (SUCKER; ZOTZ, 2015)

A primeira teoria tentando explicar o fenômeno da coagulação surgiu em 1904 com Paul Morawitz, onde este propões que tecidos, e plaquetas, dariam início a coagulação do sangue através de um fator chamado tromboquinase (fator III), este fator agiria sobre a protrombina (fator II), que na presença de íons de cálcio (fator IV), converte-a em trombina. Esta por sua vez, atuaria convertendo o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel formando assim os coágulos (MORAWITZ, P, 1904). A teoria de Morawitz, embora ainda muito incompleta, foi fundamental para lançar uma base do para o entendimento da coagulação, e perdurou como uma certeza por 40 anos. Apesar dos diversos acréscimos a teoria, muito por avanços nos estudos envolvendo distúrbio hereditários da coagulação (como em hemofílicos) e a descoberta de novos fatores de coagulação.

Tais descobertas entre as décadas de 1940 e 1950, a respeito de distúrbios de coagulação hereditários, ou não, e os fatores de coagulação presentes, ou ausentes, na sua forma ativa, ajudaram a consolidar um importante conceito a partir da metade final do século XX. No qual, os fatores de coagulação estariam presentes no sangue, na sua maior quantidade, como fatores inativos e se tornariam ativos de maneira gradual através de uma proteólise limitada e sequencial. Tal entendimento surge a partir de estudos sobre o fator VII ativado, uma vez que se observou que ele poderia, mesmo após ativado, ser inibido por um conhecido inibidor de serino proteases, o diisopropil fosfato (KINGDON; DAVIE; RATNOFF, 1964). Na presença

do inibidor, a hidroxila do resíduo de serina presente nos fatores de coagulação ativados, estimula um ataque nucleófilo ao grupo fosfato do inibidor, resultando assim na transferência do fosfato à serina, o que leva a uma mudança conformacional do fator, resultando assim na sua inativação (KINGDON; DAVIE; RATNOFF, 1964). A descoberta dessa hidroxila presente no resíduo de serina fundamental para a reação do sítio catalítico dos fatores de coagulação, mostra que tais fatores estão presentes no sangue como serino-proteases inativas e se tornavam ativas de maneira gradual através de uma proteólise limitada e sequencial (*step-by-step*) (DAVIE, 2003). Essas descobertas levaram dois grupos, quase que simultaneamente, a publicarem um novo modelo para a coagulação.

No ano de 1964, dois grupos publicaram, com alguns meses de diferença apenas, dois artigos referenciados até hoje como base para o estudo da coagulação sanguínea. O primeiro deles publicado por Macfarlane, na Nature, e o segundo por Davie, E. W., e Ratnoff na Science. Em ambos os artigos os autores sugerem que a coagulação sanguínea se daria por um mecanismo de amplificação das reações enzimáticas, onde cada estágio ativaria o próximo, por meio de uma proteólise limitada. Sendo este efeito em cascata, e que levaria à coagulação (DAVIE; RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964). As duas propostas ganharam grande destaque e renome por esclarecer a sequência de interação entre os fatores de coagulação da via intrínseca e demonstrando através de reações que poderiam ser testadas e reproduzidas em laboratórios.

Nos anos subsequentes vários autores realizam modificações nas propostas da cascata de coagulação. Apresentando assim, como um modelo útil, Figura 1, para a compreensão e entendimento dos passos essenciais para a coagulação *in vitro*. Assim como, uma definição clara das diferentes vias em intrínseca, extrínseca e comum. Permitindo assim, que deficiências e alterações no processo de coagulação fossem classificadas, diagnosticadas e tratadas de maneira apropriada. Esse modelo também foi essencial para a compreensão de vários inibidores da cascata de coagulação, no entanto, ele explica apenas a interação de fatores no plasma em um ambiente “estático” (*in vitro*, com fatores isolados), não considerado as interações das células endoteliais, para tal compreensão um novo modelo foi proposto e discutido a frente.

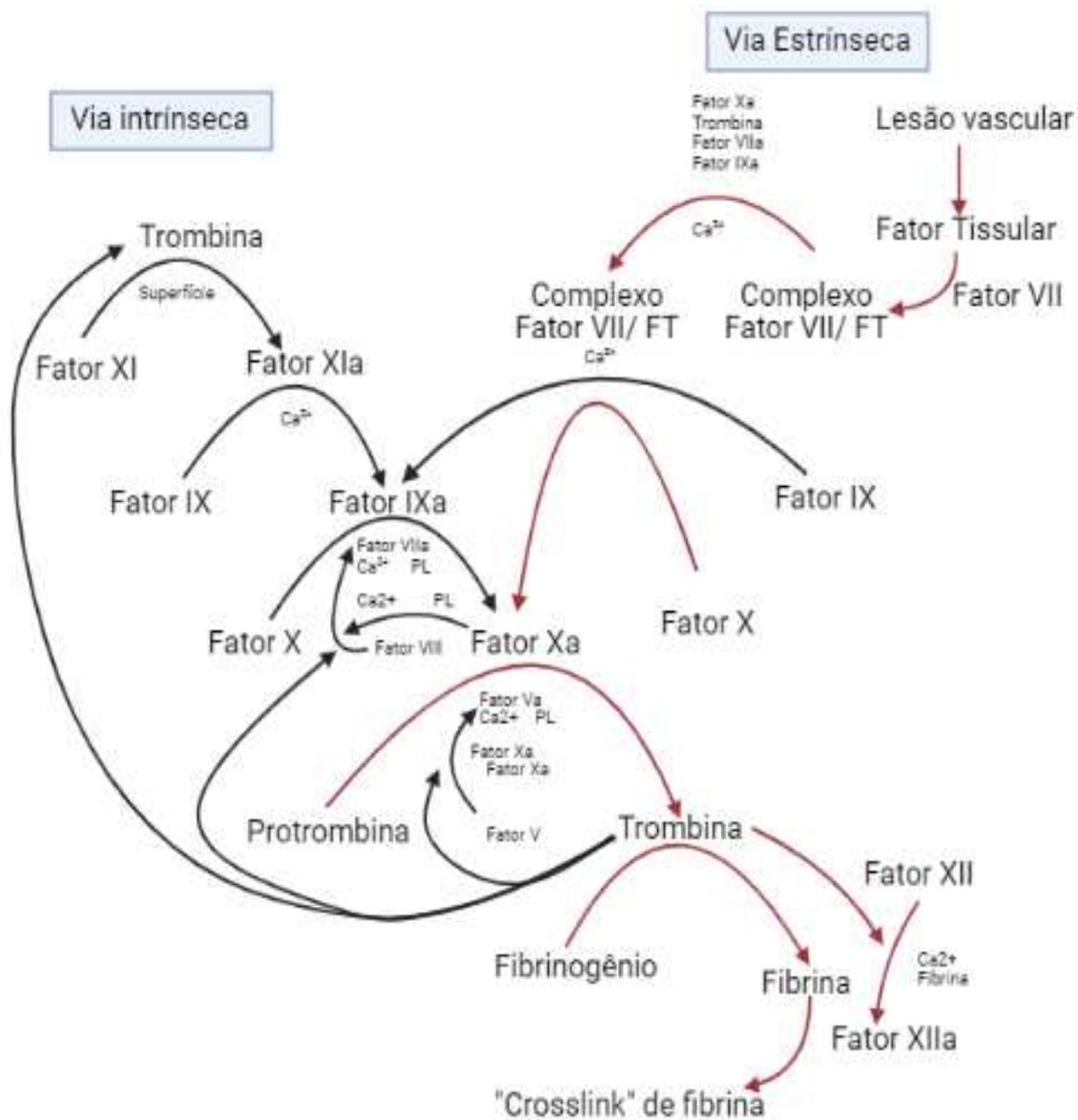


Figura 1 Modelo da cascata de coagulação (Fonte: adaptado de DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991)

1.2.2 Modelo celular da coagulação sanguínea

O modelo da cascata de coagulação proposto em 1964, e ainda muito utilizado, descreve as reações bioquímicas que se amplificam e se fazem necessárias para que ocorra a coagulação. O modelo original da cascata, conforme descrito acima, sofreu diversas alterações ao longo dos anos e hoje pode ser resumido em um esquema com duas vias bem distintas, a via intrínseca iniciada pela ativação do fator XII e a extrínseca iniciada pela ativação do fator tissular e fator VII, Figura 1. Os caminhos de ambas as vias convergem então para um em comum, no qual o complexo FXa/FVa, na presença de cálcio e fosfolípidios (complexo protrombinaquinase), ativaria a trombina, e assim como as vias intrínseca e extrínseca, resultando na amplificação do sinal até a formação do coagulo de fibrina (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991; HOFFMAN; MONROE, 2007).

No entanto esse modelo falha ao tentar explicar a hemostasia *in vivo*, uma vez que, pacientes com diferentes deficiências nos fatores da via intrínseca poderiam apresentar tempos igualmente longos de tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial (APTT) sem apresentar os mesmos riscos de hemorragias. Como, por exemplo, em pacientes com deficiências dos fatores XI ou XII, os indivíduos podem não apresentar episódios graves de hemorragia. Do mesmo modo, em deficiências dos fatores VIII ou IX, as hemofilias A e B, nas quais, mesmo com a capacidade de formar o complexo entre os fatores VIIa e o fator tissular, através da via extrínseca, portanto, capaz de ativar o fator X, os indivíduos continuam tendo problemas de sangramento (HOFFMAN; MONROE; ROBERTS, 1996; HOFFMAN; MONROE, 2007). No modelo da cascata de coagulação até então apresentado, a via intrínseca, não parece ser essencial para a homeostase *in vivo* uma vez que esta é “compensada” pela via extrínseca. No entanto, tem um papel fundamental nas patologias mencionadas acima e na patologia da trombose (DAVIE, 2003).

Na tentativa de explicar algumas falhas no modelo e ampliar o entendimento da coagulação Monroe e Hoffman, em 2001, propuseram um modelo que leva em consideração uma vasta rede de interações entre os fatores e a superfície celular que são necessárias para explicar apropriadamente a coagulação *in vivo*. Estudos iniciais da coagulação já colocavam células como plaquetas e hemácias como participantes do processo de coagulação, uma vez que, estas atuam na

formação do tampão plaquetário (MORAWITZ, PAUL, 1958). Em adição a isso, já se conhecia um pouco sobre o papel de um componente integral da membrana das células na coagulação, o fator tissular (MACFARLANE; BIGGS, 1953). No entanto, um grande avanço nas teorias da coagulação, se deu após a descoberta de que a exposição do sangue às células que expressam FT na sua superfície era suficiente para se iniciar a coagulação *in vivo* (HOFFMAN *et al.*, 2005; RIDDEL *et al.*, 2007).

Essas observações levaram a uma revisão do modelo anterior da coagulação. E à descoberta de um ponto chave para a coagulação, que seria o complexo fator VIIa/fator tissular. Este complexo atuaria na ativação do fator IX e o fator X (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991; HOFFMAN, 2003a).. Outra importante observação do novo modelo foi a de que o complexo fator VIIa/Fator tissular possui um papel fundamental na inicialização da coagulação *in vivo*, sendo expresso continuamente em células da musculatura lisa, fibroblastos, mas ausente no endotélio do vaso celular (HOFFMAN *et al.*, 2005). No entanto, a presença desse complexo formado, desencadeia o processo de coagulação do sangue quando em contato com o sangue circulante, por algum distúrbio do endotélio, lesão, ou após ativação de monócitos e de células endoteliais (RIDDEL *et al.*, 2007) . Evidências sugerem que o FT pode estar presente no sangue também como micropartículas derivadas de fragmentos de membranas de várias células como: como glóbulos brancos, endotélio e plaquetas. O que explicaria um papel importante desse fator na patofisiologia da trombose (SUCKER; ZOTZ, 2015). Sendo assim o novo modelo, modelo celular, divide a hemostasia em dois tipos, a hemostasia primária, onde seria definido todos os aspectos da formação da adesão e agregação plaquetária, e a hemostasia secundária, definida como os processos que levariam a formação e estabilização da fibrina (SUCKER; ZOTZ, 2015).

Dessa forma o modelo celular se propõe então a explicar a coagulação como um processo dinâmico que ocorre no sangue envolvendo também células e tecidos. Composto por uma série de fases que, muitas vezes, se sobrepõem na tentativa de explicar os complexos e entrelaçados processos físicos, celulares e bioquímicos que contribuem para hemostasia. Não sendo limitado a vias, ou caminhos únicos. Sendo essas fases, envolvidas também na manutenção da integridade do endotélio, denominadas de: iniciação, propagação e termino (HOFFMAN, 2003a; SUCKER; ZOTZ, 2015).

1.2.2.1 Fase de iniciação

A fase de iniciação é localizada nas células que expressão o FT, geralmente encontradas fora dos vasos, quando exposto, o FT se liga ao fator VII, circulante no sangue, ativando-o e formando o complexo fatorVIIa/FT, (HOFFMAN; MONROE, 2007). Se a exposição e ativação desses fatores é forte o suficiente para sobrepor os inibidores locais, o complexo fator VIIa/FT, ativa pequenas quantidades de fator IX e fator X. Este último fator ativado, se associa com o fator Va, formando o complexo tromboquinase, ainda na superfície da célula onde o FT está sendo expresso (HOFFMAN *et al.*, 2005; HOFFMAN; MONROE; ROBERTS, 1996). O fator V pode ser ativado também por diferentes proteases não relacionadas a coagulação ou pelo fator Xa conforme mencionado. Essa sequência de ativação pode gerar uma pequena quantidade de trombina ativada. (ALLEN; TRACY, 1995; MONKOVIC; TRACY, 1990).

Cabe aqui ressaltar que, as proteínas plasmáticas descritas na cascata de coagulação podem circular pelos tecidos sendo até encontradas na linfa (LE *et al.*, 1998). Sendo assim, é provável que o fator VII se ligue ao FT fora do vaso sanguíneo mesmo na ausência de lesão (HOFFMAN; MONROE, 2007), assim como os fator X e fator IX. No entanto o processo se encerra. No caso da coagulação, o processo irá prosseguir para uma fase de amplificação apenas quando as plaquetas e o fator VIII se ligar ao FT, sendo para isso necessário uma lesão do endotélio e exposição do sangue a essas células portadoras do FT. Uma vez danificada a parede celular e os eventos acima iniciados uma série de eventos como adesão, agregação, liberação de vesículas granulares e alterações morfológicas acontecem com as plaquetas resultando na sua ativação (RIDDEL *et al.*, 2007).

coagulação, que por sua vez, também se ligam às plaquetas ativando-as (OLIVER *et al.*, 1999; RIDDEL *et al.*, 2007). Outro ponto que vale ressaltar nessa etapa é que o complexo formado pelo fator VIIa/FT é dissociado, permitindo que o FT seja mediador de mais ativações e agregação das plaquetas no local de lesão, Figura 2 (OLIVER *et al.*, 1999; RIDDEL *et al.*, 2007).

1.2.2.3 *Fase de propagação*

Após uma abrupta geração de trombina na etapa de amplificação, resultando em grande número de plaquetas ativadas no local de lesão, tem-se início a fase de propagação e formação do coágulo, fase esta que ocorre também na superfície das plaquetas ativadas. O fator IXa gerado pelo fator XIa na superfície das plaquetas ou também pelo complexo VIIa/FT na superfície de células portadoras de FT, é pouco inibido pelo inibidor da via do fator tissular e a ATII, podendo atuar nas plaquetas onde foi ativado ou se difundir até outras plaquetas, esse fator quando ativado se liga ao fator VIIIa agora expresso na superfície das células, formando um complexo.

Uma vez formado o complexo entre fator IXa/FVIIIa, este ativa o fator X, que imediatamente, ainda na superfície das plaquetas, se liga ao fator V, gerando o complexo fator Xa/FVa. Esse complexo rapidamente converte grandes quantidades de pro-trombina em trombina, resultando na quebra do fibrinogênio e na formação dos monômeros de fibrina, que se polimerizam iniciando a formação do coágulo estável de fibrina (HOFFMAN *et al.*, 2005; SUCKER; ZOTZ, 2015).

1.2.2.4 *Fase de término*

Uma vez que o coágulo estável de fibrina é formado, uma fase de término se inicia, para que todo o processo de coagulação se mantenha limitado ao local de lesão. Evitando-se assim, que a coagulação, uma vez desencadeada, se propague por todo o sistema vascular (HOFFMAN, 2003a). Esse controle da coagulação, é feito por uma série de proteínas e sistemas que quando funcionando adequadamente restringem a coagulação ao local de lesão (HOFFMAN *et al.*, 2005)

Diversas proteínas atuam diretamente inibindo a coagulação sanguínea, um grupo de moléculas inibidores de serino proteases desempenham uma importante função na inibição da hemóstase local. De maneira geral as serino proteases atuam inibindo seus alvos de maneira competitiva, através de um mecanismo incomum de inibição suicida, onde está, apresenta sequências alvo para o reconhecimento das suas proteinases alvos, aprisionando-as em um complexo, subsequente acilação das estruturas, o que resulta em uma mudança conformacional tanto do inibidor quanto da enzima (RAU *et al.*, 2007). Dentre essas SERPINAS, a mais conhecida é a antitrombina (AT), uma glicoproteína sintetizada majoritariamente no fígado, formada por 432aa e uma massa molecular de 58kda. Essa glicoproteína possui como principal função fisiológica a inibição da trombina e do fator Xa, embora possa inibir também os fatores IXa, XIa, XIIa, a calecrinina e a plasmina (NEGRIER; SHIMA; HOFFMAN, 2019). Outra serino protease com estrutura e função semelhante ao ATIII é o Cofator II da heparina (HCII), no entanto, este possui uma especificidade limitada apenas trombina. As ações desses dois inibidores de SERPINAS, podem ser potencializadas pela presença de GAGs, aumentando assim a atividade desses inibidores na circulação evitando assim um efeito trombótico. Esses GAGs podem ser utilizados na terapia para controle da coagulação, como a heparina. Porém, estes se fazem presentes na superfície das células do endotélio e outros tecidos, desempenhando assim um papel importante na inibição da coagulação e controle da hemostasia. Os tipos de reação e como ocorre a potencialização dos inibidores de coagulação pelos GAGs serão discutidos mais a frente, assim como a importância desses para a coagulação (HUNTINGTON, 2005; MACKIE; BULL, 1989; SOBCZAK; PITT; STEWART, 2018).

Outro ponto de importante no controle da coagulação e atuando principalmente de forma sistêmica é a proteína C. Uma proteína zimogênica, também da família das serino proteases, com estrutura homóloga aos fatores dependentes da vitamina K (fatores: VII, IX e X). Esta proteína é ativada por pela a trombina após sua ligação com o receptor endotelial trombomodulina (TM) (GRIFFIN; ZLOKOVIC; MOSNIER, 2012). Na sua forma ativa, aPC, desempenha diversos papéis no organismo como na inflamação, morte celular por apoptose e coagulação sanguínea. Esta, quando ativada, causa a inativação dos fatores Va e VIIIa, fatores importantes para a formação de trombina e altamente pro coagulante, uma vez que ambos os fatores alteram a ordem de ativação da trombina e várias ordens de magnitude. Entre

os cofatores que influenciam na inativação dos fatores Va e VIIIa, está a proteína S, um importante cofator da proteína C. A proteína S se liga à APC e fosfolípidios de membrana, trazendo o sítio ativo da APC para a sua posição de clivagem. A proteína S também irá competir com o fator Xa pela ligação ao fator Va aumentando assim a inibição da coagulação (GRIFFIN; ZLOKOVIC; MOSNIER, 2012). Dessa forma, devido a eficiência da inativação do fator Va e VIIIa, a proteína C se faz um ponto crucial no controle da coagulação *in vivo*. Com indivíduos que não expressam esse tipo de proteína podendo sofrer problemas graves de trombose (quando heterozigotos) ou até mesmo problemas mais graves de coagulação como a púrpura fulminante em casos de neonatos homozigotos. Não obstante a identificação da proteína C e seu papel na coagulação implicou em uma importante mudança conceitual no papel da trombina. Não obstante ela tenha uma função coagulante, quando produzida em excesso, quando produzida apenas em pequenas quantidades é um potente anticoagulante, atuando junto com a trombomodulina na ativação da proteína C (GRIFFIN; ZLOKOVIC; MOSNIER, 2012; MARLAR; KLEISS; GRIFFIN, 1982).

Por último, mas não menos importante para o controle da hemostasia, temos o sistema fibrinolítico. Este, será responsável pela quebra dos polímeros de fibrina e consequente dissolução do coágulo, fibrinólise. Prevenindo assim o excesso de fibrina intravascular e permitindo a remoção do trombo. A superfície da fibrina serão os principais pontos de atividade da fibrinólise, modulando a ligação das principais enzimas fibrinolíticas. A principal enzima fibrinolítica é a plasmina, uma serino protease, circulante na forma de zimogênio, plasminogênio, e responsável pela degradação de várias proteínas no plasma, sendo a mais importante delas a fibrina (CHAPIN; HAJJAR, 2015). Os dois principais ativadores fisiológicos do plasminogênio são o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA, "*tissue-type plasminogen activator*") e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA, "*urokinase-type plasminogen activator*"), ambos ativadores possuem alta especificidade pelo seu substrato (plasminogênio), promovendo uma hidrólise de uma única ponte peptídica (Arg560-Val561) para a formação da serino-protease ativa denominada plasmina (HOFFMAN, 2003b). Embora a plasmina seja capaz de degradar outras proteínas, em condições fisiológicas, a fibrinólise irá ocorrer como um processo altamente específico para a fibrina, uma vez que, de uma maneira autorregulatória a fibrina atua aumentando a afinidade do t-PA pelo plasminogênio, com um $K_m = 65\text{mM}$ e de

0,15/1,5mM na presença de fibrina (CHAPIN; HAJJAR, 2015). Esse sistema fibrinolítico é muito bem regulado também através de inibidores, sendo os mais importantes, o inibidor da ativação do plasminogênio, este atua inativando o, t-PA e u-PA (CHAPIN; HAJJAR, 2015; HOFFMAN, 2003b).

Devemos aqui destacar que, as reações bioquímicas da coagulação do sangue são mais complexas do que foram descritas e devem ser estritamente reguladas de modo a evitar ativação excessiva do sistema, formação inadequada de fibrina e oclusão vascular. Assim, a atividade das proteases operantes na ativação da coagulação é regulada por GAGs e numerosas proteínas inibitórias, muitas vezes expressas pelo próprio endotélio, que atuam como anticoagulantes naturais. Devemos ter em mente também que as diferentes vias regulatórias citadas não operam isoladamente e em condições fisiológicas normais, ausência de lesão vascular, há um predomínio dos mecanismos anticoagulantes sobre os procoagulantes, mantendo-se desta forma a fluidez do sangue.

Dentre as diversas estruturas mencionadas para o controle e manutenção da fluidez do sangue, e como estes são parte fundamental, para a manutenção de diversos tecidos e da sinalização celular, incluindo a coagulação sanguínea e a manutenção da integridade dos vasos que será discutido a frente, mas não sem antes uma introdução e classificação dos PG

Dentre as diversas estruturas mencionadas para o controle e manutenção da fluidez do sangue, os proteoglicanos e suas cadeias laterais de GAGs merecem destaque. Uma vez que, ambos envolvidos em uma série de processos biológicos que serão discutidos a seguir, dentre eles a inibição de alguns fatores de coagulação, assim como, o controle e a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Dentre os GAGs, talvez o mais comum e uma das drogas mais utilizadas na terapêutica é a Heparina, e que será discutida na sequência.

1.2.3 Heparinas e seu papel na terapêutica

A heparina foi o primeiro anticoagulante descoberta em 1917 e utilizada como medicamento desde 1935. Sendo considerada como padrão ouro, no tratamento de diversos quadros clínicos como: problemas cardiovasculares, cerebrovasculares, trombose venosa profunda, profilaxia pós cirúrgica e mais recentemente, estudos tem se intensificado para outros usos como: anti-inflamatório e no tratamento de alguns tipos de câncer (HAO *et al.*, 2019; MACKMAN *et al.*, 2020; PATRIARCHEAS *et al.*, 2020). A heparina é um polissacarídeo linear altamente sulfatado, com uma massa molecular, em média, variando entre 15 e 19 kDa, compostos por unidades dissacarídicas repetidas compostas de uma glucosamina e um ácido urônico, podendo possuir diferentes domínios de sulfatações, que trazem a estrutura do polímero a habilidade de interagir com diferentes fatores da coagulação (FAN *et al.*, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2012; ONISHI *et al.*, 2016). A heparina exerce o seu maior potencial anticoagulante devido a um pentassacarídeo com alta afinidade pela antitrombina (ATIII). A presença da heparina gera uma mudança conformacional no ATIII, aumentando assim a sua afinidade por diversos fatores de coagulação, como a trombina, fator Xa e fator IXa (HIRSH *et al.*, 1995). Modificações na estrutura do polímero como, a redução do tamanho da estrutura, por digestão enzimática ou reações químicas sequenciais, dão origem às heparinas de baixo peso molecular (LMWHs) e a um pentassacarídeo o Fondaparinux®. Ambas as modificações introduzidas na terapêutica a partir de 1993 e 2001 respectivamente (MACKMAN *et al.*, 2020).

No entanto, mesmo com anos de usos e diversas aplicações as heparinas, e seus derivados, possuem várias limitações terapêuticas e que precisam ser abordadas (MACKMAN *et al.*, 2020). O primeiro efeito colateral induzido pelo uso da heparina, e um dos mais significativos para a clínica médica, é a trombocitopenia induzida pela heparina (TIH). Uma síndrome clínico patológica, que ocorre quando há formação de anticorpos (IgG) heparina-dependentes, uma vez presentes, esses anticorpos se ligam ao fator-4-plaquetário promovendo a ativação plaquetária através dos receptores Fc. A ligação dos anticorpos a este antígeno ocorre na superfície das plaquetas e das células endoteliais. Resultando em agregação e destruição

plaquetária, assim como, lesão das células endoteliais. Todo esse quadro leva a uma ativação da coagulação, aumentando assim o risco de complicações tromboembolíticas e ao quadro clínico principal da TIH, que inclui: trombocitopenia (queda no número de plaquetas) e trombose venosa e arterial (LINKINS, 2015; PATRIARCHEAS *et al.*, 2020). A formação desses anticorpos ocorre de maneira rápida, e sem a produção inicial de IgM, uma hipótese para explicar a rápida formação de anticorpos IgG, sem a formação de anticorpos de fase aguda, é a de que, sensibilizações anteriores, decorrentes de infecções bacterianas, ou outros fatores ambientais, produzem o mesmo antígeno como o produzido pela heparina/fator-4-plaquetário (LINKINS, 2015; LONGHI; LAKS; KALIL, 2001).

O quadro de TIH, geralmente, se desenvolve de 5-10 dias após o uso do medicamento. A prevalência desse tipo de trombocitopenia pode variar de 0,1% a 5%. Com uma maior incidência em pacientes que receberam a heparina após cirurgia ou trauma (1-5%), sendo pouco comum em pacientes que fazem uso profilático (<1%) e raros em mulheres grávidas (<0,1%). Tais condições quando não identificadas podem levar a uma mortalidade de 20% dos indivíduos, assim como amputação de membros (6-10%), relacionada a gangrena gerada pela obstrução da circulação. O mesmo quadro, pode ocorrer também, com o uso de heparinas de baixo peso molecular (LMWHs), ou até mesmo, em raros casos, após o uso do Fondaparinux® (LINKINS, 2015).

Outro efeito colateral importante da terapêutica com heparinas, e talvez o mais observado, são os sangramentos excessivos presentes como uma das mais comuns reações adversas após o uso de heparina (HIRSH *et al.*, 1992; ONISHI *et al.*, 2016; PATRIARCHEAS *et al.*, 2020), sendo os maiores riscos observados em mulheres acima de 60 anos, principalmente com o uso de heparinas não fracionadas (UFH) (ONISHI *et al.*, 2016). As heparinas atuam diretamente na coagulação e com um elevado potencial inibitório dos fatores de coagulação. Sendo necessária uma baixa dose para promover alterações significativas na coagulação. Dessa forma, a terapia com heparina deve ser constantemente monitorada e ajustada de acordo com o paciente, visando reduzir as complicações hemorrágicas (ONISHI *et al.*, 2016). O monitoramento da terapêutica deve ser realizado rotineiramente através de testes como o aPTT e a dose de heparina deve ser constante ajustada, visando atingir a faixa terapêutica ideal, mensurada como um aumento do aPTT em 1,5 a 2,5 vezes. Essa faixa deve ser observada com muita cautela, uma vez que sangramentos e

hemorragias estão presentes como um efeito colateral comum, e qualquer alteração seja no preparo da heparina ou até mesmo nos testes que avaliam a terapêutica, podem influenciar diretamente no tratamento (HIRSH *et al.*, 1992; ONISHI *et al.*, 2016),

Apesar de incomuns, o uso prolongado da heparina pode levar também a um quadro de osteoporose. Isso ocorre uma vez que o uso prolongado leva a uma redução da mineralização óssea, em decorrência da inibição da diferenciação dos osteoblastos promovida pela Heparina. Somado a isso, a heparina atua também acelerando a reabsorção óssea, através da redução de fatores que controlam a diferenciação dos osteoclastos (ONISHI *et al.*, 2016). O risco de osteoporose em pacientes para LMWH precisa ainda ser avaliado, uma vez que os dados para esse tipo de experimento são escassos, em decorrência da recente descoberta e aprovação de uso do medicamento. Problemas neurológicos também podem ser observados como efeito colateral da heparina, apesar de incomuns, estes podem ocorrer como resultados de hematomas espinhais ou epidurais, tal efeito é observado principalmente em LMWH, Fondaparinux® e heparinoides. Tais hematomas podem levar a uma paralisia permanente do paciente (ONISHI *et al.*, 2016). Outros problemas em decorrência do uso da heparina também podem ser observados, no entanto destacamos aqui os mais importantes e mais frequentes dentro da terapêutica com tais fármacos.

Desde que a heparina foi introduzida como o primeiro anticoagulante no mercado, novas drogas antitrombóticas surgiram. No entanto, a heparina e seus derivados ainda compõem uma significativa parcela do mercado, sendo ainda, a droga de escolha em diversos tratamentos, e com, apenas o seguimento de LMWH nos EUA estimado em USD 535,4 milhões de dólares (FAN *et al.*, 2018; MCCARTHY *et al.*, 2020). No entanto, conforme apresentado, a heparina e seus derivados, apresentam alguns efeitos colaterais graves. E que pode assim apresentar para o mercado uma oportunidade para o investimento e descoberta de novos fármacos com potencial terapêutico tão eficaz quanto os atualmente disponíveis, mas com um perfil de segurança aprimorado, em especial levando se em consideração o risco reduzido de sangramento, um melhor controle da terapia e a ausência (ou risco reduzido de desenvolvimento) da TIH.

1.3 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS: CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.3.1 Proteoglicanos

Proteoglicanos (PGs), são proteínas altamente glicosiladas, cuja estrutura consiste de um corpo proteico com uma ou mais cadeias de GAG covalentemente ligadas. PGs são uma família de glicoproteínas ubíquas, de variadas funções biológicas, tais como: organização estrutural, regulação osmótica, homeostasia e a manutenção da integridade de vários tecidos conjuntivos, sendo o principal constituinte das matrizes extracelulares (MEC) (BEDINI *et al.*, 2019; BRIMACOMBE; STACEY, 1964; KJEUIN; LINDAHL, 1991). Os PGs possuem uma grande variedade estrutural, uma vez que de todos os 30 mil genes do genoma humano (NHG, 2021), 43 genes parecem codificar proteoglicanos, e somado a essa diversidade de genes, temos também um processo de “splicing” alternativo, que garante aos PGs uma grande variedade de estruturas biologicamente ativas (SCHAEFER *et al.*, 2017).

Nos últimos 20 anos, avanços na compreensão das estruturas dos PGs levaram a uma complexa classificação que pode ser ilustrada na Figura 3. Essa sistematização, relaciona os proteoglicanos com base em três diferentes critérios. O primeiro deles, mais utilizado, é referente ao local onde o PG é encontrado. Após designados quanto ao local onde estes PG podem ser encontrados, observa-se a homologia genética e proteica geral destes, e por último, observa-se os módulos de proteínas específicos dos seus esqueletos proteicos, Figura 3 (IOZZO; SCHAEFER, 2015).

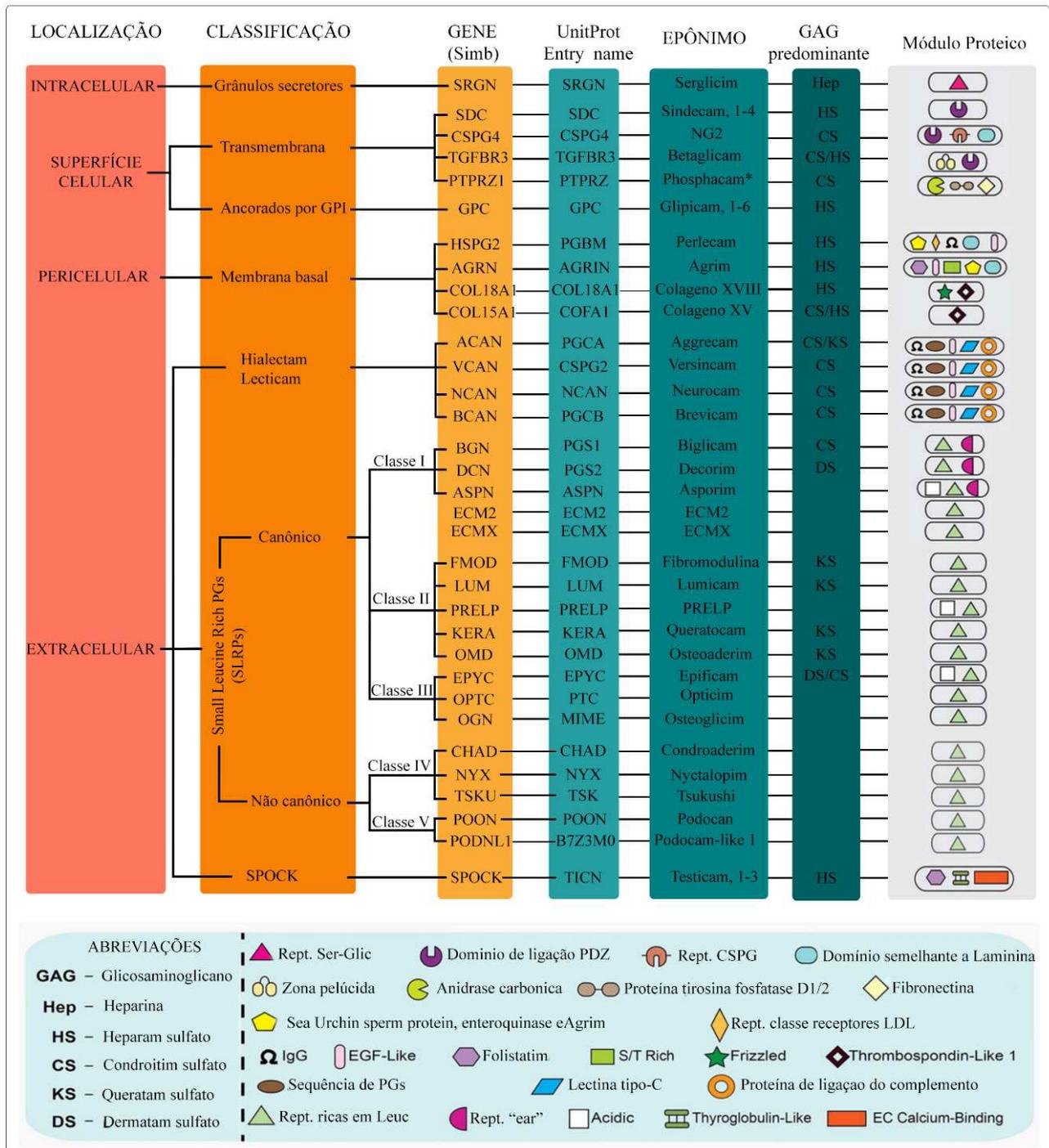


Figura 3 – Esquema para classificação de PGs. No qual, as quatro famílias são baseadas em sua localização celular e subcelular, homologia nos níveis proteico e genômico e a presença de módulos proteicos únicos que são frequentemente compartilhados por membros de uma determinada classe. A chave para os vários módulos é fornecida no painel abaixo. Para detalhes adicionais sobre estrutura e função, consulte o texto (Fonte: IOZZO; SCHAEFER, 2015).

Conforme mencionado, o primeiro critério de classificação dos PGS, talvez o mais simples e mais utilizado, é referente a sua localização. Dessa forma os PGs podem ser divididos em quatro classes de forma excêntrica partindo do interior da célula. A primeira das classes é, portanto, composta por PG localizados intracelularmente em grânulos secretores. Pertencentes a essa classe temos apenas um PG, o serglicim. Esse PG é encontrado armazenado no interior dos mastócitos, atuando em diversas funções biológicas, sendo a principal delas, a ligação com proteases intracelulares presentes nos grânulos, restringindo suas atividades quando no interior das células. Essa atividade ocorre devido a sua alta carga negativa gerada pelo GAG de heparina na sua cadeia lateral que interage com os resíduos básicos da estrutura de diversas proteases, mantendo as inativas até o momento da sua ativação (IOZZO; SCHAEFER, 2015; PRYDZ, 2015).

A segunda classe é composta por PGs localizados na superfície celular, e por apresentar uma maior diversidade que a classe anteriormente apresentada, esses PGs podem ser também divididos de acordo com o segundo critério de classificação, sua homologia genética e proteica (IOZZO; SCHAEFER, 2015). Dessa forma, temos, sete genes que codificam PGs transmembrana do tipo I, tais PGs possuem o N-terminal fora da membrana citoplasmática. E seis genes que codificam PG ancorados por glicosil fosfatidil inusitol (GPI). Dentre esses PGs de superfície celular, todos, com exceção do CSPG4/NG2 e fosfacam, possuem HS como GAG substituinte da cadeia lateral. Sendo aqui importante destacar o Glipican, o PG com maior atividade anticoagulante encontrado ancorados nas superfícies celulares dos vasos (SOBCZAK; PITT; STEWART, 2018).

Movendo de forma excêntrica as células, temos os PGs localizados no espaço pericelular ou membrana basal, essa classe contém quatro PGs, intimamente relacionados com a superfície celular de diversos tipos de células, sendo geralmente ancorados por integrinas ou outros receptores. No entanto, esses PGs são em maior parte constituintes presentes nas membranas basais, e por isso pertencentes a uma classe distinta das anteriores. Os PG pericelulares podem também ser divididos de acordo com a sua homologia genética e proteica, onde o perlecan e o agrim, compartilham semelhanças estruturais no terminal C da sua estrutura, enquanto os colágenos XVIII e XV, compartilham homologia nos terminais N- e C- dos domínios não colágenos (IOZZO; SCHAEFER, 2015).

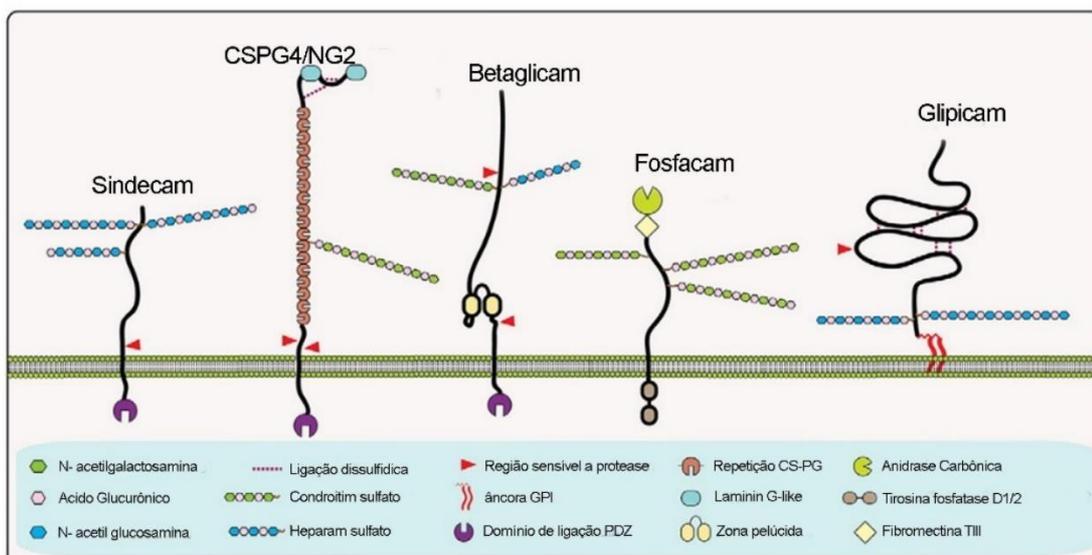


Figura 4- Representação esquemática dos PGs de superfície celular (Fonte: adaptado pelo autor de IOZZO; SCHAEFER, 2015)

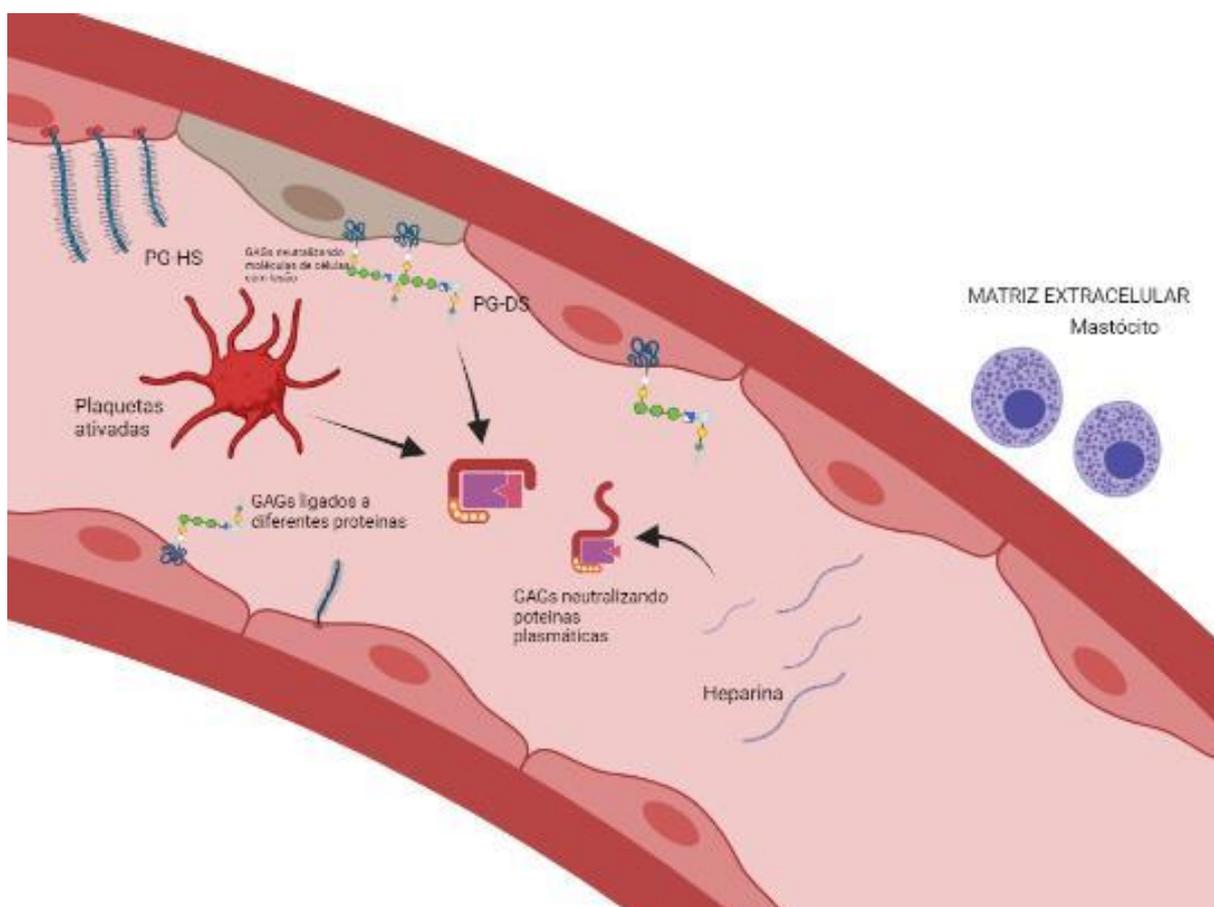


Figura 5- Representação dos principais locais de interação dos GAGs com proteínas no vaso sanguíneo (GAG). (Fonte:próprio autor)

A última classe de PGs, com 25 genes distintos codificando PGs e que engloba um maior número de membros é a classe dos PGs extracelulares (IOZZO; SCHAEFER, 2015). Dentro dessa, quatro desses genes codificam a família do hialectam, um componente estrutural importante das cartilagens, responsável pela ligação do HA conferindo a viscoelasticidade necessária alguns tecidos. A segunda família de PG extracelulares engloba 18 PGs e suas variações de “splicing”. Resultando na classe mais vasta de PGs, na qual os membros podem ser localizados em diversos tecidos. No entanto, sua cadeia proteica é relativamente pequena quando comparada com os demais PG, sendo formada por várias unidades repetidas de Leucina. Portanto, o nome da classe, do inglês “small leucine rich proteoglycans” (SLRPs) (SOBCZAK; PITT; STEWART, 2018).

Dessa forma os PGs extracelulares do tipo SLRPs, são definidos por possuírem uma cadeia proteica com uma estrutura solenoide formada por unidades repetidas de Leucina (LRRs), cada uma composta por ~24aa, onde interações proteína/proteína ocorrem (IOZZO; SCHAEFER, 2015). Esses PGs são expressos em grande quantidade durante o desenvolvimento de membranas finas de diversos órgãos, sugerindo assim uma participação direta dos PGs na regulação do tamanho e forma dos órgãos durante o desenvolvimento embrionário. De forma geral, as funções biológicas dos SLRPGs são vastas, sendo este talvez o arquétipo mais estudado dos SLRPs e primeiro PGs envolvido diretamente no controle do crescimento celular (IOZZO; SCHAEFER, 2015).

Os PGs extracelulares do tipo SLRPs podem ser também subdivididos em canônicos (classes de I-III) e não canônicos (classes de IV-V). Cujas diferenças podem ser observadas em um módulo proteico que compõe sua estrutura, sendo assim levado em consideração o terceiro critério de classificação proposto. PGs extracelulares do tipo SLRPGs tidos como canônicos, irão apresentar em sua estrutura na região N-terminal, quatro resíduos de Cys intercalados por diferentes aminoácidos, além de, duas regiões ricas em leucina (LRRs) e uma região C-terminal com uma sequência de aa atípica (IOZZO; SCHAEFER, 2015). Nesta região em específico, temos uma cadeia majoritariamente composta por leucina, porém são encontrados um resíduo de Cys inserido a cada 10 resíduos de asparagina. Essa composição de aa faz com que a cadeia se dobre nessa região, adquirindo, assim, um formato semelhante a uma “orelha” – daí nome para essa região, do inglês “ear”. PGs extracelulares do tipo

SLRPs não canônicos, não possuem esse módulo proteico disposto dessa maneira (IOZZO; SCHAEFER, 2015).

Aqui se faz importante observar também, que alguns membros dessas classes não possuem substituições de GAGs em suas cadeias. O que foge do conceito inicialmente apresentado para PG, no entanto levando-se em consideração a conservação evolutiva, a homologia genética e proteica, assim como a organização gênica, essas estruturas são consideradas como PGs (IOZZO; SCHAEFER, 2015). Uma vez que muitos destes, possuem homologia estrutural e funções próximas entre si e entre PGs, como por exemplo a ligação com colágeno, RTKs, receptores de resposta imune inata, TGF β e a modulação através da sinalização várias vias de diversos processos biológicos (IOZZO; GUBBIOTTI, 2018; SCHAEFER *et al.*, 2017).

A última família de PGs extracelulares é a dos SPOCK. Esses PG apresentam o seu esqueleto proteico homólogo a proteínas ácidas secretadas ricas em cisteína (SPACK ou BMP-40) com cadeias de GAGs do tipo CS e HS. Os PGs dessa classe têm sua estrutura formada por cinco domínios semelhante ao do perlecan e agrim. Embora isolados primeiramente de testículos, tem-se tornado aparente que os SPOCKS são quase exclusivamente expressos no sistema nervoso central e contendo o HS como seu GAG majoritário. Uma vez que, o PG SPOCK1 (ou testican 1) está associado à área pós-sináptica das células piramidais do hipocampo. O PG SPOCK2 (ou testican 2) foi localizado em células neuronais de várias regiões do cérebro. E o PG SPOCK3 (ou testican 3) é um HSPG do cérebro também parece ser expresso de forma ubíqua no sistema nervoso cerebral (IOZZO; SCHAEFER, 2015).

Para finalizar essa apresentação geral sobre PGs, vale aqui destacar que há um número de PGs “parciais”, não incluídos aqui, mas que tem sido estudado como: Prg4/lubricin, endocan, leprecan, collagens IX and XII, bikunin e CD44. No entanto ainda se sabe pouco sobre eles apesar das semelhanças funcionais e biológicas com os PGs (IOZZO; SCHAEFER, 2015).

1.3.2 Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos são partes estruturais fundamentais das cadeias de todos os PGs, pois são eles que irão promover os efeitos nos tecidos ao interagir com diversas moléculas. Ao contrário dos PGs, que possuem uma classificação

complexa, os GAGs são classificados de acordo com sua a suas repetidas unidades dissacarídicas (IOZZO; SCHAEFER, 2015). GAGs são polissacarídeos complexos, lineares, formados por unidades dissacarídicas repetidas, sendo em sua maioria sulfatados em uma, ou mais, posições na sua estrutura. Com exceção do HA, os GAGs, são polissacarídeos compostos por cadeias de tamanho médio entre 10 e 50 kDa, encontrados ligados a um ao esqueleto proteico, formando os PGs. Essa ligação se dá através de um tetrassacarídeo formado por ácido glucurônico-galactosil-xilose (GlcA-Gal-Gal-Xil). Dessa forma, a extremidade redutora da unidade de xilose do tetrassacarídeo liga-se à um resíduo de serina/treonina da proteína por uma ligação O-glicosídica. Enquanto isso, a extremidade não redutora do tetrassacarídeo se liga à cadeia de GAG (IOZZO; SCHAEFER, 2015; LINDAHL *et al.*, 2017; SAMPAIO; NADER, 2006). Essa cadeia de GAGs é formada por unidades dissacarídicas compostas por uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) unida por ligação glicosídica a um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou a um açúcar neutro. O conteúdo de sulfato e a forma como os grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos estão distribuídos na estrutura trazem uma alta densidade de cargas negativas além de uma heterogeneidade às estruturas dos polímeros. Dessa forma podemos classificar tais polissacarídeos em 5 grandes famílias: DS, CS, HÁ, HS e Hep, cada uma com uma combinação de unidades repetidas e características estruturais próprias, Figura 6, discutidas a frente (LINDAHL *et al.*, 2017; PRYDZ, 2015; VARKI *et al.*, 2015).

Os GAGs podem ser classificadas de acordo com o tipo de hexosamina presente na sua estrutura. Podendo ser divididas em dois grupos, os galactosaminoglicanos, nos quais a hexosamina presente na sua unidade dissacarídica será uma galactosamina, representado assim, pelo condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS) e os glucosaminoglicanos, nos quais a hexosamina que compões a unidade dissacaríca será uma glicosamina, sendo o heparam sulfato (HS), heparina, queratam sulfato (KS) e ácido hialurônico (HA) os representantes desse grupo (LINDAHL *et al.*, 2017; PRYDZ, 2015; VARKI *et al.*, 2015). A Figura 6 apresenta as unidades mais frequentes de cada uma dessas famílias (LINDAHL *et al.*, 2017).

Uma diferença estrutural importante entre as famílias dos GAGs está também no açúcar não nitrogenado ligado a hexosamina que compõe suas unidades dissacarídicas. Para os CS e HA temos unidades dissacarídicas contendo o ácido D-glucurônico, já os KS apresentam um açúcar neutro, sendo este geralmente a

galactose. Nos GAGs de DS, HS e heparina, unidades de ácido D-glucurônico e ácido L-idurônico coexistem em diversas proporções na estrutura podendo variar de acordo com a espécie e o tecido dos quais são extraídos (SAMPAIO & NADER, 2006; LINDAHL et al., 2017; PRYDZ, 2015; VARKI et al., 2015). Outra diferença entre os GAGs se dá em relação à conformação e tipo de ligação glicosídica que os compõem, nos CS, DS e HA, a ligação intradissacarídica, ou seja, entre o açúcar não nitrogenado e à hexosamina, é do tipo 1→3, já nos KS, HS e Hep essa ligação é do tipo 1→4. Em relação a conformação dessas ligações, elas podem ser divididas entre α e β , e será determinada pelo tipo de açúcar não nitrogenado em sua estrutura, sendo do tipo β para ácido D-glucurônico e D-galactose, e do tipo α para ácido L-idurônico. Já para as ligações interdissacarídicas, ou seja, a ligação entre a hexosamina e o ácido urônico, estas podem ser do tipo β (1→4) para os CS, DS e HA, e do tipo α (1→4) nos HS e Heparina. Nos KS, por sua vez, a hexosamina se liga à D-galactose por uma ligação β (1→3). Outra característica estrutural que vale a pena ressaltar são as N-ligações presentes na hexosamina, os CS, DS, HA e KS apresentam uma hexosamina N-acetilada, enquanto na heparina a glucosamina é geralmente N-sulfatada, para os HS as duas substituições podem ocorrer (LINDAHL et al., 2017; SAMPAIO; NADER, 2006).

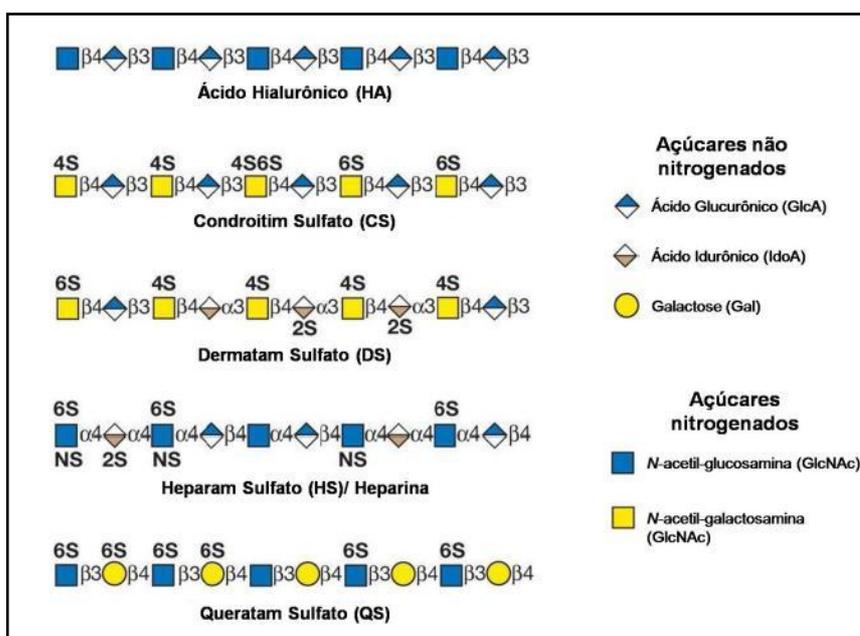


Figura 6- Esquema da composição típica de diferentes famílias de glicosaminoglicanos. Fonte: (LINDAHL et al., 2017).

1.4 DERMATAM SULFATO

O DS é um GAG encontrado em uma grande variedade de vertebrados, sendo um GAG constituído de unidades dissacarídicas repetidas de N-acetil-galactosamina, ligadas por uma ligação intradissacarídica do tipo β (1 \rightarrow 3), a um ácido D-glucurônico ou a um ácido L-idurônico. Suas ligações interdissacarídicas são do tipo β (1 \rightarrow 4) e comumente apresentam sulfatações nas posições C-4 dos resíduos de GalNAc, com ocasionais sulfatações nas posições C-6 dos resíduos de GalNAc e C-2 dos resíduos de IduAc, e assim como o CS, unidades não sulfatadas também podem estar presente na sua estrutura (NOGUEIRA *et al.*, 2019; YAMADA; SUGAHARA; ÖZBEK, 2011). Pelas suas semelhanças estruturais o DS foi por muito tempo referido como CS-B, no entanto esse difere dos GAGs de CS por apresentar uma estrutura copolimérica linear, na qual deve possuir pelo menos um resíduo de IduAc, resultado de epimerizações do C-5 do GlcAc, Figura 7-B, (POBLACIÓN; MICHELACCI, 1986; TROWBRIDGE; GALLO, 2002). Esses resíduos de IduAc podem ser encontrados em diferentes arranjos na estrutura do DS podendo apresentar-se como uma unidade dissacarídica rodeado por outras unidades contendo GlcAC, em estruturas alternadas com Glic ou em longos blocos de dissacarídeos contendo por IduAc, Figura 7-A (MALMSTRÖM *et al.*, 2012). Os resíduos de IduAc conferem uma flexibilidade a estrutura linear do polímero de DS, uma vez que esses resíduos possuem a habilidade de trocar entre a conformação de 1C4 cadeira, 2S0 em barco e 4C1 cadeira conforme apresentado na Figura 7-C (MALMSTRÖM *et al.*, 2012).

O DS pode ser isolado da matriz extracelular de tecidos conjuntivos, como pele, tendão e esclera, assim como músculo esquelético, veias, ossos e cartilagem. Neste último o DS desempenha um importante papel junto com o colágeno, elastina e outras glicorproteínas, sendo o principal GAG de PGs de decorin e epifican. O DS apresenta algumas atividades farmacológicas já bem conhecidas, dentre elas a atividade anticoagulante através da sua interação com o cofator II da heparina (HCII) detalhada abaixo.

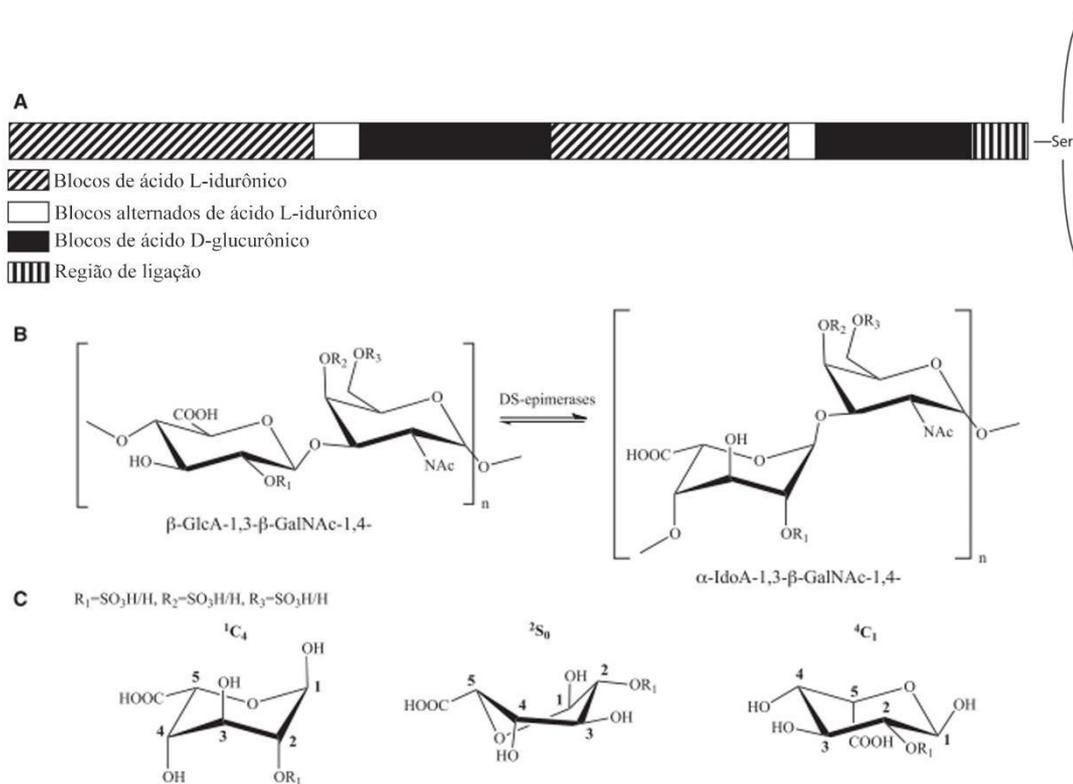


Figura 7- Estrutura do DS e das conformações do ácido L-Idurônico. (A) Representação esquemática da distribuição do IduAc no polímero de DS. (B) Reação da DS-epimerase. (C) Conformações estruturais das cadeias do IduAc (Fonte: THELIN et al., 2013).

1.4.1 DS e sua interação com o Cofator II da heparina

Conforme apresentado anteriormente, o processo biológico de coagulação sanguínea é regulado por inibidores de proteases pertencentes a superfamília das serpinas dentre elas o HCII. Este, é uma glicoproteína codificada no cromossomo 22q11, pelo gene SERPIN1 em humanos, composta de uma única cadeia polipeptídica contendo 480 aminoácidos, sendo o fígado o seu principal local de biossíntese (HORTIN; TOLLEFSEN; STRAUSS, 1986). O HCII, assim como o AT, é membro de um grupo de proteínas homologas que chegam a compartilhar cerca de 30% das sequências de aminoácidos onde a maioria dessas proteínas tem a função de inibir serino proteases. Em sua maioria essas glicoproteínas possuem uma estrutura terciária, caracterizada por três folhas betas e cerca de 8–9 alfa-hélices (TOLLEFSEN, DOUGLAS M., 2010). O HCII difere do ATIII uma vez que este atua

inibindo apenas a trombina, não inibindo outras serino proteases da via intrínseca da coagulação como ocorre com o ATIII. A ausência da expressão do HCII está relacionada a um aumento no risco do desenvolvimento de aterosclerose e a falha no controle da formação de trombos, uma vez que para esta última condição, animais knock-out para HCII possuíam graves problemas no controle da coagulação e formação de trombos arteriais (HUNTINGTON, 2005; RAU *et al.*, 2007).

Em relação a inibição da trombina, o mecanismo de ação do HCII, e do AT, se dá de maneira semelhante. Em um primeiro momento da reação temos um ataque da serpina ao sítio catalítico da sua protease alvo, formando assim um complexo através de uma ligação não covalente. Uma vez formado esse complexo, a hidroxila ligada a serino protease promove um ataque nucleofílico ao sítio reativo (P1-P1') da glicoproteína. Essa reação leva a uma quebra no sítio catalítico da enzima, e a formação de uma ligação entre o grupo hidroxila e a carbonila do resíduo P1. Clivagens proteolíticas desencadeiam, na sequência, uma mudança conformacional no sítio reativo. Conseqüentemente, o resíduo P1, com a protease ainda ligada, é transloucado para o polo oposto da serpina. Esse rearranjo molecular deforma o sítio catalítico da protease, prevenindo uma deacetilação e a liberação da proteína do complexo (TOLLEFSEN, DOUGLAS M., 2010). A especificidade das serpinas é determinado em parte pelos aminoácidos presentes em P1 do sítio reativo das glicoproteínas. Para a ATIII o resíduo de aminoácido é uma Arg393, sendo que as proteases alvo (trombina, fator Xa e fator IXa) dessas glicoproteínas preferencialmente atacam peptídeos, Arg-X, nos seus substratos. Em contraste, no sítio catalítico P1 de HCII temos um resíduo de Leu444, fazendo com que a única proteinase inibida pelo HCII é a trombina (MASCELLANI *et al.*, 1993b; RAU *et al.*, 2007; TOLLEFSEN, D M, 1984).

Em relação a sua atividade, o HCII inibe a trombina em uma taxa basal muito baixa, com uma constante de reação (k_2) de aproximadamente $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. No entanto, quando colocada na presença de GAGs há um aumento de quase mil vezes na sua atividade, sendo a constante de reação $k_2 \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Em termos fisiológicos, a meia vida de inibição da trombina por $1 \mu\text{M}$ de HCII cairia de 5min na ausência dos GAGs para 50ms na presença de DS ou Hep/HS (RAU *et al.*, 2007; TOLLEFSEN, DOUGLAS M., 2010). Esse aumento da inibição, gerado pelos GAGs, se dá através de uma modificação conformacional gerada pelos GAGs e uma região da estrutura do HCII. Essa região é formada por aproximadamente 80

aminoácidos, que formam um domínio ácido N-terminal com o HCII. Uma vez que ocorra a ligação do GAG ao HCII, esse domínio ficara livre para interagir com uma região presente na trombina, denominada exo I, Figura 8, facilitando assim a formação do complexo HCII-trombina (MASCELLANI et al., 1993; TOLLEFSEN, D M, 1984; TOLLEFSEN, DOUGLAS M., 2010).

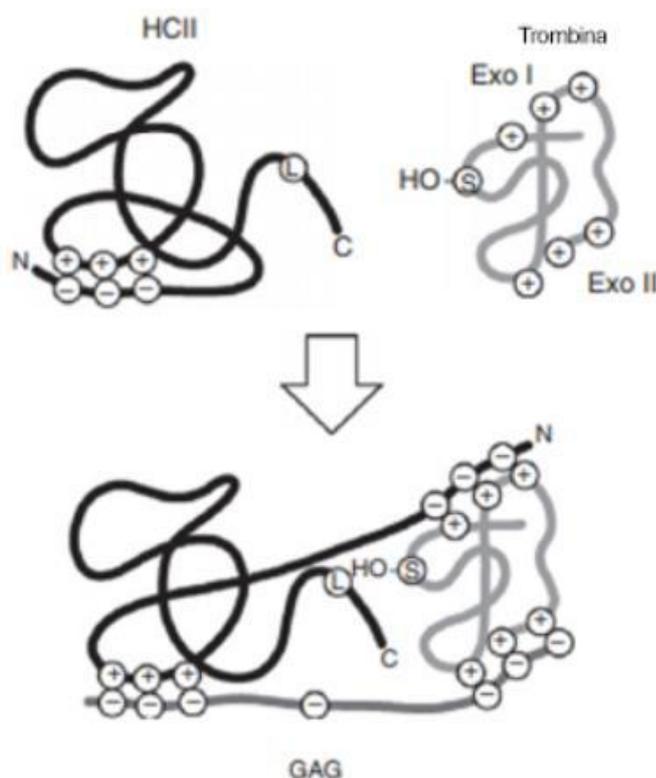


Figura 8 Esquema de ligação do HCII com a trombina e o GAG (TOLLEFSEN, DOUGLAS M., 2010)

O aumento da atividade do HCII, pode se dar pela interação do domínio ácido N-terminal de HCII e a região de hirudina na trombina, conforme descrito. No entanto, ocorreria também uma interação entre o HCII, a trombina e a estrutura do polímero de GAG, de forma que, este último agira como uma ponte entre os fatores, aumentando assim a taxa de formação do complexo. Isso pode ser observado uma vez que HCII sem o domínio ácido N-terminal, HCII e trombina, continuam sendo estimulados a formar o complexo devido apenas sua interação com a estrutura polimérica do GAGs, porém em uma taxa de inibição reduzida, Figura 9. Observa-se, assim, que a velocidade de inibição da trombina depende também do tamanho da estrutura do GAG e sua interação com a região EXOII. Onde observou-

se que a menor fração de DS, capaz de gerar efeito sobre o HCII, estimulando as alterações conformacionais e atuando como ponte entre os fatores, é um oligossacarídeo composto de 12-14 resíduos de açúcar de comprimento, contendo um octassarídeo específico na sua composição (TOLLEFSEN, D. M.; PEACOCK; MONAFO, 1986; TOLLEFSEN, DOUGLAS M., 2010). DS com estruturas menores que a descrita, promovem, baixa ou quase nenhuma, inibição da trombina pelo HCII. Foi observado também, que mutações no HCII, com a remoção da região EXOII ocasionaram uma pequena, ou quase nenhuma, da atividade de potencialização da atividade de HCII.

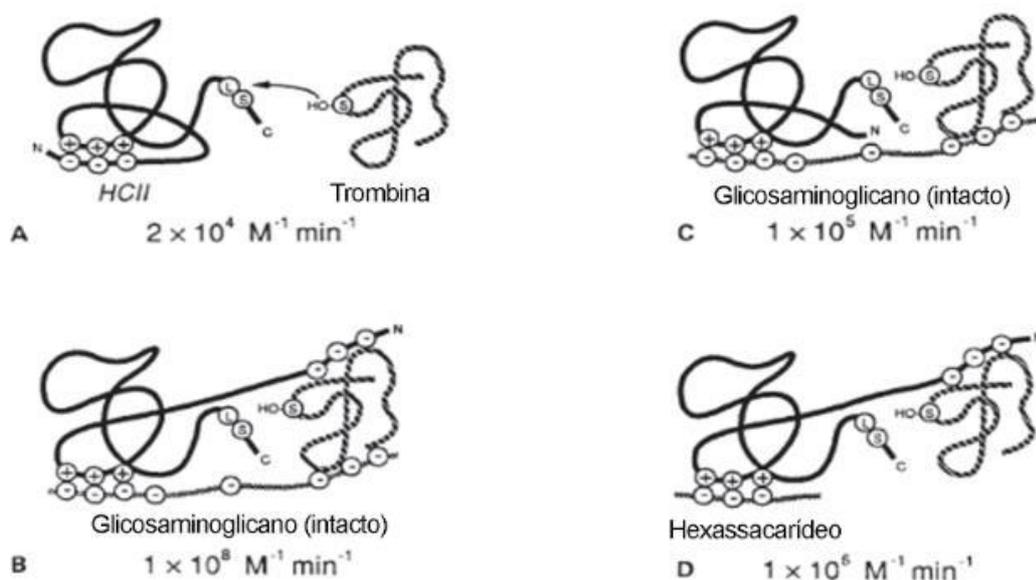


Figura 9- Modelo de inibição da trombina pelo HCII e sua interação com os GAGs (TOLLEFSEN, DOUGLAS M., 2010)

Embora a interação e os efeitos do HCII com GAGs ocorram de maneira semelhante, tanto para o DS como para Hep/Hs, estes GAGs se ligam em locais diferentes da estrutura do HCII. Essa região de ligação descrita foi identificada através de uma análise de um indivíduo norueguês com uma síntese de HCII variante (BLINDER *et al.*, 1989), a essa variante foi dada o nome de HCII-Oslo, e ganhou destaque pois verificou-se que nela havia a ligação da Hep/HCII mas não do DS (OLDS *et al.*, 1992). Essa porção de HCII foi amplificada por PCR, e alterações em códons específicos do gene, resultaram em uma histidina na mesma posição do

fenótipo HCII-Oslo, essas mutações/alterações em um único aminoácido da estrutura do HCII, faz com que seja necessário, cerca de 100 vezes mais DS para produzir uma inibição de trombina semelhante ao HCII normal (OLDS *et al.*, 1992). Experimentos relacionados ao HCII-Oslo foram as primeiras evidências de DS e Hep/HS se ligavam em posições diferentes da estrutura do HCII, sendo tal teoria confirmada por pesquisas posteriores (HORTIN; TOLLEFSEN; STRAUSS, 1986).

Tendo em vista essas formas de interação entre o HCII, trombina e DS, foi observado que a menor porção do GAG capaz de estimular o HCII a inibir a trombina é um hexassarídeo composto por três unidades dissacarídicas de IdoAc2SO₃→GalNAc4SO. Hexassacarídeos, contendo o ácido idurônico, mas apenas um, ou os dois, dissacarídeos sulfatados também se ligam ao HCII, porém com uma afinidade muito menor, enquanto hexassacarídeos compostos inteiramente de ácido urônico monossulfatados em C-4 da GalNAc não interagem com o HCII. No entanto a presença da sulfatação, nessa posição de C4, é importante uma vez que, estudos utilizando polímeros de DS compostos majoritariamente por IdoA2SO₃→GalNAc6SO₃, foram cerca de 1000 menos eficazes estimulando a inibição da trombina pelo HCII, quando comparados com compostos majoritariamente formados por IdoA2SO₃→GalNAc4SO₃ (PAVÃO *et al.*, 1998). Outros tecidos, como mucosa intestinal de porco, contêm uma ou mais unidades dissacarídicas sulfatadas nas posições C4 e C6 da galactosamina, e também são capazes de estimular o HCII. Sendo assim, modificações nas subunidades UA → GalNAc4SO₃ no polímero de DS, tanto por uma sulfatação na posição de C2 do IdoAc, quanto por uma sulfatação em C4 da GalNAc, podem gerar locais de ligação do HCII.

Essas observações permitem concluir que os GAGs aceleram a formação do complexo trombina-HCII primariamente de maneira alostérica, e em segundo agindo como uma ponte entre as estruturas. DS e Hep/HS, se ligam mais fortemente a trombina do que ao HCII, sendo sugestivo assim que para o caminho de ativação alostérica do HCII ocorrer, os GAGs devem se ligar a trombina, formando um complexo GAGs/trombina para este depois se ligar ao HCII, Figura 9.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo extrair e caracterizar o glicosaminoglicano de dermatam sulfato a partir de pele suína (PS) e córnea bovina (CB), bem como avaliar suas atividades farmacológicas sobre a manutenção da hemóstase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e caracterizar os GAGs obtidos de diversos tecidos animais;
- Purificar os GAGs de PS e CB diferentes origens,
- Caracterizar quimicamente e por espectroscopia (Infravermelho, Raman e NMR-HSQC) os GAGs extraídos de PS e CB.
- Avaliar a atividade antitrombótica *in vitro* e *in vivo* dos DS extraídos de PS e CB ;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Tecidos animais

Tecidos de diferentes espécies foram utilizados para a extração dos GAGs, dentre eles:

- Pele de suína (***Sus scrofa domesticus***), adquirida de diferentes açougues da cidade de Juiz de Fora/MG;
- Pele de diferentes tipos de peixe: namorado (***Pseudopercis numida***), truta salmonada (***Oncorhynchus clarkii clarkii***), corvina (***Argyrosomus regius***) foram cedidas pela peixaria Armazém do Porto (Juiz de Fora, MG, Brasil);
- Globos oculares bovinos (***Bos taurus***) cedidos pela Fripai Distribuidora de Carnes Ltda (Juiz de Fora, MG, Brasil). Separados nos seus respectivos tecidos, esclera, retina (tecido nervoso), humor vítreo, musculo ciliado, cristalino e córnea bovina.

3.1.2. Animais

Foram utilizados para os ensaios *in vivo*, ratos machos do tipo Winstar criados e cedidos pelo Centro de Biologia da Reprodução, na Universidade Federal de Juiz de Fora. Os ensaios foram realizados de acordo com as boas práticas e manejo animais, tendo sido aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal. Protocolo: 022/2019 . Para determinação da avaliação da atividade anti trombótica foi utilizado o método de ligadura da veia cava descrito por Reyers et al. (1980).

3.1.3. Padrões de Carboidratos

- Condroitim 4-sulfato de traqueia bovina, dermatam sulfato de mucosa intestinal de porco, N-acetil-glucosamina, ácido D-glucurônico todos adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA) Condroitim 6-sulfato de cartilagem de tubarão adquirido da Seikagaku Kogyo Co. Ltda. (Tóquio, Japão). Padrões de dissacarídeos insaturados de condroitim sulfato (Δ Di0S, Δ Di4S e Δ Di6S) gentilmente cedidos pela Prof.^a Dr.^a Yara Maria Michelacci (UNIFESP).

3.1.4. Purificação de GAGs

- Extração de GAGs: papaína P.A., (PROQUÍMIOS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), fosfato dissódico (Na_2HPO_4) e fosfato de sódio (NaH_2PO_4) (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil), ácido tricoloroacético P.A., (Anidrol Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil).
- Purificação dos GAGs: Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia).

3.1.5. Dosagens químicas

- Dosagem de ácido urônico (método de Carbazol, FERRANTE et al., 1971): tetraborato de sódio, ácido sulfúrico P.A., carbazol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), álcool metílico P.A., (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, SP, Brasil).
- Dosagem de açúcares aminados (hexosamina) (método de Rondle e Morgan, 1955): acetilacetona, p-dimetilaminobenzaldeído (DAB), (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA); ácido clorídrico, (J.T. Baker, Mexico); álcool metílico P.A., (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, SP, Brasil), carbonato de sódio P.A., (LABSYNTH, Produtos para Laboratório Ltda. (Diadema, SP, Brasil).

- Dosagem de sulfato inorgânico (Método de Dodgson, 1961): ácido clorídrico, (J.T. Baker, México), cloreto de bário P.A., (LABSYNTH, Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil), gelatina DIFCO, (Becton, Dickinson and Company, Le Pont-de-Claix, France).
- Dosagem de proteínas (Método de Bradford, 1976): Coomassie brilhante blue G-250, (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil); ácido fosfórico P.A., (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Indaiatuba, SP, Brasil). Albumina bovina obtida da INLAB Confiança (Diadema, SP, Brasil), ácido clorídrico, (J.T. Baker, México).

3.1.6. Eletroforese

- Eletroforese em gel de agarose em Tampão propilenodiamino acetato (PDA), pH 9,0: lâminas de vidro de 1 mm de espessura, dimensões de 10 x 7,5 cm, 7,5 x 7,5 cm e 5 x 7,5 cm (Geo-Química, Produtos para Laboratórios Ltda., São Paulo, SP, Brasil), câmara de eletroforese horizontal, modelo desenvolvido por Jaques et al (1968), (Técnica Permatron Ltda., Joinville, SC, BR), agarose, (Bio-Rad Laboratories Inc., Richmond, CA, USA), 1,3-diaminopropano, brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio (Cetavlon), (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), azul de toluidina e vermelho de cresol (Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI, USA), benzina P.A., (ÊXODO, Sumaré, SP, Brasil).
- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (Polyacrylamide gel electrophoresis - PAGE): acrilamida, (Ludwig Biotecnologia Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil), N-N'-metilbisacrilamida, (Neon Comercial Ltda., Suzano, SP, Brasil), persulfato de amônio (APS), (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil); N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), azul de toluidina (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis (FACE): 2-aminoacridona (AMAC), cianoboridreto de sódio, glicina, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA); dimetil sulfóxido P.A., (Isofar, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), acrilamida (Ludwig

Biotecnologia Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil), N-N'-metilbisacrilamida (Neon Comercial Ltda., Suzano, SP, Brasil), persulfato de amônio (APS), (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil), Δ Di0S, Δ Di4S e Δ Di6S, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA).

3.1.7. Reagentes em geral

- Fitas de diálise Spectrapor® (MWCO 6.000-8.000), Spectrum Medical Industries Inc. foram adquiridas da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA);
- Sulfato de sódio da anidro adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil).
- Cloreto de sódio e Etanol P.A., PROQUÍMIOS (Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Ácido tricloroacético e Ácido Acético, LABSYNTH Produtos para Laboratório Ltda. (Diadema, SP, Brasil);
- Tris(hidroximetil) aminometano da Biosolve (França);
- Ácido clorídrico adquiridos da J.T. Baker, México;
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) da Êxodo Científica (SP, Brasil)
- Glicerol da Cromato Produtos Químicos Ltda., SP, Brasil;
- Fluoreto de sódio a 0.1M (The Coleman & Bell Co, Norwood, Ohio, USA);
- Kits comerciais doados ao laboratório de Glicoconjugados da UFJF pela Labtest®, utilizados para testes anticoagulantes *in vivo*.

3.1.8. Equipamentos

- Agitador magnético MA 085, Marconi Equipamentos para Laboratório (SP, Brasil);
- Balança, Bell Engineering (SP, Brasil);
- Banho ultrassônico Modelo USC-2800A, Unique (Indaiatuba, SP, Brasil);
- FT Raman Spectrophotometer RFS 100/S(Bruker) (Instrumento utilizado para obtenção dos espectros Raman no Núcleo de Espectroscopia do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora coordenado pelo Prof. Luiz Fernando Cappa de Oliveira);

- Câmara de eletroforese em gel de agarose horizontal, modelo desenvolvido por Jaques et al. (1968), adquirido da Técnica Permatron Ind. Com. Ltda. (Joinville, SC, Brasil);
- Centrífuga de bancada com 12 tubos, Centribio (Brasil);
- Centrífuga Excelsa Baby, Fanem Ltda. (Brasil);
- Densitômetro Epson Perfection V700 Photo scanner, Epson America, Inc. (Long Beach, CA, USA).
- Espectrofotômetro Multiskan GO, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA);
- Espectrômetro Bruker modelo Alpha (Espectrômetro usado para obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho);
- Fonte de corrente contínua regulável - Electrophoresis Power Supply Model 494, Instrumentation Specialties Company (USA);
- GelDoc-It Imaging System, UVP (Upland, Califórnia, EUA);
- Impressora multifuncional (modelo HPC3180) em modo de cores RGB resolução 600 di;
- Liofilizador 0,01 mBar, -88 °C, Labconco FreeZone 2.5 (EUA);
- pHmetro digital de bancada, Casa Americana artigos para laboratórios (São Paulo, SP, Brasil);
- Sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell da Bio-RadLaboratories Inc. (Richmond, CA, EUA);
- Vórtex, Phoenix (Brasil).
- Thermo Forma 900 Ultra Low Temperature Freezer, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
- Bomba peristáltica Pharmacia Biotech, Pump P-1, Suécia

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Extração de GAGs

Para a extração dos GAGs foram utilizados os seguintes tecidos: pele suína (215,64g), pele de *Pseudoperca numida* (namorado) (106,71), pele de *Plagioscion squamosissimus* (corvina) (11,52g), pele de *Salmo salar* (salmão) (1327,79g) e olhos de *Bos taurus* (bovinos), divididos conforme seus tecidos, esclera (484,07g), retina (tecido nervoso) (15,21g), humor vítreo (600,97g), musculo ciliado (8,49g), cristalino (42,52g) e córnea bovina (41,06g). Inicialmente, os tecidos foram desidratados e delipidados em acetona 48h, com trocas de acetona a cada 12h, na sequência, secos em estufa a 50°C por 72h. Após secagem, o material de cada tecido foi triturado e o pó cetônico obtido submetido à proteólise com papaína (1mg/mL em tampão fosfato-cisteína 0,05M, pH 6,5; 2mL enzima/100mg de pó cetônico). Após incubação por 24h a 60°C, as amostras foram filtradas em gaze e os GAGs precipitados com 2,5 volumes de etanol PA em presença de NaCl 1M, lentamente, sob agitação e mantidos a -20 °C por 18h. Após, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm, 15 minutos) e o precipitado obtido foi seco a vácuo, armazenado a -20°C e submetidos às análises químicas, enzimáticas, físico-químicas e espectroscópicas. Todo o processo de extração e análise pode ser visto de maneira geral na .

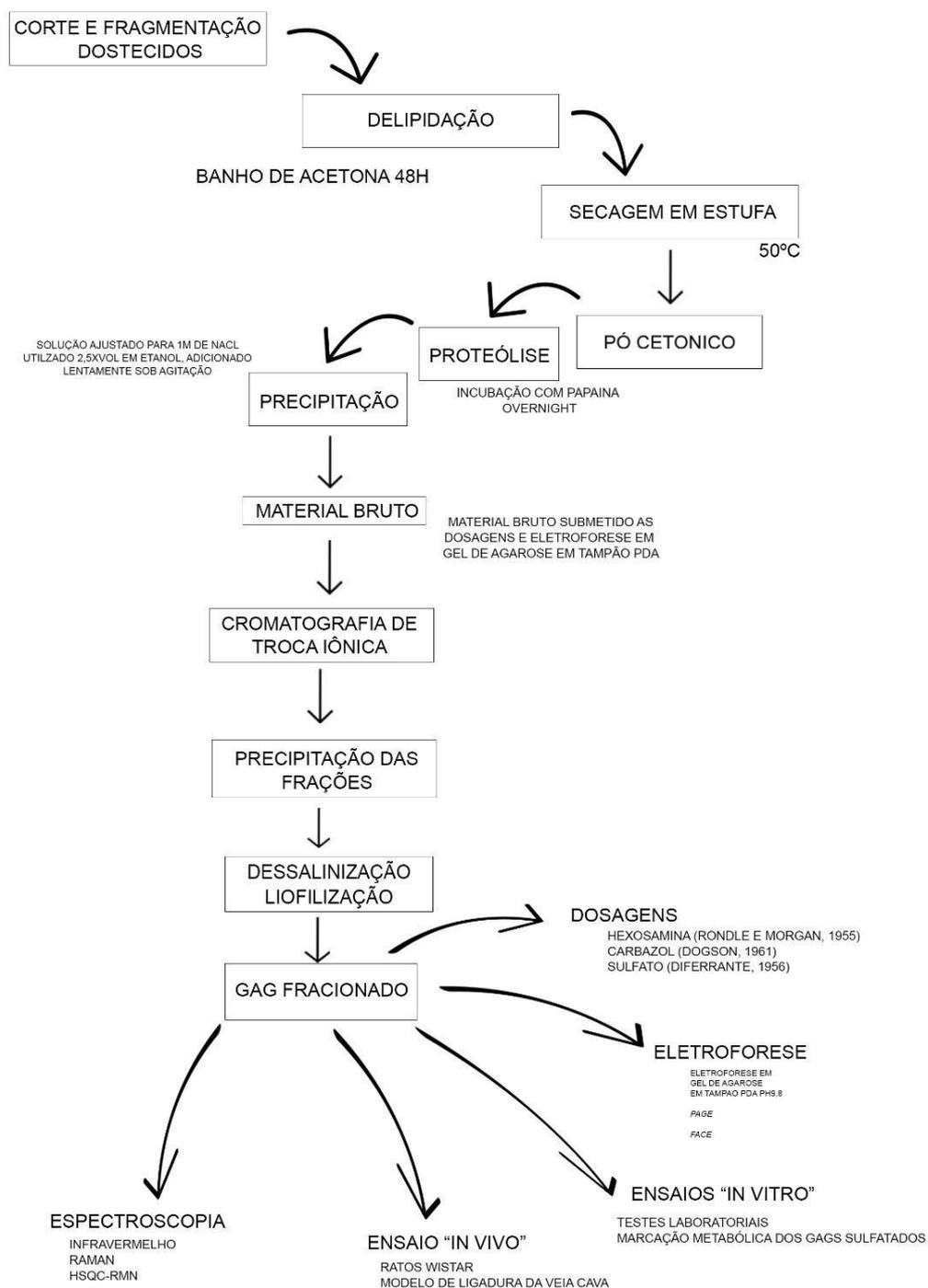


Figura 10- Representação esquemática do processo de extração, purificação e caracterização dos GAGs (Fonte: próprio autor)

3.2.2. Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA)

A identificação e a quantificação dos GAGs presentes nas amostras de tecidos foram obtidas por eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA), como descrito por Dietrich e colaboradores (DIETRICH; DIETRICH, 1976). Soluções de 10 mg/ml de cada amostra foram feitas e alíquotas de 5µL aplicadas em lâmina de gel de agarose 0,55% em tampão PDA pH 9,2. A corrida eletroforética foi submetida a diferença de potencial de 100V até a migração apropriada, em câmara refrigerada caixa refrigerada a 4 °C. O tampão PDA discrimina CS, DS e HS por ordem decrescente de mobilidade eletroforética, refletindo a interação da diamina com os compostos, ou seja, quanto maior a interação do composto com o tampão menor será a carga residual presente na estrutura e em decorrência disso menor a migração das bandas eletroforética (DIETRICH; DIETRICH, 1976). Após a migração eletroforética, as lâminas foram então imersas em uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0.1% por um período mínimo de 2 horas, a temperatura ambiente, para a precipitação das bandas de glicosaminoglicanos (GAGS). O gel foi então seco sob corrente de ar quente e corado com uma solução de azul de toluidina 0.1% em etanol P.A. 50% e ácido acético 1% por no mínimo 20 minutos. O excesso do corante foi então removido com solução de Etanol P.A. 50% e ácido acético 1%. A aquisição da imagem das lâminas foi realizada a partir da impressora multifuncional (modelo HPC3180) em modo de cores RGB resolução 600di. A quantificação das amostras feita posteriormente por densitometria a 525nm, comparando-se a intensidade de suas manchas metacromáticas com as de padrões de concentração conhecida, o método possui um erro na ordem de 5%.

3.2.3. Dosagens químicas

Com as preparações de GAGS brutas e purificadas de diferentes origens foram realizadas as análises químicas descritas a seguir:

3.2.3.1. *Dosagem de Ácido Urônico*

As dosagens de ácido urônico foi realizada segundo o método proposto por Dische (1947) e posteriormente adaptado por Ferrante, Donnelly e Berglund (FERRANTE *et al.*, 1971), onde nos tubos com as amostras contendo 5 µg e 10 µg de amostra, com volume final de 250 µL (completados com água destilada), foram adicionados 2,5 mL do reagente borato (tetraborato de sódio 0,4% em ácido sulfúrico) e 100 µL de carbazol 0,1% em metanol 95%. Os tubos foram agitados cuidadosamente em vórtex e colocados em banho fervente por 15 minutos, a leitura foi realizada na absorvância em 525 nm no espectrofotômetro SP-22, em temperatura ambiente. Os valores de Ac glucurônico foram calculados baseados em uma curva padrão com Ac D-glucurônico.

3.2.3.2. *Dosagem de Açúcares Aminados*

A dosagem de hexosaminas foi conduzida conforme o método de Elson e Morgan (1933) modificado por Rondle e Morgan (RONDLE; MORGAN, 1955). O material foi hidrolisado em capilares com HCl 6M por 4h a 100°C com posterior evaporação do ácido a vácuo sob NaOH. Após as secagens, ressuspendeu-se as amostras em 200µL de H₂O e adicionado 200µL de reagente de acetilacetona (preparado na hora: 5mL de Na₂CO₃ e 0,15mL de acetilacetona), as amostras foram submetidas a incubação sob pressão a 100°C por 20 min e após resfriar até temperatura ambiente adicionou-se 2 mL de Etanol P.A e 200µL do reagente de Ehrlich (preparado na hora: 1,6g de p-dimetilaminobenzaldeído, 30mL de HCl P.A e

30mL de Etanol PA). A leitura foi realizada a 530 nm e os valores de Hexosamina foram calculados baseados em uma curva padrão com N-acetil-glucosamina.

3.2.3.3. *Dosagem de Sulfato Inorgânico*

A dosagem de sulfato inorgânico foi realizada como proposto por Dodgson (DODGSON, 1961), para isso foi realizado a hidrólise do material em capilares com HCl 8M a 100°C por 6h. Posteriormente o material foi lavado dos capilares e secos no dessecador com NaOH para neutralização do ácido. Às amostras foram então adicionadas 1,4 mL de água destilada e 0,5mL do reagente de gelatina-BaCl₂ (0,5% de gelatina e 0,5% de BaCl₂). O sulfato foi então dosado por turbidimetria com bário/gelatina após hidrólise. As leituras foram realizadas a 500 nm e os valores de sulfato foram calculados com base em uma curva padrão de sulfato de sódio.

3.2.3.4. *Dosagem de Proteínas*

As dosagens de proteínas foram realizadas conforme o método de (BRADFORD; M. M. BRADFORD, 1976) método de Bradford (1976). Tubos contendo 2µL e 4µL das frações enzimáticas ou soluções de GAGs (10µg/µL), com ajustado com H₂O para um volume final de 100µL. foram adicionados na sequência 2,9 mL do reagente de Comassie brilliant blue BG-250, a leitura da absorbância das amostras foi realizada a 595 nm no espectrofotômetro. Os valores de proteína foram calculados por meio de curva padrão de albumina.

3.2.4. Purificação dos extratos brutos por cromatografia de troca-iônica (Q-Sepharose Fast Flow)

Após a eletroforese as amostras proteolisadas foram submetidas à Cromatografia de troca-iônica (Q-Sepharose Fast Flow). As frações foram solubilizadas em H₂O destilada e aplicadas 1mg de material para cada 1mL de volume de resina (“*bed volum*”) previamente ativada com NaCl 4M e equilibrada com água destilada. O material foi então eluído com concentrações crescentes de NaCl, por adição “*step wise*” usando um volume três vezes o da resina, totalizando assim cinco frações (Amostra, H₂O, 0.5M, 1M e 2M). Os eluatos foram então precipitados com 2,5 volumes de etanol PA, adicionados lentamente, sob agitação e deixados “overnight” a -20°C, as frações foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos, o precipitado coletado foi seco a vácuo, solubilizadas em H₂O destilada em um volume suficiente para solubilizar o material, que logo em sequência foi dialisado (utilizando Spectra/POR®) e analisado por eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA).

3.2.5. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

A estimativa da massa molecular dos GAGs foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (DIETRICH; NADER, 1974; HILBORN; ANASTASSIADIS, 1971). Alíquotas (10 µg) das amostras ressuspensas em 20 µL (2:1) de tampão de amostra (Tris 40 mM, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, glicerol 40%, vermelho de cresol 0,05%) e aplicadas ao gel de poliacrilamida 7,5% em tampão Tris-HCl 20nM preparado na hora, em lâminas de 7,2 cm com espaçadores de 1,5mm, contendo 10 poços de 0,5 cm foram inseridos entre as placas. Realizou a corrida utilizando o sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell, a uma voltagem de 100V em tampão de corrida contendo Tris 40mM, NaCl 20mM, EDTA 2mM a 100V, a corrida foi acompanhada pela migração do vermelho de cresol no tampão de amostra. Após a corrida os géis, imersos em uma solução de ácido acético 1% até total remoção do corante utilizado no tampão de amostra, em sequência esses foram lavados com H₂O e corados com

uma solução de azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% por 5min. O excesso de corante foi removido com solução de ácido acético 1% e o gel digitalizado e submetido a análise pelo programa TotalLab t 120 1D v 2009 (Nolinear Dynamics Ltd.) onde a distância percorrida pelos compostos (R_f) puderam ser determinados e em seguida através de uma regressão linear a massa molecular modal dos compostos analisados pode ser estimada. Esse método correlaciona então a distância percorrida pelos compostos com o inverso do logaritmo do seu peso molecular, usando para o preparo da curva de calibração três polissacarídeos de massas moleculares conhecidos (Dextran, C4S e C6S) (DIETRICH; NADER, 1974; HILBORN; ANASTASSIADIS, 1971).

3.2.6. Caracterização espectroscópica

3.2.6.1. Espectroscopia no Infravermelho

Os GAGs extraídos e purificados foram analisados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Os espectros foram obtidos no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICE) da Universidade Federal de Juiz de Fora mediante auxílio do Dr. Arthur Girardi Carpane. Os espectros gerados foram comparados com os valores da literatura para os GAGs. Para esta análise utilizou-se um espectrômetro Bruker modelo Alpha e as leituras foram realizadas na região entre 4000-400 cm^{-1} .

3.2.6.2. Espectroscopia Raman

Os GAGs extraídos e purificados foram analisados por espectroscopia Raman. Os espectros de Raman foram obtidos através do instrumento Bruker RFS 100 operando a 1064 nm, em 100 mW de potência de laser e realizada leituras de 3500-200 número de onda/cm. Todas as análises Raman foram realizadas com a ajuda da Dr^a Lenize Fernandes Maia no Núcleo de Espectroscopia do Instituto de Ciências Exatas (ICE) da Universidade Federal de Juiz de Fora coordenado pelo Prof.

Luiz Fernando Cappa de Oliveira e comparados com valores já estabelecidos na literatura.

3.2.6.3. *Ressonância magnética nuclear*

Os espectros de RMN das amostras foram realizados a 25 °C utilizando espectrômetro Bruker Avance III 500MHz. Foram utilizados 20 mg das amostras previamente submetidas à liofilização. Como sonda foi utilizada a *pa_txi_5mm Bruker*. Optimizada para observação do ^1H , com o pulso *noesygppr1d Bruker*. Com tamanho da janela (*spectral width*, SW) de 19,9927ppm (10000Hz), com “*time domain*” (TD) de 65536 e o número de scans realizados (NS) de 8. O padrão interno utilizado foi 2,2,3,3,- tetradeuterium-3-trimethylsilylpropionate, TMSP-d4: ($\delta=0$).

3.2.7. **Atividade antitrombótica *in vitro***

Para os ensaios de atividade anticoagulante *in vitro* foram utilizados kits comerciais doados ao laboratório de Glicoconjugados da UFJF pela Labtest®. Os testes descritos a seguir foram realizados de acordo com as especificações dos fabricantes e seus respectivos manuais de referência.

3.2.7.1. *Tempo de Trombina (PT)*

A determinação do tempo de trombina foi realizado utilizando plasma comercial de carneiros, contendo 10 μg das amostras de GAGs extraídos ou 5 μg de heparina (controle), também foi incubado plasma sem a adição de nenhum outro fator. Para este ensaio incubou-se por 3 minutos, a 37°C, 100 μL de um pool de plasma citratados 3,2%. Adicionou-se então ao plasma 200 μL do reagente 1, contendo extrato de cérebro de coelho liofilizado ($\geq 2\%$) em tampão tris-glicina 74,8mmol/L, cloreto de cálcio 22,2mmol/L, azida sódica 2,15mmol/L e estabilizadores. 9 segundos é resultado.

O tempo de coagulação foi medido imediatamente após a adição do reagente 1 através de inclinações sucessivas no tubo (menores que 1 segundo). Após visualização da formação do coágulo, parou-se o cronômetro e registrou-se o tempo, o prolongamento no tempo de formação do coágulo, quando comparado com o branco e heparina, indica uma possível atividade dos GAGs extraídos no presente estudo no complexo protrombínico (fatores II, V, VII, X).

3.2.7.2. *Tempo de trombina parcial ativado (APTT)*

O APTT foi medido incubando uma alíquota de 100 µL de plasma comercial de carneiro, a 37°C por 5 minutos, com 10 µg de amostras (ou 1,5 µg de heparina, padrão). Foram adicionadas as amostras 100µL do reagente APTT (contendo fosfolipídio de cérebro de coelho), homogeneizadas e incubadas novamente a 37°C por 5 minutos, registrando o tempo de coagulação após a adição de 100µL de CaCl₂ 20mmol/L (pré-aquecido a 37°C). O reagente APTT contém fosfolipídios de extrato cerebral em quantidade otimizadas como substituto trombocitário e ácido elágico para ativação completa do fator XII, que forma um complexo com o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e com a pré-caliceína (PK). O fator XII ativado atua sobre o fator XI, ativando-o, o que na presença de fosfolipídeos e cálcio transforma o fator IX em uma enzima ativa (fator IXa), que por sua vez ativa o fator VIII, formando o complexo IXa-fosfolipide-VIIIa que ativa o fator X.

3.2.7.3. *Fibrinogênio*

O fibrinogênio foi medido a partir de sangue de carneiro comercial citratado (1:9) após remoção do plasma por centrifugação (15min- 3000rpm ou 1500g). Deste diluições foram preparadas conforme o manual do fabricante (Labtest® -Ref. 506), onde 0,1 mL da amostra ou controle eram diluídos em 0,9 mL do tampão R1, em seguida 0,2mL da diluição preparada foi incubada em banho-maria a 37°C por 5min. Após esse tempo 0,1 mL de trombina bovina (Reagente 2) foi adicionado ao tubo com o cronometro disparado simultaneamente. O tubo foi então inclinado de forma repetida em intervalos menores que 1 segundo observando-se a formação do coágulo que interrompa a movimentação do líquido. O cronometro era parado toda vez que isso

ocorria e o tempo era registrado. De maneira geral, na presença de elevada concentração de trombina, o tempo de coagulação do plasma citratado deve ser inversamente proporcional à concentração do fibrinogênio, para este trabalho o teste de fibrinogênio foi utilizado apenas para verificar a normalidade desse fator nas amostras analisadas

3.2.8. Quantificação do HS sintetizado por células endoteliais em cultura de células de aorta de coelho

3.2.8.1. Marcação metabólica dos GAGs sulfatados

Células endoteliais de aorta de coelho foram cultivadas no departamento de bioquímica da UNIFESP. As células foram cultivadas em placas de Petri (35x10mm) até atingirem a confluência. Em seguida as células foram lavadas com meio F12 na ausência de soro fetal bovino (SFB) e adicionado após lavagem um novo meio contendo 150 μ Ci/mL de [35S]-sulfato de sódio na presença ou ausência das frações de GAGs extraídos ou 100 μ g/mL de heparina (controle positivo) e mantidos por a 37°C, em atmosfera de 2,5% de CO₂, por 22 horas. Após o tempo de incubação, o meio foi removido e armazenado a -20°C, as células sem o meio foram lavadas com PBS por 3 vezes e mantidas em banho de gelo, sendo removidas na sequência com adição de 1mL de solução de uréia 3,5M em tampão tris-HCl 0,05M pH 8,0 e o uso de um “scraper”. Alíquotas de 20 μ L foram separadas para dosagens de proteínas.

3.2.8.2. Análise dos GAGs sintetizados

Alíquotas das células e do meio de cultura foram submetidos a proteólise por 4h a 60°C com uma solução de Maxatase 3mg/mL em tris-HCl 0,05M, pH 8,0 e NaCl 0,15M. Sendo posteriormente analisados por eletroforese em tampão PDA conforme descrito no item 3.1.4. Após a eletroforese as amostras foram analisadas e quantificadas pela exposição do gel de agarose a um filme radio sensível que excita íons de fósforo. Na sequência, o filme sensibilizado foi submetido a leitura dos íons excitados pelo aparelho CycloneTM, quantificando-os como unidade de luminescência.

Amostras com radioatividade conhecida foram também impressionadas ao filme, a quantificação da radioatividade de cada banda de GAG foi determinada empregando o uso do software OptiQuant™, com resultados expressos em cpm/ μ g de proteínas.

3.2.9. Atividade antitrombótica *in vivo* - ensaio de ligadura da veia cava em ratos winstar

A atividade antitrombótica *in vivo* foi realizada no Centro de Biologia da Reprodução, na Universidade Federal de Juiz de Fora. Os ensaios foram realizados de acordo com as boas práticas e manejo animais, tendo sido aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal. Protocolo: 022/2019. A atividade foi determinada em ratos machos do tipo Wistar, pelo método de ligadura da veia cava descrito por Reyers et al. (1980). Este consiste na realização de uma incisão no ventre do animal anestesiado, e exposição de cerca de 1cm da veia cava inferior e posterior ligadura da mesma com fio de algodão. A ligadura, por sua vez, ocorre na porção inferior da veia, anterior a sua ramificação em veia renal esquerda, e após realização deste procedimento, iniciou-se a contagem do tempo de uma hora. A cavidade abdominal do animal é então fechada e suturada com nylon, o animal mantido sob aquecimento e constante observação durante o decorrer da uma hora. Ao final desta, aproximadamente 2mL de sangue foram retirados por punção cardíaca do animal para testes posteriores APTT, PT e fibrinogênio. A parte inferior da veia cava foi então ligada, seccionada, sendo o pedaço entre os dois nós coletado e levado para uma placa de Petri com solução salina. Os nós foram desfeitos e o trombo, caso existente, foi liberado do interior da veia sendo coletado em papéis de filtro previamente secos e pesados. Foi definido como parâmetro para a análise do efeito antitrombótico o peso seco do trombo formado após uma hora de ligadura da veia cava, determinado pela diferença no peso do papel seco para o papel seco após a coleta do trombo. Como controle negativo, foram injetados 200 μ L de solução salina (NaCl 0,9%) pela veia caudal dos animais, para controle positivo utilizou-se a heparina na proporção de 1,5 μ L/g do animal administrados da mesma maneira. As amostras foram aplicadas em diferentes concentrações por grama de animal (μ L/g), os dados coletados foram então analisados através de teste estatístico One-way ANOVA, seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, utilizando o software Prism® 8.

3.2.10. Tratamento estatístico

Os dados coletados foram nos diferentes testes *in vivo* e *in vitro* foram então analisados através de teste estatístico One-way ANOVA, seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey quando necessário, sendo utilizado o software Prism® 8 para a execução dos testes. Para tal, foram realizados também a avaliação de possíveis "outliers", não havendo, foram testadas a normalidade das amostras de acordo com os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. De forma a satisfazer os requisitos do teste One-way ANOVA. Quando houve diferença significativa na análise de variância, procedeu-se com o teste de Tukey para múltiplas comparações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS OBTIDOS DE DIFERENTES TECIDOS

4.1.1. Extração e Caracterização dos GAGs de diferentes origens

Os GAGs estudados nesse trabalho foram extraídos a partir dos seguintes tecidos: pele de *Pseudopercis numida* (namorado), pele de *Argyrosomus regius* (corvina), pele de *Salmo salar* (salmão), pele de *Sus domesticus* (suínos) e de diferentes tecidos de olhos de *Bos taurus* (bovinos) (esclera, retina, humor vítreo, músculo ciliado, cristalino e córnea). Os tecidos, como descrito em Métodos 3.1.1, foram desidratados e delipidados em acetona, secos, triturados e o pó cetônico obtido foi submetido à proteólise com papaína em tampão fosfato-cisteína 0,05M, pH 6,5 (50mg de tecido/1mg de enzima). Após a proteólise, os GAGs foram precipitados com etanol e NaCl (1M) deixados a -20°C, por 18 horas. As amostras obtidas foram liofilizadas e analisadas por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05 M pH 9,0 (DIETRICH; DIETRICH, 1976).

Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05 M pH 9,0 é amplamente utilizado para a análise de GAGs e baseia-se na interação diferencial da diamina com os diferentes tipos de GAGs permitindo uma separação desses compostos após a aplicação de corrente elétrica (NADER, H. B.; DIETRICH, 1977). Dessa forma, compostos mais sulfatados e/ou com maior flexibilidade de sua estrutura (presenças de ácido L-idurônico), como o HS e heparina, interagem com a diamina de maneira que suas cargas são quase completamente neutralizadas por esta, resultando assim em uma menor migração no gel após a aplicação da corrente elétrica. Todavia, GAGs com menor densidade de cargas e/ou menor flexibilidade em sua estrutura, como o CS, apresentam maior migração devido a uma menor interação, e assim, possuindo uma maior densidade de carga negativa (DIETRICH; DIETRICH, 1976; DIETRICH; MCDUFFIE; SAMPAIO, 1977; NADER, H. B.; DIETRICH, 1977)

Após a corrida, os GAGs foram precipitados com brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON), secos e corados com azul de toluidina em ácido acético 1% e etanol 50%. Esse corante se complexa com grupos eletronegativos livres nas estruturas dos GAGs e essa interação, faz com que ocorra uma mudança na

absorção de ondas na região do espectro visível, causando alteração da cor do azul para o roxo, um fenômeno conhecido como metacromasia. Alternativamente, os géis também foram corados com azul de toluidina em tampão acetato de cálcio (concentração), pH 4,3. O pH da solução do corante se aproxima ao pKa do grupamento sulfato, permitindo assim a protonação deste. Dessa forma, a complexação com o corante ocorrerá somente nos grupos carboxílicos dos ácidos urônicos não ocorrendo metacromasia (SRIDHARAN; SHANKAR, 2012). O uso desse corante em diferentes pHs possibilita a identificação no gel da presença de estruturas carboxiladas e/ou sulfatadas.

A Figura 12 e Figura 13 apresentam as eletroforeses em gel de agarose dos materiais obtidos após a proteólise.

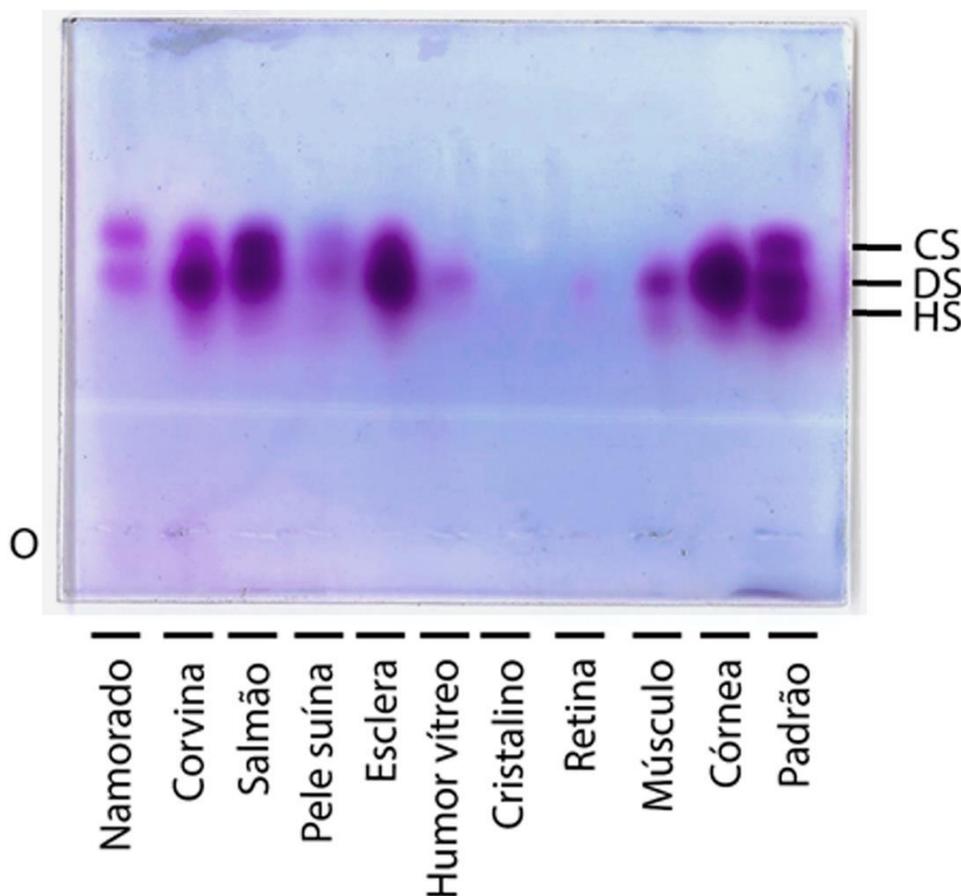


Figura 12- Eletroforese em gel de agarose de GAGs obtidos de diferentes tecidos (Fonte: Próprio autor) Alíquotas (5 μ L, solução 10 mg/mL) de GAGs de: Córnea, Músculo, Retina, Cristalino, Humor vítreo, Esclera, Pele Suína, Salmão, Corvina e Namorado, obtidos após a extração foram aplicadas no gel de agarose e submetidas a eletroforese em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0. Após a corrida, os GAGs presentes no gel foram precipitados CETAVLON, por 2h em temperatura ambiente. O gel foi seco e corado com corante azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1%/etanol 50%; P: mistura padrão contendo 5 μ g de GAG: CS (Condroitim Sulfato), DS (Dermatam Sulfato), HS (Heparim Sulfato); O: Origem.

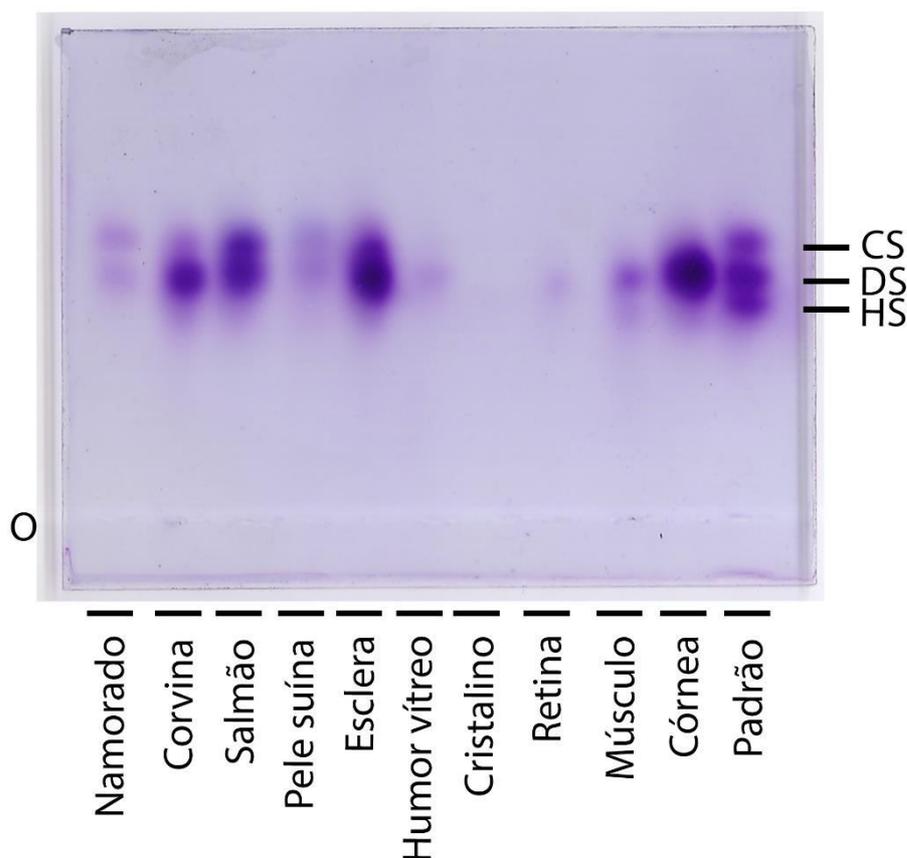


Figura 13- Eletroforese em gel de agarose de extratos de CS obtidos de diferentes fontes após corado com azul de toluidina pH 4.3. Aliquotas (5 μ L, solução 10 mg/mL) de GAGs de de GAGs de: Córnea, Músculo, Retina, Cristalino, Humor vítreo, Esclera, Pele Suína, Salmão, Corvina e Namorado, obtidos após a extração foram após a extração foram aplicadas no gel de agarose e submetidas a eletroforese em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0. Após a corrida, os GAGs presentes no gel foram precipitados CETAVLON, por 2h em temperatura ambiente. O gel foi seco e corado com corante azul de toluidina 0,1% em tampão acetato de cálcio, pH 4,3 (conc.); P: mistura padrão contendo 5 μ g de GAG: CS (Condroitim Sulfato), DS (Dermatam Sulfato), HS (Heparan Sulfato); O: Origem.

Todos os tecidos analisados, com exceção do cristalino, apresentaram pelo menos uma banda de coloração metacromática. Pode se observar, em todas as amostras, banda comigrando com padrão de DS, com intensidades diferentes, para cada tecido analisado. Esse fato demonstra a diferença do conteúdo desse GAG nos tecidos que foram extraídos. Em relação ao tecido cristalino, o não aparecimento de bandas pode ser explicado devido a uma baixa concentração de GAGs abaixo do limite de detecção do teste na amostra, impossibilitando assim a visualização destes através da complexação com o corante. As amostras de pele de salmão e namorado, apresentaram também, uma banda comigrando com CS.

A coloração dos diferentes géis com azul de toluidina nos diferentes solventes não apresentou alterações em relação às bandas presentes para cada tecido indicando a presença de compostos carboxilados e sulfatados.

As amostras foram submetidas às dosagens químicas para determinação da quantidade de GAGs nas extrações. A amostra de esclera apresentou um maior percentual, Tabela 1, com um total de 96,86g de GAG em relação ao peso do tecido seco, com um teor de 71% de teor de GAGs. Valor este muito acima do encontrado para o mesmo tecido na literatura, 0,7-0,9% (POLATNICK; LA TESSA; KATZIN, 1957). A amostra de cornea bovina apresentou o segundo maior teor de GAGs, 41%, e um total de 3,32g de GAGs em relação ao total do peso seco, valores estes também acima aos encontrados na literatura, onde este valor varia em torno de 2,2% de GAG por peso de material seco (MEYER *et al.*, 1953; POLATNICK; LA TESSA; KATZIN, 1957), enquanto outros autores relatam uma quantidade de GAGs nas córneas de 11,6 mg/g de tecido utilizado (WEYERS *et al.*, 2013). Essa amostra apresentou também uma elevada quantidade de proteínas, muito em função da quantidade de colageno presente no tecido (WEYERS *et al.*, 2013).

A amostra pele suína por sua vez apresentou um teor de GAGs de 24%, e um rendimento de 20,4g de GAGs total. Poblacion *et al* 1986, relata um teor de GAG para PS de 0,67 mg/g de material seco, em comparação com tal extração, obtivemos um resultado superior, de 254,2464 mg/g de material seco, outros autores também relataram rendimentos inferiores aos obtidos no presente estudo (DAMLE; CÖSTER; GREGORY, 1982; ET; ACTA, 1971). Para a amostra de humor vitreo o resultado obtido da extração foi de 21,31% de GAG, e um total de 0,5g de GAGs. Em comparação com outros autores o resultado relatado foi de 2,3% de GAG (PENG *et al.*, 2018). Para os demais tecidos de olhos bovinos as amostras de cristalino e musculo tiveram um teor total de GAG proximos, 18%. Enquanto para as amostras de corvina e salmão os rendimentos obtidos foram de 10,2% e 5,6%, respectivamente.

Diversos tipos de pele tem sido utilizados para a extração de GAGs. O rendimento geral apresentado nesses trabalho tem sido de 0,1% a até quantidades 1% (BEN MANSOUR *et al.*, 2009; GAVVA *et al.*, 2020; VIOLA *et al.*, 2006). Para o presente estudo, obtivemos um teor de 10,2% de GAGs para as amostras de salmão e de 5,6% para as amostras de corvina. Devido as restrições de movimentação e trabalhos impostas pela COVID-19 a, as amostras de pele de namorado não foram

avaliadas quimicamente, por esta razão seus valores se encontram não determinados (n.d) na tabela.

Tais variações nas extrações em comparação com a literatura, podem ser explicadas com base na seleção do método de extração. Como exemplo, para as extrações de PS, os autores, utilizam, em sua maioria, agentes alcalinizantes, obtendo os GAGs através de uma β -eliminação, para a liberação do carboidrato do tecido, ou da proteína, que este se encontra ligado. Já os métodos citados para CB, alguns utilizaram enzimas proteolíticas para a quebra dos esqueletos proteicos, e consequente, liberação do GAG do seu PG. No entanto, diferentes enzimas foram utilizadas para as extrações. A escolha destas pode influenciar no rendimento final da extração. Os autores citados descrevem a utilização de pepsina, tripsinas e actinase E para a extração (MEYER *et al.*, 1953; POLATNICK; LA TESSA; KATZIN, 1957; WEYERS *et al.*, 2013). A primeira dessas enzimas é uma protease aspártica, cujo mecanismo de ação mais aceito se dá pela quebra de dois resíduos, em sequência, de aspartato. Já as tripsinas, são endo peptidases, que possuem como mecanismo de ação a pela quebra de ligações peptídicas específicas, clivando as ligações após Arg ou Lys, mas não as seguidas de Pro. Para as nossas extrações a enzima proteolítica de escolha foi a papaína. Esta enzima (EC 3.4.22.2), atua tanto como uma endo ou exo-peptidases, preferencialmente clivando ligações também após resíduos de arginina e lisina, precedidos por um aminoácido hidrofóbico (CUNNINGHAM, 1970). As diferenças nas atividades catalíticas das enzimas proteolíticas, como a preferência pela clivagem de determinados grupos de aminoácidos, e pelo fato de a papaína atuar em qualquer ponto da cadeia proteica, podem explicar em parte a nossa extração ser um tanto mais eficiente.

Outras operações realizadas durante a extração também podem se mostrar importantes para explicar os resultados. Como a redução do tecido a um pó-cetônico, ao invés de pedaços de tecidos como apresentado pelos autores, favorecendo assim a superfície de contato e melhorando a digestão da enzima (MEYER *et al.*, 1953; POLATNICK; LA TESSA; KATZIN, 1957; WEYERS *et al.*, 2013). Outro ponto que difere de alguns autores da literatura para a extração, é a escolha do método de precipitação dos GAGs. Para o presente estudo o método de escolha foi, sob agitação, gotejando o etanol na presença de NaCl, conforme descrito no item 3.2.1. Todos esses fatores contribuem para explicar os obtidos.

Conforme mencionado anteriormente, GAGs são polímeros lineares formados por repetidas unidades dissacarídicas. Sendo essas compostas por um ácido urônico (dos tipos D-urônico e/ou L-Idurônico) ligado a uma hexosamina ou a um açúcar neutro, podendo, ou não conter sulfatações em sua estrutura (Item 1.3.2). Sendo assim, faz-se válido observar a composição das extrações com base na razão molar entre a GlcA e a GlcNac (GlcA:GlcNac) sendo esta teoricamente próxima de 1. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, as preparações de GAGs apresentaram razões variáveis entre as proporções molares de grupamentos de ácido D-glucurônico e hexosamina nas suas estruturas. Sendo as amostras de salmão, pele suína, humor vítreo e córnea, próximas de 1, conforme o esperado, tendo em vista que, a maioria das amostras comigraram com o DS na eletroforese em gel de agarose. Essas relações iguais a 1, não ocorrem para os polímeros de DS. Isso acontece, devido a presença do IdoA, uma vez que estes absorvem apenas 83% do UV quando comparado com CS (BITTER; MUIR, 1962). Logo, a relação de 1:1 esperada entre hexosamina e ácido urônico, observada em amostras de CS, não se faz linear para o DS.

Tabela 1 Rendimento de GAG de diferentes tecidos

Amostra	Peso úmido (g)	Peso seco (g)	Perda de água e/ou gordura (%)	GAG TOTAL (g) ^a	GAG TOTAL (g) ^b	TEOR DE GAG	TEOR DE GAG	Proteína (%)
Corvina	11,52	2,54	77,9	0,14	0,00149	5,641	0,143	n.d
Salmão	134,14	0,79	89,40	0,08	0,068	10,21	8,63	2,74
Namorado	276,41	106,71	61,39	n.d	n.d.	n.d	n.d	n.d
Pele Suína	215,64	85,4	60,4	20,43	12,9	23,99	14,20	9,73
Esclera	484,07	136,42	71,8	96,86	32,92	71,00	24,14	22,00
Retina	18,21	2,23	87,75	0,26	0,342	11,90	13,34	1,26
H. vítreo	600,97	2,35	99,6	0,50	0,476	21,31	20,24	12,21
Cristalino	42,52	16,16	61,99	2,93	1,039	18,17	6,43	2,19
Músculo	8,49	1,57	81,50	0,29	0,296	18,62	18,88	5,07
Córnea	41,06	8,00	80,51	3,32	2,374	41,45	29,67	63,81

a- Massa total de GAG, calculados com base nos valores de DS encontrados nas dosagens de hexosamina.

b- Massa total de GAG, calculados com base nos valores de DS encontrados nas dosagens de Acido Glucurônico

n.d – Não determinado

As demais amostras (corvina, esclera, retina, cristalino e músculo), também não apresentaram essa relação de 1:1. Tal achado pode ser explicado pela presença diferentes tipos de açúcares na estrutura dos GAGs. Uma vez que os materiais extraídos de corvina, esclera, cristalino e músculo possuem uma baixo teor de ácido glucurônico quando comparado com o de hexosamina. O mesmo resultado pode ser observado para as amostras de retina em relação a hexosamina.

Sendo assim, com base nas bandas eletroforéticas bem definidas comigrando com DS, as relações GlcA:GlcNAc coerentes com os padrões de DS encontrados na literatura (BITTER; MUIR, 1962; POBLACIÓN; MICHELACCI, 1986) e a facilidade de obtenção de material para extração. Selecionou-se para a sequência do trabalho os tecidos de pele suína e córnea bovina. As demais extrações serão utilizadas em outros trabalhos do laboratório para uma melhor elucidação dos GAGs que compõem tais tecidos.

Tabela 2- Dosagens químicas dos materiais brutos obtidos pós proteólise de diferentes origens e razões molares de GlcA / GlcNAc

Amostra	µg/100 µg de amostra		µmol/100µg		Razão
	GlcNAc	GlcA	GlcNAc	GlcA	GlcA / GlcNAc
Corvina	2,63±0,008	0,59± 0,007	1,19x10 ²	3,02 x10 ³	0,25
Salmão	4,75± 0,013	3,53± 0,023	2,15 x10 ²	1,82 x10 ²	0,85
Pele Suína	11,7± 0,006	5,8± 0,005	5,05 x10 ²	3,91 x10 ²	0,77
Esclera	33,04±0,003	9,86±0,022	1,49 x10 ²	5,08 x10 ²	0,34
Retina	5,54±0,006	6,26±0,022	2,51 x10 ²	3,23 x10 ²	1,28
H. vítreo	9,92±0,002	8,26±0,05	4,48 x10 ²	4,26 x10 ²	0,95
Cristalino	8,46±0,004	2,63±0,033	3,82 x10 ²	1,35 x10 ²	0,35
Músculo	8,67±0,004	7,71±0,03	3,92 x10 ²	3,97 x10 ²	1,01
Córnea	19,29±0,002	12,12±0,09	8,72 x10 ²	6,24 x10 ²	0,71

4.1.2. Purificação de GAGs de pele suína (PS) e córnea bovina (CB)

4.1.2.1. Cromatografia de Troca Iônica (Q-sepharose)

Após a extração do material bruto os materiais de CB e PS foram submetidos a uma precipitação com TCA 10%, para remoção das proteínas, e na sequência precipitados com etanol PA, dessalinizados e liofilizados. As amostras, foram então submetidas a uma cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose), utilizando-se um gradiente crescente de NaCl. Totalizando cinco frações denominadas de acordo com a concentração do sal aplicado. Sendo nomeadas de: amostra (A), água (H₂O), NaCl 0.05M, NaCl 1M e NaCl 2M. A Figura 14, apresenta a eletroforese em tampão PDA das amostras brutas após precipitação proteica com TCA de córnea bovina (CB) e pele suína (PS), assim como, as suas respectivas frações após a cromatografia de troca iônica. Podemos observar na figura que não houve aparecimento de nenhuma banda eletroforetica nas frações CB-A, CB-H₂O, PS-A e PS-H₂O. Indicativo de que todos os GAG presentes no material bruto permaneceu ligado a resina de Q-Sepharose. Podemos observar também, a presença de bandas eletroforéticas nas frações eluidas com NaCl1M e NaCl 2M, para as duas purificações, ambas comigrando com o DS presente no padrão utilizado. No entanto, para CB pode-se observar também a presença de uma banda eluída na fração CB-0,5M, comigrando com o padrão de DS. Analisando as eletroforeses das frações coradas com o azul de toluidina em diferentes pHs, Figura 15, pode-se observar, que houve significativa alteração na coloração das bandas apenas para a amostra de C-0,5M. Esse composto demonstrou maior intensidade na coloração quando o corante utilizado foi o azul de toluidina em pH 4,3. Sendo um indicativo de que a carga negativa presente no polímero possa ser mais devido a carboxila do que das sulfatações (NADER, H. B.; DIETRICH, 1977; SRIDHARAN; SHANKAR, 2012). O mesmo efeito não pode ser observado para as demais amostras, onde não houve consideráveis alteração na sua coloração.

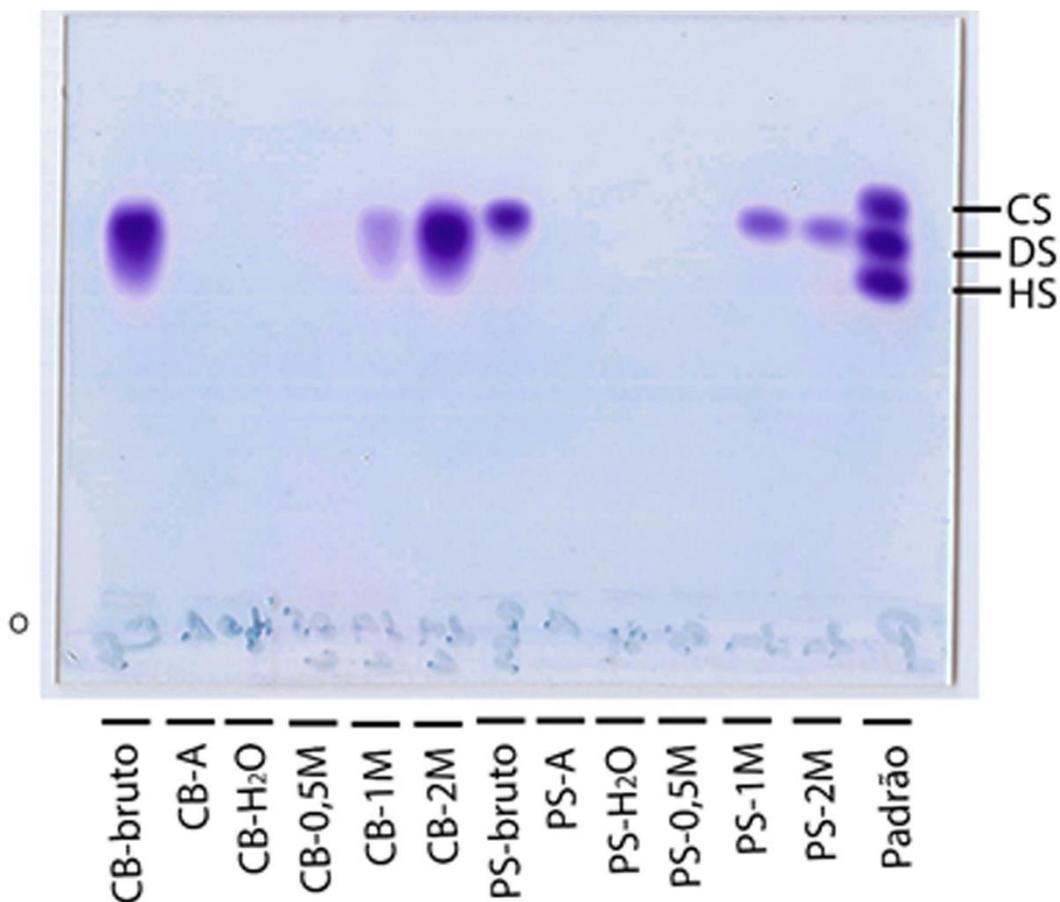


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose de extratos brutos de córnea bovina, pele suína e amostras após cromatografia de troca iônica corado com Azul de toluidina. Alíquotas (5 uL, solução 10 mg/mL) de cada extrato de CB e PS foram aplicadas no gel de agarose e submetidas a eletroforese em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0. Após a corrida, os GAGs presentes no gel foram precipitados com brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) por 2h em temperatura ambiente. O gel foi seco e corado com corante azul de toluidina 0,1% água:etanol:ácido acético (50:49:1); CB-Bruto: cornea bovina bruto, CB-A: cornea bovina amostra, CB-H₂O: córnea bovina eluída com água (0M de NaCl), CB-0,5M: cornea bovina eluída na concentração de 0,5M de NaCl, CB-1M: cornea bovina eluída na concentração de 1M de NaCl, CB-02M: cornea bovina eluída na concentração de 2M de NaCl, PS-Bruto: pele suína bruto, PS-A: pele suína amostra, PS-H₂O: pele suína eluída com água, PS-0,5M: pele suína eluída na concentração de 0,5M de NaCl, PS-1M: pele suína eluída na concentração de 1M de NaCl, PS-02M: pele suína eluída na concentração de 2M de NaCl, Padrão: mistura padrão de glicosaminoglicanos contendo 5µg de cada GAG: CS (Condroitim Sulfato), DS (Dermatam Sulfato), HS (Heparam Sulfato); O: Origem.

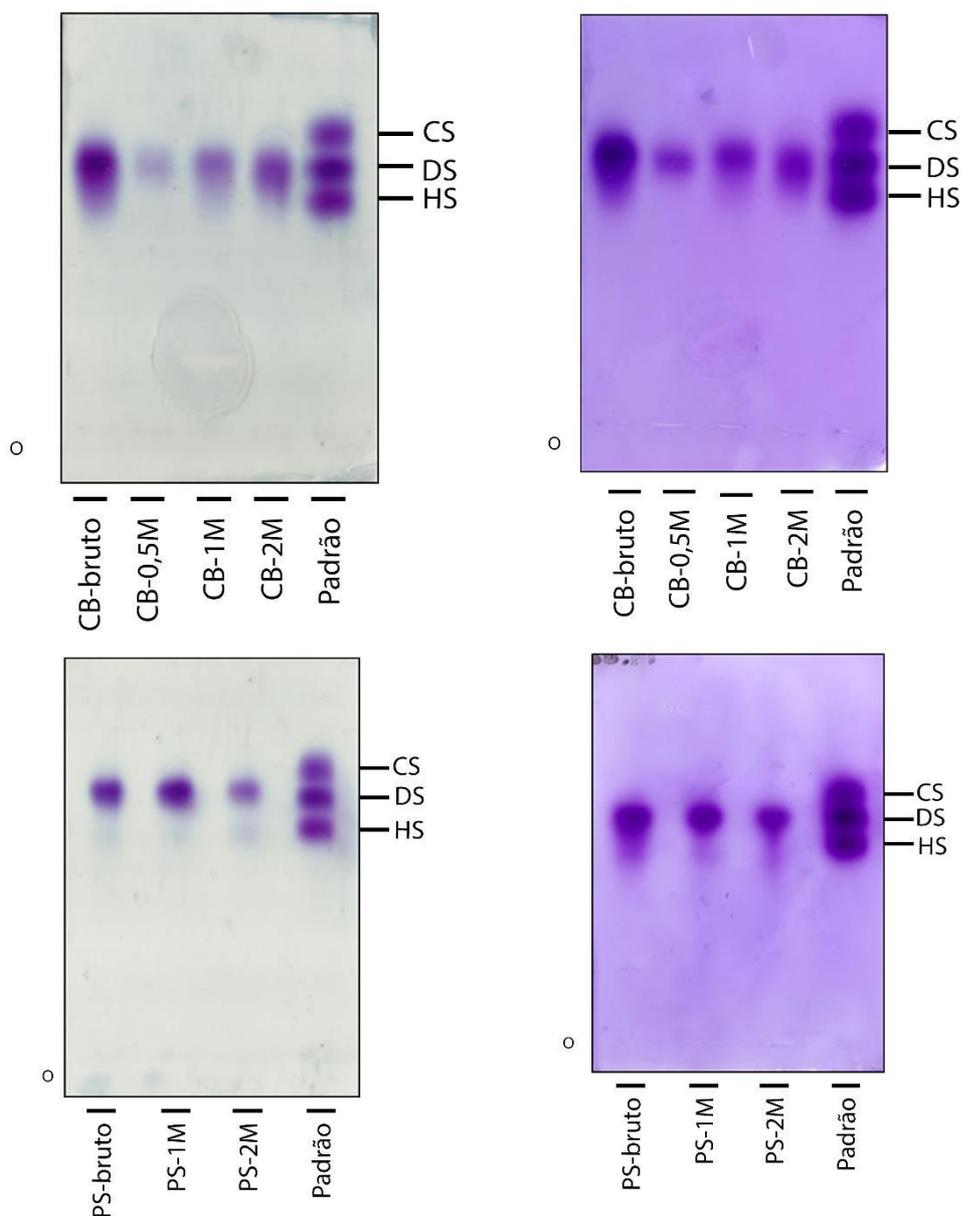


Figura 15- Eletroforese em gel de agarose dos extratos brutos de pele suína e amostras após cromatografia de troca iônica. Aliquotas (5 μ L, solução 10 mg/mL) de cada extrato de CB e PS foram aplicadas no gel de agarose e submetidas a eletroforese em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0. Após a corrida, os GAGs presentes no gel foram precipitados com brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) por 2h em temperatura ambiente. O gel foi seco e corado com corante azul de toluidina 0,1% água:etanol:ácido acético (50:49:1) escaneado e corado novamente com azul de toluidina em tampão acetato de cálcio pH 4.3; CB-Bruto: cornea bovina bruto, CB-0,5M: cornea bovina eluído na concentração de 0,5M de NaCl, CB-1M: cornea bovina eluído na concentração de 1M de NaCl, CB-02M: cornea bovina eluído na concentração de 2M de NaCl, PS-Bruto: pele suína bruto, PS-A: pele suína amostra, PS-H₂O: pele suína eluída com água, PS-1M: pele suína eluído na concentração de 1M de NaCl, PS-02M: pele suína eluído na concentração de 2M de NaCl, Padrão: mistura padrão de glicosaminoglicanos contendo 5 μ g de cada GAG: CS (Condroitim Sulfato), DS (Dermatam Sulfato), HS (Heparam Sulfato); O: Origem.

4.1.3. Caracterização físico-química dos GAGs obtidos após cromatografia

4.1.3.1. Dosagens químicas

Como parte da avaliação preliminar das amostras purificadas, dosagem química foram realizadas para determinar a concentração de GAGs presentes nas frações, assim como obter indicativos de algumas características estruturais através das avaliações da quantidade de ácido urônico (GlcA), hexosamina (GlcNAc) e sulfato (SO_4^{2-}) conforme apresentados na Tabela 3. Pode se observar através das dosagens um conteúdo reduzido de sulfato para a amostra CB-0,5M, condizente com a eletroforese onde a fração apresentou coloração azulada com pouca metacromasia, e uma menor carga considerando que foi necessário um gradiente iônico de 0,5M de sal para a retirada da estrutura da resina (HEALTHCARE, 2016). Pode-se observar também, que as relações entre GlcA:GlcNAc, das amostras de CB-1M, PS-1M se mantem condizentes com amostras de DS encontradas na literatura (BEDINI *et al.*, 2019; POBLACIÓN; MICHELACCI, 1986). No entanto, apresentando diferenças nas dosagem, o que podem refletir diferenças estruturais na composição dos polímeros, tanto para a relação GlcA:GlcNAc, quanto para SO_4^{2-} :GlcNAc. Pode se observar também, que as amostras de CB-2M possuem um conteúdo reduzido de GlcA e PS-2M um conteúdo reduzido de GlcNAc. Todavia, com os dados até então apresentados esses valores podem ser usados apenas como indicativos de que os GAGs possuem diferenças estruturais com relações as demais frações, esses pontos, serão discutidos com mais detalhes posteriormente no trabalho.

Tabela 3: Dosagens químicas das amostras purificadas em cromatografia de troca iônica

	$\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de amostra			μmol			Razão molar	
	GlcNAc	GlcA	SO_4^{2-}	Hex	GlcA	SO_4^{2-}	GlcA/Hex	$\text{SO}_4^{2-}/\text{Hex}$
CB- 0,5M NaCl	29,76±0,004	20,12±0,11	6,83±0,001	0,135	0,104	0,079	0,771	0,591
CB- 1M NaCl	35,82±0,006	19,45±0,06	11,17±0,009	0,162	0,100	0,130	0,619	0,802
CB- 2 M NaCl	42,18±0,004	8,58±0,03	20,33±0,007	0,191	0,044	0,236	0,232	1,240
PS- 1M NaCl	27,03±0,002	26,30±0,12	12,5±0,001	0,122	0,135	0,145	1,109	1,189
PS- 2M NaCl	19,15±0,007	27,29±0,21	8,33±0,002	0,087	0,141	0,097	1,624	1,119

GlcNAc – N- acil glucosamina, **GlcA**- ácido D-glucurônico, **SO_4^{2-}** - Sulfato, **Hex** – Hexosamina, μg - micrograma, μmol - micromol.

4.1.4. Determinação da massa molecular

A massa molecular modal dos GAGs extraídos e purificados de córnea bovina e pele suína foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito em métodos. A Figura 16 apresenta uma imagem representativa da eletroforese e a equação da reta utilizada para o cálculo do peso molecular modal dos compostos, no qual a velocidade de migração, determinada pelo fator de retenção (R_f) é inversamente proporcional ao logaritmo do peso molecular. A Tabela 4 apresenta as massas moleculares modais estimadas para cada um dos GAGs purificados. Para a obtenção destes valores utilizou-se a equação da reta mostrada na Figura 16 (B) e os valores de R_f (fator de retenção) que foram determinados para cada uma das amostras, assim como os padrões.

Pode-se observar que os GAGs extraídos da Córnea, CB-1M e CB-2M, foram os compostos de maior massa molecular, com 37,37kDa e 39,38 kDa, respectivamente, valores condizentes ao encontrado para GAGs extraídos de CB (ACHUR *et al.*, 2004; MICHELACCI, 2003) . Já o composto purificado em CB-0,5M não apresentou bandas coradas, em parte esse resultado pode ser explicado pelo tamanho do polímero, logo este não penetrou e difundiu-se no gel como os outros. Outro fator, importante que podemos apresentar para explicar a ausência de coloração, pode ser a ausência de grupamentos sulfatos na estrutura dos GAGs, uma vez que o corante utilizado se baseia na ligação com grupamentos negativamente carregados pelo sulfato gerando assim um shift na coloração para o roxo.

Por sua vez, os GAGs purificados de PS apresentaram massas moleculares modais semelhantes entre si, sendo de 21,9 kDa para PS-1M e 21,99 kDa para PS-2M, valores estes dentro do esperado de acordo com a literatura (FRANSSON *et al.*, 1974; MASCELLANI *et al.*, 1993b; MICHELACCI, 2003). Cabe aqui ressaltar que, algumas alterações na massa modal dos GAGs, podem ser resultantes de reações ocorridas durante o processo de extração, por exemplo, Poblacion 1986, cita uma massa modal de 13 kDa para os GAGs extraídos de PS, com uma variação de 7 a 23 kDa entre as estruturas. Essa variação encontrada, pode ser explicada pelo método de extração escolhido, o que no caso, foi uma hidrólise alcalina. Tal método pode ter impactado a cadeia do polímero. Conforme descrito, para o presente estudo utilizou-

se a uma enzima para a quebra das proteínas e consequente liberação dos GAGs e na sequencia processos de purificação visando não alterar a estrutura do polímero.

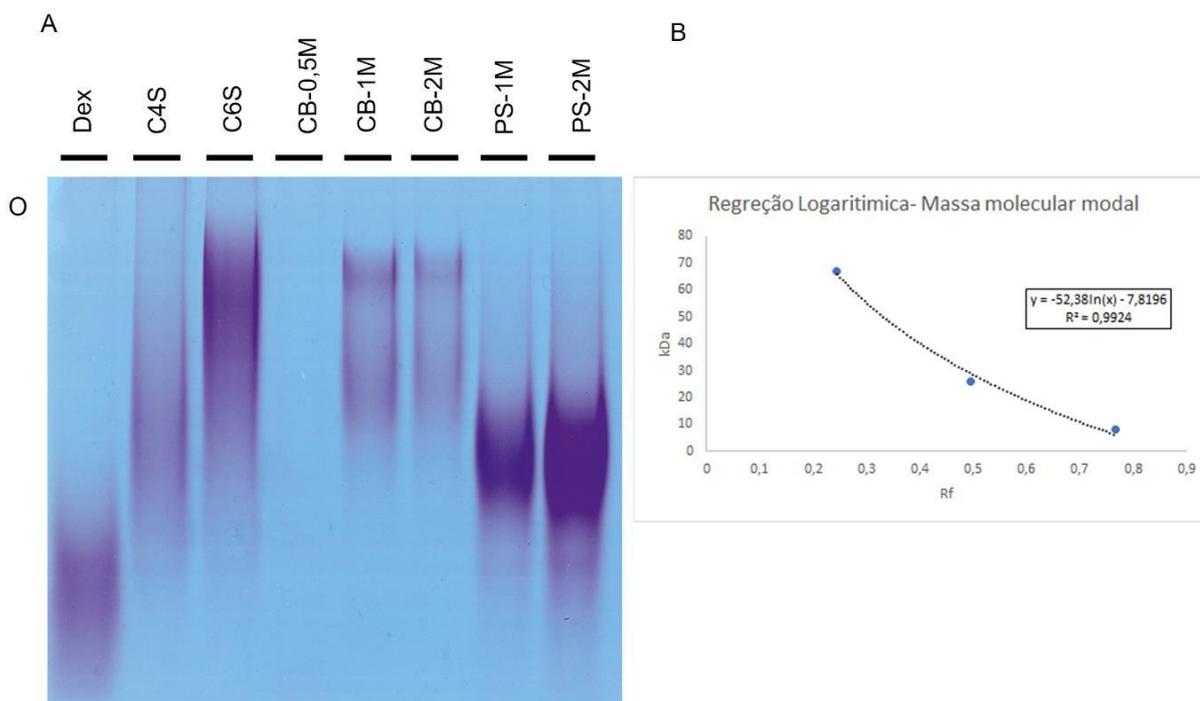


Figura 16 – (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida e (B) equação da reta utilizada para determinação da massa molecular modal dos GAGs extraídos e purificados de córnea bovina e pele suína determinação da massa molecular modal das amostras. Alíquotas (5ug) dos GAGs foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4. Após a corrida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1%. O gel foi submetido à densitometria e as distâncias de migração foram medidas (Rf), determinando-se massa modal de acordo com o pico de intensidade de cada amostra. DEX: Dextran comercial (8kDa), C4S: CS comercial de traqueia bovina (26kDa); C6S: CS comercial de tubarão (67kDa); CB-0,5M: córnea bovina eluído na concentração de 0,5M de NaCl, CB-1M: córnea bovina eluído na concentração de 1M de NaCl, CB-02M: córnea bovina eluído na concentração de 2M de NaCl, PS-1M: pele suína eluído na concentração de 1M de NaCl, PS-02M: pele suína eluído na concentração de 2M de NaCl; O: Origem.

Tabela 4: Massa molecular modal estimada dos GAGs presentes em CB e PS após a purificação.

Amostra	Fator de Retenção (Rf)	Massa Molecular Modal ^a
Padrão DEX	0,766	8,0
Padrão C4S	0,495	26,0
Padrão C6S	0,245	67,0
CB-0,5M	-	-
CB-1M	0,422	37,37
CB-2M	0,403	39,78
PS-1M	0,567	21,90
PS-2M	0,566	21,99

a- kDa

4.1.5. Análise espectroscópica de absorção no infravermelho

A espectroscopia de infravermelho é amplamente utilizada para a caracterização de GAGs encontrados na matriz extracelular de mamíferos, como o CS, DS, KS, HS/Hep e HA (LONGAS; RUSSELL; HE, 1986). Dessa forma os GAGs purificados foram submetidos à análise espectroscópica de absorção no infravermelho para análise e identificação dos principais grupos funcionais presentes nas frações.

A Figura 17 apresenta o espectro dos GAGs purificados. Importa destacar a absorbância ampla e intensa observada na região de 3334 cm^{-1} atribuída à vibração de estiramento do grupo O-H presente em todos os GAGs analisados (PAVIA *et al.*, 2010). Além da absorção em 2926 cm^{-1} característica do estiramento vibracional de anéis de açúcar (BAI *et al.*, 2018). Ao analisar a região digital dos espectros como na Figura 18, pode-se observar uma evidente ausência de picos para a amostra CB-0,5M na região atribuída ao estiramento de S=O, uma vez que este é representado por um complexo de absorção centrado próximo a 1248 cm^{-1} (MAINRECK *et al.*, 2011). Já para as amostras CB-2M podemos observar também uma ausência de picos relacionados aos sinais atribuídos à vibração de estiramento antissimétrico de grupos COO^- (MAINRECK *et al.*, 2011), tal resultado, apoia as evidências encontradas nas dosagens referente a fração, Tabela 3, sendo estas consideravelmente baixa pra GlcAC.

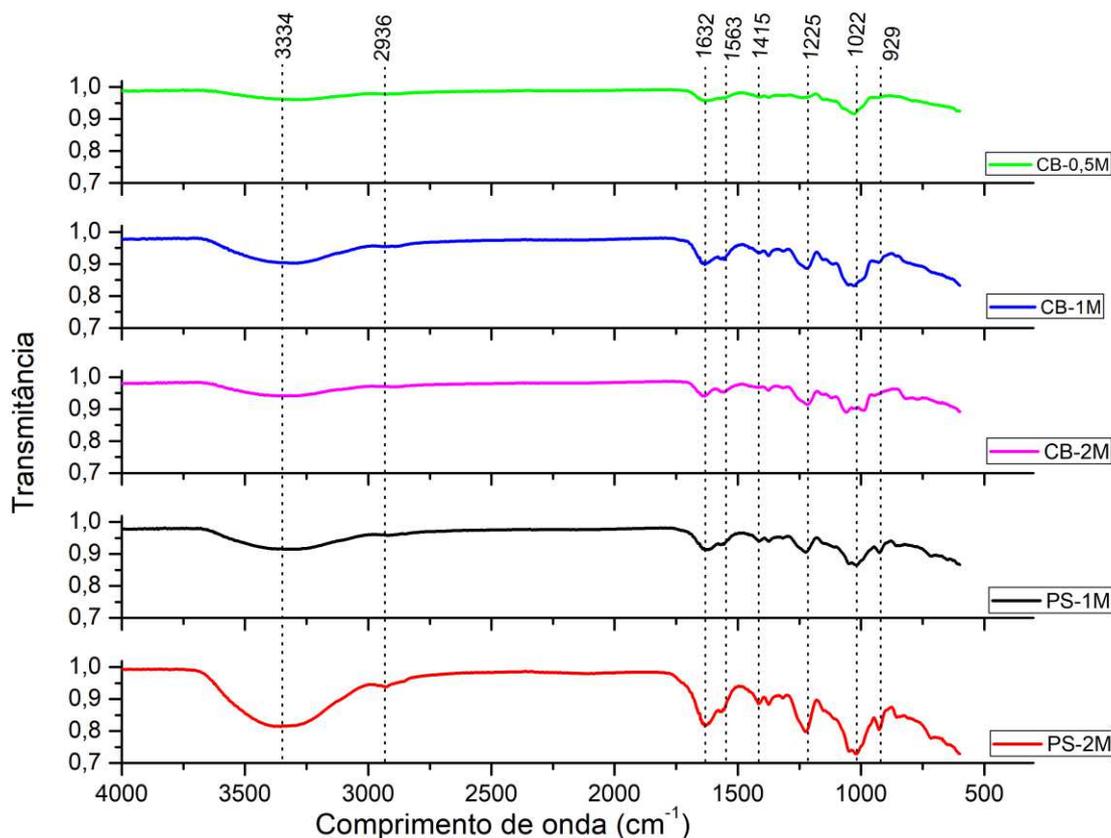


Figura 17 – Espectro infravermelho dos GAGs purificados de córnea bovina e pele suína. (C05M: córnea bovina eluído na concentração de 0,5M de NaCl, C1M: córnea bovina eluído na concentração de 1M de NaCl, C2M: córnea bovina eluído na concentração de 2M de NaCl, P1M: pele suína eluído na concentração de 1M de NaCl, P2M: pele suína eluído na concentração de 2M de NaCl).

De maneira geral, outros sinais podem ser destacados e observados nos espectros como os sinais próximos a 1022 cm^{-1} relacionados às vibrações do esqueleto de C-O-C, em 1219 cm^{-1} no qual a presença de picos nos espectros atribuídos a vibrações de estiramento de S=O, podem ser atribuídos a algumas amostras, visto que, a vibração do grupo sulfato é representada por um complexo de absorção centrado próximo a 1248 cm^{-1} assim como mencionado anteriormente (MAINRECK *et al*, 2011). De acordo com BAI (2018), os picos encontrados próximos a 1556 cm^{-1} podem ser relacionados às variações no ângulo de vibração de N-H. Já os sinais próximos a 1629 cm^{-1} , podem ser relacionados para a maioria da amostra aos sinais de vibração de estiramento antissimétrico de grupos COO^- (MAINRECK *et al*, 2011).

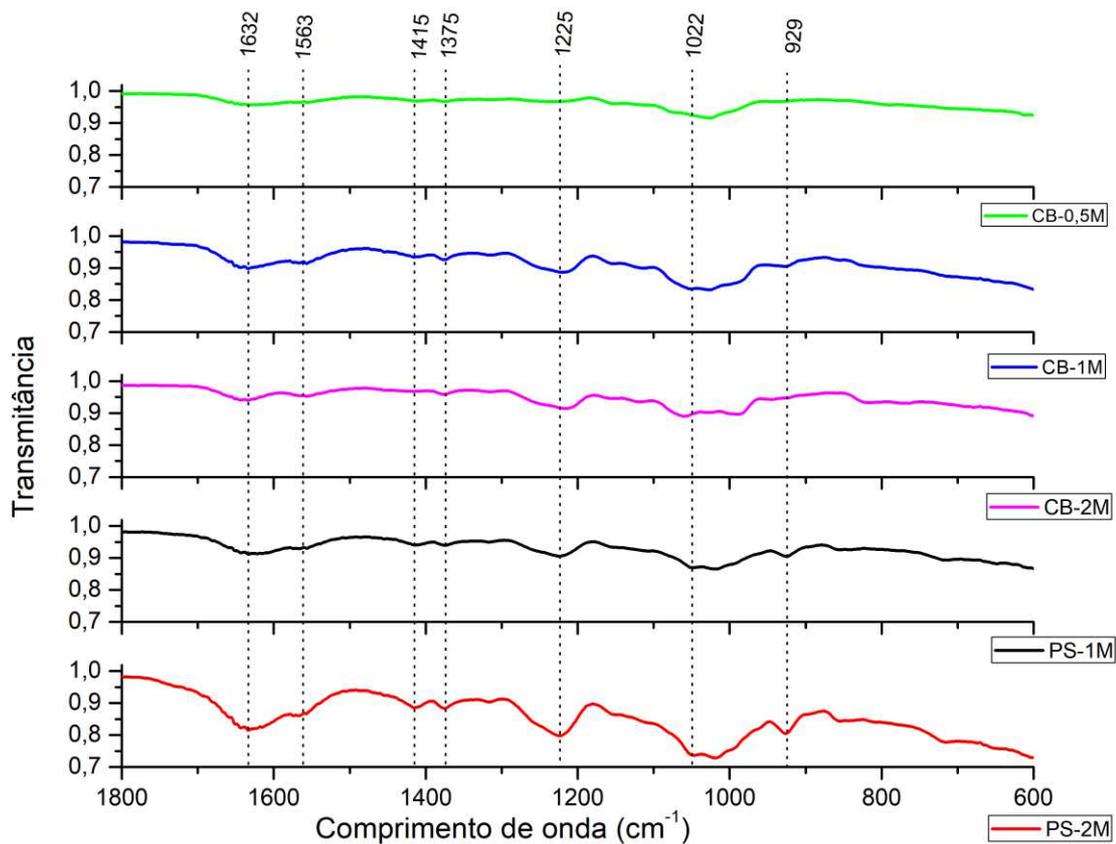


Figura 18 – Espectro infravermelho da região digital das moléculas de GAGs extraídos de CB e PS. (C05M: cornea bovina eluido na concentração de 0,5M de NaCl, C1M: cornea bovina eluido na concentração de 1M de NaCl, C2M: cornea bovina eluido na concentração de 2M de NaCl, P1M: pele suína eluido na concentração de 1M de NaCl, P2M: pele suína eluido na concentração de 2M de NaCl).

Através da espectroscopia de infravermelho, associada com os resultados acima descritos podemos confirmar a ausência de grupamentos sulfatos no GAG extraído de CB-0,5M Figura 19, e a ausência de carboxila para o GAG purificado em CB-2M. Podemos afirmar também que os GAGs purificados em CB-1M, PS-1M e PS-2M apresentam semelhantes grupos funcionais em sua estrutura.

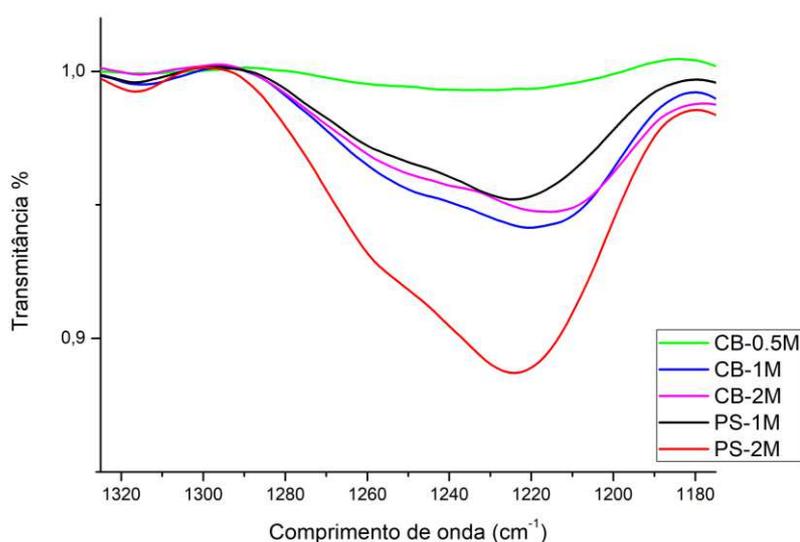


Figura 19- Espectro infravermelho da centrada em 1248 cm^{-1} atribuído a região de estiramento de sulfato para as estruturas purificadas de CB e PS. (C05M: cornea bovina eluído na concentração de 0,5M de NaCl, C1M: córnea bovina eluído na concentração de 1M de NaCl, C2M: córnea bovina eluído na concentração de 2M de NaCl, P1M: pele suína eluido na concentração de 1M de NaCl, P2M: pele suína eluido na concentração de 2M de NaCl).

4.1.6. Análise espectroscópica Raman

A espectroscopia Raman é uma análise baseada nas vibrações originadas de uma mudança na polarização da molécula através de interações entre o campo elétrico da radiação incidente e o momento dipolo, sendo assim o momento pode ser considerado induzido pela radiação eletromagnética devendo assim haver uma variação na polarizabilidade da molécula durante a vibração. Desse modo, os espectros Raman e infravermelho atuam de forma complementar para a análise estrutural, uma vez que neste é necessário que haja uma variação no momento dipolar durante a vibração (RUDD *et al.*, 2010).

A análise espectroscópica de RAMAN dos GAGs purificados de diferentes tecidos está representada na Figura 20. Podemos notar a presença de um sinal com maior intensidade em 1070 cm^{-1} , presente em todas as amostras, com exceção de CB-0,5M, e que pode ser atribuída a vibrações de ligações de grupamentos sulfato (BANSIL *et al.*, 1978). Além disso, verificou-se a ausência do sinal de COO^- em 1415 cm^{-1} (BANSIL *et al.*, 1978) apenas para as amostras CB-2M. De maneira geral, também podem ser observadas, deformações de hidrogênio de C1 para números de onda próximos a 890 cm^{-1} (BANSIL *et al.*, 1978). Vibrações em 940 cm^{-1} atribuídas ao esqueleto C-O-C de ligações $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$ de GAGs (CARVALHO, 2015). Em 1100 cm^{-1} são também encontrados modos de deformação de C-OH, porém, em alguns casos, a banda pode estar mascarada devido à presença das vibrações de grupos sulfato (BANSIL *et al.*, 1978). Sendo assim, através da espectroscopia RAMAN também foi possível atribuir as diferenças estruturais entre os GAGs purificados. Sendo a ausência do grupamento sulfato a principal característica do GAG purificado na fração CB-0,5M, e para o GAG CB-2M a ausência de grupamentos carboxilas. Para CB-1M, PS-1M e PS2M podemos observar semelhanças estruturais no que tange os grupamentos funcionais conforme encontrado no IR.

No entanto, deve-se ressaltar que os três GAGs, apesar de possuírem espectros com grupamentos semelhantes apresentam diferenças estruturais evidenciadas por outros experimentos, como, a massa modal e eletronegatividade (uma vez que suas migrações são diferentes na eletroforese em tampão PDA e a fração na qual é eluída na coluna de troca iônica).

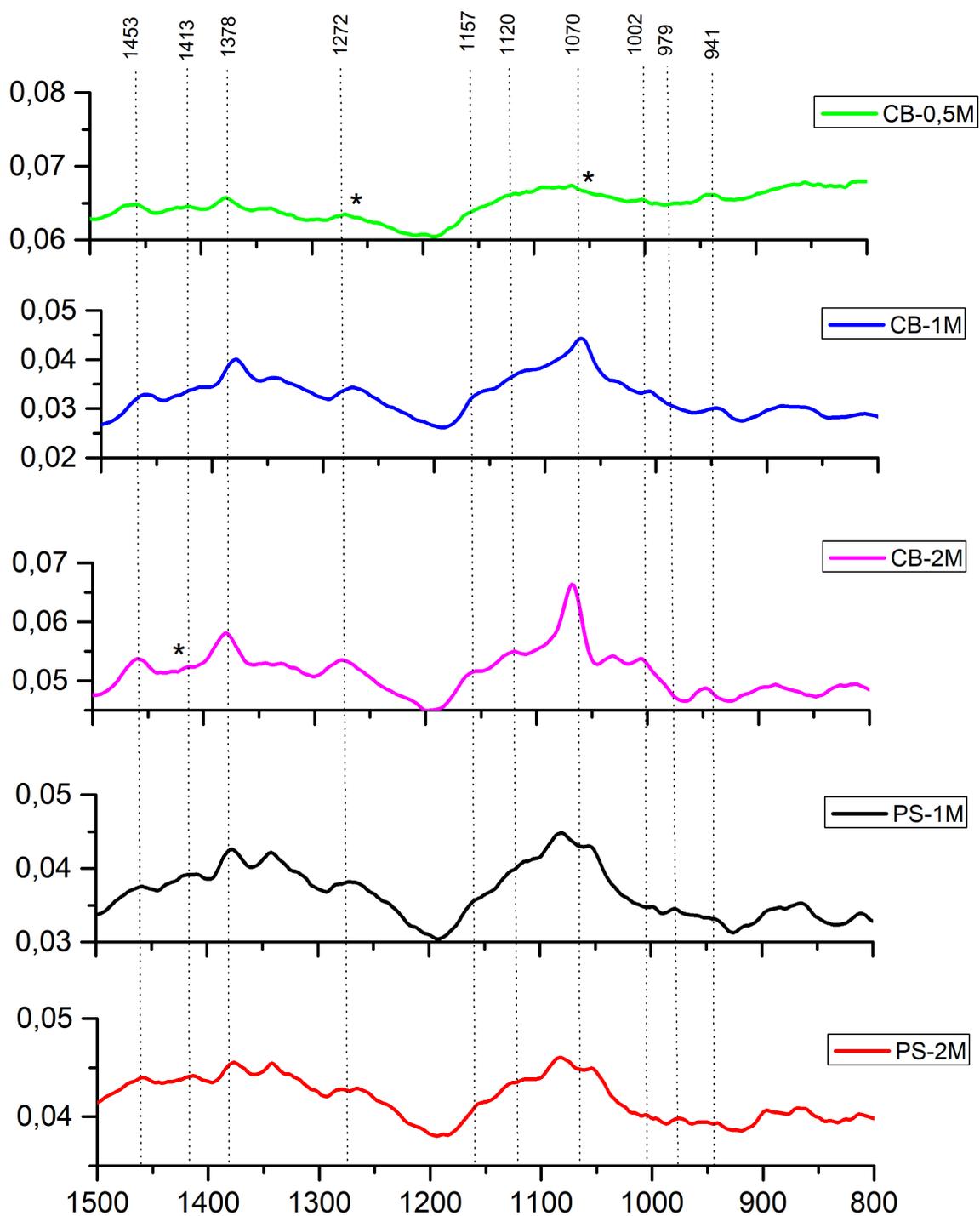


Figura 20 - Espectro Raman dos GAGs purificados de CB e PS. (CSTs: CS de traqueia suína; CSTB: CS de traqueia bovina; CSRj: CS de arraia; C4S: CS comercial de traqueia bovina).

4.1.7. Análise espectroscópica RMN- HSQC

A identificação dos GAGs extraídos e a análise das diferenças estruturais foram realizadas por técnicas de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e mapas de correlação HSQC. A vantagem de se empregar tal técnica está na pequena quantidade de amostra necessária para realizar os experimentos e da possibilidade de recuperação da amostra, visto que, trata-se de uma técnica não destrutiva. mapa de correlação HSQC da amostra C-0.5M, Figura 21, apresenta manchas de correlação características de ácido glucurônico ligado a glucosamina N-acetilada (5,39/102,41) assim como outras correlações ligadas a estrutura do GlucA (3,76/75,6 ppm) e de GlcNAc (3,88/63,5 ppm).

A inexistência de absorções na faixa 4,20 e 4,60 para o núcleo de ^1H e 79,12 e 70,36 para o núcleo de ^{13}C sugere a ausência de grupamentos sulfato ligados a estrutura do GAG nas posições C4 e C6 da hexosamina. Esse resultado reforça os dados obtidos por INFRA e RAMAN e justifica os valores das dosagens de sulfato. Dessarte, o conjunto de resultados aponta para uma estrutura de ácido hialurônico.

O mapa de correlação HSQC das amostras CB-1M (Figura 22) e PS-1M (Figura 23) apresentam manchas de correlação referente as ligações $[\rightarrow 4\text{GlcA}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow]$ em 4,49-106.9 e em 4,89-4,92/106,23-106,3 referente a ligação $[\rightarrow 4\text{IdoA}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow]$. Além disso, podemos destacar as correlações atribuídas ao H4-C4 do IdoAc em 4,14-83,1 e a GalNAc-4 sulfatada em 4,67-78.35. A vista disso, embora ambas as amostras aparentam ser DS-like elas apresentam diferenças estruturas entre si.

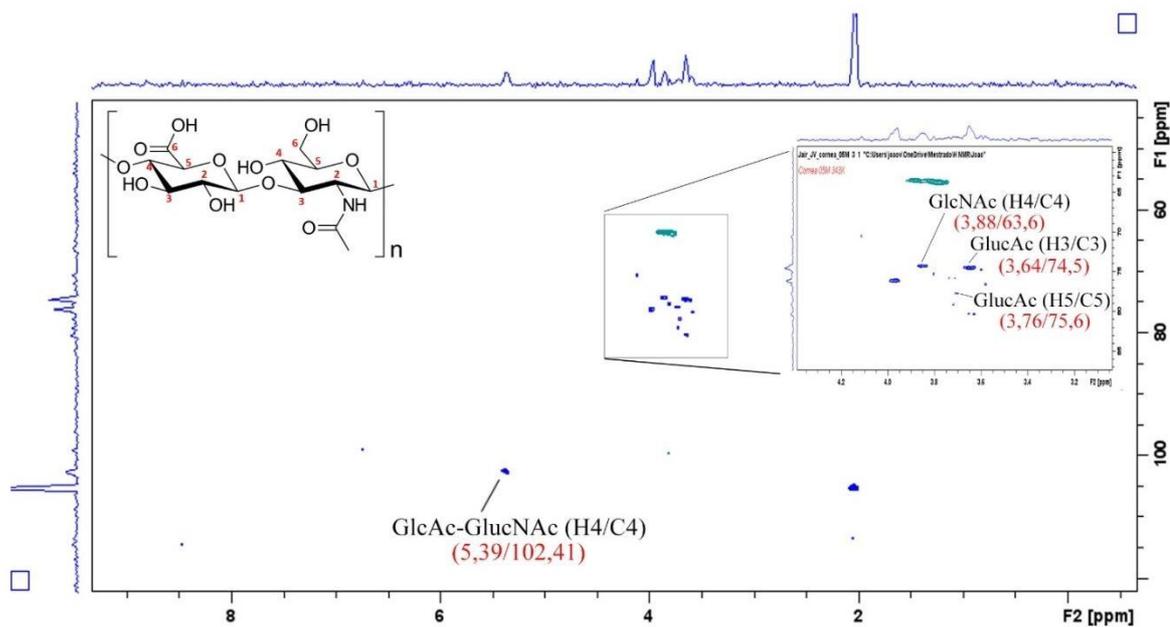


Figura 21 - Espectro NRM-HSQC da amostra CB-0.5M

Tabela 5- Valores da literatura para os espectros de Ácido Hialurônico

	Ac Hialurônico (literatura) CB-0,5M			
	GlcA	GlcNAc	GlcA	GlcNAc
H1/C1	4,48/103,80	4,74/101,40	n.d.	n.d
H2/C2	3,34/73,29	3,81/55,06	n.d	n.d
H3/C3	3,51/74,47	3,73/83,86	3,59/76,5	3,66/80,25
H4/C4	3,51/80,83	3,54/69,36	3,69/74,2	3,8/63,5
H5/C5	3,73/77,21	3,48/76,23	3,73/77,36	n.d
H6/C6	175,01	3,76-3,9/61,37	n.d	n.d

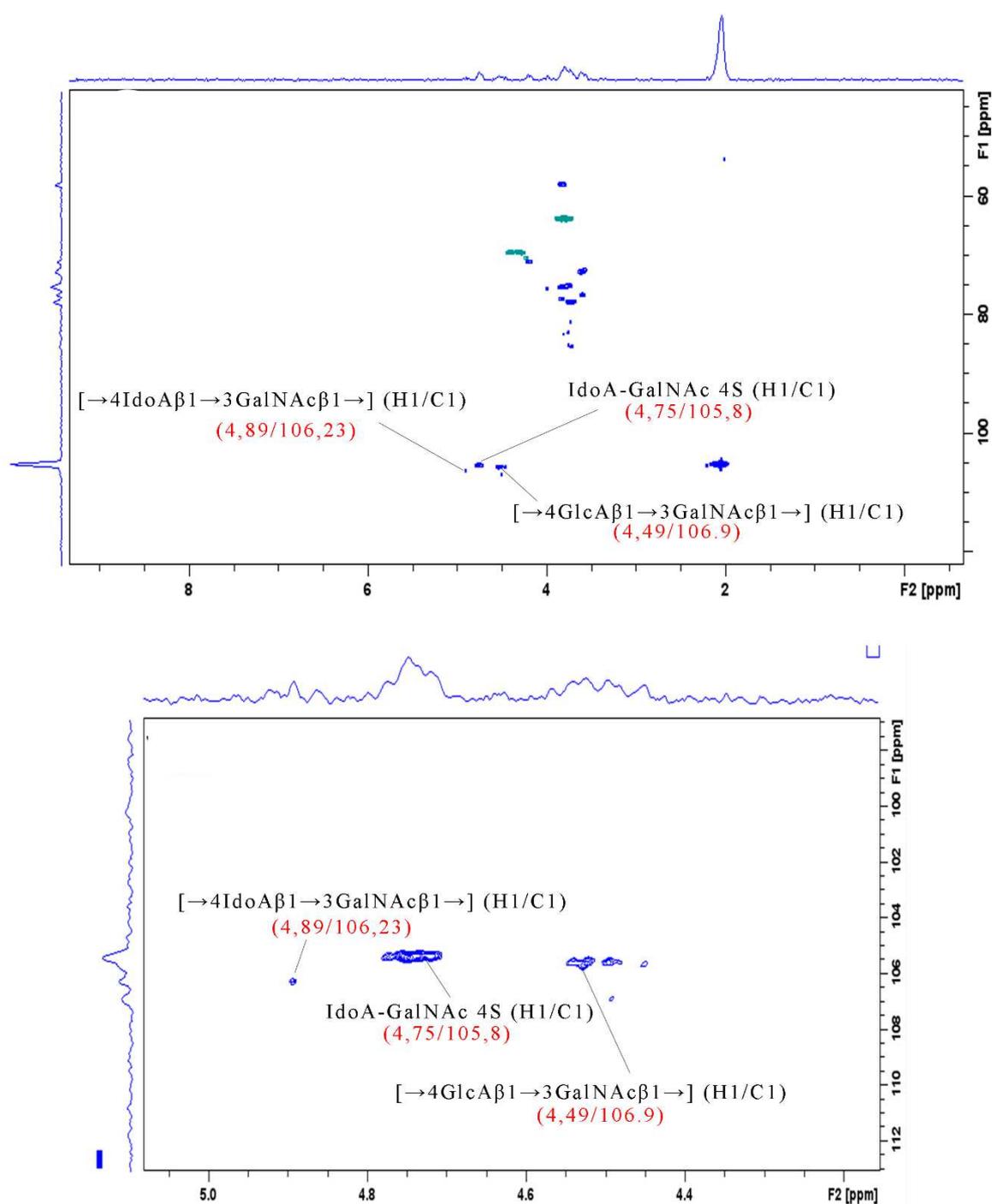


Figura 22 - Espectro NRM-HSQC da amostra CB-1M

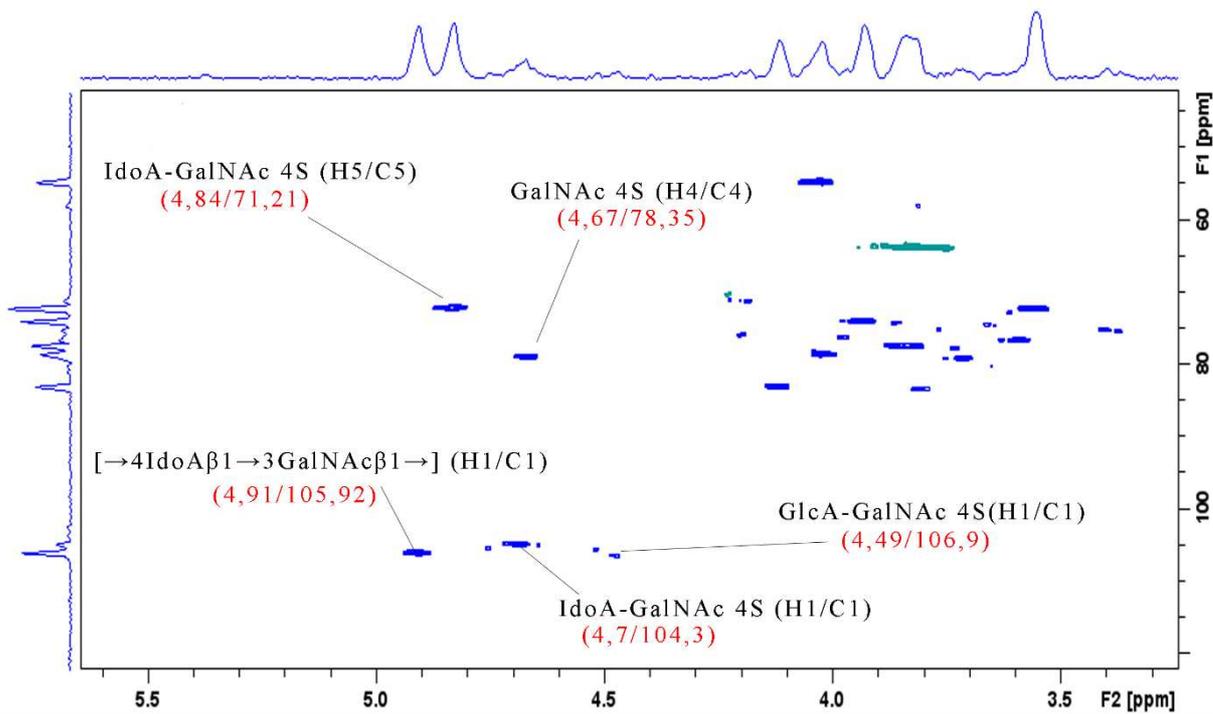


Figura 23 - Espectro NRM-HSQC da amostra PS-1M

Tabela 6- 1H e 13C-Chemical Shifts (ppm) dos sinais identificados espectro 2D NMR encontrados para diferentes dissacarídeos na literatura^(a,b,c)

	GlcA-GalNAc 4S		GlcA-GalNAc 6S		IdoA-GalNAc 4S		GlcA-GlcNAc		IdoA 2S-GalNAc	
	GlcA	GalNAc 4S	GlcA	GalNAc 6S	IdoA	GalNAc 4S	GlcA	GlcNAc	a-L-IdA-(2SO ₄)	→3-(β-Gal-(1→
H1/C1	4,63/105,94	4,67/103,59	4,55/105,56	4,66/104,28	4,9/105,7	4,72/105,3	4,48/103,80	4,74/101,4	5,16/101,2	4,9/105,7
H2/C2	3,47/75,86	4,08/54,94	3,45/75,85	4,03/53,93	3,53/72,0	4,02/54,2	3,34/73,29	3,81/55,06	4,17/73,8	3,53/72,0
H3/C3	3,64/76,78	4,16/78,62	3,63/77,08	3,95/82,68	3,95/73,7	4,02/77,8	3,51/73,29	3,73/83,86	4,23/69	3,95/73,7
H4/C4	3,80/83,07	4,63/79,12	3,76/84,26	4,19/70,17	4,10/82,7	4,65/78,5	3,51/74,47	3,54/69,36	4,06/79,2	4,10/82,7
H5/C5	3,78/79,09	3,87/77,69	3,76/78,83	4,01/75,70	4,72/72,0	3,78/77,0	3,73/77,21	3,48/46,23	4,85/68	4,72/72,0
H6/C6	n.d	3,80/63,98	n.d	4,24/70,36	n.d	3,78/63,5	3,66/75,01	3,76-3,9/61,37	n.d	n.d

a-(POMIN *et al.*, 2012), b- (COCKIN; HUCKERBY; NIEDUSZYNSKI, 1986), c- (POMIN, 2014)

Tabela 7 – 1H e 13C-Chemical Shifts (ppm) dos sinais identificados espectro 2D NMR das frações de Córnea Bovina 1M

	GlcA-GalNAc 4S		GlcA-GalNAc 6S		IdoA-GalNAc 4S		GlcA-GlcNAc		IdoA 2S-GalNAc	
	GlcA	GalNAc 4S	GlcA	GalNAc 6S	IdA	GalNAc 4S	GlcA	GlcNAc	a-L-IdA-(2SO ₄)	→3-(β-Gal-(1→
H1/C1	n.d	n.d	4,49/106,94	n.d	4,9/106,3	4,75/105,8	4,4/105	n.d	n.d	4,28/106,3
H2/C2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	3,83/57,8	4,2/70,7	n.d
H3/C3	3,62/76,5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	3,62/81	4,3/69,4	n.d
H4/C4	3,78/82	n.d	3,76/85,2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	4,04/75,4	n.d
H5/C5	n.d	3,83/77,3	n.d	n.d	n.d	3,76/77,5	3,71/74,4	n.d	n.d	n.d
H6/C6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	3,8/63,8	3,64/72	n.d	n.d	n.d

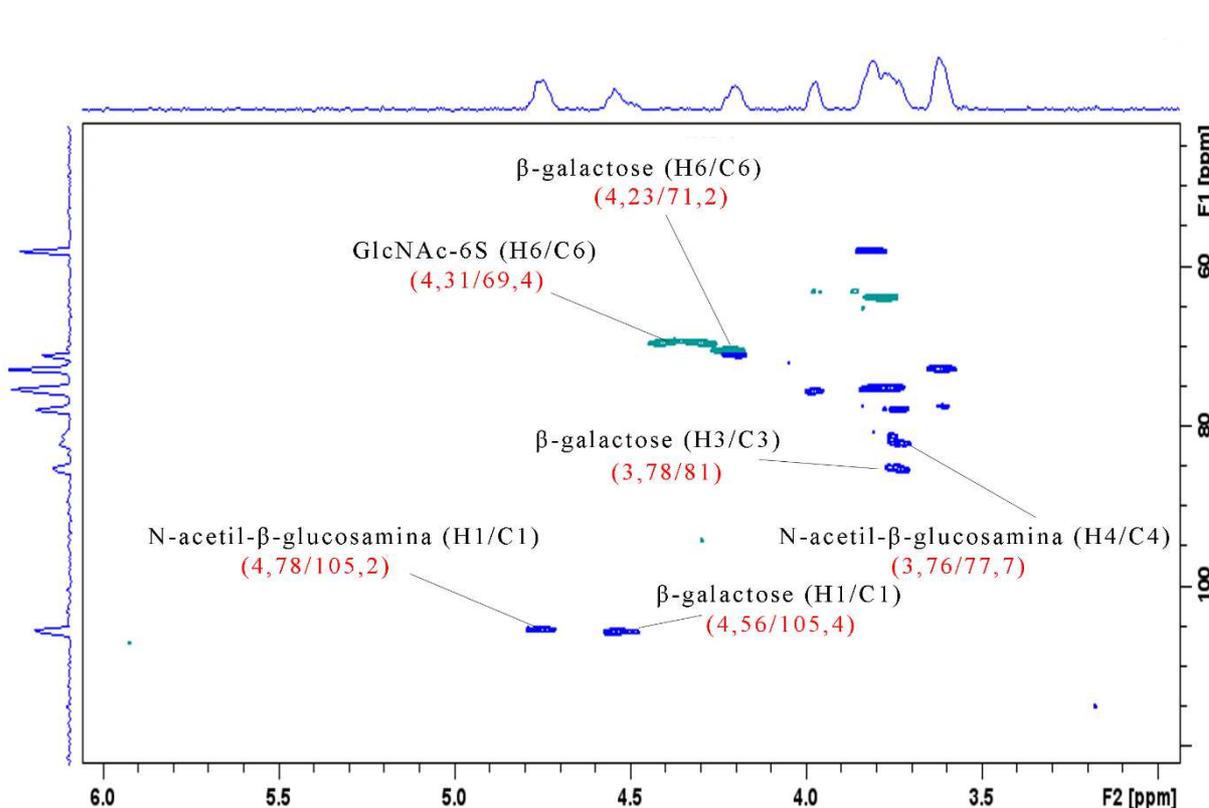


Figura 24 - Espectro NRM-HSQC da amostra CB-2M.

Para a amostra CB-2M por sua vez podemos observar dois sinais β -anoméricos característicos em 4,56/105,4 e 4,78/105,2 ppm, sendo estes identificados e atribuídos a resíduos de N-acetil- β -glucosamina (GlcNAc), denominado de N1 na Figura 24 e β -galactose, denominado de G1 na mesma figura (POMIN, 2014). Ambos os sinais são de proporções equimolares aproximadas, o que pode ser correlacionado com a estrutura do polímero analisado, sendo este composto de unidades dissacarídicas repetidas de $[\rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow]$. Outros sinais claros envolvendo a ligações glicosídicas podem ser observados em 3,76/77,7 ppm e 3,78/81 ppm, atribuídos Figura 24 como N4 e G3, esses dois picos também podem ser atribuídos a ligações do tipo $[\rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow]$ típicas de polímeros de queratam sulfato (POMIN, 2014; POMIN *et al.*, 2012). Por último, informações a respeito do 6-sulfato ligado a GlcAc e resíduos de Gal pode ser deduzida através da análise dos picos anti-fase (mostrados em verde, onde temos sinais de CH_2 e em azul sinais CH, Figura 24), nestes podemos identificar sinais em 4,31/69,4 ppm e 4,23/71,2 ppm, atribuídos a unidades 6-sulfato GlcNAc (N6S na Figura 24) e Gal (G6S, Figura 24) respectivamente.

Tabela 9- ¹H e ¹³C-Chemical Shifts (ppm) dos sinais identificados espectro 2D NMR das frações de CB-0,5M comparadas com dados da literatura

	KS literatura ^(a,b,c)		CB-2M	
	[→3Galβ1→	→4GlcNAcβ1→]	[→3Galβ1→	→4GlcNAcβ1→]
H1/C1	4,49-5,54/102,86-105	4,68-4,76/102,83/105	4,56/105,4	4,78/105,2
H2/C2	3,53/69,97	3,55-3,83/55,13-57	3,62/72,5	3,48/58,2
H3/C3	3,70/82,22-85	n.d	3,78/81	n.d
H4/C4	4,22/70,87	3,71-3,8/78,81-81	4,26/70	3,76/77,7
H5/C5	3,97/75,42	n.d	4,01/75,5	n.d
H6/C6	3,58-3,5/62,80	3,69/56,9	3,8/63,88	3,84/5
H6/C6				
sulfatados	4,15-4,22/67,72-70	4,27-4,39/66-69	4,23/2	4,31/69,4

a-(POMIN *et al.*, 2012), b- (COCKIN; HUCKERBY; NIEDUSZYNSKI, 1986), c- (POMIN, 2014)

A utilização de análises espectroscópicas por RMN, assim como as apresentadas acima nos permitiu obter valiosas informações estruturais tais como: a composição monossacarídica e dissacarídica dos polímeros, a posição das sulfatações e os tipos de ligações existentes na estrutura da cadeia dos GAGs extraídos no presente trabalho, reforçando também achados evidenciados também por outras técnicas apresentadas no trabalho. Com isso foi possível purificar no tecido de córnea bovina, três tipos de GAGs, sendo estes: ácido hialurônico (fração CB-0.5M), dermatam sulfato (CB-1M) e queratam sulfato (CB-2M). Já para o tecido pele suína, foi possível identificar apenas um tipo de GAG, dermatam sulfato, porém com diferenças estruturais perceptíveis (diferente corrida eletroforética, diferente perfil de eluição na cromatografia de troca iônica) porém ainda não claramente identificadas, parte pela baixa quantidade de amostra PS-2M para a realização do PS-2M

4.2. ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA *IN VITRO* DOS DS PURIFICADOS DE CÓRNEA BOVINA E PELE SUÍNA

De forma preliminar, a atividade de cada fração purificada foi avaliada através de ensaios baseados no tempo de formação de trombina, como ATTP, FB e PT. Estes ensaios nos permitem avaliar de maneira prática e eficaz os efeitos dos DS purificados em diferentes pontos da coagulação que serão discutidos na sequência.

4.2.1. Tempo de tromboplastina parcial (APTT)

O Teste da trombina parcialmente ativada está entre os testes de triagem mais pedidos na prática clínica, utilizado, muitas vezes, para avaliar distúrbios na hemostasia. Este, tem como objetivo detectar deficiências nos fatores VIII, IX, e XII, além de deficiências moderadas e graves dos fatores II, V, X e fibrinogênio. Sendo em muitos casos requisitado junto de outros testes: como o tempo de trombina para o manejo clínico e da terapia farmacológica (KAMAL; TEFFERI; PRUTHI, 2007).

Um teste de APTT dentro dos valores laboratoriais de referência indica uma hemostasia normal (24 a 40 segundos), conforme descrito no Item 3.2.7.2. O APTT é mensurado, pela incubação da cefalina ativada com plasma teste, a 37°C, e após 2 a 5 minutos é adicionado a este o cloreto de cálcio, os resultados são expressos em tempo de coagulação (segundos). Prolongamentos no tempo normal de coagulação, indicam que a tromboplastina parcial (cefalina), os fosfolípidios de origem animal ou vegetal e o ativador com carga negativa (sílica, ácido elágico ou caulim), utilizados no teste foram incapazes de ativar a via extrínseca, uma vez que requer o fator tecidual completo (tromboplastina). Podendo indicar assim, a suspeita de deficiência dos fatores VIII, IX, XI ou a presença de inibidor externo da via.

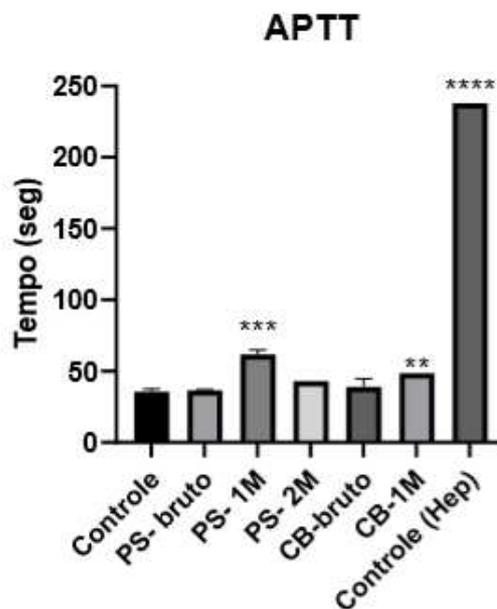


Figura 25 – Ensaio de atividade anticoagulante *in vitro*, tempo de ativação parcial da trombina. 10µg de material bruto e amostras purificadas foram incubados com plasma comercial de carneiro, o ensaio foi realizado como recomendado pelo fabricante. Após foi realizado uma análise multivariada (one-way ANOVA) utilizando o teste de Dunnett, dessa forma todas as amostras foram comparadas com o controle. Diferenças significativas estão representadas pelo asterisco no topo da coluna, assim como o nível de significância (*:p=0,05; **: p=0,01; ***:p=0,00.1; ****:p=0,0001). Controle: plasma comercial, PS- bruto: GAGs após digestão com papaína, sem nenhum processo cromatográfico de purificação, PS-1M: 10ug (teor de 58,089 % de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de pele suína eluida na concentração de 1M de NaCl, PS-2M: 10ug (teor de 41,157% de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de pele suína eluida na concentração de 2M de NaCl, CB-bruto: GAGs após digestão com papaína, sem nenhum processo cromatográfico de purificação, CB-1M: 10ug (teor de 76,974% de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de cornea bovina eluida na concentração de 1M de NaCl, Controle (Hep): 1,5µg de heparina.

Com base nos valores encontrados para o teste, e apresentados na Figura 25, podemos observar um aumento no tempo normal de coagulação para as frações PS-1M e CB-1M quando comparados com o controle. As demais amostras, não apresentaram um tempo de coagulação estendido quando comparados com o controle. Para as amostras brutas (contendo diferentes GAGs na sua composição) esse fato pode ser explicado devido a baixa concentração dos agentes capazes promover tal alteração. Como esperado, o controle heparina se mostrou o agente mais potente, uma vez que esse polissacarídeo é capaz de interagir com diversos fatores de coagulação, sendo capaz da elevação no tempo de coagulação mesmo em baixas concentrações.

Conforme dito anteriormente, esse tipo de teste nos permite realizar uma triagem de potenciais drogas inibidoras da coagulação, observando assim o efeito desses candidatos no “sistema intrínseco” de ativação da coagulação.

4.2.2. Tempo de trombina (PT)

Em conjunto com o APTT, na prática clínica temos o PT (prothrombin time/tempo de trombina), dentre os testes, esse foi o primeiro a ser desenvolvido por Owren (1947) e tem sido utilizado como um marcador da “via extrínseca” e “comum” da coagulação, avaliando a atividade dos fatores VII, X, V, II e fibrinogênio. Sendo utilizado, principalmente, para monitorar a terapia oral com anticoagulantes (especialmente inibidores da vitamina K), avaliar dano hepático, coagulopatia intravascular disseminada, trauma entre outras condições. Com base nos valores encontrados para o teste, e apresentados na Figura 26, podemos observar que não houve alteração no PT para nenhuma das amostras testadas, o resultado se encontra de acordo com a literatura, uma vez que o dermatam sulfato é incapaz de prolongar o tempo de coagulação no teste em questão, por atuar especificamente na inibição do HCII, diferente da heparina que atua em mais fatores da via (HOPPENSTEADT; WALENGA; FAREED, 1990).

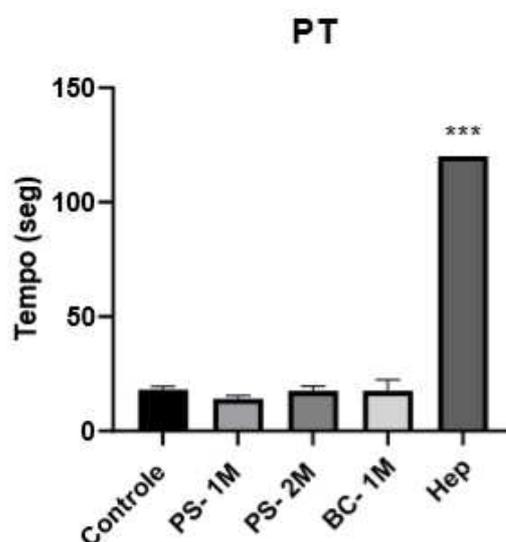


Figura 26 - Ensaio de atividade anticoagulante *in vitro*, tempo de trombina. 10µg de material bruto e amostras purificadas foram incubados com plasma comercial de carneiro, o ensaio foi realizado como recomendado pelo fabricante. Após foi realizado uma análise multivariada (one-way ANOVA) utilizando o teste de Dunnett, dessa forma todas as amostras foram comparadas com o controle. Diferenças

significativas estão representadas pelo asterisco no topo da coluna, assim como o nível de significância (***: $p=0,00.1$). Controle: plasma comercial, PS-1M: 10ug (teor de 58,089 % de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de pele suína eluida na concentração de 1M de NaCl, PS-2M: 10ug (teor de 41,157% de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de pele suína eluida na concentração de 2M de NaCl, BC-bruto: GAGs após digestão com papaína, sem nenhum processo cromatográfico de purificação, BC-1M: 10ug (teor de 76,974% de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de cornea bovina eluida na concentração de 1M de NaCl, Controle (Hep): 1,5 μ g de heparina.

4.2.3. Fibrinogênio

Outra forma dentro da clínica médica de se avaliar alterações na coagulação é o teste de fibrinogênio (fator I), usado principalmente para avaliar distúrbios na coagulação envolvendo esta proteína. Com base nos valores encontrados para o teste, observados na Figura 27, podemos observar que não houve alteração no teste de fibrinogênio para nenhuma das amostras testadas. Esse resultado, condizente com a literatura, demonstra que o dermatam sulfato é incapaz interagir diretamente como o fibrinogênio conservando assim um tempo normal de coagulação. (HOPPENSTEADT; WALENGA; FAREED, 1990).

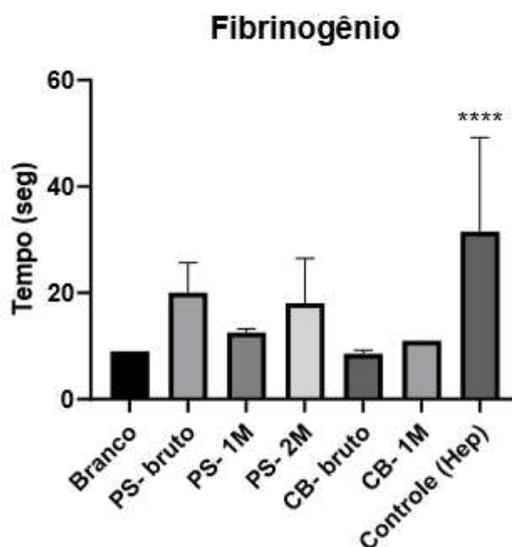


Figura 27 - Ensaio de atividade anticoagulante *in vitro*, fibrinogênio. 10 μ g de material bruto e amostras purificadas foram incubados com plasma comercial de carneiro, o ensaio foi realizado como recomendado pelo fabricante. Após foi realizado uma análise multivariada (one-way ANOVA) utilizando

o teste de Dunnett, dessa forma todas as amostras foram comparadas com o controle. Diferenças significativas estão representadas pelo asterisco no topo da coluna, assim como o nível de significância (*:p=0,05; **: p=0,01; ***:p=0,00.1; ****:p=0,0001). Controle: plasma comercial, PS- bruto: GAGs após digestão com papaína, sem nenhum processo cromatográfico de purificação, PS-1M: 10ug (teor de 58,089 % de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de pele suína eluida na concentração de 1M de NaCl, PS-2M: 10ug (teor de 41,157% de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de pele suína eluida na concentração de 2M de NaCl, CB-bruto: GAGs após digestão com papaína, sem nenhum processo cromatográfico de purificação, CB-1M: 10ug (teor de 76,974% de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de cornea bovina eluida na concentração de 1M de NaCl, Controle (Hep): 1,5µg de heparina.

4.2.4. Síntese de heparam sulfato antirombótico

Até então a atividade do DS foi descrita apenas como resultante da inibição doo HCII, e o seu potencial de inibir a trombina. No entanto, conforme o entendimento sobre a coagulação avançou, mais tem se observado o papel de destaque das células e das suas superfícies no controle e manutenção da hemostasia. Dessa forma diversos autores foram capaz de demonstrar que a parede dos vasos celulares e arterias desempenham um papel também na ação de compostos antitromboticos (DE AGOSTINI *et al.*, 1990; NADER, H.B. *et al.*, 2001). O endotélio vascular é composto por uma camada de de tecido epitelial simples não estratificado, de origem mesodérmica, que reveste internamente os vasos sanguíneos permitindo a interação com diversos constituintes da circulação sanguínea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1991). Sendo assim, a ação dos DS purificados foram testadas em células do epitélio vascular de coelhos.

Em 1976, Buonassisi e Venter, verificaram que células endoteliais de uma determinada linhagem de coelho continham receptores para diversos agentes vasoativos tais como, noradrenalina, acetilcolina, angiotensina II e histamina. Nos anos subsequentes, diferentes autores apontaram uma importante função do endotélio vascular, no qual, em condições normais, este contribuiria para a circulação do sangue promovendo uma atividade antitrombotica. Essa função se da de acordo com à produção de diversos compostos, tais como, o ativador de plaminogênio, o

inibidor da via do fator tecidual, além do proteoglicano de HS (Buonassisi & Colburn 1982, BOMBELI MUELLER & HAEBERLI 1997).

Esse proteoglicano, possui uma cadeia proteica com massa molecular de 22k Da, e cadeias de HS com aproximadamente 50kDa (CASTILLO; COLBURN; BUONASSISI, 1987). A estrutura das cadeias de HS, é composta por regiões alternadas de IdoAc e GlcA, contendo dissacarídeos di- e trissulfatados, assim como, tetrassacarídeos tetra- e pentassulfatados, semelhantes aos encontrados na estrutura da Hep, e assim como esta, possuindo um efeito inibitório na coagulação sanguínea (NADER, H. B. *et al.*, 1987). Foi demonstrado também por Nader et al 1987, que o estímulo à produção desse PG, assim como modificações estruturais na cadeia lateral de HS, tanto para o meio celular, quanto na superfície celular, é aumentado de 2 a 3 vezes quando essas células foram cultivadas com Hep (NADER, HELENA B. *et al.*, 1989).

Para avaliar o efeito dos diferentes DS extraídos na produção de HS por células endoteliais foi realizada uma incubação por 24h conforme descrito no Item 3.2.8. Podemos observar assim, que com relação ao controle basal, as frações PS-1M e PS-2M não mostraram nenhuma alteração na síntese de HS na superfície celular após 24h. No entanto no mesmo período de tempo, pode se observar um aumento significativo na produção e liberação desses PGs de HS para o meio extracelular (Figura 28), sendo a produção desse estimulado em maior quantidade pela fração PS-1M, com cerca de 4000 cpm/ μ g de proteína celular, com o controle positivo de Hep, gerando cerca de 3000 cpm/ μ g de proteína celular (Figura 29). Já para as frações de CB-1M o estímulo a produção de HS pode ser observada tanto na superfície celular (Figura 28) quanto no meio extracelular (Figura 29). Não houve alterações significativas na síntese de proteoglicanos de CS, de superfície celular e para o meio, para nenhuma das amostras testadas. Tais resultados são importantes, uma vez que, alterações significativas no comprimento e quantidade de PG de CS de células endoteliais, estão relacionados com um aumento do risco e formação de placas de aterosclerose, uma vez que estes PG se ligam a moléculas de LDL aprisionando-os nas paredes dos vasos (LITTLE; BALLINGER; OSMAN, 2007). Esses resultados, demonstram que além do DS atuar inibindo a coagulação através da interação com o HCII, conforme já descrito extensivamente na literatura, esse GAG pode estar atuando, também, estimulando a síntese de HS endotelial com propriedades antitrombóticas nunca antes descritas para o DS.

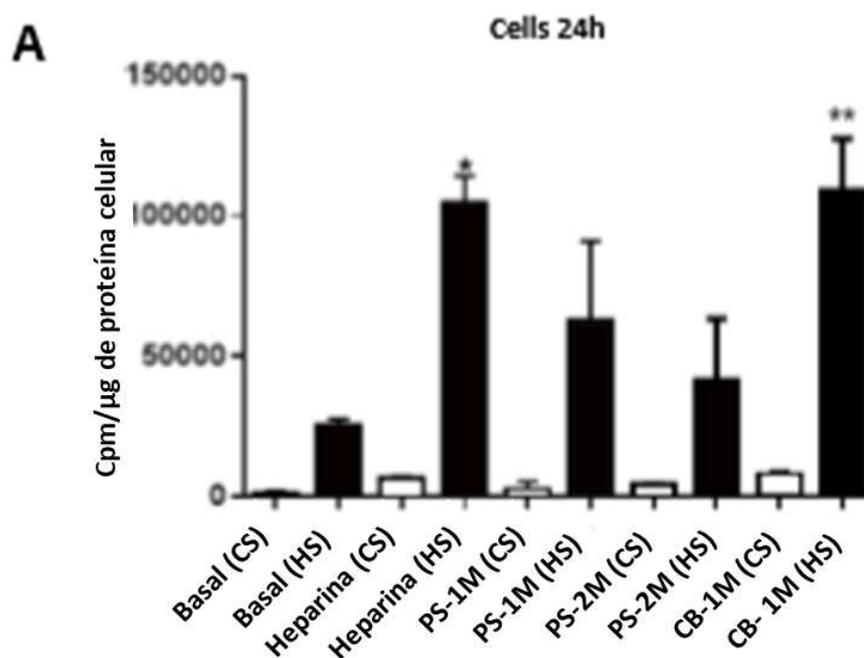


Figura 28 – Síntese de heparan sulfato por células endoteliais de coelho. Células foram incubadas com 100μg/mL dos materiais, na presença de $[^{35}\text{S}]$ sulfato (150μCi/mL), controle exposto apenas a $[^{35}\text{S}]$ sulfato (150μCi/mL). Sendo PS-1M: 100ug (teor de 58,089 % de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de pele suína eluída na concentração de 1M de NaCl, PS-2M: 100ug (teor de 41,157% de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de pele suína eluída na concentração de 2M de NaCl, CB-bruto: GAGs após digestão com papaína, sem nenhum processo cromatográfico de purificação, CB-1M: 100ug (teor de 76,974% de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de córnea bovina eluída na concentração de 1M de NaCl, Controle (Hep): 1,5μg de heparina.

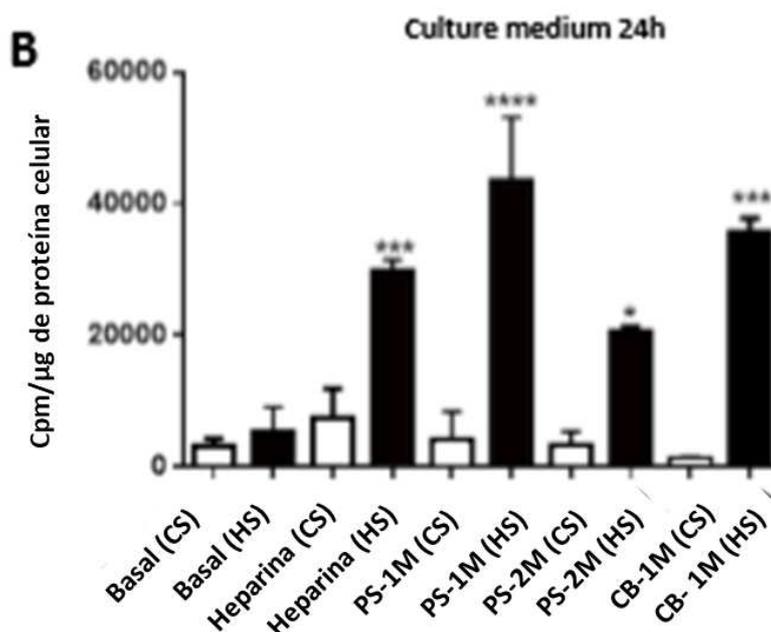


Figura 29 - Síntese de heparan sulfato liberado por celulares endoteliais de coelho para o meio de cultura. Células foram incubadas com 100μg/mL de materiais, na presença de [³⁵S] sulfato (150μCi/mL), controle exposto apenas a [³⁵S] sulfato (150μCi/mL). Sendo PS-1M: 100ug (teor de 58,089 % de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de pele suína eluída na concentração de 1M de NaCl, PS-2M: 100ug (teor de 41,157% de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de pele suína eluída na concentração de 2M de NaCl, CB-bruto: GAGs após digestão com papaína, sem nenhum processo cromatográfico de purificação, CB-1M: 100ug (teor de 76,974% de DS com base nas dosagens de hexosamina) da fração de córnea bovina eluída na concentração de 1M de NaCl, Controle (Hep): 1,5μg de heparina.

Como ocorre a sinalização desse estímulo ocorre na presença de DS ainda não foi estudado, assim como suas implicações para o organismo. Porém, conforme mencionado anteriormente, um efeito semelhante já foi descrito para a Hep. Neste caso, o efeito se dá através de uma auto-fosforilação dos receptores de tirosina-quinase, estimulada pela presença do GAG na matriz extracelular. Resultando assim, no estímulo da síntese do PG de HS. Cabe aqui ressaltar que, estudos com a Hep, determinam que o estímulo para a síntese do PG de HS não ocorre na ausência da matriz extracelular, assim como a menor unidade capaz de gerar o estímulo a produção do HS é um tetrassacarídeo pentassulfatado formado a partir da Hep. Cabe também observar, que a ausência de N-sulfatações também acarreta na perda da atividade. No entanto estruturas com diferentes padrões de sulfatações e sem N-sulfatações também se mostraram capazes de estimular a síntese do PG de HS (GAO; GOLDFARB, 1995; MEDEIROS *et al.*, 2012; NADER, H.B. *et al.*, 2001). Considerando

as semelhanças estruturais entre tais compostos e o DS, podemos apenas inferir que o DS estimule a síntese deste PG de maneira análoga.

No entanto, conforme mencionado, o efeito do DS sobre a produção de PGHS foi aqui observado pela primeira vez. Sendo assim, uma vez que ocorre o aumento na síntese do HS após exposição ao DS, uma hipótese foi levantada, a de que a atividade antitrombótica *in vivo*, pelo menos em uma pequena parte, possa ser devido também ao aumento da produção deste HS pelas células endoteliais. Em favor dessa hipótese estão os achados de que o tetrassacarídeo de Hep e o ácido ciclo octafenol-octassulfônico (composto Y), exibem atividade antitrombótica *in vivo*, porém pouca atividade anticoagulante *in vitro*, podendo ser parte dessa atividade atribuída a um aumento da síntese de PG de HS (NADER, H.B. *et al.*, 2001). Modificações na síntese de GAGs de células endoteliais nos indicam um caminho no qual novas drogas podem ser desenvolvidas. Uma vez que, a investigação e desenvolvimento de agentes que modificam a síntese desses PGs endoteliais, possam ser alvo da terapia. Por estarem ativamente envolvidos em diversos processos biológicos, assim como, atuarem como potenciais agentes redutores do risco potencial de doenças cardiovasculares.

4.3. ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA *IN VIVO* DOS DS PURIFICADOS DE CÓRNEA BOVINA E PELE SUÍNA

Para avaliar o potencial antitrombótico dos dermatans sulfatos extraídos e purificados neste trabalho, um ensaio *in vivo* foi realizado utilizando o método descrito em Métodos 3.2.9. Foi possível, assim, observar uma relação de dose e resposta para os DS extraídos e seu efeito antitrombótico, conforme a Figura 30.

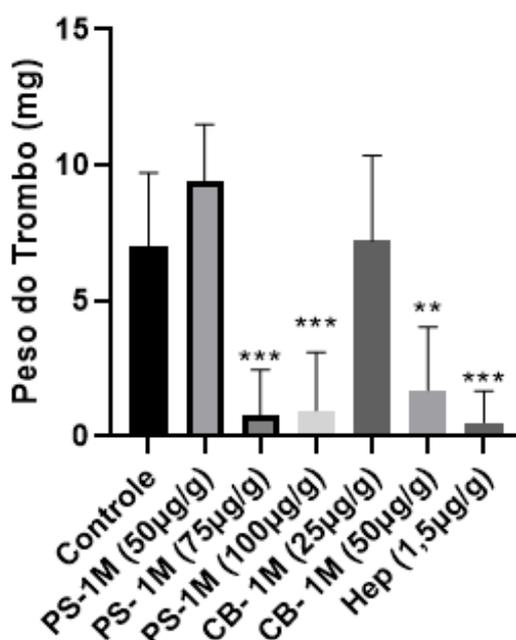


Figura 30 - Ensaio de atividade anticoagulante *in vivo*, usando o modelo de ligadura da veia cava. Após foi realizado um análise multivariada (one-way ANOVA) utilizando o teste de Dunnett, comparando o peso dos trombos obtidos (ou não) com o controle. Diferenças significativas estão representadas pelo asterisco no topo da coluna, assim como o nível de significância (*:p=0,05; **: p=0,01; ***:p=0,00.1; ****:p=0,0001). Controle: ratos injetados com 200µL de salina, PS-1M 50: 50µg de DS de pele suína eluido na concentração de 1M de NaCl (teor de DS: 58,089%), PS-1M 75: 75µg de DS de pele suína eluido na concentração de 1M de NaCl (teor de DS: 58,089%, PS-1M 100: 100µg de DS de pele suína eluido na concentração de 1M de NaCl (teor de DS: 58,089%), CB- 1M 25: 25 µg de DS de córnea bovina eluido na concentração de 1M de NaCl (teor de DS: 76,974%) , CB- 1M 50: 50 µg de DS de córnea bovina eluido na concentração de 1M de NaCl (teor de DS: 76,974%), Hep: 1,5µg de heparina.

Para o teste foram avaliados os DS purificados em diferentes concentrações e sua capacidade de reduzir a formação de trombo. Maggi et al em 1987 relataram a

atividade antitrombótica do DS em modelo animal semelhante ao utilizado, obtendo redução na formação do trombo, no entanto nosso trabalho difere do citado uma vez que diferentes DS foram testados sendo o do estudo um DS isolado de mucosa intestinal bovina.

Para o DS de PS- 1M pode se observar que a menor dose avaliada capaz de impedir a formação de trombo foi a de 75 µg de GAG (teor de DS: 58,089%, 43,56µg de DS)) por grama de animal. Para o DS de CB-1M, a menor dose capaz de gerar a resposta desejada foi de 50 µg de GAG (teor de DS: 76,974%, 38,487 µg de DS) por grama de animal. Essa variação na resposta biológica pode ser explicada devido as variações estruturais do DS.

Polímeros de DS provenientes de diferentes origens e tecidos possuem uma estrutura bastante heterogênea, para o DS de PS sua cadeia polimérica apresenta longas regiões de IdoAC, sendo esse ácido urônico o de maior proporção em todo o polímero. Dentre os dissacarídeos que o compõem o mais frequente é o IdoAc-GalNAc4SO₃, formando aproximadamente 90% da estrutura deste DS. Além da sulfatação na quarta posição da galactosamina, dissacarídeos dissulfatados, formando o IdoAc2SO-GalNAc4SO₃, podem compor também cerca de 10% da sua estrutura polimérica. Dissacarídeos sulfatados no carbono 6 da GalNAc compõem cerca de 2,9% da estrutura, sendo o restante dessa composta por dissacarídeos sem sulfatação (BOSENNEC; PETITOU; PERLY, 1990; CÖSTER; FRANSSON, 1981; LAURENT; LAURENT; FRASER, 1996; MAIMONE; TOLLEFSEN, 1990; MALMSTROM; FRANSSON, 1971; MASCELLANI *et al.*, 1993a; POBLACIÓN; MICHELACCI, 1986). Já para os polímeros de DS provenientes de córnea bovina, temos relatos da literatura que descrevem um tipo de DS cuja proporção de GlicAC e IdoAc se dá de forma mais equivalente (1:1) (ACHUR *et al.*, 2004), com blocos de IdoAc distribuídos pela estrutura, formando polímeros com aproximadamente 40 unidades dissacarídicas (PLAAS *et al.*, 2001), sendo essas unidades compostas por aproximadamente 60% de unidades sem sulfatação, e com 28% de unidades sulfatadas em C-4 da Galactosamina, nesse tipo de DS também podem ser encontrados até 8% de sulfatações em C-6 na sua estrutura (PLAAS *et al.*, 2001). Todos esses dissacarídeos, relatados por diferentes autores, puderam ser encontrados nas estruturas dos polímeros através das análises espectroscópicas e dosagens acima apresentadas. Devido as condições médico sanitárias do Brasil, uma

análise mais profunda na composição dissacarídica dos polímeros, não foi realizada a tempo da defesa desta dissertação.

Os resultados da demonstram que o tempo de protrombina não foi afetado, no modelo *in vivo*, após a administração de DS. Dessa forma o efeito atitrombótico do DS não afeta o tempo de sangramento, reduzindo assim os potenciais efeitos colaterais de aumento de sangramentos e hemorragias, o que difere da Hep que em doses equipotentes as do DS demonstraram aumentos significativos no tempo de sangramento e possui como principal efeito colateral o aumento de sangramentos e episódios hemorrágicos (MAGGI *et al.*, 1987). Esses dados evidenciam que os DS purificados podem agir como agentes antitromboticos no modelo animal testado, agindo de forma semelhante a heparina. Embora esta precise de uma dose menor que o DS para gerar tal efeito, observa-se, que em doses capaz de gerar efeito antitrobotico, o DS não apresenta tendência a sangramentos e somado ao estímulo a síntese de PG de HS endotelial, agindo assim por diferentes mecanismos, sendo o HS, atuante principalmente sobre a AT, e o DS exclusivamente sobre o HCII. Desta forma o DS se mostra capaz de exercer uma atividade antitrombótica semelhante a da Hep de baixo peso molecular, no entanto sem apresentar o principal efeito colateral desta, as hemorragias. Estes DS também mostraram-se capaz de exercer efeito nas células endoteliais, possuindo assim um papel fisiológico na manutenção da hemostase do endotélio.

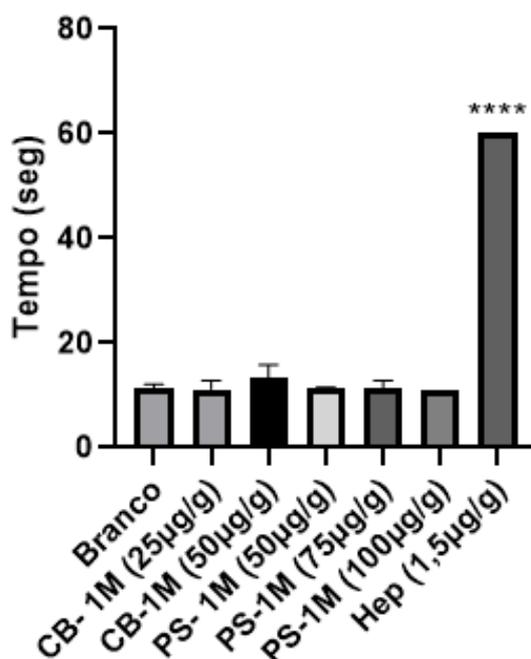


Figura 31 - Ensaio de atividade anticoagulante *in vitro*, tempo de trombina (PT) dos ratos. 100µL do plasma dos animais utilizados no ensaio foram incubados por 2min a 37°C, após esse período 200µL do reagente 1 foram adicionados aos tubos, como indicado pelo fabricante. Após foi realizado uma análise multivariada (one-way ANOVA) utilizando o teste de Dunnett, dessa forma todas as amostras foram comparadas com o controle. Diferenças significativas estão representadas pelo asterisco no topo da coluna, assim como o nível de significância (****: $p=0,0001$). Controle: ratos injetados com 200µL de salina, PS-1M 50: 50µg de DS de pele suína eluido na concentração de 1M de NaCl (teor de DS: 58,089%), PS-1M 75: 75µg de DS de pele suína eluido na concentração de 1M de NaCl (teor de DS: 58,089%), PS-1M 100: 100µg de DS de pele suína eluido na concentração de 1M de NaCl (teor de DS: 58,089%), CB- 1M 25: 25 µg de DS de córnea bovina eluido na concentração de 1M de NaCl (teor de DS: 76,974%) , CB- 1M 50: 50 µg de DS de córnea bovina eluido na concentração de 1M de NaCl (teor de DS: 76,974%), Hep: 1,5µg de heparina.

5. CONCLUSÃO

Concluimos neste trabalho que a extração de GAGs de diferentes tecidos nos levaram a rendimentos acima dos valores encontrados na literatura para a maioria dos tecidos estudados. Sendo o perfil de migração eletroforética em gel de agarose 0,5% tampão PDA distintos para cada material, bem como, as intensidades de metacromasia após as colorações. No entanto, a maioria dos tecidos avaliados apresentaram bandas comigrando com o DS.

A purificação e análise dos GAGs de CB e PS, após fracionamento com cromatografia de troca iônica em Q-sepharose foi efetiva para o presente trabalho. Com a separação de três GAGs para CB (CB-0,5M, CB-1M, CB-2M) e dois para PS (PS-1M, PS-2M). Análises físico-químicas e espectroscópicas, permitiram classificar tais polissacarídeos em três famílias distintas, sendo o CB-05M classificado como um Ac. Hialurônico, CB-1M como um DS, e CB-2M como um KS. As amostras de PS foram ambas classificadas como DS.

As frações de DS extraídas e purificadas no trabalho, CB-1M e PS-1M, puderam ser avaliadas quanto a sua atividade antitrombótica *in vivo* e *in vitro*. Com ambas demonstrando atividade em uma resposta dose dependente.

Ambos DS foram avaliados também em relação a sua capacidade de estimular a síntese de HS endotelial. Com resultados promissores, onde foi demonstrado pela primeira vez a capacidade dos DS em estimular o HS endotelial.

REFERÊNCIAS

ACHUR, Rajeshwara N. *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycans of bovine cornea: structural characterization and assessment for the adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics** v. 1701, n. 1–2, p. 109–119, set. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963904001694>>.

AFONSO, Ana *et al.* A terapêutica antitrombótica: atual e em desenvolvimento. **Angiologia e Cirurgia Vasculiar** v. 12, n. 3, p. 170–179, set. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1646706X16300581>>.

ALLEN, Debra H.; TRACY, Paula B. Human Coagulation Factor V Is Activated to the Functional Cofactor by Elastase and Cathepsin G Expressed at the Monocyte Surface. **Journal of Biological Chemistry** v. 270, n. 3, p. 1408–1415, jan. 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818830162>>.

BAI, Mingyue *et al.* Glycosaminoglycans from a Sea Snake (*Lapemis curtus*): Extraction, Structural Characterization and Antioxidant Activity. **Marine Drugs** v. 16, n. 5, p. 170, 18 maio 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/16/5/170>>.

BEDINI, Emiliano *et al.* Chondroitin, Dermatan, Heparan, and Keratan Sulfate: Structure and Functions. [S.l: s.n.], 2019. p. 187–233. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-12919-4_5>. 9783030129194.

BEN MANSOUR, Mohamed *et al.* Polysaccharides from the skin of the ray *Raja radula*. Partial characterization and anticoagulant activity. **Thrombosis Research** v. 123, n. 4, p. 671–678, fev. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2008.05.018>>.

BITTER, T.; MUIR, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry** v. 4, n. 4, p. 330–334, out. 1962. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269762900957>>.0003-2697.

BLINDER, M. A. *et al.* Heparin Cofactor II/Oslo. **Journal of Biological Chemistry** v. 264, n. 9, p. 5128–5133, mar. 1989. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818837085>>.

BOSSENNEC, V.; PETITOU, M.; PERLY, B. ^1H -n.m.r. investigation of naturally occurring and chemically oversulphated dermatan sulphates. Identification of minor monosaccharide residues. **Biochemical Journal** v. 267, n. 3, p. 625–630 , 1 maio 1990. Disponível em:

<<https://portlandpress.com/biochemj/article/267/3/625/36634/1Hnmr-investigation-of-naturally-occurring-and>>.

BRADFORD, Marion M; M. M. BRADFORD. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry** v. 72, n. 1–2, p. 248–254 , 1976.

BRIMACOMBE, J.S.; STACEY, M. Mucopolysaccharides in Disease. **Advances in clinical chemistry**. [S.l.]: Elsevier, 1964. 7 v. p. 199–234. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065242308603753>>. 0065-2423.

CASTILLO, C. J.; COLBURN, P.; BUONASSISI, V. Characterization and N-terminal sequence of a heparan sulphate proteoglycan synthesized by endothelial cells in culture. **Biochemical Journal** v. 247, n. 3, p. 687–693 , 1 nov. 1987. Disponível em: <<https://portlandpress.com/biochemj/article/247/3/687/22979/Characterization-and-Nterminal-sequence-of-a>>.

CHAN, Noel C.; WEITZ, Jeffrey I. Antithrombotic Agents. **Circulation Research** v. 124, n. 3, p. 426–436 , fev. 2019. Disponível em:

<<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.118.313155>>.

CHAPIN, John C.; HAJJAR, Katherine A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Reviews** v. 29, n. 1, p. 17–24 , 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003>>.

COCKIN, Gordon H; HUCKERBY, T N; NIEDUSZYNSKI, Ian A. High-field n.m.r. studies of keratan sulphates. ^1H and ^{13}C assignments of keratan sulphate from shark cartilage. **Biochemical Journal** v. 236, n. 3, p. 921–924 , 15 jun. 1986.

Disponível em:

<<https://portlandpress.com/biochemj/article/236/3/921/22352/Highfield-nmr-studies-of-keratan-sulphates-1H-and>>.

CÖSTER, L; FRANSSON, L A. Isolation and characterization of dermatan sulphate

proteoglycans from bovine sclera. **Biochemical Journal** v. 193, n. 1, p. 143–153 , 1 jan. 1981. Disponível em:

<<https://portlandpress.com/biochemj/article/193/1/143/19088/Isolation-and-characterization-of-dermatan>>.

CUNNINGHAM, LEON. The structure and mechanism of action of papain.

Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences v. 257, n. 813, p. 237–248 , 12 fev. 1970. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781483197104500106>>.

DAMLE, S. P.; CÖSTER, L.; GREGORY, J. D. Proteodermatan sulfate isolated from pig skin. **Journal of Biological Chemistry** v. 257, n. 10, p. 5523–5527 , maio 1982.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819838085>>.

DAVIE, Earl W. A Brief Historical Review of the Waterfall/Cascade of Blood Coagulation. **Journal of Biological Chemistry** v. 278, n. 51, p. 50819–50832 , 2003.

DAVIE, Earl W.; FUJIKAWA, Kazuo; KISIEL, Walter. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry** v. 30, n. 43, p. 10363–10370 , out. 1991. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00107a001>>.

DAVIE, Earl W.; RATNOFF, O. D. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. **Science** v. 145, n. 3638, p. 1310–1312 , 18 set. 1964. Disponível em:

<<https://www.jstor.org/stable/1713886%0A>>.

DE AGOSTINI, A I *et al.* Localization of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta. **Journal of Cell Biology** v. 111, n. 3, p. 1293–1304 , 1 set. 1990. Disponível em:

<<https://rupress.org/jcb/article/111/3/1293/59610/Localization-of-anticoagulant-active-heparan>>.

DIETRICH, C; NADER, H. Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparitin sulfate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects** v. 343, n. 1, p. 34–44 , mar. 1974.

DIETRICH, Carl P.; DIETRICH, Sonia M.C. Electrophoretic behaviour of acidic

mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry** v. 70, n. 2, p. 645–647 , 1976.

DIETRICH, Carl P.; MCDUFFIE, Norman M.; SAMPAIO, Lucia O. Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. **Journal of Chromatography A** v. 130, n. C, p. 299–304 , jan. 1977. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730089809X>>.

DODGSON, K S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemical Journal** v. 78, n. 2, p. 312 , 1961.

ET, Biochimica; ACTA, Biophysica. BJORN OBRINK Institute of Medical Chemistry, University of Uppsala, Uppsala (Sweden) (Received December 21st, 1971). v. 264, n. 1972, p. 354–361 , 1971.

FAN, Ping *et al.* Recent progress and market analysis of anticoagulant drugs. **Journal of Thoracic Disease** v. 10, n. 3, p. 2011–2025 , mar. 2018. Disponível em: <<http://jtd.amegroups.com/article/view/19859/15565>>.

FERRANTE, Nicola Di *et al.* Induced Degradation of Glycosaminoglycans in Hurler's and Hunter's Syndromes by Plasma Infusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 68, n. 2, p. 303–307 , fev. 1971.

FRANSSON, Lars-Åke *et al.* The copolymeric structure of pig skin dermatan sulphate. Isolation and characterization of l-idurono-sulphate-containing oligosaccharides from copolymeric chains. **Biochemical Journal** v. 143, n. 2, p. 379–389 , 1 nov. 1974. Disponível em: <<https://portlandpress.com/biochemj/article/143/2/379/9516/The-copolymeric-structure-of-pig-skin-dermatan>>.

GAO, Guangxia; GOLDFARB, Mitchell. Heparin can activate a receptor tyrosine kinase. **The EMBO Journal** v. 14, n. 10, p. 2183–2190 , maio 1995. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07212.x>>.

GAVVA, Chandra *et al.* Glycosaminoglycans from fresh water fish processing discard - Isolation, structural characterization, and osteogenic activity. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 145, p. 558–567 , fev. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.189>>.

GRIFFIN, John H; ZLOKOVIC, Berislav V.; MOSNIER, Laurent O. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. **International Journal of Hematology** v. 95, n. 4, p. 333–345 , abr. 2012.

HAO, Cui *et al.* Low molecular weight heparins and their clinical applications. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2019. 163 v. p. 21–39. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.02.003>>. 9780128177402.

HEALTHCARE, G E. **Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods**. [S.l: s.n.], 2016. 170 p. www.gelifesciences.com.11-0004-21.

HILBORN, J.C.; ANASTASSIADIS, P.A. Estimation of the molecular weights of acidic mucopolysaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry** v. 39, n. 1, p. 88–92 , jan. 1971.

HIRSH, Jack *et al.* Heparin: Mechanism of Action, Pharmacokinetics, Dosing Considerations, Monitoring, Efficacy, and Safety. **Chest** v. 102, n. 4, p. 337S-351S , out. 1992. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369215413315>>.

HIRSH, Jack *et al.* Heparin: Mechanism of Action, Pharmacokinetics, Dosing Considerations, Monitoring, Efficacy, and Safety. **Chest** v. 108, n. 4, p. 258S-275S , out. 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369216338983>>.

HOFFMAN, Maureane. A cell-based coagulation factor VIIa and the role of. **Blood Reviews** v. 17, p. S1–S5 , 2003a.

HOFFMAN, Maureane. Remodeling the Blood Coagulation Cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis** v. 16, n. 1/2, p. 17–20 , ago. 2003b. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/B:THRO.0000014588.95061.28>>.

HOFFMAN, Maureane *et al.* Rethinking the Coagulation Cascade. **Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis** v. 16, n. 1, p. 70–81 , 2005. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jjsth/16.70?from=CrossRef>>.

HOFFMAN, Maureane; MONROE, Dougald M.; ROBERTS, Harold R. Cellular

Interactions in Hemostasis. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis** v. 26, n. 1, p. 12–16 , 1996.

HOFFMAN, Maureane; MONROE, Dougald M. Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis. **Hematology/Oncology Clinics of North America** v. 21, n. 1, p. 1–11 , fev. 2007.

HOPPENSTEADT, D.; WALENGA, J.M.; FAREED, J. Comparative antithrombotic and hemorrhagic effects of dermatan sulfate, heparin sulfate and heparin.

Thrombosis Research v. 60, n. 3, p. 191–200 , nov. 1990. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004938489090180K>>.

HORTIN, G.; TOLLEFSEN, D. M.; STRAUSS, A. W. Identification of two sites of sulfation of human heparin cofactor II. **Journal of Biological Chemistry** v. 261, n. 34, p. 15827–15830 , dez. 1986. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818666372>>.

HUNTINGTON, James A. Heparin Activation of Serpins. **Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate**. [S.l.]: Elsevier, 2005. 1 v. p. 367–398. 9780080448596.

IOZZO, Renato V.; GUBBIOTTI, Maria A. Extracellular matrix: The driving force of mammalian diseases. **Matrix Biology** v. 71–72, p. 1–9 , out. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.023>>.

IOZZO, Renato V.; SCHAEFER, Liliana. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. **Matrix Biology** v. 42, p. 11–55 , mar. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>>.

KAMAL, Arif H.; TEFFERI, Ayalew; PRUTHI, Rajiv K. How to Interpret and Pursue an Abnormal Prothrombin Time, Activated Partial Thromboplastin Time, and Bleeding Time in Adults. **Mayo Clinic Proceedings** v. 82, n. 7, p. 864–873 , jul. 2007.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002561961161313X>>.

KINGDON, Henry S.; DAVIE, Earl W.; RATNOFF, Oscar D. The Reaction between Activated Plasma Thromboplastin Antecedent and Diisopropylphosphorofluoridate *. **Biochemistry** v. 3, n. 2, p. 166–173 , fev. 1964.

KJEUIN, L.; LINDAHL, U. **Proteoglycans: Structures and Interactions**. [S.l.: s.n.],

1991. 443–475 p. .9110701044.

KYRLE, Paul A.; EICHINGER, Sabine. Deep vein thrombosis. **The Lancet** v. 365, n. 9465, p. 1163–1174 , mar. 2005. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673605718808>>.

LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B.G.; FRASER, J. R. E. The structure and function of hyaluronan : An overview. **Immunology and Cell Biology** v. 74, p. 1–7 , 1996.

LINDAHL, Ulf *et al.* **Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans**. 3rd. ed. [S.I.]: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2017.

Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/28876828>>. .

LINKINS, L.-A. Heparin induced thrombocytopenia. **BMJ** v. 350, n. jan08 7, p. g7566–g7566 , 8 jan. 2015. Disponível em:

<<https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.g7566>>.

LITTLE, Peter J.; BALLINGER, Mandy L.; OSMAN, Narin. Vascular wall proteoglycan synthesis and structure as a target for the prevention of atherosclerosis. **Vascular Health and Risk Management** v. 3, n. 1, p. 117–124 , 2007.

LONGAS, Maria O.; RUSSELL, Charlotte S.; HE, Xue-Ying. Chemical alterations of hyaluronic acid and dermatan sulfate detected in aging human skin by infrared spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects** v. 884, n. 2, p. 265–269 , nov. 1986. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304416586901728>>.

LONGHI, Fernanda; LAKS, Dani; KALIL, Nelson G.N. Trombocitopenia induzida por heparina. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** v. 23, n. 2, p. 1071–1082 , ago. 2001. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300893207751667>>.

MACFARLANE, R. G. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier. **Nature** v. 202, n. 4931, p. 498–499 , maio 1964. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/202498a0>>.

MACFARLANE, R. G.; BIGGS, Rosemary. A Thrombin Generation Test. **Journal of clinical pathology** v. 6, n. 1, p. 3–8 , 1953.

MACKIE, I. J.; BULL, H. A. Normal haemostasis and its regulation. **Blood Reviews**

v. 3, n. 4, p. 237–250 , 1989.

MACKMAN, Nigel *et al.* Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 19, n. 5, p. 333–352 , 2020.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41573-020-0061-0>>.

MACKMAN, Nigel. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature** v. 451, n. 7181, p. 914–918 , 20 fev. 2008. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/nature06797>>.

MAGGI, Antonio *et al.* Antithrombotic Properties of Dermatan Sulphate in a Rat Venous Thrombosis Model. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis** v. 17, n. 6, p. 329–335 , 28 set. 1987. Disponível em:

<<https://www.karger.com/Article/FullText/215765>>.

MAIMONE, M. M.; TOLLEFSEN, D. M. Structure of a dermatan sulfate hexasaccharide that binds to heparin cofactor II with high affinity. **Journal of Biological Chemistry** v. 265, n. 30, p. 18263–18271 , 1990.

MALMSTRÖM, Anders *et al.* Iduronic Acid in Chondroitin/Dermatan Sulfate. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry** v. 60, n. 12, p. 916–925 , 16 dez. 2012.

Disponível em: <<http://jhc.sagepub.com>>.

MALMSTROM, Anders; FRANSSON, Lars-Ake. Structure of Pig Skin Dermatan Sulfate. 2. Demonstration of Sulfated Iduronic Acid Residues. **European Journal of Biochemistry** v. 18, n. 3, p. 431–435 , fev. 1971. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1971.tb01260.x>>.

MARLAR, Richard A; KLEISS, Alice J; GRIFFIN, John H. Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. **Blood** v. 59, n. 5, p. 1067–1072 , 1982.

MASCELLANI, G. *et al.* Structure and contribution to the heparin cofactor II-mediated inhibition of thrombin of naturally oversulphated sequences of dermatan sulphate. **Biochemical Journal** v. 296, n. 3, p. 639–648 , dez. 1993a.

MASCELLANI, G. *et al.* Structure and contribution to the heparin cofactor II-mediated inhibition of thrombin of naturally oversulphated sequences of dermatan sulphate.

Biochemical Journal v. 296, n. 3, p. 639–648 , 15 dez. 1993b. Disponível em:

<<https://portlandpress.com/biochemj/article/296/3/639/31468/Structure-and-contribution-to-the-heparin-cofactor>>.

MCCARTHY, Cian P. *et al.* Running thin: implications of a heparin shortage. **The Lancet** v. 395, n. 10223, p. 534–536 , 2020. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33135-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33135-6)>.

MEDEIROS, Valquíria P. *et al.* Heparin-integrin interaction in endothelial cells: Downstream signaling and heparan sulfate expression. **Journal of Cellular Physiology** v. 227, n. 6, p. 2740–2749 , jun. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.23018>>.

MEYER, Karl *et al.* THE MUCOPOLYSACCHARIDES OF BOVINE CORNEA. **Journal of Biological Chemistry** v. 205, n. 2, p. 611–616 , dez. 1953. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)49203-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)49203-4)>.

MICHELACCI, Y.M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 36, n. 8, p. 1037–1046 , ago. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2003000800009&lng=en&tlng=en>.

MONKOVIC, Don D.; TRACY, Paula B. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. **Biochemistry** v. 29, n. 5, p. 1118–1128 , 6 fev. 1990. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00457a004>>.

MORAWITZ, P. Beitrage zur kennnis der blutgerinnung. **Dtsch Arch Klin Med** v. 79, p. 1–3 , 1904.

MORAWITZ. Paul. **The chemistry of blood coagulation**. [S.l.: s.n.], 1958.

NADER, H. B. *et al.* Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 84, n. 11, p. 3565–3569 , 1 jun. 1987. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.84.11.3565>>.

NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Determination of Sulfate after Chromatography Toluidine Blue Complex Formation. **Analytical Biochemistry** v. 118, p. 112–118 , 1977.

- NADER, H.B. *et al.* Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 34, n. 6, p. 699–709 , jun. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2001000600002&lng=en&tlng=en>.0100-879X.
- NADER, Helena B. *et al.* Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology** v. 140, n. 2, p. 305–310 , 1989.
- NEGRIER, Claude; SHIMA, Midori; HOFFMAN, Maureane. The central role of thrombin in bleeding disorders. **Blood Reviews** v. 38, p. 100582 , 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.05.006>>.
- NOGUEIRA, Alexsandro V. *et al.* Viscera of fishes as raw material for extraction of glycosaminoglycans of pharmacological interest. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 121, p. 239–248 , jan. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.156>>.
- OLDS, R. J. *et al.* Antithrombin III Budapest: A single amino acid substitution (429Pro to Leu) in a region highly conserved in the serpin family. **Blood** v. 79, n. 5, p. 1206–1212 , 1992.
- OLIVER, Julie A. *et al.* Thrombin Activates Factor XI on Activated Platelets in the Absence of Factor XII. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** v. 19, n. 1, p. 170–177 , jan. 1999. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.19.1.170>>.
- ONISHI, Akihiro *et al.* Heparin and anticoagulation. **Frontiers in Bioscience - Landmark** v. 21, n. 7, p. 1372–1392 , 2016.
- OWREN, Paul Arnor. The coagulation of blood; investigations on a new clotting factor. **Acta Med Scand** v. 194, p. 1–7 , 1947.
- PATRIARCHEAS, Vasileios *et al.* Heparin-induced Thrombocytopenia: Pathophysiology, Diagnosis and Management. **Cureus** v. 12, n. 3 , 2020.
- PAVÃO, Mauro S.G. *et al.* Highly Sulfated Dermatan Sulfates from Ascidians. **Journal of Biological Chemistry** v. 273, n. 43, p. 27848–27857 , out. 1998.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819595382>>.

PENG, Yanfei *et al.* Glycosaminoglycans from bovine eye vitreous humour and interaction with collagen type II. **Glycoconjugate Journal** v. 35, n. 1, p. 119–128 , 5 fev. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10719-017-9808-1>>.1071901798081.

PLAAS, Anna H. *et al.* Altered Fine Structures of Corneal and Skeletal Keratan Sulfate and Chondroitin/Dermatan Sulfate in Macular Corneal Dystrophy. **Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 43, p. 39788–39796 , 26 out. 2001. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M103227200>>.0021-9258 (Print)r0021-9258 (Linking).

POBLACIÓN, Carlos A.; MICHELACCI, Yára M. Structural differences of dermatan sulfates from different origins. **Carbohydrate Research** v. 147, n. 1, p. 87–100 , mar. 1986. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0008621586850091>>.

POLATNICK, Jerome; LA TESSA, A.J.; KATZIN, H.M. Comparison of bovine corneal and scleral mucopolysaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 26, n. 2, p. 361–364 , nov. 1957. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006300257900161>>.

POMIN, Vitor H. NMR Chemical Shifts in Structural Biology of Glycosaminoglycans. **Analytical Chemistry** v. 86, n. 1, p. 65–94 , 7 jan. 2014. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac401791h>>.

POMIN, Vitor H. *et al.* Residual keratan sulfate in chondroitin sulfate formulations for oral administration. **Carbohydrate Polymers** v. 90, n. 2, p. 839–846 , out. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.156>>.

PRYDZ, Kristian. Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. **Biomolecules** v. 5, n. 3, p. 2003–2022 , 21 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2218-273X/5/3/2003>>.4722856753.

RAU, J. C. *et al.* Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v. 5, n. SUPPL. 1, p. 102–115 , 9 jul. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2007.02516.x>>.

RIDDEL, James P. *et al.* Theories of blood coagulation. **Journal of Pediatric Oncology Nursing** v. 24, n. 3, p. 123–131 , 2007.

RONDLE, C. J. M.; MORGAN, W. T. J. The determination of glucosamine and galactosamine. **Biochemical Journal** v. 61, n. 4, p. 586–589 , dez. 1955.

SAMPAIO, Lucia O.; NADER, Helena B. Emergence and Structural Characteristics of Chondroitin Sulfates in the Animal Kingdom. **Advances in Pharmacology**. [S.l.: s.n.], 2006. 53 v. p. 233–251. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1054358905530114>>. 0120329557.

SCHAEFER, Liliana *et al.* Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology. **The FEBS Journal** v. 284, n. 1, p. 10–26 , 7 jan. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/febs.13963>>.

SOBCZAK, Amélie I.S.; PITT, Samantha J.; STEWART, Alan J. Glycosaminoglycan Neutralization in Coagulation Control. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** v. 38, n. 6, p. 1258–1270 , jun. 2018. Disponível em:

<<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.118.311102>>.

SRIDHARAN, Gokul; SHANKAR, Akhil A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology** v. 16, n. 2, p. 251–255 , 2012.

SUCKER, Christoph; ZOTZ, Rainer B. The Cell-Based Coagulation Model. p. 3–11 , 2015.

TOLLEFSEN, D. M.; PEACOCK, M. E.; MONAFO, W. J. Molecular size of dermatan sulfate oligosaccharides required to bind and activate heparin cofactor II. **Journal of Biological Chemistry** v. 261, n. 19, p. 8854–8858 , 1986.

TOLLEFSEN, D M. Activation of heparin cofactor II by heparin and dermatan sulfate. **Nouvelle revue française d'hématologie** v. 26, n. 4, p. 233–237 , 1984.

TOLLEFSEN, Douglas M. Vascular Dermatan Sulfate and Heparin Cofactor II. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2010. 93 v. p. 351–372.

TROWBRIDGE, J. M.; GALLO, R. L. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. **Glycobiology** v. 12, n. 9, p. 117R-125R , 1 set. 2002.

Disponível em: <<https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwf066>>.0959-6658.

VARKI, Ajit *et al.* **Essentials of Glycobiology [internet]**. [S.l.]: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. .

VIOLA, Manuela *et al.* EroS enzyme from *Aliivibrio fischeri* plays Cupid to choanoflagellates. **chem bio chem** From Duplicate 14 (Extraction , Isolation and Analysis of Chondroitin Sulfate Glycosamino - glycans - Nakano, Takuo; Betti, Mirko; Pietrasik, Zeb)describe well the process used to extract and purify DS in my case studydescribes other methods as well although I can focus in see how they wrote about my workFrom Duplicate 21 (Elucidation of the Mechanism of Polysaccharide Cleavage by Chondroitin AC lyase from *F.heparinum* - Rye, Carl S.; Withers, Stephen G.)proposed mechanis of polysacaride lyases, v. 4, n. 2, p. 1–11 , 2006. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/95342/article>>.0002-7863.

WENDELBOE, Aaron M.; RASKOB, Gary E. Global Burden of Thrombosis. **Circulation Research** v. 118, n. 9, p. 1340–1347 , 29 abr. 2016. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.115.306841>>.

WEYERS, Amanda *et al.* Isolation of bovine corneal keratan sulfate and its growth factor and morphogen binding. **FEBS Journal** v. 280, n. 10, p. 2285–2293 , 2013.

WHO. *Cardiovascular diseases*. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>.

YAMADA, Shuhei; SUGAHARA, Kazuyuki; ÖZBEK, Suat. Evolution of glycosaminoglycans. **Communicative & Integrative Biology** v. 4, n. 2, p. 150–158 , 27 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cib.4.2.14547>>.1942-0889 (Electronic).