

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Tayná Rodrigues Coelho**

**Glicosaminoglicano do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*: caracterização físico-química e atividades anticoagulante e antitrombótica.**

**Juiz de Fora**  
**2022**

**Tayná Rodrigues Coelho**

**Glicosaminoglicano do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*: caracterização físico-química e atividades anticoagulante e antitrombótica.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Área de concentração: Produtos Naturais.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Valquíria Pereira de Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar

**Juiz de Fora**

**2022**

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

Rodrigues Coelho, Tainá.

Glicosaminoglicano do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* : caracterização físico-química e atividades anticoagulante e antitrombótica / Tainá Rodrigues Coelho. -- 2022.

98 p.

Orientadora: Valquíria Pereira de Medeiros

Coorientador: Jair Adriano Kopke de Aguiar

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. *Farfantepenaeus brasiliensis*. 2. anticoagulant. 3. antithrombotic. I. Pereira de Medeiros, Valquíria, orient. II. Adriano Kopke de Aguiar, Jair, coorient. III. Título.

**Tayná Rodrigues Coelho**

**Glicosaminoglicano do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*: caracterização físico-química e atividades anticoagulante e antitrombótica**

Dissertação  
apresentada ao  
Programa de Pós-  
Graduação em  
Ciências  
Farmacêuticas  
da Universidade  
Federal de Juiz de  
Fora como requisito  
parcial à obtenção do  
título de Mestre em  
Ciências  
Farmacêuticas. Área  
de concentração:  
Produtos Naturais e  
Sintéticos Ativos.

Aprovada em 13 de maio de 2022.

BANCA EXAMINADORA

**Prof(a). Dr(a). Valquíria Pereira de Medeiros - Orientadora**

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar - Coorientador**

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof(a). Dr(a). Juliana Luporini Dreyfuss Regatieri**

Universidade Federal de São Paulo

**Prof(a). Dr(a). Fabiana Ourique da Silva**

Juiz de Fora, 08/09/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Valquiria Pereira de Medeiros, Professor(a)**, em 08/09/2022, às 16:57, 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 **Fabiana Ourique da Silva, Professor(a)**, em 09/09/2022, às 10:03, 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 09/09/2022, às 12:00, 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 **Juliana Dreyfuss Regatieri, Usuário Externo**, em 23/09/2022, às 12:41, 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](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0941030** e o código CRC **51C8689B**.

## **AGRADECIMENTOS**

Um trabalho de mestrado é uma longa viagem, que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, tristezas, incertezas, alegrias e muitos percalços pelo caminho, mas apesar do processo várias pessoas foram indispensáveis para encontrar o melhor rumo em cada momento da caminhada.

Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas, a quem dedico especialmente este projeto.

Especialmente à minha orientadora, Professora Doutora Valquíria Medeiros, que me deu a oportunidade da pesquisa, do aprendizado e iniciação à docência. Agradeço pela orientação que permitiu, passo por passo, a realização deste trabalho e por toda paciência durante essa caminhada que não foi nada fácil para mim.

Igualmente agradeço ao meu coorientador Professor Doutor Jair Adriano Kopke de Aguiar que contribuiu juntamente para a construção deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Glicoconjugados, que além do apoio e motivação, ajudaram a tornar este trabalho uma válida e agradável experiência de aprendizagem. Obrigada por todos os momentos compartilhados.

À minha família, pelo encorajamento nos momentos cruciais desta difícil jornada.

Ao meu companheiro de vida, Felipe, pelo amor, partilha, companheirismo e apoio incondicional, agradeço a enorme compreensão, generosidade e por sempre acreditar em mim.

## RESUMO

Glicosaminoglicanos de animais marinhos são compostos com grande potencial terapêutico devido a sua variabilidade estrutural. O objetivo deste estudo foi realizar a extração, caracterização química, e investigar as atividades anticoagulante e antitrombótica do heparam sulfato (HS) obtido do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*. A fração F2M foi obtida por cromatografia em resina de troca iônica em *step-wise*, analisada por eletroforese em gel de agarose em dois sistemas de tampões (PDA e Ba/PDA), seu conteúdo químico foi determinado por dosagens químicas (conteúdo de hexosamina, ácido urônico, sulfato e proteína residual). O peso molecular modal foi estimado por eletroforese e gel de poliacrilamida. As características estruturais do HS foram obtidas por despolimerização enzimática utilizando liases oriundas da *Flavobacterium heparinum* (heparinase e heparitinases) e por meio de técnicas espectroscópicas RAMAN e FT-IR. A atividade anticoagulante foi investigada *in vitro* pelo método USP 1965, TTPa, Tempo de Fibrinogênio e inibição dos fatores Xa e IIa. Em RAEC, foi avaliado a capacidade do HS em estimular a síntese do proteoglicano de heparam sulfato (PGHS) antitrombótico, utilizando marcação metabólica com sulfato [ $S^{35}$ ]. A atividade antitrombótica foi avaliada *in vivo* (CEUA/UFJF 014/2019) pelo modelo de trombose induzida pela ligadura da veia cava inferior, em ratos machos *Wistar* e, foi avaliada o TTPa no sangue dos ratos expostos a fração F2M. A Atividade hemorrágica *in vivo* da fração F2M do camarão *F. brasiliensis* foi realizada utilizando ratos machos *Wistar*, pelo modelo de escarificação caudal. Os resultados demonstraram que a fração F2M apresentou bandas de migração eletroforética com metacromasia similar ao HS, alta concentração de sulfatos, peso molecular de 56,86 kDa, e é composta pelos dissacarídeos  $\Delta$ U-GlcNS, 6S e  $\Delta$ U-GINS, comumente encontrados em HS de animais terrestres. A fração F2M na concentração de 55  $\mu$ g/ $\mu$ l, prolongou o TTPa em 8 vezes em relação ao controle negativo, inibiu significativamente os fatores Xa e IIa, 60% e 90%, respectivamente. RAEC estimuladas com fração F2M (13,7 e 27,5  $\mu$ /mL) apresentaram aumento de síntese de PGHS de maneira dose-dependente. Na análise da atividade antitrombótica *in vivo*, a fração F2M (27,5  $\mu$ /mL) reduziu em 80% o trombo formado após 1 hora de exposição, no entanto não foi observado prolongamento do TTPa quando avaliado no sangue desses animais. Além disso, a fração F2M não apresentou sangramento residual significativo quando comparado a heparina. Os resultados mostraram que o HS obtido do cefalotórax do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* apresenta atividade antitrombótica e anticoagulante promissoras e sugerem que a atividade antitrombótica pode

não estar correlacionada somente com a inibição dos fatores envolvidos na via intrínseca da coagulação sanguínea.

Palavras-chave: *Farfantepeneaus brasiliensis*, anticoagulante, antitrombótica.

## ABSTRACT

Glycosaminoglycans from marine animals are compounds with great therapeutic potential due their structural variability. The aim of this study was to perform the extraction, Chemical characterization, and to investigate the anticoagulant and antithrombotic activities of heparan sulfate (HS) obtained from the shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis*. The F2M fraction was obtained by step-wise ion Exchange resin chromatography, analyzed by agarose gel electrophoresis in two buffer systems (PDA and Ba/PDA) its Chemical content was determined by Chemical assays (hexosamine content, uronic acid, sulfate and residual protein). The modal molecular weight was estimated by electrophoresis and polyacrylamide gel. The structural characteristics of HS were obtained by enzymatic depolymerization using lyases from *Flavobacterium heparinum* (heparinase and heparinases) and by means of RAMAN and FT-IR spectroscopic techniques. The anticoagulant activity was investigated *in vitro* by the USP 1965 method, aPTT, Fibrinogen Time and inhibition of factors Xa and IIa. In RAEC, the ability of HS to stimulate the synthesis of antithrombotic heparan sulfate proteoglycan (PGHS) was evaluated using metabolic sulfate labeling [ $S^{35}$ ]. Antithrombotic activity was evaluated *in vivo* (CEAUA/UFJF 014/2019) by the model of thrombosis induced by ligation of the inferior vena cava, in male Wistar rats, and the aPTT in the blood of rats exposed F2M fraction was evaluated. The *in vivo* hemorrhagic activity of the F2M fraction of *F. brasiliensis* shrimp was performed using male Wistar rats, using the caudal scarification model. The results showed that the F2M fraction showed electrophoretic migration bands with metachromasia similar to HS, high concentration of sulfates, molecular weight of 56.86 kDa, and is composed of the disaccharides  $\Delta$ U-GlcNS, 6S e  $\Delta$ U-GINS, commonly found in HS of terrestrial animals. The F2M fraction at a concentration of 55  $\mu$ g/ $\mu$ l prolonged the aPTT by 8 times in relation to the negative control, significantly inhibiting factors Xa and IIa, 60% and 90%, respectively. RAEC stimulated with F2M fraction (13.7 and 27.5  $\mu$ g/ mL) showed dose-dependent increase in PGHS synthesis. In the analysis of antithrombotic activity *in vivo*, the F2M fraction (27.5  $\mu$ g/ mL) reduced the thrombus formed after 1 hour of exposure by 80%. However, no prolongation on aPTT was observed When evaluated in the blood of these animals. In addition, the F2M fraction showed no significant residual bleeding when compared to heparin. The results showed that the HS obtained from the cephalothorax of the shrimp *F.brasiliensis* shows promising antithrombotic and anticoagulant activity and suggest that the antithrombotic activity may

not be correlated only with the inhibition of factors involved in the intrinsic pathway of blood clotting.

Key words: Farfantepeneaus brasiliensis, anticoagulant, antithrombotic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Unidade estrutural dos glicosaminoglicanos .....	17
Figura 2- Representação esquemática dos proteoglicanos.....	18
Figura 3-Representação esquemática da via Biosintética e papel biológico dos PGs na MEC .....	19
Figura 4-Participação das plaquetas na formação do tampão plaquetário (hemostasia primária) .....	21
Figura 5-Vias envolvidas da cascata da coagulação .....	22
Figura 6-Novo modelo da cascata da cascata da coagulação .....	27
Figura 7-Inibidores endógenos da cascata de coagulação .....	29
Figura 8-Participação do endotélio na hemostasia .....	31
Figura 9-Representação esquemática da estrutura do heparam sulfato de células endoteliais .....	32
Figura 10-Unidade hexassacarídica octassulfatada da heparina e seus dissacarídeos constituintes.....	33
Figura 11- Mecanismo de ação da heparina e heparina de baixo molecular .....	37
Figura 12 -Estrutura do heparam sulfato .....	38
Figura 13-Unidades dissacarídicas do HS obtido por degradação enzimática .....	36
Figura 14-Camarão <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> .....	41
Figura 15-Esquema de extração dos GAGS de camarão <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> .....	44
Figura 16-Células endoteliais de aorta de coelho (RAEC).....	50
Figura 17-Esquema ilustrativo do procedimento de ligadura da veia cava inferior.....	52
Figura 18- Esquema representativo do delineamento do modelo experimental de atividade hemorrágica por escarificação. ....	54
Figura 19 - Perfil de eluição de GAGs presentes no pó pós-proteólise do cefalotórax de camarão <i>F. brasiliensis</i> .....	56
Figura 20 - Perfil eletroforético das frações F 0.5M, F 1M e F 2M.....	57
Figura 21 - Perfil eletroforético da fração F2M em eletroforese em gel de agarose em sistema descontínuo (Ba/PDA).....	61
Figura 22- Perfil de migração e identificação dos produtos de degradação enzimática da fração F2M .....	67

Figura 23 - Proposta de heparam sulfato presente na fração F2M obtida do cefalotórax do camarão <i>F. brasiliensis</i> .....	68
Figura 24- Espectro de Infravermelho da fração F2M.....	69
Figura 25 -Espectro RAMAN da fração F2M.....	71
Figura 26 -Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) da fração F2M.....	74
Figura 27 -Tempo de Fibrinogênio.....	75
Figura 28-Inibição dos fatores Xa e IIa pela fração F2M obtida das vísceras de <i>F.brasiliensis</i> .....	78
Figura 29-Viabilidade celular de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) após estímulo com fração F2M.....	80
Figura 30 - Produção de PGHS por células endoteliais de aorta de coelho estimuladas com fração F2M.....	82
Figura 31 - Atividade antitrombótica <i>in vivo</i> da fração F2M obtida do camarão <i>F.brasiliensis</i> .....	83
Figura 32 - Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) no plasma de ratos.....	85
Figura 33 - Atividade hemorrágica <i>in vivo</i> da fração F2M obtida do camarão <i>F.brasiliensis</i> .....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química da fração F2M.....	63
Tabela 2- Atribuições das bandas de Infravermelho .....	70
Tabela 3 - Atribuições das bandas de Raman.....	71
Tabela 4 – Atividade anticoagulante – USP (1965).....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido hialurônico
APS	Persulfato de Amônio
CaCO-2	Células de câncer de cólon
CBR	Centro de reprodução animal
CETAVLON	Cetiltrimetilamônio
CS	Condroitim sulfato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Demitilsufóxido
DS	Dermatam sulfato
F0.5M	Fração de glicosaminoglicano de cabeça de camarão <i>Farfantepeneaus brasiliensis</i> obtida com NaCl 0,5M
F1M	Fração de glicosaminoglicano de cabeça de camarão <i>Farfantepeneaus brasiliensis</i> obtida com NaCl 1M
F2M	Fração de glicosaminoglicano de cabeça de camarão <i>Farfantepeneaus brasiliensis</i> obtida com NaCl 2M
<i>FTIR</i>	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GAG	Glicosaminoglicano
HS	Heparan Sulfato
IR	Infravermelho
LMWH	<i>Low Molecular Weight Heparin</i>
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PDA	1,3-diaminopropano acetato
PGs	Proteoglicanos
SFB	Soro fetal bovino
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TT	Tempo de protombina
TEMED	Tetrametil etileno diamina
TF	Fator tecidual
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcento
°C	Graus celsius
μL	Microlitro
μg	Micrograma
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1. GLICOSAMINOGLICANOS E PROTEOGLICANOS .....	16
2.2. HEMOSTASIA E COAGULAÇÃO.....	19
2.3. ENDOTÉLIO VASCULAR.....	26
2.3.1. <b>Proteoglicano de heparam sulfato e o endotélio vascular</b> .....	28
2.4. TROMBOSE.....	29
2.5. HEPARINA.....	31
2.6. HEPARAM SULFATO.....	34
2.7. GLICOSAMINOGLICANOS DE ORIGEM MARINHA.....	36
3. OBJETIVOS .....	38
3.1. OBJETIVO GERAL.....	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. MATERIAL.....	40
4.1.1. <b>Camarão <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i></b> .....	40
4.1.2. <b>Linhagem celular</b> .....	40
4.1.3. <b>Animais</b> .....	41
4.1.4. <b>Reagentes</b> .....	41
4.1.5. <b>Equipamentos</b> .....	41
4.2. MÉTODOS .....	42
4.2.1. <b>Extração dos glicosaminoglicanos</b> .....	42
4.2.1.1. <i>Proteólise</i> .....	42
4.2.1.2. <i>Purificação em cromatografia de troca iônica</i> .....	43
4.2.2. <b>Eletroforese</b> .....	44
4.2.2.1. <i>Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA)</i> .....	44
4.2.2.2. <i>Eletroforese em gel de agarose em dois sistemas de tampões: acetato de bário – 1,3 – diaminopropano acetato (Bário/PDA)</i> .....	44
4.2.2.3. <i>Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) – Estimativa de Peso Molecular</i> .....	45

4.2.3. <b>Dosagens químicas</b> .....	45
4.2.3.1. <i>Dosagem de ácidos urônicos</i> .....	45
4.2.3.2. <i>Dosagem de Hexosamina</i> .....	45
4.2.3.3. <i>Dosagem de proteína</i> .....	46
4.2.3.4. <i>Dosagem de sulfato</i> .....	46
4.2.4. <b>Despolimerização enzimática.</b> .....	46
4.2.4.1. <i>Incubação com as enzimas da Flavobacterium heparinum</i> .....	46
4.2.4.2. <i>Cromatografia descendente em papel</i> .....	46
4.2.5. <b>Espectroscopia RAMAN</b> .....	47
4.2.6. <b>Espectroscopia Infravermelho</b> .....	47
4.2.7. <b>Ensaio biológico</b> .....	47
4.2.7.1. <i>Atividade anticoagulante in vitro</i> .....	47
4.2.7.2. <i>Manutenção da linhagem celular (RAEC)</i> .....	48
4.2.7.3. <i>Teste de redução de MTT</i> .....	49
4.2.7.4. <i>Síntese de PGHS por células de aorta de coelho após estímulo com F2M do camarão F.brasiliensis</i> .....	50
4.2.7.5. <i>Atividade antitrombótica in vivo</i> .....	50
4.2.7.6. <i>Tempo de tromboplastina parcial ativada no plasma dos ratos</i> .....	52
4.2.7.7. <i>Atividade hemorrágica in vivo</i> .....	52
5. <b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	54
6. <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
6.1. <b>EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO CEFALOTÓRAX DO CAMARÃO <i>F. brasiliensis</i></b> .....	55
6.1.1. <b>Extração e purificação do bruto de glicosaminoglicanos</b> .....	55
6.1.2. <b>Eletroforese em gel de agarose e, dois sistemas de tampões: acetato de bário – 1,3 – diaminopropano acetato (PDA)</b> .....	59
6.1.3. <b>Dosagens químicas e estimativa de peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida</b> .....	61
6.1.4. <b>Despolimerização enzimática da fração F2M obtido do cefalotórax do camarão <i>F.brasiliensis</i></b> .....	62
6.1.5. <b>Análise por espectroscopia infravermelho e RAMAN da fração F2M do cefalotórax do camarão <i>F. brasiliensis</i></b> .....	65
6.2. <b>ENSAIOS BIOLÓGICOS</b> .....	71

6.2.1. Atividade anticoagulante.....	71
6.2.2. Teste de redução do MTT.....	78
6.2.3. Síntese de PGHS por células de aorta de coelho após estímulo com F2M do camarão <i>F.brasiliensis</i> .....	80
6.2.4. Atividade antitrombótica <i>in vivo</i> .....	82
6.2.5. Tempo de tromboplastina parcial ativada no plasma dos ratos.....	84
6.2.6. Atividade hemorrágica <i>in vivo</i> .....	86
7. CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS .....	88
ANEXOS .....	80
Anexo I.....	80
Anexo II.....	81

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Justificativa

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, estima-se que cerca de 17,9 milhões de pessoas morreram em 2019 em virtude de doenças cardiovasculares, representando 32% de todas as mortes registradas globalmente naquele ano. No Brasil, dentre as doenças crônicas classificadas como não transmissíveis (DCNT), as DCVs foram as responsáveis pelo maior número de óbitos em 2016, cerca de 28% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

A trombose é uma patologia caracterizada como a formação desregulada de coágulos sanguíneos, conhecidos como trombos ou eventos tromboembólicos, no interior de veias e artérias, prejudicando o fluxo normal de sangue. É a principal patologia subadjacente as doenças cardiovasculares (DCVs), sendo uma doença potencialmente fatal (NORTH AMERICAN TROMBOSIS FORUM, 2020).

Dentre as estratégias indicadas para a profilaxia e tratamento da trombose está a terapia farmacológica com o uso de anticoagulantes e antitrombóticos orais ou injetáveis, sendo a heparina de baixo peso molecular (LMWH, do inglês *low molecular weight heparin*) e a heparina não fracionada (UFH, do inglês *Unfractionated heparin*) dois dos principais medicamentos de escolha (NADER *et al.*, 2001; ANDERSON, D.R *et al.*, 2019).

A heparina, obtida a partir de mucosa bovina e suína, é uma macromolécula pertencente a classe dos glicosaminoglicanos (GAGs), polímeros de elevada densidade aniônica, heterogeneidade e complexidade estrutural. É largamente utilizada na prática clínica devido ao seu efeito anticoagulante e antitrombótico, sendo indicada tanto para o tratamento quanto profilaxia de eventos trombolíticos venosos e arteriais e controle da coagulação intravascular em processos cirúrgico (AFRATIS, 2012; KNELSO, BLOBE., 2014; WANG *et al.*, 2017, TSAI, ZULETA, HUNG., 2017).

No entanto, seu uso está associado a eventos adversos graves, como quadros hemorrágicos, desencadeados pela sua potência de ação e que, para tanto se faz necessário o acompanhamento do paciente (WEIZT, 1994; NADER *et al.*, 2001; SOKOLOVA, 2014). Até o presente momento, inexistente no mercado um medicamento que possa ser utilizado como alternativa a heparina no controle da coagulação.

Motivado por esse cenário, este trabalho foi conduzido com o propósito de explorar o potencial anticoagulante, antitrombótico e hemorrágico do heparam sulfato presente no cefalotórax do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*, a fim de avaliar o seu efeito anticoagulante, antitrombótico e, além disso, o efeito hemorrágico associado. Ademais, o uso da heparina, como agente anticoagulante e antitrombótico, apesar de efetivo, carrega consigo efeitos colaterais e adversos consideráveis e, por este motivo, se faz necessário a pesquisa e desenvolvimento de possíveis alternativas a heparina de origem suína e bovina que possam ser utilizadas no tratamento e profilaxia da trombose.

O heparam sulfato (HS), assim como a heparina, é uma macromolécula pertencente à família dos GAGs, que vem ganhando destaque devido ao seu potencial anticoagulante e antitrombótico associado a efeitos adversos mais brandos quando comparados a heparina. Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de isolar e caracterizar química e biologicamente HS obtidos a partir de diferentes fontes, principalmente HS obtido de animais marinhos (NADER *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2018).

O ambiente marinho devido a sua grande biodiversidade e em sua maioria inexplorada, é considerado uma fonte potencial de novas substâncias com estruturas químicas distintas e biologicamente ativas. O Brasil, por sua vez, apresenta um vasto litoral e, portanto, detêm uma considerável fonte de novas moléculas com potencial terapêutico (JIMÉNEZ., 2018). Os GAGs presentes nos tecidos de organismos marinhos distinguem-se dos GAGs encontrados em animais terrestres por apresentarem particularidades estruturais relacionadas à densidade de cargas aniônicas, padrão de repetição de unidades monoméricas e peso molecular. Tais diferenças conferem-lhes propriedades biológicas distintas e grande potencial farmacológico, uma vez que a ação desses compostos se deve a sua composição, complexidade e heterogeneidade química (VALCARCEL *et al.*, 2017).

Portanto, o presente estudo foi desenvolvido por meio da extração, caracterização química do HS de origem marinha, e norteado pela avaliação dos efeitos desse sobre a coagulação sanguínea, a fim de explorar alternativas à heparina.

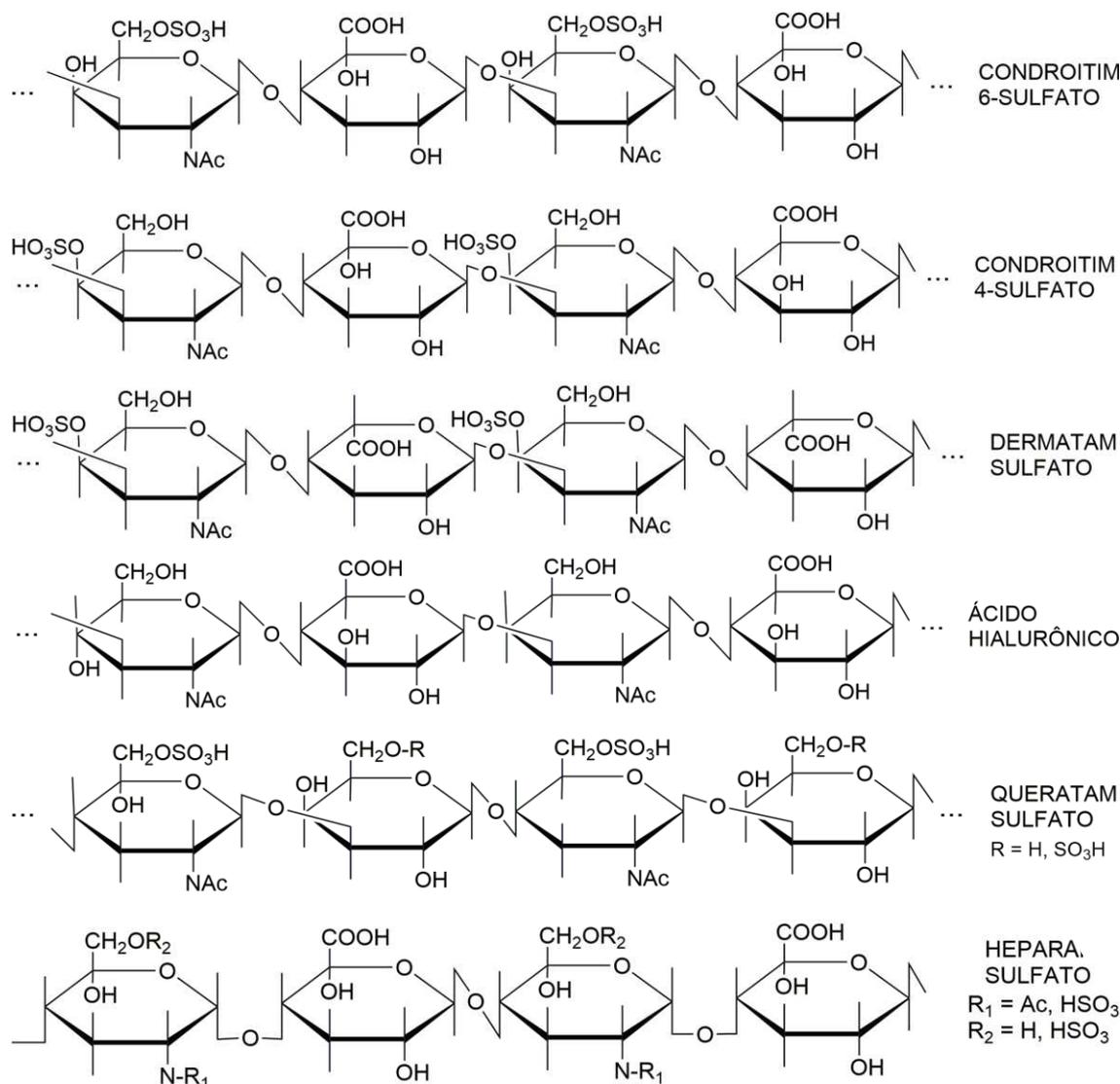
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. GLICOSAMINOGLICANOS E PROTEOGLICANOS

A matriz extracelular (MEC) de tecidos de animais terrestres ou marinhos, vertebrados ou invertebrados é composta por diferentes macromoléculas, dentre as quais podemos destacar os GAGs. Esses compostos são polissacarídeos lineares constituídos por unidades dissacarídicas repetidas e alternadas; sendo elas: uma hexosamina (N-acetil-galactosamina ou N-acetil-glucosamina) unida por ligação glicosídica a um monossacarídeo não nitrogenado (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico ou D-galactose). Cada unidade monossacarídica pode ser N ou O-sulfatada, com exceção do ácido hialurônico, por meio de uma esterificação, que juntamente com as carboxilas dos ácidos urônicos conferem a esses compostos elevada densidade aniônica (DIETRICH *et al.*, 1984; NADER, DIETRICH, 1989).

De acordo com o açúcar nitrogenado presente, os GAGs podem ser divididos em: glucosaminoglicanos, onde o monossacarídeo nitrogenado é uma N-acetil-glucosamina, tais como: heparina, HS, queratam sulfato (QS) e ácido hialurônico (AH); e em galactosaminoglicanos, como por exemplo: condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS). Esses compostos ainda podem diferir entre si em relação ao açúcar não nitrogenado, a proporções entre as unidades dissacarídicas, quanto ao grau e ponto de sulfatação, bem como o tipo de ligação inter e intrassacarídica. São bastante heterogêneos em termos de peso molecular, variando entre 5 e 100 kDa (Figura 1) (SAMPAIO *et al.*, 2006).

**Figura 1 – Unidade estrutural dos glicosaminoglicanos**

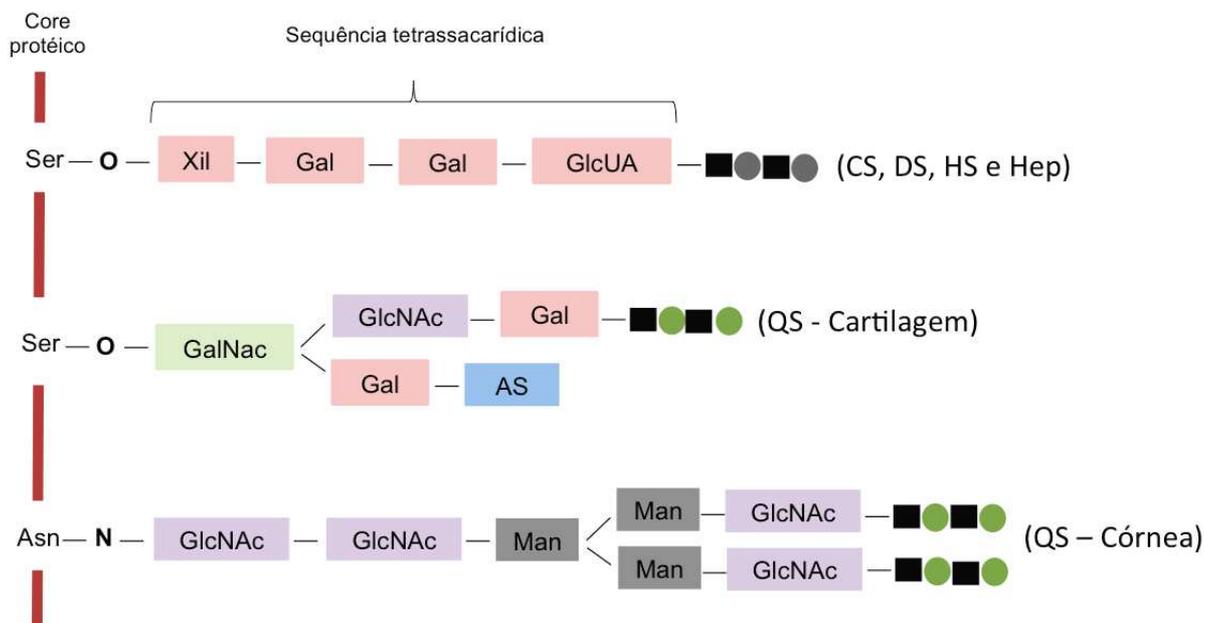


Fonte: Adaptado de DIETRICH *et al.*, 1984

Com exceção do ácido hialurônico, todos os GAGs aparecem nos tecidos animais na forma de proteoglicanos (PGs), ou seja, associados a uma cadeia protéica. A grande maioria deles; CS, DS, HS e heparina; apresentam-se ligados covalentemente à proteína através de um tetrassacarídeo (xilose–galctosil–galactosil–ácido glucurônico), por uma ligação O-glicosídica ao grupamento hidroxila de um resíduo de serina do esqueleto protéico. O QS encontrado em tecido cartilaginoso, também é um GAG O-ligado a um resíduo de serina, no entanto não apresenta a sequência tetrassacarídica, e sim uma n-acetil-galactosamina. Já o QS presente na córnea, está ligado ao *core* protéico por uma

ligação N-glicosídica entre um N-acetilglucosamina e a amida do resíduo de asparagine (Figura 2).

**Figura 2 – Representação esquemática dos proteoglicanos**



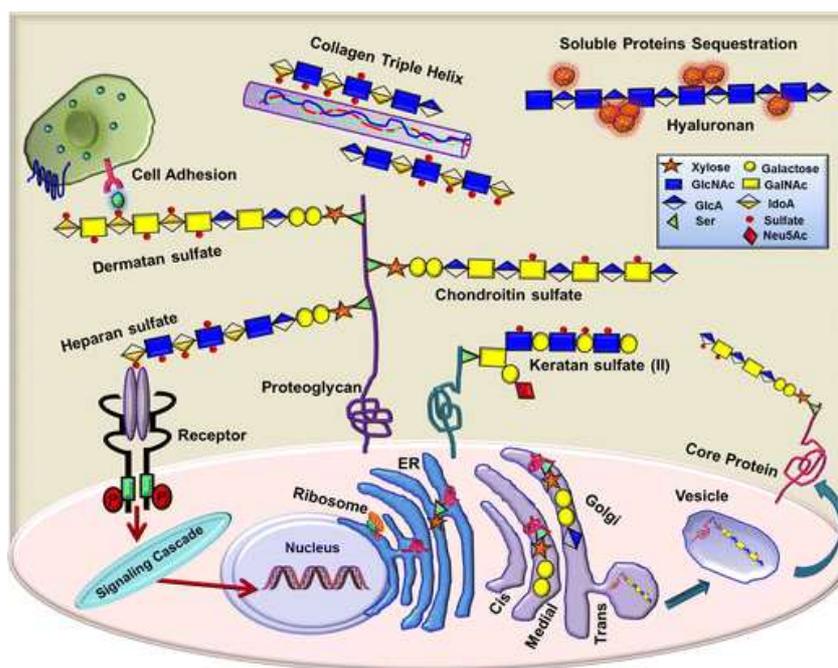
**NOTA:** Ser, resíduo de serina; Asn, resíduo de asparagina; Xil, xilose; Gal, galactose; GlcUA, ácido glucurônico; GalNac, n-acetil-galactosamina; GlcNAc, n-acetil-glucosamina; Gal, galactose; AS, ácido siálico; Man, manose; CS, condroitim sulfato; DS, dermatam sulfato; HS, heparam sulfato; Hep, heparina; QS, queratam sulfato, □, hexosamina; □, ácido urônico; □, D-galactose. □. Fonte: Adaptado de HARDINGHAM, FOSANG, 1992.

Os PGs estão presentes na MEC, membrana basal, superfície celular e intracelularmente em grânulos secretórios. As atividades biológicas dos PGs estão intimamente relacionadas com a localização em que ocupam no meio celular, composição peptídica do núcleo proteico, bem como com o tamanho, número e tipo de cadeia de GAG covalentemente ligado (DIETRICH *et al.*, 1984)

Os PGs interagem com diversas moléculas da MEC como proteínas fibrosas; possibilitando a organização das fibras de colágeno. Alguns PGs interagem com proteínas de adesão influenciando tanto na migração quanto na proliferação celular, na medida em que certos PGs podem modular a atividade fatores de crescimento, controlando assim, processos importantes como o desenvolvimento e progressão de tumores e a

embriogênese. Outros podem atuar como co-receptores de alguns fatores de crescimento, que se ligam primeiramente as cadeias de GAGs presente nos PGs, para depois se ligarem aos seus receptores, provavelmente como forma de proteção contra degradação destes pela ação de proteases da MEC. Além disso, devido a presença de cargas negativas nas cadeias laterais de GAGs, alguns PGs podem atuar como filtros biológicos, como por exemplo o perlecan e o agrim, PGs de HS, que contribuem para a seletividade da membrana basal glomerular. Os GAGs também estão envolvidos na ligação de cátions (como sódio, potássio e cálcio) e na retenção de água nos tecidos, possuindo papel fundamental na hidratação e, portanto, sustentação da MEC (Figura 3) (PINHAL, SOUZA, 2011).

**Figura 3 – Representação esquemática da via Biosintética e papel biológico do proteoglicanos na MEC.**



Fonte: GULATI; POLURI, 2016

## 2.2. HEMOSTASIA E COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

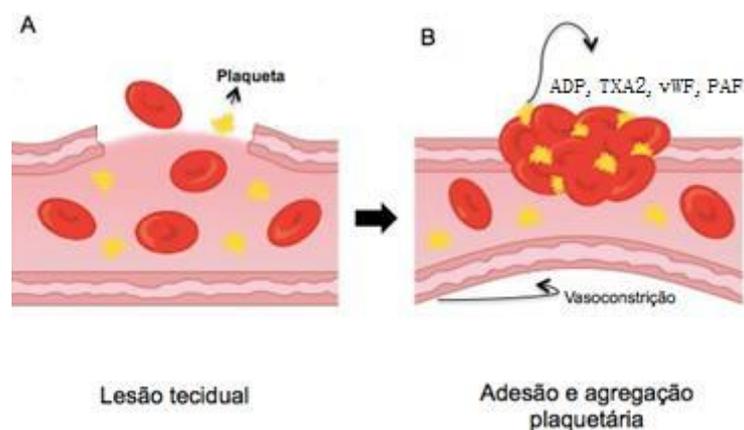
A hemostasia é um processo fisiológico responsável por manter a fluidez sanguínea, abrangendo mecanismos que se contrapõem a fim de evitar tanto a perda excessiva de sangue em lesões vasculares, quanto a formação descontrolada de trombos, e ainda engloba mecanismos de remoção dos coágulos após o reparo da integridade

vascular. A hemostasia é um processo rigorosamente controlado e coordenado que envolve a interação entre plaquetas, endotélio vascular, proteínas da coagulação, cofatores e receptores teciduais que levam a formação e dissolução do coágulo sanguíneo, sendo dividida, didaticamente, em primária, secundária e terciária (MULLER, GAILANI, RENNÉ, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2012; VERSTEEG *et al.*, 2013).

A hemostasia primária (Figura 4) é composta pela ativação e agregação de plaquetas e compreende a formação de um tampão plaquetário, o qual é o primeiro estágio de contenção de extravasamento sanguíneo.

A injúria tecidual leva ao rompimento da vasculatura, expondo os componentes da MEC da camada subendotelial, um deles é o colágeno tipo IV, glicoproteína mais abundante em lâminas basais. Esse se liga a plaquetas via receptor GPIV (receptor acoplado a proteína G), ancorando e ativando-as no local da lesão. O fator de *von Willebrand* (vWF, do inglês *von Willebrand factor*), glicoproteína circulante produzida e secretada pelas células endoteliais, também ativa e recruta plaquetas até o local da injúria. Uma vez aderidas, as plaquetas unem-se umas às outras, processo denominado de agregação plaquetária, pela interação entre fibrinogênio e seus receptores de superfície celular. Colágeno tipo IV e vWF são estímulos primários que levam à liberação de estímulos secundários, via aumento da concentração de  $Ca^{+2}$  intracelular, a partir dos grânulos citoplasmáticos, sendo eles: adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), fibrinogênio e vWF. Além desses, as plaquetas liberam ainda o Fator Ativador de Plaquetas (PAF), oriundo de eicosanóides e Tromboxano  $A_2$ , que intensifica a vasoconstrição local. Todos esses estímulos são agentes ativadores e promotores de agregação plaquetária, levando a formação de um tampão hemostático primário o qual é reforçado por um coágulo de fibrina resistente e estável, formado como produto da hemostasia secundária (GAILANI; RENNÉ, 2011; VERSTEEG *et al.*, 2013; BACH, M. E *et al.*, 2019).

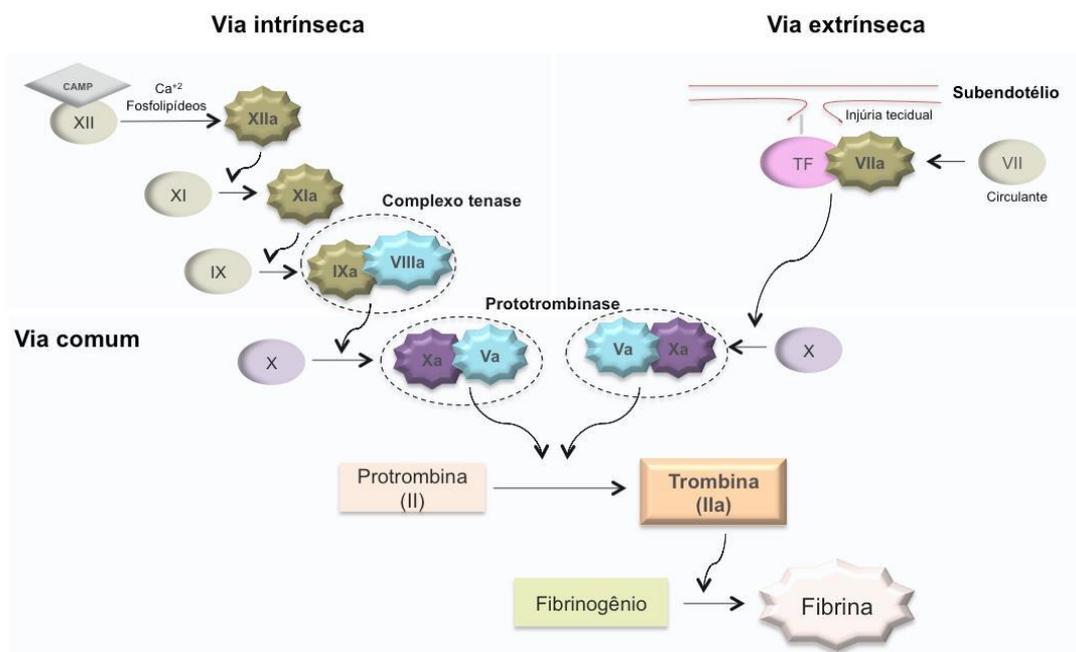
**Figura 4: Participação das plaquetas da formação do tampão plaquetário (hemostasia primária)**



**NOTA:** (A) Injúria tecidual e exposição de agonistas plaquetários presentes no subendotélio; (B) adesão das plaquetas aos componentes do subendotélio e secreção de fatores autócrinos pelas plaquetas, com consequente formação do tampão plaquetário por meio da ativação e agregação de plaquetas. Fonte: Adaptado de CASTRO *et al.*, 2006.

A cascata de coagulação, como é chamada a hemostasia secundária, abrange uma série de reações enzimáticas envolvendo serino proteases, que resultam na formação de um coágulo estável composto principalmente por fibrina. Esse modelo denominado de “modelo clássico de cascata de coagulação”, foi proposto em 1964, por dois grupos independentes a fim de explicar o princípio fisiológico da coagulação sanguínea (MACFARLANE, 1964; DAVIE, RATNOFF, 1964). Nesse modelo, cada fator envolvido na cascata é uma proenzima a qual é convertida em sua forma ativa pelo fator ativado anterior, e de acordo com esse modelo o processo de coagulação sanguínea é desencadeado por meio de duas vias convergentes: a via extrínseca e a via intrínseca (Figura 5) (VERSTEEG *et al.*, 2013; CHAPIN; HAJJAR, 2015).

**Figura 5: Vias envolvidas na cascata de coagulação**



**NOTA:** CAMP, cininogênio de alto peso molecular; XII, fator XII; XIIa, fator XII ativado; XI, fator XI; XIa, fator XI ativado; IX, fator IX; IXa, fator IX ativado; VIIIa, fator VIII ativado; X, fator X; Xa, fator X ativado; TF, fator tecidual; VII, fator VII; VIIa, fator VII ativado. Fonte: Elaborado pela própria autora.

A via extrínseca (Figura 5) é desencadeada quando fator VII (FVII) circulante se liga ao seu receptor presente na membrana de células subendoteliais, o fator tecidual (TF)(FIII), o qual é exposto ao sangue sempre que ocorre alguma injúria à vasculatura. O TF promove proteólise e ativação do FVII. O complexo FVIIa-TF cliva o fator X (FX) em sua forma ativa. FXa, ponto de convergência das duas vias (extrínseca e intrínseca), associado ao fator V ativado (FVa) forma o complexo protrombinase (FXa-FVa), responsável por converter protrombina (FII) em trombina, a qual catalisa a conversão de fibrinogênio, proteína solúvel, em fibrina, proteína insolúvel (COLMAN, 2006; OWENS; MACKMAN, 2010; MULLER; GAILANI; RENNÉ, 2011; CHAPIN; HAJJAR, 2015).

O fibrinogênio é uma glicoproteína produzida pelos hepatócitos e circulante no sangue de indivíduos saudáveis. A trombina (IIa) cliva a ligação peptídica entre resíduos de arginina e glicina das cadeias polipeptídicas do fibrinogênio, liberando fibrinopeptídeos (monômeros de fibrina). A trombina também ativa o fator XIII, responsável pelo *crosslink* entre esses monômeros, ou seja, pela polimerização dos

monômeros de fibrina, conferindo rigidez e estabilidade ao coágulo e, o deixando menos susceptível à fibrinólise. A trombina ainda fomenta a ativação e agregação de plaquetas, uma vez que as ativa por meio do receptor GPIb, promovendo a liberação de TXA<sub>2</sub> e PAF (VRIES, J.J *et al*, 2020).

A via intrínseca (Figura 5), inicia-se após a interação fator XII (FXII) com as cargas negativas presentes no endotélio lesado (fosfolípidios de membrana e íons cálcio, secretados por plaquetas ativadas), processo conhecido como “ativação por contato”. O cininogênio de alto peso molecular (CAPM) atua como cofator do fator XII ativado (FXIIa) acelerando sua autocatálise. FXIIa converte pré-caliceína em caliceína, responsável por ativar mais FXII, mantendo dessa forma um loop de ativação do FXII. A ativação desse fator é o início do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), um dos testes de diagnóstico de coagulação mais comumente utilizado na prática clínica para o rastreamento e monitoramento da hemostasia e utilizado para análise de várias serino proteases (MULLER; GAILANI; RENNÉ, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2012; GEDDINGS, MACKMAN, 2014). O FXIIa converte o Fator XI inativo à sua forma ativa, o qual ativa o Fator IX. O Fator IX ativado juntamente com o FVIIIa, formam o complexo tenase intrínseco e cliva o FX tornando-o ativo, logo, promovendo a produção de fibrina que rapidamente polimeriza-se formando uma rede, até que o dano tecidual possa ser reparado (VERSTEEG *et al.*, 2013).

No entanto, alguns estudos demonstraram que o modelo clássico de coagulação sanguínea não traduz completamente a homeostasia *in vivo*. Uma vez que o processo de ativação das serino proteases não assume o formato hierárquico, e tão pouco as duas vias de coagulação ocorrem de maneira independente. Como forma de representar melhor a coagulação sanguínea *in vivo* um novo modelo foi proposto, onde existe apenas uma via subdividida em três estágios distintos: iniciação, amplificação e propagação (Figura 6) (RODRIGUES *et al.*, 2012; VERSTEEG *et al.*, 2013; REYS, 2019).

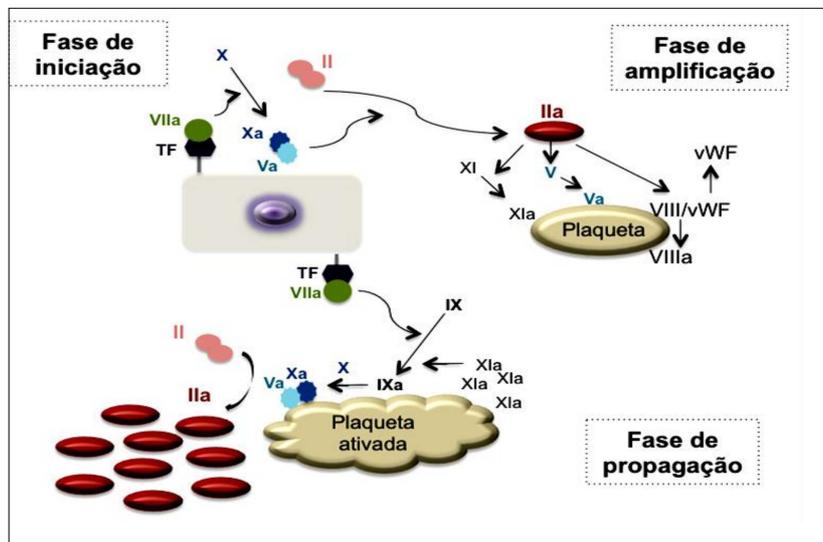
Na fase de iniciação, que ocorre nas células que expressam o FT na superfície (células endoteliais, células do músculo liso e fibroblastos), o complexo FVIIa-TF formado após à injúria do endotélio, ativa proteoliticamente pequenas quantidades dos FIX e FX, formando respectivamente o FIXa e FXa. O FXa cliva o FV em FVa e, associado a esse forma o complexo prototrombinase (FXa-FVa), responsável por converter protrombina (FII) em trombina (FIIa). No entanto, são geradas apenas traços de trombina, que não são suficientes para sustentar um coágulo porém necessária para induzir a amplificação do coágulo. O FIXa pode migrar para outra região da lesão ou para

a superfície das plaquetas, ativando-as e desencadeando a fase de amplificação (RODRIGUES *et al.*, 2012; VERSTEEG *et al.*, 2013; REYS, 2019).

Na fase de amplificação, os pequenos traços de trombina ativam mais plaquetas por meio do estímulo de liberação de fator ativador de plaquetas (PAF) e adenosina difosfato (ADP), agentes ativadores e promotores de agregação plaquetária. A trombina pode ainda promover a dissociação do complexo FVIIIa-VWF na superfície das plaquetas, liberando-os para recrutar mais plaquetas no local da lesão, além disso esses traços de trombina formados podem ativar FV em FVa, que associado ao fator FXa forma mais complexo prototrombinase e, FIXa oriundo do estágio de iniciação associa-se ao FVIIIa presente na superfície das plaquetas ativadas formando o complexo tenase (FIXa-FVIIIa).

A fase de propagação também envolve a superfície das plaquetas, onde o complexo tenase (FIXa-FVIIIa) cliva mais FX em FXa, que associado ao FVa forma o complexo prototrombinase (FXa-FVa) gerando grandes quantidades de trombina responsável por converter fibrogênio em fibrina, formando assim um coágulo estável e resistente (RODRIGUES *et al.*, 2012; VERSTEEG *et al.*, 2013; REYS, 2019).

**Figura 6: Novo modelo da cascata de coagulação**



**NOTA:** XI, fator XI; XIa, fator XI ativado; IX, fator IX; IXa, fator IX ativado; VIIIa, fator VIII ativado; X, fator X; Xa, fator X ativado; TF, fator tecidual; VII, fator VII; VIIa, fator VII ativado.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A partir do momento em que o coágulo não é mais necessário para a hemostase, esse deve ser removido pelo sistema fibrinolítico (hemostasia terciária) para que seja

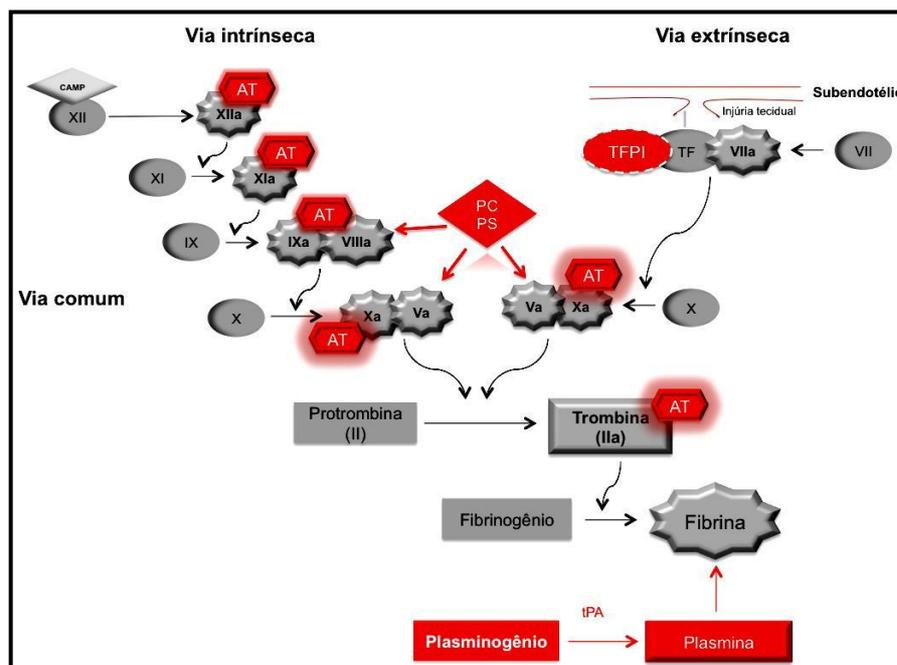
restabelecido o lúmen vascular e não ocorra interferências no fluxo sanguíneo. Na fibrinólise, processo de remoção gradual da fibrina, o plasminogênio, uma proenzima inativa circulante, é convertida em plasmina principalmente por meio do ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA), produzido e liberado pelo endotélio. A plasmina é uma serino protease responsável por degradar a rede de fibrina em produtos de degradação solúveis (PDF), desestabilizando o coágulo. Além da participação da plasmina, o sistema fibrinolítico conta com a ação de metaloproteinases de matriz (MMPs), como colagenases que degradam colágeno, onde fica ancorado o tampão plaquetário e conseqüentemente o coágulo (RODRIGUES *et al.*, 2012; VERSTEEG *et al.*, 2013; CHAPIN, HAJJAR, 2015).

O sistema hemostático é rigorosamente controlado para manter a fluidez do sangue, portanto obviamente existem inibidores naturais endógenos responsáveis pela regulação negativa da coagulação sanguínea. São eles: antitrombina (AT), cofator II da heparina (HC-II), proteína C (C), inibidor do fator tecidual (TFPI, do inglês *tissue factor pathway inhibitor*) e os participantes do sistema fibrinolítico, o ativador tecidual do plasminogênio (tPA) e a plasmina (Figura 7) (RODRIGUES *et al.*, 2012; VERSTEEG *et al.*, 2013; CHAPIN, HAJJAR, 2015).

A antitrombina (AT), cofator II da heparina II (HC II), o inibidor do fator tecidual (TFPI) ligam-se ao sítio ativo das serino proteases envolvidas na coagulação sanguínea e inibem a ativação das mesmas, por meio do bloqueio das suas respectivas clivagens proteolíticas. O TFPI, um antagonista do TF secretado pelas plaquetas e por células do endotélio microvascular, limita o processo inicial de coagulação ao mimetizar o substrato tanto do FXa livre quanto do complexo TF-FVIIa, ocupando estes fatores em uma metabolização lenta ou quase nula do TFPI. A AT tem a capacidade de inibir todas as serino proteases envolvidas no processo de coagulação, no entanto apresenta maior afinidade pelos fatores FIXa, FXa e principalmente pela trombina (FIIa). A AT se liga à esses fatores provocando uma mudança conformacional e distorcendo o sítio catalítico dos mesmos, os quais ficam impossibilitados de seguir com as reações de ativação dos fatores subsequentes. A heparina, anticoagulante largamente utilizado, atua aumentando exponencialmente a afinidade da AT pelos fatores FXa e trombina, de maneira que é necessário o uso de um antídoto (protamina) para desfazer a ligação AT-FXa/AT-Trombina, caso contrário essa inibição é irreversível, podendo levar o paciente a morte devido a um grande desequilíbrio homeostático (VERSTEEG *et al.*, 2013).

A plasmina e o tPA, como dito anteriormente, atuam desfazendo a rede de fibrina formada após o reparo tecidual. A proteína C ativada (PCa), associada à Proteína S (PS) (Pca-PS), é um fator anticoagulante que catalisa a inativação dos fatores FVIIIa e FVa, cofatores necessários para a formação dos complexos coagulantes tenase e prototrombinase.

**Figura 7 – Inibidores endógenos da cascata de coagulação**



**NOTA:** TFPI, inibidor do fator tecidual; tPA, ativador do tipo tecidual do plasminogênio; PCPS, complexo formado pela proteína C e seu cofator, proteína S. Fonte: Elaborado pela própria autora.

### 2.3. ENDOTÉLIO VASCULAR

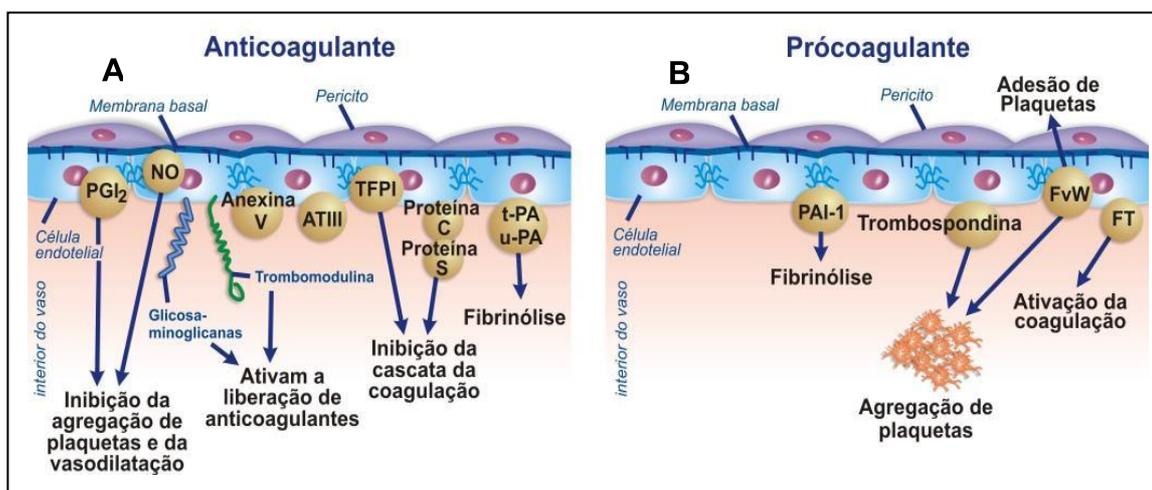
O endotélio vascular é uma camada de tecido epitelial que reveste o lúmen vascular e participa ativamente da regulação do fluxo sanguíneo local. As células endoteliais recobrem a superfície luminal dos vasos podendo interagir e regular tanto positivamente quanto negativamente os fatores envolvidos na manutenção da hemostasia (Figura 8).

Em condições de injúria ou dano tecidual, as células endoteliais secretam endotelina, um potente vasoconstritor. Adquirem uma superfície de caráter pró-coagulante, FT, VWF, exposição de componentes da MEC, de maneira a estimular a ativação e agregação plaquetária, prevenindo o extravasamento de sangue até que haja a

formação do tampão plaquetário, e desencadear o processo de formação do coágulo. Além disso, as células endoteliais apresentam em sua superfície uma família de receptores (PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4), os quais são ativados pela grande maioria dos fatores envolvidos na coagulação sanguínea atuando como fatores pró-coagulantes (RODRIGUES *et al.*, 2012; VERSTEEG *et al.*, 2013; REYS, 2019).

Em contrapartida, em condições normais o endotélio não permite que o sangue circulante coagule dentro do vaso, secretando substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária. As células endoteliais também impedem a ativação excessiva e equilibram o processo de coagulação por meio da produção e secreção de fatores do sistema fibrinolítico mencionados anteriormente (TFPI, tPA, uPA) e de serpinas como a AT e Pca-PS. Além disso, o endotélio vascular expressa em sua superfície um proteoglicano de HS (PGHS) que apresenta atividade antitrombótica, atuando como cofator da AT, inibindo de maneira indireta o fator Fxa e trombina (RODRIGUES *et al.*, 2012; REYS, 2019).

**Figura 8– Participação do endotélio na hemostasia**



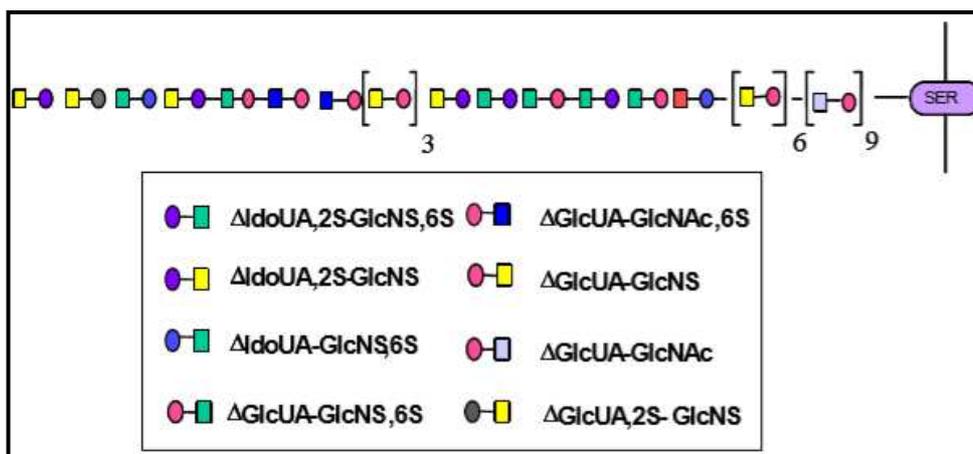
**NOTA:** (A) Mediadores da função anticoagulante das células endoteliais: PGI<sub>2</sub>, prostaciclina; NO, óxido nítrico; Anexina V, ATIII, antitrombina; TFPI, inibidor do fator tecidual; Proteína C-Proteína S, complexo formado pela proteína C ativada e seu cofator proteína S; t-PA, ativador de plasminogênio tecidual; u-PA, ativador de plasminogênio do tipo uroquinase. (B) Mediadores da função procoagulante das células endoteliais: PAI-1, inibidor do t-PA; FvW, fator de von Willebrand; FT, fator tecidual. Fonte: Adaptado de RODRIGUES *et al.*, 2012.

### 2.3.1. Proteoglicano de heparam sulfato e o endotélio vascular

A presença do PGHS na superfície de células endoteliais foi primeiramente observada, em cultura de células de aorta de coelho (RAEC), por Buonassi em 1973. Posteriormente foi verificado que este PG apresentava um efeito inibitório sobre o processo de coagulação sanguínea (BUONASSSI, COLBURN, 1983).

Estudos de degradação enzimática, utilizando heparinase e heparitinases I e II obtidas a partir do *Flavobacterium heparinum*, demonstraram que o PGHS é composto por unidades de dissacarídeos tri- e dissulfatados contendo ácido idurônico e tetrassacarídeos, tetra e pentassulfatados típicos da heparina (Figura 9). É provável que esta seja a única cadeia de HS que apresenta tal configuração (NADER *et al.*, 1987; NADER *et al.*, 1984).

**Figura 9: Representação esquemática da estrutura do heparam sulfato (HS) de células endoteliais**



**NOTA:** Este GAG contém quantidade significativa de ácido L-idurônico, intercalados por regiões contendo ácido D-glucurônico, sendo um copolímero de HS e heparina, onde regiões características de heparina estão intercaladas em regiões características de HS.  $\Delta$ IdoUA,2S-GlcNS,6S: Ácido L-idurônico 2 sulfatado-D-glucosamina N, 6-sulfatada;  $\Delta$ IdoUA,2S-GlcNS: Ácido L-idurônico 2 sulfatado- D-glucosamina N-sulfatada;  $\Delta$ IdoUA-GlcNS,6S: Ácido L-idurônico-D-glucosamina N, 6 sulfatada;  $\Delta$ GlcUA-GlcNS,6S: Ácido D-glucurônico-D-glucosamina N,6 sulfatada;  $\Delta$ GlcUA-GlcNAc,6S: Ácido D-glucurônico- D-glucosamina N-acetilada, 6 sulfatada;  $\Delta$ GlcUA-GlcNS: Ácido D-glucurônico-D-glucosaminana N-sulfatada;  $\Delta$ GlcUA-GlcNAc: Ácido D-glucurônico- D-glucosamina N-acetilada;  $\Delta$ GlcUA,2S-GlcNS: Ácido D-glucurônico 2-sulfatado- D- glucosamina N-sulfatada. Fonte: TRINDADE, 2004.

Acredita-se que a atividade antitrombótica do PGHS endotelial seja similar ao mecanismo de ação da heparina, uma vez que apresenta em sua estrutura regiões tipicamente encontradas em heparinas comercializadas com este propósito, atuando como um ativador da AT (PINHAL *et al.*, 1994).

Foi demonstrado que a heparina regula positivamente a síntese do PGHS antitrombótico presente na superfície das células endoteliais, por meio da interação com proteínas na MEC, exercendo assim um efeito antitrombótico indireto (TRINDADE *et al.*, 2008). A heparina se liga a fibronectina, uma proteína de MEC, ativando via integrina, proteína transmembrana responsável por encaminhar sinais intracelularmente a partir de interação com componentes da MEC, a fosforilação de proteínas de adesão focal, desencadeando duas vias de sinalização intracelular: via do  $Ca^{+2}$ / NO e a cascata de sinalização Raf-Ras-MEK-ERK MAP, levando a produção do PGHS e, portanto, maior expressão deste na superfície de células endoteliais (MEDEIROS *et al.*, 2012).

#### 2.4. TROMBOSE

A falta de regulação do processo de coagulação sanguínea, bem como a deficiência do sistema fibrinolítico, pode levar a formação excessiva e desregulada de trombos (trombose), configurando uma resposta patológica do sistema hemostático na presença ou ausência de injúria tecidual, prejudicando o fluxo contínuo de sangue em artérias e veias (VERSTEEG *et al.*, 2013).

O tromboembolismo venoso é dividido em trombose venosa profunda (TVP), o qual compreende a formação e depósito de trombos em veias profundas de membros inferiores (pernas e coxas), trombose venosa cerebral e tromboembolismo pulmonar.

A TVP, manifestação mais comum da doença, normalmente acarreta dor intensa, inchaço, e formação de varizes devido ao dano ocasionado a válvulas venosas. No entanto, a TVP pode evoluir para quadros mais graves quando esses trombos se desprendem, deslocam-se e obstruem totalmente o fluxo sanguíneo em veias de menor calibre, ocasionando a morte do tecido adjacente. Os principais fatores de risco para trombose venosa, além da idade, incluem procedimentos cirúrgicos, hospitalização e repouso por período prolongado, trauma, gravidez, uso de anticoncepcionais, além de fatores endógenos, como câncer, obesidade, vasculites, síndrome nefrótica e desordens adquiridas ou genéticas do sistema homeostático como a trombofilia e policetemia

(OWENS, MACKMAN, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2012; VERSTEEG *et al.*, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A trombose arterial, condição mais grave da doença, engloba a formação de trombos em artérias do coração e do cérebro, podendo levar ao infarto agudo do miocárdio e AVC, respectivamente. Essa doença está associada ao processo de formação de placas de ateroma no interior das artérias (aterosclerose). A instabilidade ou ruptura destas placas leva a exposição de moléculas pró-coagulantes no vaso, que ao se associarem a fatores de coagulação, promovem a formação de trombos, capazes de interromper o fluxo sanguíneo, levando a obstrução total de artérias no cérebro e coração (OWENS, MACKMAN, 2010; LIBBY, RIDKER, HANSSON, 2011). Os trombos arteriais são ricos em plaquetas e por isso conhecido como coágulos brancos. Vários fatores de risco podem aumentar a incidência de trombose arterial, tais como tabagismo, hipertensão, hiperlipidemia, diabetes mellitus, procedimentos invasivos como aqueles que requerem reperfusão cardíaca (OWENS, MACKMAN, 2010).

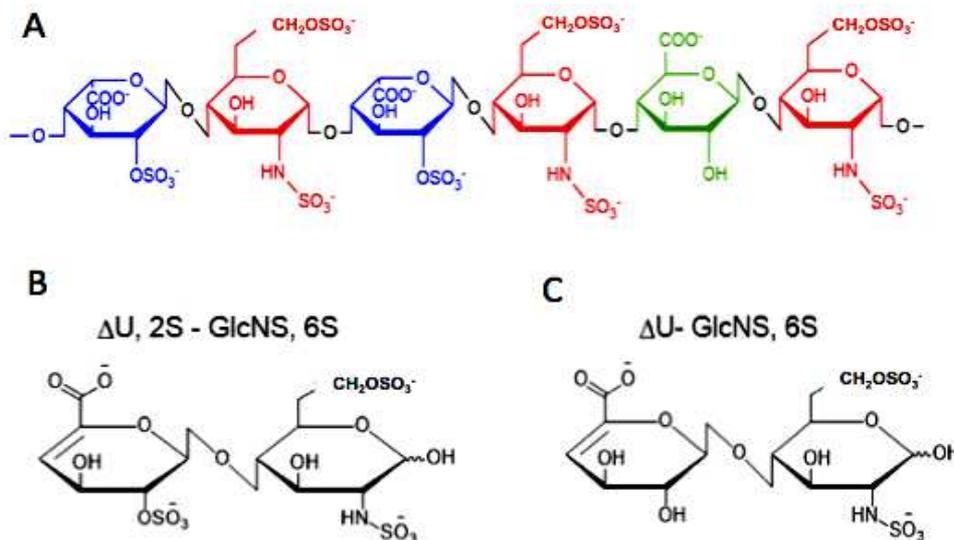
A heparina de origem bovina ou suína é em dos fármacos de escolha, desde 1936, para o tratamento e prevenção de trombozes venosas e arteriais, causadas por diferentes etiologias. Além disso, a heparina é o único medicamento disponível no mercado utilizado em cirurgias, como as que requerem reperfusão cardíaca, com o intuito de impedir a coagulação sanguínea e conseqüentemente formação de trombos. Devido a sua forte interação com a serpina AT, que aumenta a inibição do fator Xa e trombina, um dos riscos associado ao uso da heparina é o desenvolvimento de complicações hemorrágicas, efeito hemorrágico residual e trombocitopenia, no entanto existe hoje no mercado as heparinas de baixo peso molecular (LWM, do inglês *low weight molecular heparin*), que apresentam menos risco devido a seu efeito anticoagulante controlado. Apesar disso, o uso da heparina na prática clínica ainda é muito turbulento, uma vez que a única fonte de obtenção deste fármaco é a partir de mucosa bovina e suína, e portanto há o risco de contaminação por partículas virais oriundas do processo de purificação da mesma (WEIZT, 1994; NADER *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2004; SOKOLOVA, 2014).

## 2.5. HEPARINA

A heparina, como dito anteriormente, é polissacarídeo pertencente à família dos glicosaminoglicanos muito utilizado na prática clínica devido a seu efeito terapêutico anticoagulante e antitrombótico. A heparina teve sua estrutura determinada por meio de análises envolvendo degradação enzimática com heparinase e heparitinase II, enzimas oriundas do *Flavobacterium heparinum*, uma bactéria que quando cultivada em meio adequado produz tais enzimas capazes de romper ligações glicosídicas específicas entre os monômeros de heparina e HS (SILVA, DIETRICH, 1975).

A heparina apresenta como unidade estrutural predominante uma sequência hexassacarídica octassulfatada, constituída essencialmente de dois tipos de dissacarídeos: um substituído com três grupos sulfatos ( $\text{SO}_3^-$ ) e outro com dois, na proporção 2:1 (Figura 10-A). Dessa forma, essa unidade estrutural é composta de dissacarídeos contendo ácido urônico e D-glucosamina, sendo que os resíduos de ácidos urônicos em sua maioria (70-80%) são do tipo L-idurônico (IdoUA), e em menores proporções de D-glucurônico (GlcUA) (20-30%) (Figura 10-B e C). Grande parte dos resíduos de IdoUA apresentam sulfatação no carbono 2 (C2), enquanto o ácido D-glucurônico raramente se encontra sulfatado. Os resíduos de D-glucosamina geralmente são dissulfatadas, em C2 e/ou C6). As ligações glicosídicas intradissacarídicas são tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  ou  $\beta(1\rightarrow4)$  e a ligação interdissacarídica é do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$  (SILVA, DIETRICH, 1975; ZHANG *et al.*, 2019).

**Figura 10: Unidade hexassacarídica octassulfatada da heparina e seus dissacarídeos constituinte**



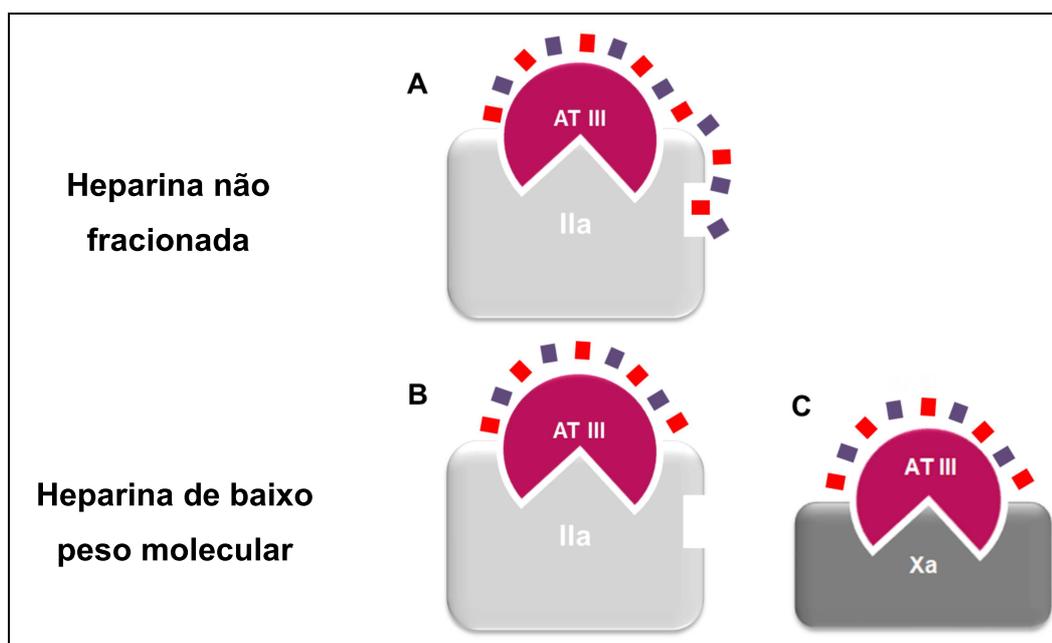
**NOTA:** (A) Unidade hexassacarídica básica da heparina, onde está representado que a heparina é constituída principalmente por dois tipos de dissacarídeos: ■ D-glucosamina, N,6-dissulfatada, unida por ligação  $\alpha(1\rightarrow4)$  ao ■ ácido L-idurônico 2, O-sulfatado, e um outro dissacarídeo de D-glucosamina, N,6-dissulfatada unida a um ■ ácido D-glucurônico por ligação do tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$ . (B) Dissacarídeo trissulfatado da heparina. (C) Dissacarídeo dissulfatado da heparina. Fonte: Adaptada de TERSARIOL, 1995; NADER *et al.*, 2004.

Acreditava-se que a função biológica da heparina estivesse relacionada com sua propriedade anticoagulante/antitrombótica, no entanto a heparina endógena não apresenta tais efeitos. A heparina é sintetizada exclusivamente na forma de proteoglicanos (associada a um núcleo protéico) e, se encontra armazenada em grânulos citoplasmáticos de mastócitos (MENEGETTI *et al.*, 2015).

A atividade anticoagulante/antitrombótica da heparina está relacionada com a formação de um complexo ternário entre heparina-AT e com as diferentes serino proteases do processo de coagulação. Dessa forma, a heparina potencializa a inibição tanto da trombina quanto do FXa pela antitrombina mais de 1.000 vezes. Existe disponível no mercado as heparinas de baixo peso molecular obtidas a partir do fracionamento da heparina. Tanto a heparina não fracionada quanto a de baixo molecular ligam-se à antitrombina. No entanto, a AT apresenta dois sítios de ligação, um para a trombina e

outro para o Fator Xa. Enquanto a heparina não fracionada é capaz de modular ambos os sítios, a heparina de baixo peso consegue modular apenas o Fator Xa, o que explica a baixa atividade anticoagulante e alta atividade antitrombótica associada as heparinas de baixo peso (Figura 11) (NADER *et al.*, 2001; MONAKHOVA *et al.*, 2019).

**Figura 11: Mecanismo de ação da heparina e heparina de baixo molecular.**



**NOTA:** (A) Complexo ternário formado entre heparina, antitrombina e trombina. (B) Complexo ternário formado entre heparina de baixo peso molecular, antitrombina e trombina. (C) Complexo ternário formado entre heparina de baixo peso, antitrombina e fator Xa. AT III, antitrombina; IIa, trombina; Xa, fator X ativado. Fonte: Elaborado pela própria autora.

A heparina comercial é obtida por um processo complexo que envolve extração, purificação, branqueamento e fracionamento. Considerado como um medicamento de origem animal, a quantidade de impurezas em potencial é relativamente alta quando comparada a uma medicamento obtido por síntese, sendo necessário que esteja associado a um rigoroso controle de qualidade. Hoje em dia, devido à ocorrência do surto de encefalopatia espongiforme bovina (EEB), muitos países proibiram o uso de heparina de origem bovina com receio da contaminação pelo príon da EEB. Além disso, em 2008, houve uma crise mundial no mercado da heparina logo após um lote deste fármaco levar pacientes a morte nos Estados Unidos devido a respostas clínicas adversas a contaminação, como arritmia, náusea, edema, hipotensão e reações anafiláticas.

Recentemente Mendes e colaboradores, 2019 demonstraram que tal contaminação foi ocasionada por um CS supersulfatado adicionado propositalmente ao extrato bruto de heparina (GUERRINI *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2019).

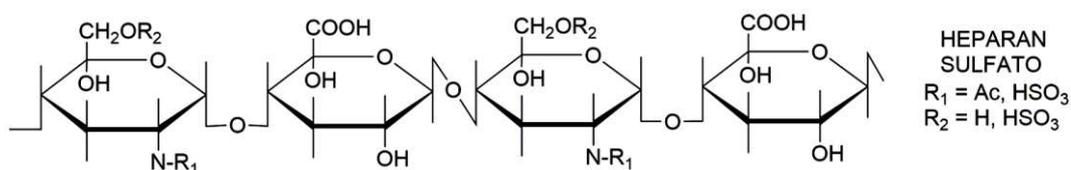
Todos esses fatos evidenciam a importância pela busca de novas fontes e/ou novos agentes antitrombóticos com menos risco de efeitos adversos, contaminação e apresentando melhor custo-benefício.

## 2.6. HEPARAM SULFATO (HS)

O HS, um polissacarídeo também pertencente a família dos glicosaminoglicanos, foi isolado em 1948 por Jorpes e Gardel e acredita-se que era uma nova molécula de heparina com baixa atividade anticoagulante (JORPES, GARDEL., 1948).

Ao contrário da heparina, a D-glucosamina no HS apresenta elevado grau de N-acetilação (40-60%), sendo que o restante na forma N-sulfatada (60-40%). Apresenta majoritariamente ácido D-glucurônico e pequenas proporções de ácido L-idurônico. O HS é menos sulfatado que a heparina e apresenta maior variabilidade estrutural (Figura 12) (DIETRICH *et al.*, 1998; LI, GULLBERG., 2016).

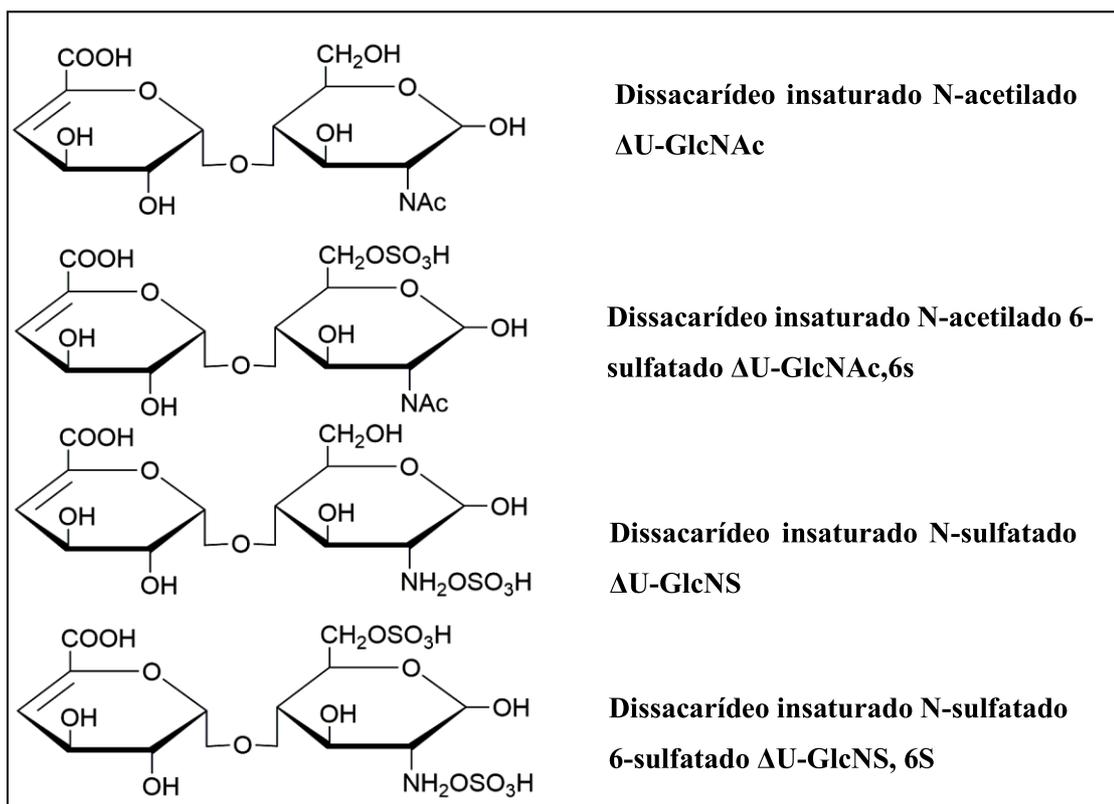
**Figura 12: Estrutura do heparam sulfato**



Fonte: elaborada pela própria autora.

HS está presente na MEC e na superfície de células, na forma de PGs, de todos os tecidos animais vertebrados e invertebrados. Degradações enzimáticas demonstraram a presença de quatro tipos principais de dissacarídeos na molécula de HS (Figura 13).

**Figura 13: Unidades dissacarídicas do HS obtido por degradação enzimática.**



Fonte: Adaptado de PINHAL, 1996.

Acredita-se que os HSs sejam constituídos das mesmas unidades dissacarídicas, porém variando na proporção dessas unidades de acordo com cada tipo celular e tecido de origem (DIETRICH *et al.*, 1998; LI; GULLBERG., 2016).

A maioria das atividades biológicas desenvolvidas pelo HS se devem a interações, em grande parte de natureza eletrostática, com vários componentes da MEC. Trabalhos apontam que os PGHS presentes na superfície, principalmente de células endoteliais, atuam como um co-receptor imprescindível para o fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF2, do inglês *fibroblast growth factor 2*), o qual é responsável primordialmente pela angiogênese. Acredita-se que o PGHS forme um complexo ternário entre o FGF e seu receptor, potencializando a ação dos FGFs. Além disso, devido a interação com fatores de crescimento, acredita-se que o PGHS tenha importante papel na proliferação e desenvolvimento de metástase (GAMBARINI *et al.*, 1993; KNELSON *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2019).

## 2.7. GLICOSAMINOGLICANOS DE ORIGEM MARINHA

O Brasil é um país com uma vasta extensão litorânea, cuja biodiversidade marinha tem sido reconhecida por ser fonte de compostos com propriedades diversas biológicas (JIMÉNEZ, 2018). Os glicosaminoglicanos (GAGs) estão entre as inúmeras moléculas de origem marinha, que vem despertando grande interesse devido a sua variabilidade estrutural (WANG, WANG e GUAN, 2012). Estão amplamente distribuídos nos filós de espécies marinhas e, estudos vem demonstrando a participação destes em processos anti-inflamatórios, anti metastáticos, regenerativos, anticoagulante e antitrombóticos (WANG *et al.*, 2017).

Os GAGs geralmente são obtidos a partir de tecidos animais por meio de processos de extração, isolamento e purificação. Grande parte dos GAGs comercializados para fins terapêuticos são oriundos de pele, trato intestinal e tecidos conjuntivos de origem animal (bovinos e suínos, em sua grande maioria). No entanto, esses tecidos podem oferecer certos riscos em decorrência de contaminações, como infecções virais. Portanto, é de grande interesse encontrar recursos alternativos para a obtenção dessa classe de compostos (VOLPI; MACCARI., 2007).

O principal interesse nos GAGs de origem marinha esta relacionado as peculiaridades encontradas nestes organismos, seja em relação à sulfatação, seja em relação a diferentes proporções de unidades dissacarídicas. Os GAGs de origem marinha apresentam variedade estrutural ainda pouco explorada e, geralmente, exibem características estruturais que os distinguem dos GAGs de animais terrestres. Dessa forma, podem ser considerados como uma nova fonte de compostos de interesse terapêutico.

Há uma diferença considerável no padrão de sulfatação entre os GAGs de origem marinha e terrestre, o que acarreta alterações quanto a densidade de cargas negativas, produzindo alterações na densidade de carga entre as cadeias GAG. Além disso, os GAGs de origem marinha podem apresentar padrões únicos e sequências bem específicas de unidades dissacarídicas, apresentando grande potencial terapêutico a ser explorado (CHAVANTE *et al.*, 2014; GULLBER., 2016).

Brito e colaboradores demonstraram atividades anticoagulante, anti-inflamatória e antitumoral de um heparinoide obtido a partir das vísceras do camarão *Litopenaeus vannamei* (BRITO *et al.*, 2008, BRITO *et al.*, 2018, BRITO *et al.*, 2014), evidenciando o

potencial terapêutico que pode ser explorado a partir de glicosaminoglicanos de origem marinha.

### **2.7.1 Camarão *Farfantepeneaus brasiliensis***

*Farfantepeneaus brasiliensis* (*F. brasiliensis*), comumente conhecido como o “camarão rosa”, é uma das espécies de camarão mais exploradas no Brasil (Valentine *et al*, 2012). É típico do oceano atlântico ocidental, podendo ser encontrado desde o norte da Carolina do Norte – EUA até o Rio Grande do Sul – Brasil (Pérez-Farfante., 1967; Díncao *et al*, 199; Costa *et al.*, 2003).

Apesar da extensa zona de habitação desta espécie, um estudo desenvolvido por Gusmão e colaboradores (2005), demonstraram que, muito embora possa existir uma diferença morfológica entre indivíduos desta espécie, oriundos do litoral sul e norte do Brasil, não existe uma variabilidade genética significativa entre estes grupos, ratificando que apesar das diferentes condições ambientais, o genótipo dos indivíduos desta espécie não sofrem grandes variações de acordo com a localização de origem. Visando a disponibilidade e facilidade de obtenção da matéria-prima e presença e concentração de glicosaminoglicanos, o camarão da espécie *Farfantepeneaus brasiliensis* foi escolhido para extração e caracterização do HS.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a estrutura química e avaliar a atividade anticoagulante, antitrombótica e hemorrágica do heparam sulfato obtido do cefalotórax do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e purificar por cromatografia de troca-iônica em *Q-Sepharose* os glicosaminoglicanos do cefalotórax do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*;
- Realizar a caracterização físico-química (dosagens de hexosamina, ácido urônico, sulfato e proteína, eletroforeses em gel de agarose em tampão propileno diaminoacetato, pH 4,5 e 9, determinação de peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida, degradação com mucopolissacaridases específicas e determinação dissacarídica por cromatografia descendente em papel) e espectroscópica (*FT-IR*, *RAMAN*) do heparam sulfato obtido do cefalotórax do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*;
- Avaliar a atividade anticoagulante *in vitro* pelos métodos USP, TTPa, tempo de fibrinogênio, inibição do Fator Xa, inibição do Fator IIa do heparam sulfato obtido do cefalotórax do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*;
- Avaliar o estímulo do heparam sulfato obtido do cefalotórax do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* sobre a síntese do heparam sulfato antitrombótico produzido por linhagem de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC);
- Investigar a atividade antitrombótica do heparam sulfato obtido do cefalotórax do camarão rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* pelo modelo experimental de ligadura da veia cava em ratos *Wistar*.
- Avaliar a influência do heparam sulfato obtido do cefalotórax do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* nos fatores envolvidos na cascata de coagulação *in vivo*;

- Investigar a atividade hemorrágica do heparam sulfato obtido do cefalotórax do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* pelo modelo experimental em ratos *Wistar* de sangramento caudal residual.

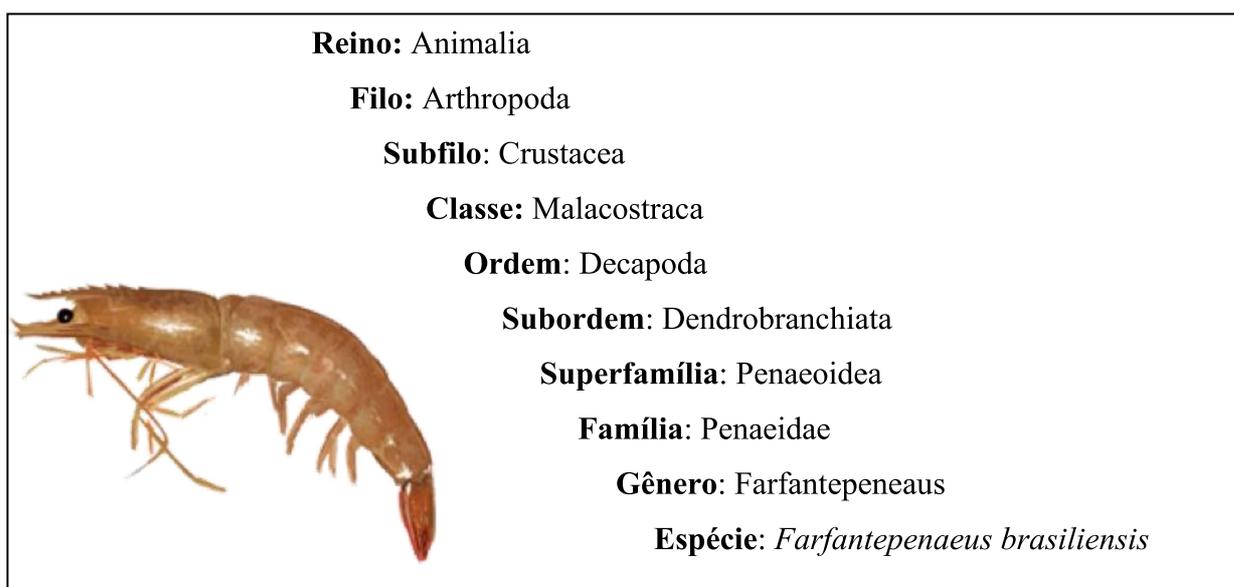
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL

#### 4.1.1. Camarão *Farfantepeneaus brasiliensis*

Camarões da espécie *Farfantepeneaus brasiliensis* (*F. brasiliensis*) foram gentilmente doados pela peixaria Armazém do Porto situada na cidade de Juiz de Fora, MG, Brasil. A identificação da espécie foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sônia Sin Singer, do Departamento de Zoologia – Instituto de Ciências Biológicas – UFJF. Na Figura 14 é descrita a classificação taxonômica.

**Figura 14 – Camarão *Farfantepeneaus brasiliensis***



O exoesqueleto dos crustáceos foi retirado, e o cefalotórax triturado, pesado e mantido a -80 °C para posterior extração dos GAGs.

#### 4.1.2. Linhagem Celular

A linhagem celular de endotélio de aorta de coelho (RAEC) foi gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena B. Nader da Disciplina de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica - UNIFESP, SP, Brasil.

#### 4.1.3. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, com aproximadamente 75 dias de vida e pesando cerca de 250 g. Os animais foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), mediante aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFJF, sob o Protocolo nº 014/2019 (Anexo I) e protocolo nº 022/2019 (Anexo II). Todos os animais utilizados neste estudo foram alojados em pequenos grupos em gaiolas de polipropileno, cobertas com maravalha e com livre acesso à ração e água. Os animais foram mantidos em ambiente com regime de luz (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $21 \pm 1$  °C) controlados.

#### 4.1.4. Reagentes

Q-Sepharose TM<sup>XL</sup> adquirida da GE HEALTHCARE (Uppsala, Sweden.). Enzimas heparitinases I e II e heparinase foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Helena B. Nader (UNIFESP, São Paulo, Brasil). Heparina (165 UI) obtida da Kim Master (Passo Fundo, RS, Brasil). Agarose foi adquirida da BioRad Laboratories (Richmond, CA, USA). Heparin sulfato bovino, condroitim sulfato, dermatam sulfato, DMSO, azul de toluidina, papaína, diamino propano etileno (1,3-diamino propano) adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os kits comerciais Activated partial thromboplastin time (aPTT) e thrombin time (TT) utilizados foram da Labtest (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). ACTICHROME® Heparin (Anti-FIIa) e ACTICHROME® Heparin (Anti-FXa) utilizados foram da BioMedica Diagnostics (Windsor, NS, Canada). Plasma citratado adquirido da Bionutrientes do Brasil, Ltda (Barueri, SP, Brasil). Meio de cultura F12 e soro fetal bovino (FBS) adquirido da Cultilab (Campinas, SP, Brasil). Cetamina 10% e xilazina 2% da Syntec (Santana de Parnaíba, SP, Brasil). Acetona PA foi adquirida da Neon (Suzano, SP, Brasil). Ácido acético, etanol, ácido clorídrico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Todos os demais solventes e produtos químicos utilizados apresentavam grau analítico.

#### 4.1.5. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram: Agitador magnético (Phoenix, AP56); Balança analítica (BEL Engineering,

MARK M254A); Balança analítica (Shimadzu, AY 220); Balança semi-analítica (Shimadzu, BL3200H); Banho-maria (Unique Ultrasonic Cleaner, USC 2800A); Cabine de Fluxo Laminar (Thermo Scientific 1300 Series A<sub>2</sub>); Centrífuga 10000 rpm (Jouan Paris); Centrífuga 5000 rpm (Excelsa Baby FANEN Ltda, 208N); Centrífuga 4000 rpm (Centribio); Estufa de secagem (FANEM, 315 5E); Fonte de eletroforese (Isco Electrophoresis Power Supply, 494); Freezer -20°C (Intelligent Bosch 32); Freezer -80°C (ThermoScientific); Incubadora de CO<sub>2</sub> umidificada (Thermo Scientific Forma Series II WaterJacket); Infravermelho (FT-IR-Fourier-transform infrared); Leitor de placas (Thermo Scientific Multiskan 60); Sistema de eletroforese vertical (BioRad); Unidade filtrante (Millipore, Coagulômetro Cascade-M da Helena Laboratories, Company).

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Extração dos glicosaminoglicanos

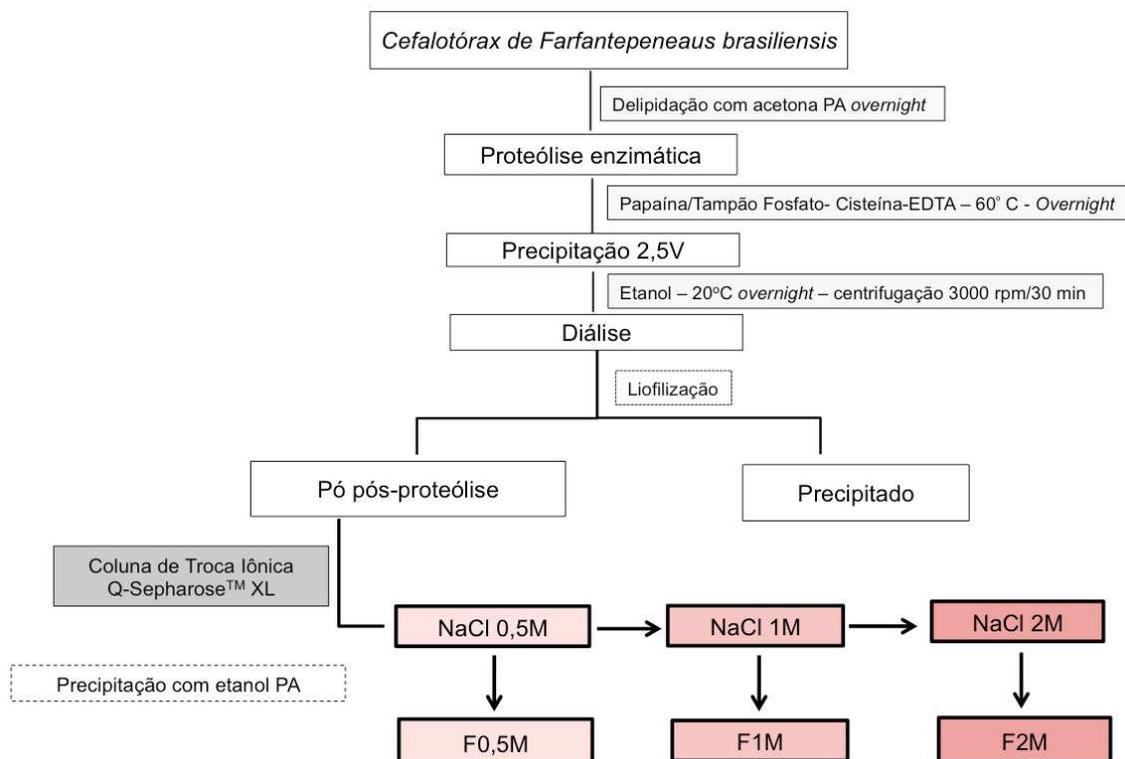
#### 4.2.1.1. *Proteólise*

O bruto de glicosaminoglicanos foi extraído a partir do cefalotórax do camarão *Farfantepenaeus brasiliensis* (Figura 15). Cerca de 475,81g do material foi triturado e delipidado por duas vezes com 250 ml de acetona. Em seguida, o material foi submetido a proteólise com papaína em tampão fosfato-cisteína-EDTA, pH 6,5 na proporção de 1,0 mg de enzima para cada 100 mg de tecido. O material foi incubado por 18 horas em banho-maria a 60°C. Após esse período, o material foi filtrado e o sobrenadante submetido à precipitação com 2,5 volumes de etanol, adicionados lentamente, sob agitação constante e em presença de NaCl 1M. Após incubação a -20°C por 24 horas, o material foi centrifugado a 3.000 rpm por 30 minutos e o precipitado recuperado foi despigmentado, por meio de incubação com acetona por 48 horas (com troca de solvente a cada 12 horas), dialisado por 48 horas para remoção do excesso de sal e, posteriormente, liofilizado (bruto de glicosaminoglicanos). Este precipitado foi ressuspenso em água destilada (soluções de 100mg/mL).

#### 4.2.1.2. Purificação em cromatografia de troca iônica

Os glicosaminoglicanos (GAGs) presentes no bruto de GAGs foram purificados por cromatografia de troca iônica (*Ion Exchange Chromatography*). Foi utilizada coluna cromatográfica empacotada com 20 mL de resina *Q-Sepharose*. A eluição foi realizada em gradiente de NaCl (NaCl 0,5M, NaCl 1M e NaCl 2M), no fluxo de 8 mL/min. Foram aplicados 175 mg do bruto de GAGs, em volume final de 60 mL. A resina *Q-Sepharose* foi previamente ativada com 60 ml de NaCl 2M e equilibrada com água destilada. As subfrações obtidas foram identificadas por dosagem de ácido urônico (Métodos 4.2.3.1) e, as que apresentaram o mesmo conteúdo químico foram agrupadas em três frações: F0.5M, F1M e F2M. O HS presente em cada uma destas, foi precipitado com 2,5 volumes de etanol, adicionados lentamente e sob agitação. Após 24 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , as frações foram centrifugadas (3.000 rpm, 30 minutos), e o precipitado foi dialisado e liofilizado. Soluções de 1 mg/mL de cada uma das frações foram preparadas em água destilada.

**Figura 15: Esquema de extração dos GAGs de camarão *Farfantepenaeus brasiliensis*.**



Fonte: elaborado pela própria autora.

#### 4.2.2. Eletroforese

##### 4.2.2.1. *Eletroforese em gel de agarose 0,6% em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA) 0,05M*

As frações (F0.5M, F1M e F2M) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,6% (p/v), de acordo com a metodologia proposta por Dietrich & Dietrich, 1976. As soluções de 1 mg/mL, de uma cada uma das frações, foram secas à vácuo e concentradas, ressuspensas em alíquotas de 5 µL de água destilada, e aplicadas no gel, preparado em tampão PDA, 0,05M, pH 9,0. A corrida foi realizada utilizando-se voltagem constante (100 V) por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Após a migração eletroforética, a lâmina com gel foi imersa em brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0,1% (p/v) por no mínimo 2 horas para precipitação dos GAGs. Em seguida, o gel foi seco sob corrente contínua de ar quente. A lâmina foi corada com azul de toluidina 0,1% (p/v) em solução de etanol 50% (v/v): ácido acético 1% (v/v) por 15 minutos. O excesso de corante foi removido com solução descorante (etanol 50% (v/v): ácido acético 1% (v/v)). A lâmina foi descorada e, corada novamente com azul de toluidina 0,1% (p/v) em tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 4,5. O excesso de corante foi removido por tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 5.

##### 4.2.2.2. *Eletroforese em gel de agarose em dois sistemas de tampões: acetato de bário – 1,3 – diaminopropano acetato (Bário/PDA)*

Seguindo a metodologia proposta por Bianchini *et al*, 1980, os GAGs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,55% (p/v) em sistema descontínuo, utilizando dois tampões: acetato de bário 40 mM e PDA 0,05M. As frações F1M e F2M (200 µg de cada) foram ressuspensas em alíquotas 5 µL de água destilada, e aplicadas no gel de agarose 0,55% em tampão acetato de bário 40 mM pH 5,8. Inicialmente o gel foi submetido a eletroforese em uma câmara com o mesmo tampão, por 15 minutos a uma diferença de potencial de 80 volts. Decorrido esse tempo, o gel foi transferido para outra cuba com tampão PDA 0,05M, permanecendo em repouso por 15 minutos a 4°C. Em seguida a corrida foi retomada a uma diferença de potencial de 100 volts. Decorrido o tempo necessário para a corrida eletroforética, os GAGs presentes no gel foram precipitados com CETAVLON 0,1% durante o período de no mínimo 2 horas. A seguir,

o gel foi seco sob calor e ventilação, e corado com uma solução de azul de toluidina 0,1% (p/v) em solução de ácido acético 1%: etanol 50 %. O excesso de corante, foi retirado com uma solução de ácido acético 1%:etanol 50%.

#### 4.2.2.3. *Eletroforese em gel de poliacrilamida para estimativa de peso molecular*

A estimativa do peso molecular modal (PM) do HS presente nas frações foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (Hilborn; Anastassiadis, 1971; (Dietrich & Nader, 1974). As frações (100 µg) foram secas a vácuo e ressuspensas em 10µL de tampão de amostra (Tris 40 mM, NaCl 20 mM, EDTA mM, glicerol 40%, vermelho de cresol 0,05%), e aplicadas em gel de poliacrilamida 30%, em tampão Tris-HCl 20 mM. A eletroforese foi realizada tampão de corrida contendo Tris 40 mM, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3 (100 V), em sistema de eletroforese vertical. Após 1 hora de corrida o gel foi removido da placa e corado com azul de toluidina 0,1% (p/v) em ácido acético 1% por 20 minutos, em seguida, o excesso de corante foi removido com solução ácido acético 1%. Foram utilizados como padrões de PM: dextram sulfato (8 kDa), condoitim-4-sulfato (26 kDa) e condroitim-6-sulfato (67 kDa). O PM modal dos compostos foi obtido por análise do padrão de migração utilizando o programa TotalLab.

### **4.2.3. Dosagens químicas**

#### 4.2.3.1. *Dosagem de ácidos urônicos*

O conteúdo de ácidos urônicos foi avaliado pelo Método de Carbazol segundo (Di Ferrante et al., 1971) em espectrofotômetro a 525 nm. A concentração de ácidos urônicos foi estimada em relação a uma curva padrão de ácido D-glucurônico.

#### 4.2.3.2. *Dosagem de hexosamina*

O conteúdo de hexosamina foi determinado pela reação modificada de (RONDLE & MORGAN, 1955), após hidrólise ácida (HCl 4M, 6 horas, 100° C). A reação foi observada em espectrofotômetro a 530 nm. Uma curva padrão foi construída usando concentrações conhecidas de n-acetil-glucosamina.

#### 4.2.3.3. *Dosagem de sulfato*

O teor de sulfato foi analisado através do método proposto por (DODGSON, 1961), onde a amostra foi submetida à hidrólise ácida, utilizando ácido clorídrico 8M por 4 horas, a 100°C e posteriormente neutralizado por evaporação avácuo na presença de NaOH. O teor de sulfato foi verificado em espectrofotômetro a 500 nm. A concentração de sulfato foi estimada em relação a uma curva padrão de sulfato de sódio.

#### 4.2.3.4. *Dosagem de proteínas*

A quantidade de proteínas foi avaliada pelo método proposto por (Bradford, 1976) em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteínas estimada em relação a uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

### **4.2.4. Despolimerização enzimática**

#### 4.2.4.1. *Incubação com as enzimas da *Flavobacterium heparinum**

A fração F2M obtida do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis* foi submetida à despolimerização enzimática, utilizando combinações das enzimas heparinase e heparitinase I e II.

A fração F2M (100 µg de GAG) foi incubada com as enzimas nas seguintes combinações: heparinase, heparinase + heparitinase II, heparitinase I, heparitinase II e heparitinase I e II. Também foram incubados nas mesmas condições padrão de HS de pâncreas bovino e heparina suína. O material foi incubado à 37°C *overnight*, em seguida, alíquotas de 5 µL do sobrenadante foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,55% em tampão PDA 0,05M, e a cromatografia descendente em papel para identificação dos produtos formados.

#### 4.2.4.2. *Cromatografia descendente em papel*

Cromatografia descendente em papel foi utilizada para discriminar os produtos obtidos a partir da despolimerização enzimática da fração F2M, obtida a partir do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis*. A cromatografia foi realizada em papel Whatman

3 MM, em sistema de solvente ácido isobutírico:amônia 1,25N (5:3,3 v/v) por 24 horas. Em seguida, o cromatograma foi seco em estufa. Os produtos insaturados oriundos da degradação foram revelados com nitrato de prata alcalino.

#### **4.2.5. Espectroscopia Infravermelho**

Foi realizada análise por espectroscopia de infravermelho (FT-IR - *Fourier-transform infrared*) da fração F2M de um aparelho Burker Alpha FT-IR, na região espectral 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando a técnica de reflexão total atenuada (ATR) de medição. A execução desta análise também foi realizada no Núcleo de Espectroscopia do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

#### **4.2.6. Espectroscopia RAMAN**

Os espectros de Raman para as amostras e padrões foram obtidos a partir de análise espectral realizada a 1000 scans no instrumento Bruker RFS 100, operando a 1064 nm, potência de laser de 100 mW e realizando uma varredura de 4000 a 500 número de onda ( $4 \text{ cm}^{-1}$ ). A execução desta análise foi realizada no Núcleo de Espectroscopia do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

#### **4.2.7. Ensaio biológicos**

##### *4.2.7.1. Atividades anticoagulantes in vitro*

##### **a) Atividade anticoagulante total - Método USP (1965)**

Inicialmente, as amostras e o padrão de heparina (165 UI) foram adicionados em tubos de vidro e secas a vácuo. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em NaCl 0,9 %. O plasma foi então adicionado e os tubos foram incubados por 3 minutos a 37 °C. Após esse tempo, foi adicionado o  $\text{CaCl}_2$ , para ativação da cascata da coagulação e os tubos, novamente, incubados a 37 °C. A observação da retração do coágulo foi realizada uma hora depois, como controle negativo foi utilizado o plasma citratado.

### **b) Atividade anticoagulante – Ensaios TTPa e Tempo de Fibrinogênio**

Os ensaios - tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) e tempo de fibrinogênio foram realizados conforme protocolos dos *kits* adquiridos comercialmente (Labtest) utilizando plasma citratado. O tempo de coagulação foi determinado em coagulômetro Cascade-M (Helena Laboratories, Company), sendo o tempo máximo dos testes de 300 segundos. Como controle negativo, foi utilizado o plasma citratado e como controle positivo heparina (165UI).

### **c) Análise da atividade anti-Xa e anti-IIa**

As atividades de anti-Xa e anti-IIa foram realizadas através de métodos cromogênicos, utilizando *kits* ACTICHROME® Heparin (Anti-FXa) e ACTICHROME® Heparin (Anti-FIIa). Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços. A heparina (165UI) foi utilizada como padrão e as leituras foram realizadas à 405 nm em leitor de fluorimetria/colorimetria.

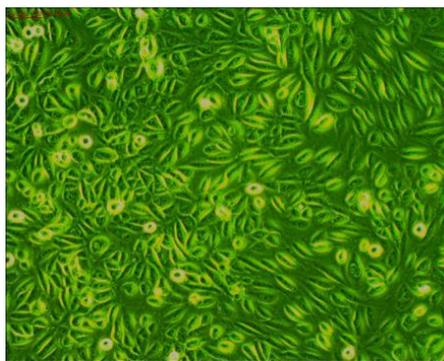
#### *4.2.7.2. Manutenção da linhagem celular (RAEC)*

As células endoteliais da aorta do coelho (RAEC) apresentam crescimento em monocamadas, até atingirem a confluência, apresentando inibição de contato. Quando observadas ao microscópio óptico, possuem forma oval ou poligonal, com citoplasma escuro ao redor do núcleo central, contendo dois ou mais nucléolos. Já o citoplasma periférico aparece mais claro e o contorno das células é bem definido (Figura 16) (Buonassisi; Colburn, 1980).

As células foram mantidas em placas de 100 mm de diâmetro, em meio de cultura F-12, enriquecido com 10% de soro fetal bovino na presença de penicilina (100 IU/ml) estreptomicina (100 mg/mL) e mantidas a 37°C sob atmosfera de 2,5% de CO<sub>2</sub>. O subcultivo foi realizado no ponto de confluência (cerca de 3,5 x 10<sup>6</sup> células/placa) (Figura 16). Para este procedimento, as placas eram previamente lavadas com solução de EBSS duas vezes, e posteriormente incubadas com 3,5 mL de solução de tripsina (10X) diluída em EBSS, na incubadora a 37 °C até que células se desprendessem da placa. Em seguida, as células eram transferidas para um tubo de 15 mL contendo 8 mL de meio de cultura completo e centrifugadas a 2000 rpm/minutos por 2 minutos. Posteriormente o

sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura suplementado com 10% SFB e levadas para contagem em câmara de Neubauer. Cerca de  $3,5 \times 10^5$  células foram plaqueadas em uma nova placa contendo meio de cultura suplementado com 10% SFB, onde foram mantidas a 37°C sob tensão de 2,5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado em dias alternados até atingirem o estado de confluência.

**Figura 16 – Células endoteliais de aorta de coelho (RAEC)**



Fonte: A imagem foi gentilmente cedida por Andrade, R, G. C, 2019.

#### 4.2.7.3. *Teste de redução de MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).*

O teste de viabilidade celular foi realizado após incubação da amostra (fração F2M) em cultura de células endoteliais de aorta de coelho-RAEC ( $1 \times 10^4$  células/poço). Em placas de 96 poços as células foram incubadas com as amostras (13,7 e 27,5 µg/mL) por 24 horas para aderirem, quando então foi adicionado o sal de tetrazólio MTT (brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) e novamente incubadas por mais 4 horas. A viabilidade celular foi medida pela capacidade mitocondrial de converter o sal de tetrazólio (amarelo) em cristais de formazam (azul), que foram solubilizados em DMSO para análise em leitor de microplacas a 492 nm (Mosmann, 1983).

#### 4.2.7.4. *Síntese de PGHS por células de aorta de coelho após estímulo com fração F2M do camarão F. brasiliensis.*

Para verificar se a fração F2M aumenta na síntese de PGHS,  $1,5 \times 10^4$  células RAEC/poço foram plaqueadas em microplaca de 24 poços e cultivadas até atingirem o estado de subconfluência (80% da confluência), sendo o meio de cultura trocado em dias alternados. Em seguida, as células foram lavadas por 2 vezes em EBSS e 1 vez em meio F12 sem soro, e adicionado um novo meio contendo  $150 \mu\text{Ci/ml}$  de  $[\text{S}^{35}]$ -sulfato de sódio na presença ou ausência da fração F2M nas concentrações de 50 e  $100 \mu\text{g/mL}$  e de heparina ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) e mantidas por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  sob atmosfera de 2,5% de  $\text{CO}_2$ .

Após o tempo de incubação, o meio foi removido em banho de gelo, e armazenado em tubo de microcentrífuga de 2 mL a  $-20^\circ\text{C}$ . As células foram lavadas por 3 vezes com PBS em banho de gelo e removidas com 1ml de uma solução de ureia 3,5 M em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 com o auxílio de um “scrapper”. Uma alíquota de  $20 \mu\text{l}$  do extrato celular foi separado para a dosagem de proteínas por BCA.

Os glicosaminoglicanos (GAGs) secretados para o meio de cultura e presentes na fração celular, foram submetidos a proteólise com maxatase ( $4 \text{ mg/mL}$ ) em tris-HCl 0,5 M, pH 8, contendo NaCl 1 M, e posteriormente foram submetidos a eletroforese em gel de agarose tampão PDA, como demonstrado no item 4. 2. 2.

Após eletroforese, as amostras foram expostas a um filme radiosensível e submetidas a varredura a laser no aparelho Cyclone<sup>TM</sup>, o qual faz leitura do fósforo excitado e o quantifica como unidade de luminescência, variando conforme o grau de excitação. As bandas dos GAGs presentes no gel foram recortadas e transferidas para microtubos contendo  $500 \mu\text{L}$  do líquido de cintilação, ultimagold, para quantificação da radioatividade por meio do aparelho OptiQuant<sup>TM</sup>, que quantifica as cintilações por minuto (cpm). Posteriormente foram plotados os dados recebidos do aparelho, e relacionamos o resultado em cpm/proteína.

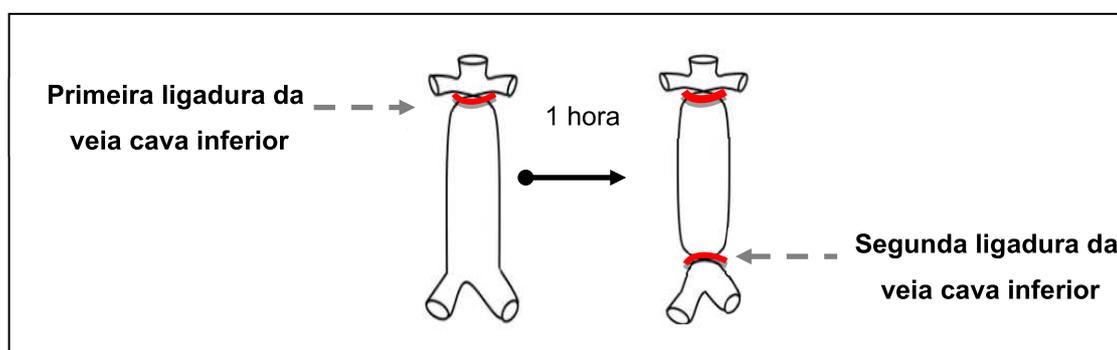
#### 4.2.7.5. *Atividade antitrombótica in vivo*

Os animais foram organizados, de maneira aleatória, em quatro grupos ( $n = 5$ ) e submetidos ao modelo de ligadura da veia cava inferior, de acordo com trabalhos previamente publicados (Dore et al., 2013; Reis et al., 2020; Reyers et al., 1980).

A amostra (fração F2M) foi seca à vácuo e ressuspensas em 200 µl de solução salina (NaCl 0,9% p/v) de maneira a obter as doses de 13,7µg/g e 27,5µg/g. O preparo das doses foi feito no momento prévio a administração.

A fração F2M (200µL) foi então aplicada na veia caudal (intravenosa). Logo após a aplicação da dose, sob efeito de anestesia (Quetamina (10%) 90 mg/kg e Xilazina (2%) 10 mg/kg), foi realizada laparotomia 2 centímetros abaixo do processo xifoide dos animais. A porção da veia cava inferior foi exposta cerca de 1 cm abaixo da veia renal esquerda e uma ligadura com um fio de algodão foi realizada na veia cava inferior, distalmente ao ponto de origem da veia renal esquerda. A cavidade abdominal foi fechada com a sutura do peritônio e das camadas musculares, assim como da pele dos animais com pontos simples (Nylon 4.0). Este modelo induz e mimetiza um quadro de trombose venosa profunda, por meio da estase sanguínea local. Decorrido uma hora do procedimento cirúrgico, sobre efeito anestésico, a cavidade dos animais foi novamente aberta e uma nova ligadura foi realizada um centímetro abaixo da primeira (Figura 17).

**Figura 17 – Esquema ilustrativo do procedimento de ligadura da veia cava inferior**



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Os animais foram então submetidos à exsanguinação sobre efeito anestésico e ruptura do diafragma. Após eutanásia o fragmento da veia cava entre as duas ligaduras foi seccionado, removido e colocado numa placa de Petri. Qualquer trombo formado foi removido lavado com solução salina, colocado em papel de filtro previamente seco e tarado. O papel de filtro contendo o trombo foi então seco por 12 horas a vácuo e novamente pesado, sendo a diferença entre as pesagens correspondente ao peso do trombo formado.

#### 4.2.7.6. *Atividade hemostática in vivo.*

O sangue dos animais submetidos ao modelo de trombose induzida pela ligadura da veia cava foi coletado diretamente do coração 1º min antes do procedimento de eutanásia. O plasma foi obtido por centrifugação (3 000 rpm, 15 min). Em seguida, 100 µl do mesmo foi incubado (37 °C, 10 min) e submetido ao teste de TTPa, de acordo com o *kit* Labtest (Lagoa Santa, Brasil).

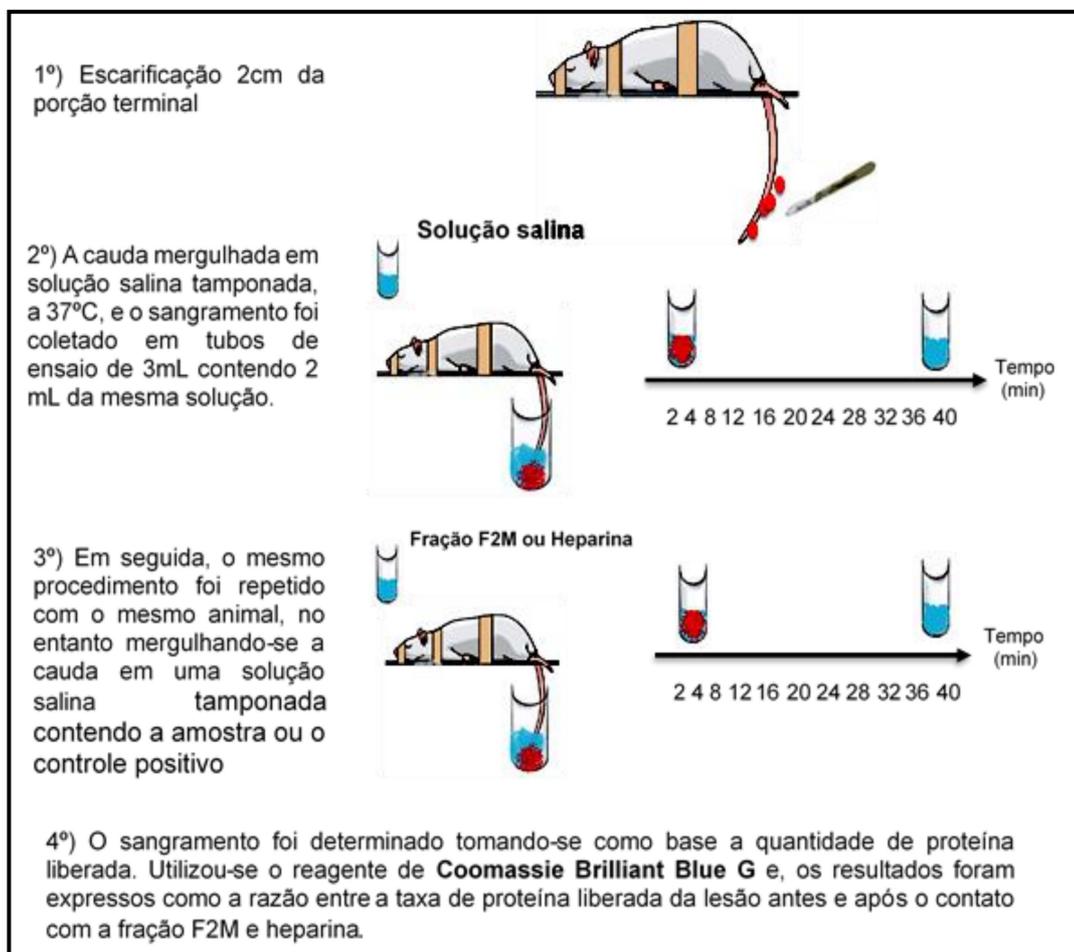
#### 4.2.7.7. *Atividade hemorrágica in vivo*

A atividade hemorrágica *in vivo* foi determinada utilizando-se o método proposto por Cruz & Dietrich, 1967 com algumas modificações. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n=5), sendo eles: F2M 27,5 µg/mL, F2M 55 µg/mL, heparina 1,5 µg/mL, a qual foi utilizada como controle positivo. O objetivo desse experimento foi avaliar se fração F2M possuía efeito hemorrágico residual, tendo em vista seu potencial anticoagulante e antitrombótico.

Inicialmente os animais foram devidamente anestesiados com Quetamina (10%) 90 mg/kg e Xilazina (2%) 10 mg/kg, em seguida tanto os tratamentos foram diluídos em 2 mL de solução salina tamponada (NaCl 0,9%, NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mM, pH 7,0, 37°C) obtendo as concentrações acima mencionadas.

Sob o efeito da anestesia, higienizou-se com álcool 70%, a porção terminal (cerca de 2 cm) da cauda de cada um dos animais e, então realizou-se uma escarificação com uma lâmina de bisturi nesta região até que se formasse gotículas de sangue. A cauda foi então mergulhada, por 2 minutos, em um tubo de ensaio de 3 mL contendo 2 mL de solução salina tamponada a 37°C. Decorridos este tempo, a cauda foi mergulhada em outro tubo contendo solução salina, e então observou-se o sangramento. Este procedimento foi repetido 12 vezes, em um total de 40 minutos. A representação esquemática deste protocolo experimental encontra-se na Figura 18.

**Figura 18- Esquema representativo do delineamento do modelo experimental de atividade hemorrágica por escarificação.**



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Em seguida, o mesmo animal teve a cauda, já escarificada, mergulhada em solução salina contendo a amostra teste, e o mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado.

O sangue coagulado era retirado com uma gaze, tomando o cuidado para não gerar outro ponto de lesão na cauda. Os resultados foram expressos pela razão da taxa de proteínas liberadas da lesão antes e após o contato com a fração F2M ou heparina.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism® versão 5.0. Os dados obtidos neste estudo foram representados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Para comparações envolvendo mais de dois grupos, a análise de variância (Oneway ANOVA) foi usada para determinar as diferenças significativas, utilizando o teste estatístico de Bonferroni ou Newman-Keuls. Todos os experimentos foram realizados em duplicada ou mais. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.

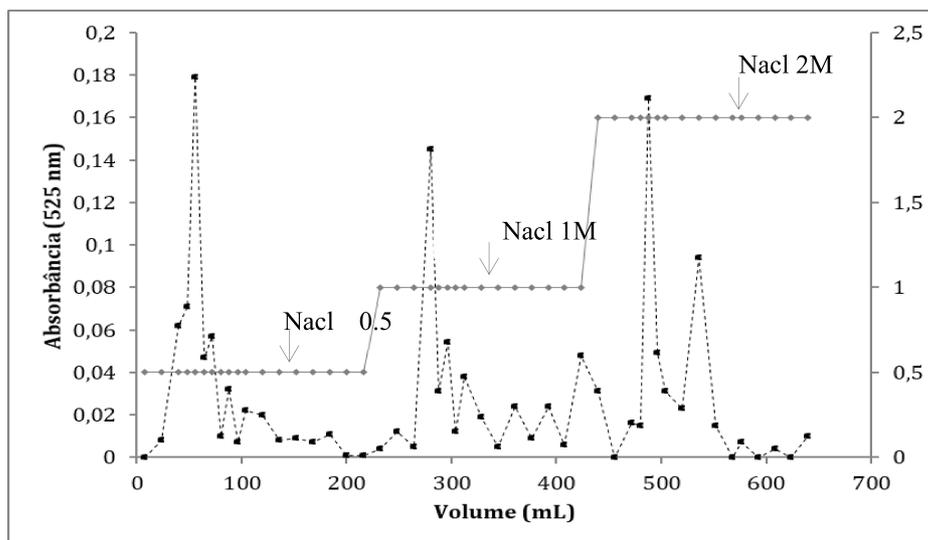
## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO CEFALOTÓRAX DO CAMARÃO *F. brasiliensis*.

#### 6.1.1. Extração e purificação do bruto de glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos (GAGs) do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis* foram obtidos por extração e purificação conforme descrito em Métodos 4.2.1.1. e 4.2.1.2. Buscando obter maior rendimento da extração desses compostos, o cefalotórax foi triturado a fim de aumentar a sua superfície de contato com a papaína e solventes utilizados. O material triturado foi submetido à delipidação para eliminação do conteúdo lipídico, e dessa forma, obter maior eficiência na etapa de purificação. O material obtido após a extração por proteólise foi submetido a cromatografia de troca iônica em resina *Q-Sepharose* e eluídos em *step-wise*, com concentrações crescentes de NaCl (0,5M, 1M e 2M), Figura 19.

**Figura 19-** Perfil de eluição de GAGs presentes no pó pós-proteólise do cefalotórax de camarão *F. brasiliensis*

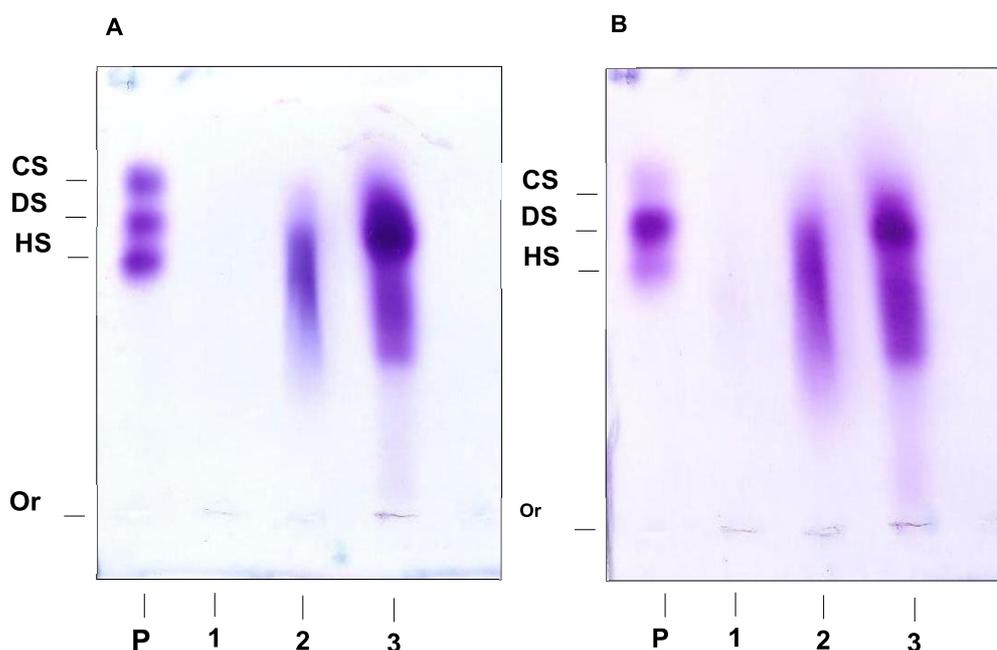


**NOTA:** A concentração de NaCl está representada no gráfico pela linha cinza. O perfil de eluição dos GAGs foi acompanhado pelo método de dosagem de ácido urônico (DISCHE, 1954). Fonte: elaborado pela própria autora.

De acordo com a Figura 19, podemos observar a presença de três picos principais de eluição dos GAGs, os quais foram agrupados, dialisados, liofilizados e pesados em três frações denominadas: F0.5M (8 mg), F1M (5,1 mg) e F2M (4,7 mg).

Essas frações foram identificadas utilizando eletroforese em gel de agarose 0,6% em tampão PDA 0,05M, pH 9,0 conforme descrito em Métodos 4.2.2.1. O resultado obtido está demonstrado na Figura 20.

**Figura 20- Perfil eletroforético das frações F 0.5M, F 1M e F 2M.**



**NOTA:** Foram aplicados 100 µg de cada uma das frações no gel. **(A)** Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05M corada com azul de toluidina pH 9,0. **(B)** Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA corada com azul de toluidina pH 4,5. 1, F 0,5M; 2, F 1M; 3, F 2M; CS, condroitim sulfato; DS, dermatam sulfato; HS, heparam sulfato; Or, origem; P, padrão composto por 5µg de CS, 5µg de DS e 5µg de HS. Fonte: elaborada pela própria autora.

Analisando a figura 20 (A e B), pela metacromasia formada, notamos a presença de GAGs nas frações F1M e F2M, enquanto na fração F0.5M, mesmo após a utilização dos dois corantes, não foi observado nenhuma banda metacromática. Além disso, é possível observar que as frações F1M e F2M migraram com perfil semelhante ao HS presente na mistura de padrões de GAGs (Figura 20). Entretanto, é interessante notar que ambas as frações migraram além do HS padrão de pâncreas bovino, apresentando perfil de migração entre o dermatam sulfato (DS) e HS.

O método de obtenção de GAGs, proteólise enzimática seguida de cromatografia em resina de troca iônica, é relatado na literatura para outras espécies de camarão (*Litopenaeus vannamei* e *Artemia franciscana*) (BRITO *et al.*, 2008; CHAVANTE *et al.*, 2000). Nesses trabalhos foi observado perfil semelhante de eluição dos GAGs em *step-wise*, sendo obtido picos desses compostos em concentrações de 0.8M de NaCl. No entanto, esses trabalhos realizaram o fracionamento por acetona em volumes crescentes. De acordo com Costa e colaboradores (2012), a adição de volumes crescentes de acetona gradativamente reduz a constante dielétrica da água, promovendo, assim, a precipitação de diferentes porções de GAGs. A separação destes pela acetona é dependente da interação das cargas dessas macromoléculas com a água, sendo que aquelas que sofrem maior interação são as últimas a precipitar.

Andrade e colaboradores (2013) realizaram a extração de HS presente em caranguejos da espécie *Goniopsis cruentata*, utilizando papaína e, obtiveram um pico de GAG em NaCl 2M e NaCl 3M, semelhante ao obtido com os GAGs oriundos do cefalotórax de camarão *F. brasiliensis*.

Os GAGs são moléculas organismo e tecido específicas, apresentando diferentes padrões de sulfatação e repetição de unidades dissacarídicas, sendo que essas alterações são decorrentes das diversas funções fisiológicas que desempenham em cada organismo. Portanto, é justificável o fato de encontrarmos GAGs com distintas densidades aniônicas, o que explica a diferença no padrão de eluição desses compostos entre os estudos citados acima e o GAG obtido no presente trabalho. Dessa forma, o perfil de eluição dos GAGs em resina de troca iônica, está intimamente ligado a espécie de crustáceo em estudo e as etapas de purificação envolvidas.

Para o camarão *F. brasiliensis*, há apenas um relato na literatura envolvendo a extração de GAGs por proteólise, no entanto não há relato empregando a extração com papaína seguida de purificação em coluna de resina de troca iônica (DIETRICH *et al.*, 1999).

A eletroforese, técnica empregada para a identificação das frações F0.5M, F1M e F2M, permite identificar compostos carregados negativamente por meio de seu perfil de migração, o qual está relacionada não só com a neutralização e interação destas com o tampão PDA, mas também com a conformação estrutural da molécula a qual está ligada as cargas negativas. Ademais, a metacromasia do corante mediante cargas negativas oriundas de grupamentos sulfato ou carboxílicos, permite inferir sobre densidade aniônica, e, portanto, concentração destas na amostra (DIETRICH; DIETRICH, 1976).

HS e a heparina apresentam elevada densidade aniônica, o que os faz interagir mais com o tampão e apresentar menor migração no gel. Condroitim sulfato (CS) é o que apresenta menor interação com o tampão e, portanto, apresenta maior migração. Já o DS apresenta maior interação com o tampão, em relação ao CS, devido à presença de ácido L-idurônico em sua estrutura, o que o faz migrar menos no gel.

Dessa forma, de acordo com a Figura 20, observamos que a fração F2M apresenta migração entre os padrões de HS e DS, e acreditamos que, por ser de origem marinha, o GAG presente na fração nesta apesar de ser similar ao HS de pâncreas bovino, apresenta particularidades estruturais, tais como: densidade aniônica, o que justifica sua menor interação com o tampão e, portanto, maior migração eletroforética. Esse perfil de migração em eletroforese de gel de agarose em tampão PDA 0,05M obtido foi observado para o HS extraído do camarão *L. vannamei* (BRITO *et al.*, 2008).

O mesmo gel foi corado por azul de toluidina em diferentes valores de pH: 0,1% em solução de ácido acético 1% e etanol 50% em pH 9,0 (Figura 20-A) origina metacromasia a partir da interação do azul de toluidina com grupamentos sulfato e, em contrapartida, este mesmo corante em pH 4,5 (Figura 20-B) interage com cargas negativas referentes a grupos carboxilatos. Em geral, o corante azul de toluidina pH 4,5 é utilizado para visualizar componentes que não apresentam os grupamentos sulfato típicos de GAGs, como o ácido hialurônico, único GAG que não apresenta esta característica (DIETRICH; DIETRICH, 1976).

Analisando a Figura 20, nota-se que, em ambos os valores de pH, o perfil eletroforético foi o mesmo para as frações F1M e F2M, indicando a presença de GAGs sulfatados. Para a fração F0.5M não foi observada nenhuma banda de migração em nenhum dos corantes utilizados, sugerindo que não há GAG nesta fração, sendo, portanto, excluída das análises posteriores. A Figura 20 mostra, que a fração F1M, muito embora tenha apresentado metacromasia, não apresenta a formação de uma banda nítida de maior concentração como pode-se observar na fração F2M, portanto, considerando as atividades que seriam desenvolvidas com o composto obtido a partir do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis*, optamos por desenvolver o trabalho utilizando apenas a fração F2M, a qual foi atribuída maior rendimento de GAGs.

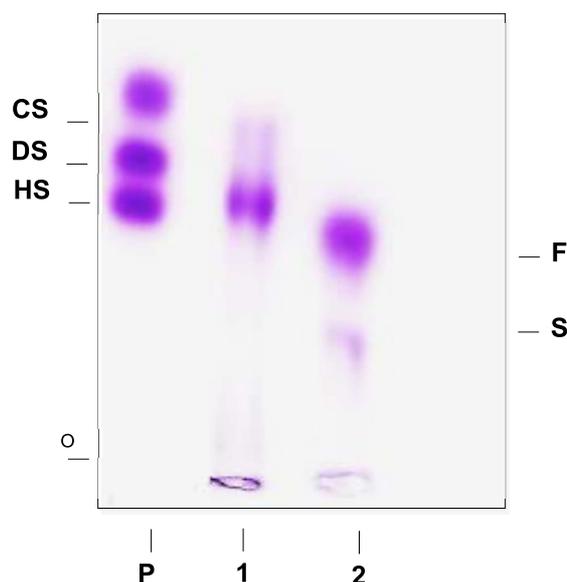
### **6.1.2. Eletroforese em gel de agarose e, dois sistemas de tampões: acetato de bário – 1,3 – diaminopropano acetato (PDA)**

Como dito anteriormente (itens 2.5 e 2.6), HS e heparina apresentam similaridades estruturais, muito embora apresentem variabilidade entre diferentes tecidos e espécies. Devido a essa similaridade, não é possível distingui-los pelo padrão de migração ou pela metacromasia formada na eletroforese em gel de agarose em tampão PDA, uma vez que interagem de maneira muito similar com a diamina presente no tampão (DIETRICH & NADER, 1974)

Para tanto procedeu-se a eletroforese em gel de agarose 0,55%, utilizando dois sistemas de tampão: acetato de bário 40 mM e PDA 0,05M, como proposto por (BIANCHINI et al., 1980)

Neste sistema de eletroforese, conhecido como descontínuo, onde são utilizados dois tampões (Bário/PDA), a heparina de origem suína (utilizada como padrão neste estudo) apresenta um padrão de migração peculiar, uma vez é composta por famílias de componentes, de maneira fracionada em duas bandas denominadas de componentes de migração rápida e lenta (BIANCHINI *et al.*, 1980; MEDEIROS *et al.*, 2000). Desta maneira, é possível diferir HS e heparina, uma vez que o HS não apresenta essas famílias de componentes, migrando indiferentemente da mesma maneira em ambos sistemas de eletroforese (PDA ou descontínuo Ba/PDA).

**Figura 21 – Perfil eletroforético da fração F2M em eletroforese em gel de agarose em sistema descontínuo (Ba/PDA)**



**NOTA:** 200  $\mu\text{g}$  de cada uma das frações foram aplicados no gel de agarose, submetidos à eletroforese e corados com azul de toluidina. , F0,5M; 2, F1M; 3, F2M; CS: condroitim sulfato, DS: dermatam sulfato, HS: heparam sulfato, HEP: Heparina, HEP-F: Banda de migração rápida da heparina, HEP-S: banda de migração lenta da heparina, Or: Origem, P: Mistura de padrões contendo 5 $\mu\text{g}$  de CS, DS e HS. Fonte: elaborada pela autora.

Conforme observado na Figura 21, a fração F2M apresentou apenas uma banda eletroforética, que migrou de maneira similar ao HS de pâncreas bovino utilizado como padrão, contendo apenas a banda de migração rápida da heparina, o que permite sugerir que a fração F2M não apresenta os demais componentes que são responsáveis pela banda de migração lenta da heparina. Este mesmo comportamento foi observado para compostos híbridos do tipo HS/Heparina de outras espécies de camarão (*Artemia franciscana* e *Litopenaeus vannamei*) (CHAVANTE *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2008). HS obtido a partir do caranguejo *Gniphys cruentata*, obteve padrão similar de migração na eletroforese em sistema descontínuo (ANDRADE *et al.*, 2013). Sugerimos que a fração F2M apresenta um HS que se assemelha às características estruturais (proporção de unidades dissacarídicas e padrão de sulfatação) a um HS de origem bovina. No entanto, é válido reafirmar que os GAGs de origem marinha apresentam padrões estruturais distintos daqueles encontrados em GAGs de animais terrestres, e são comumente chamados de heparinoides, por serem similares a heparina mas apresentarem

peculiaridades estruturais, o que os tornam compostos de interesse (BRITO *et al.*, 2008; CHAVANTE *et al.*, 2000; DIETRICH *et al.*, 1999; NADER *et al.*, 2004; VALCARCEL *et al.*, 2017), o que justifica o padrão de migração distinto para fração F2M na eletroforese em gel agarose em tampão PDA, 0,05M, pH 9,0.

### 6.1.3. Dosagens químicas e estimativa de peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida

Como parte da caracterização da fração F2M obtida do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis*, procedeu-se a realização de dosagens químicas relativas a componentes comumente encontrados em GAGs como: conteúdo de hexosamina, ácido urônico, grupamentos sulfato e residual de proteína. Além disso, como estimativa de peso molecular, realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida (*Polyacrylamide gel electrophoresis*). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

De acordo com a Tabela 1, a fração F2M apresentou uma estimativa de peso molecular modal de 56,86 KDa, maior que os pesos de heparina suína ( $\cong 16$  kDa) e HS bovino ( $\cong 25$  kDa). A fração F2M apresentou razão molar de sulfato por dissacarídeo (sulfato/hexosamina) de 2,3: 1,0. Esta razão está entre os valores descritos para o HS (sulfato/hexosamina, 1,6: 1,0) (Dietrich; Nader, 1974) e heparina (sulfato/hexosamina, 2,8: 1,0) (DIETRICH *et al.*, 1985).

A fração F2M apresentou o conteúdo de 0,27  $\mu$ g de hexosamina/ $\mu$ g de amostra (27%), e cerca de 0,18  $\mu$ g de ácido urônico/ $\mu$ g de amostra (18%). Krinchen e colaboradores (2015) encontraram conteúdo de ácido urônico em torno de 27% para GAGs extraídos da pele de duas espécies de peixes (*Balistes capriscuse Mustelus mustelus*). Observamos um conteúdo de sulfato de 0,12  $\mu$ g de sulfato/ $\mu$ g de amostra, o que está de acordo com a proporção de sulfato por unidade dissacarídica (2,31 /unidade dissacarídica).

Não foi detectado a presença de proteínas, de forma significativa, para a fração F2M obtida a partir de cefalotórax de camarão *F. brasiliensis*.

Na tabela 1, podemos observar a razão molar das unidades de hexosamina e ácido urônico na fração F2M, sendo a relação de 1:0,66, respectivamente. Este resultado obtido para a fração F2M sugere que este é um GAG, que é um polímero constituído de unidades dissacarídicas repetidas e alternadas de hexosamina e ácido urônico.

O ácido urônico pode se apresentar na forma de ácido L-idurônico ou D-glucurônico, ambos estão presentes nas moléculas de HS e heparina, muito embora em proporções distintas

O resultado mostra que para o ácido urônico foi quantificado 0,66, isto pode estar associado a composição dissacarídica da amostra. Nesta metodologia apenas o ácido glucurônico é quantificado, por apresentar maior absorção da luz ultravioleta no comprimento de onda de 525 nm. Portanto, a fração F2M apresentou menor absorção o que sugere à presença de ácido idurônico em sua composição dissacarídica.

**Tabela 1 – Composição química e estimativa de peso molecular da fração F2M**

Hexosamina ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	Ácido Urônico ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	Sulfato ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ )	Proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Razão de Sulfato/ Dissacarídeo	Razão molar		Peso molecular (kDa)
					Hexosamina	Ácido urônico	
0,27±0,01	0,18±0,0	0,121	ND	2,31	1	0,66	56,86

ND: Não determinado

**NOTA:** Foi utilizado 100 $\mu\text{g}$  de F2M em cada uma das dosagens. Fonte: elaborada pela própria autora.

#### 6.1.4 Despolimerização enzimática da fração F2M obtido do cefalotórax do camarão *F.brasiliensis*

A composição dissacarídica da fração F2M obtida a partir do cefalotórax do camarão *F.brasiliensis*, foi determinada por meio da despolimerização enzimática da fração F2M pelas liases oriundas da *Flavobacterium heparinum*: heparinase e heparitinases I e II de *Flavobacterium heparinum*. A fração F2M foi incubada nas seguintes combinações: F2M+heparinase, F2M+heparitinase I, F2M+heparitinase II, F2M+heparitinase I e II e F2M+heparinase e heparitinase II.

O produto de degradação obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05M (Figura 21), e por cromatografia descendente em papel (Figura 22).

A heparitinase I cliva ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  (1→4) entre *n*-acetil ou *n*-sulfato-glucosamina e ácido D-glucurônico (DIETRICH *et al*, 1999; SILVA; DIETRICH,

1974). Enquanto a heparitinase II é inespecífica, podendo clivar ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) entre D-glucosamina e ácido D-glucurônico e entre D-glucosamina e ácido L-idurônico (NADER *et al.*, 1990; DIETRICH *et al.*, 1999). Essas enzimas são eliminase, portanto, geram uma instauração entre C4 e C5 no resíduo do ácido urônico. Essas enzimas degradam o HS a quatro tipos distintos de dissacarídeos insaturados que diferem entre si quanto ao grau e ponto de sulfatação e acetilação bem como ponto de sulfatação.

A heparinase cliva ligações do tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) entre glucosamina N-sulfatada e ácido L-idurônico obrigatoriamente sulfatado na posição C2, não atuando quando o ácido urônico é ácido glucurônico 2-O ou 3-O-sulfato, ou quando a glucosamina é n-acetilada. Essa enzima é uma liase promovendo também instauração entre C4 e C5 do resíduo de ácido idurônico (NADER *et al.*, 1999).

Heparinase cliva a heparina de mamífero a tetrassacarídeos e dissacarídeo insaturado trissulfatado ( $\Delta$ U, 2S-GlcNS, 6S). Enquanto a heparitinase II degrada o tetrassacarídeo, a um dissacarídeo insaturado trissulfatado ( $\Delta$ U,2S-GlcNS,6S) e um dissacarídeo insaturado dissulfatado ( $\Delta$ U-GlcNS,6S) (TERSARIOL, 1995).

De acordo com a Figura 21-A, a fração F2M sofreu degradação pela heparitinase I e degradação total, pela ação conjunta das enzimas heparitinase I e II.

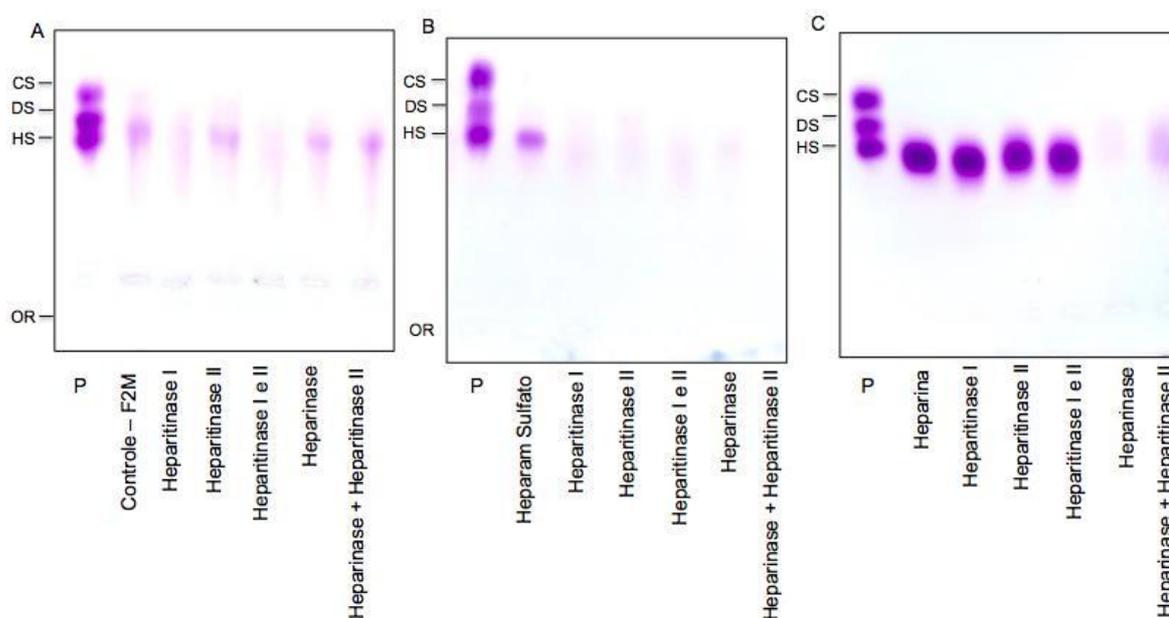
A figura 21-B mostra que o HS de pâncreas bovino foi totalmente degradado pela ação de todas as enzimas utilizadas. Enquanto a heparina de origem suína sofreu degradação apenas pela heparinase e ação conjunta desta com a heparitinase II, o que já era esperado. Os padrões demonstram a especificidade e funcionalidade das enzimas utilizadas.

Baseado na especificidade das enzimas, podemos notar que o HS presente na fração F2M é composto por unidades dissacarídicas do tipo *n*-acetil ou *n*-sulfato-glucosamina ligado a um ácido D-glucurônico e/ou L-idurônico. Levando em consideração a relação molar de ácido urônico (0,66 de glucurônico) encontrada nas dosagens químicas e a susceptibilidade da fração F2M a heparitinase I, sugerimos que o HS presente nesta fração apresenta maior percentual de ácido glucurônico do que L-idurônico em sua constituição dissacarídica.

Além disso, podemos notar que a fração F2M difere na composição dissacarídica em relação a um HS de animal terrestre. O HS de pâncreas bovino, utilizado como controle (Figura 21-B) foi totalmente degradado por todas as enzimas, evidenciando

também a presença de regiões compostas de glucosamina N-sulfatada ligado a ácido L-idurônico sulfato em C2, sendo que esta região não é encontrada no HS presente da fração F2M, uma vez que a F2M não foi degradada pela heparinase.

**Figura 21 – Perfil eletroforético dos produtos de degradação enzimática da fração F2M, HS e heparina**



**NOTA:** (A) Eletroforese em gel agarose em tampão PDA referente aos produtos de degradação de 100  $\mu$ g da fração F2M. (B) Eletroforese em gel agarose em tampão PDA referente aos produtos de degradação HS e (C) Eletroforese em gel agarose em tampão PDA referente aos produtos de degradação da heparina. CS: Condroitim Sulfato, DS: Dermatam Sulfato, HS: Heparin Sulfato, OR: Origem, P: Mistura de padrões contendo 5 $\mu$ g de CS, DS e HS. Fonte: elaborada pela autora.

Na cromatografia descendente em papel (Figura 22-A), foi possível identificar que dois dissacarídeos insaturados foram gerados da degradação pela heparitinase I e heparitinase II:  $\Delta$ U-GlcNS (Figura 22-B) e  $\Delta$ U-GlcNS, 6S (Figura 22-C). De acordo com a especificidade de cada uma destas enzimas, podemos dizer que o HS presente na fração F2M apresenta composição dissacarídica característica de HS. No entanto, podemos observar que a fração F2M não gerou como produto os outros dois dissacarídeos comumente oriundos de HS ( $\Delta$ U-GlcNAc,  $\Delta$ U-GlcNAc, 6S [Figura 22 – A]).

Este resultado sugere que o HS presente da fração F2M do camarão *F. brasiliensis* apresenta regiões dissacarídicas típicas encontradas em HS de animais terrestre, no entanto, difere em sua composição dissacarídica também, uma vez que os resultados

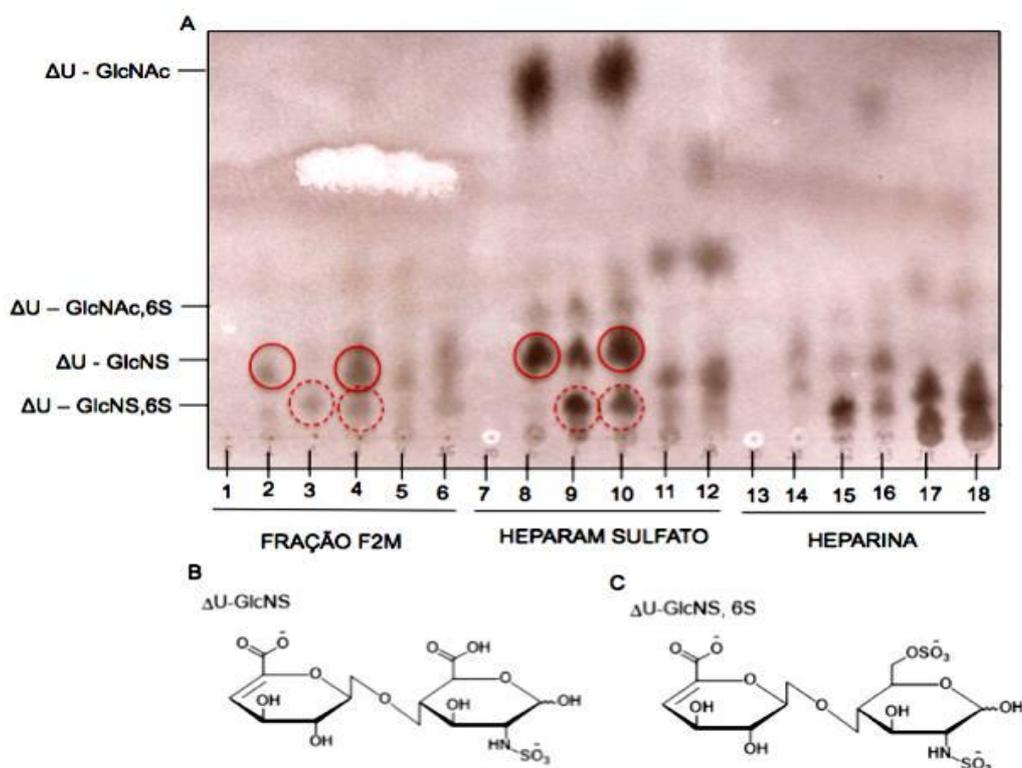
anteriores sugerem diferenças quanto ao grau de sulfatação. Como os dissacarídeos dissulfatados encontrados são formados principalmente pela ação conjunta da heparitinase I e heparitinase II e, como pode ser observado na Figura 21-A que a fração F2M é mais degradada pela heparitinase I do que pela heparitinase II, esses resultados sugerem que a fração F2M do camarão *F. brasiliensis* é degradada por estas enzimas, semelhante a HS de mamíferos (Figura 22 – A).

O dissacarídeo  $\Delta$ U-GlcNS, 6S, oriundo da degradação pela heparitinase II, também foi encontrado por Brito e colaboradores (2014) a partir de uma molécula híbrida de HS/Heparina do camarão *L. vannamei*.

O mesmo padrão de degradação foi encontrado por Chavante e colaboradores (2000), a partir da despolimerização do HS obtido do camarão *A. franciscana*. Neste trabalho, os autores demonstraram a formação principalmente dos dissacarídeos insaturados  $\Delta$ U-GlcNS, 6S e  $\Delta$ U-GlcNS, em consonância com a fração F2M.

Dietrich e colaboradores (1999) demonstraram que o GAG obtido também do camarão *F. brasiliensis* foi resistente a degradação pela heparitinase I, gerando o dissacarídeo trissulfatado (( $\Delta$ U, 2S-GlcNS, 6S). Não foi detectado a presença deste dissacarídeo trissulfatado insaturado na degradação enzimática da fração F2M, o que caracteriza uma grande diferença entre a fração F2M e heparina de mamífero.

**Figura 22 – Perfil de migração e identificação dos produtos de degradação enzimática da fração F2M**



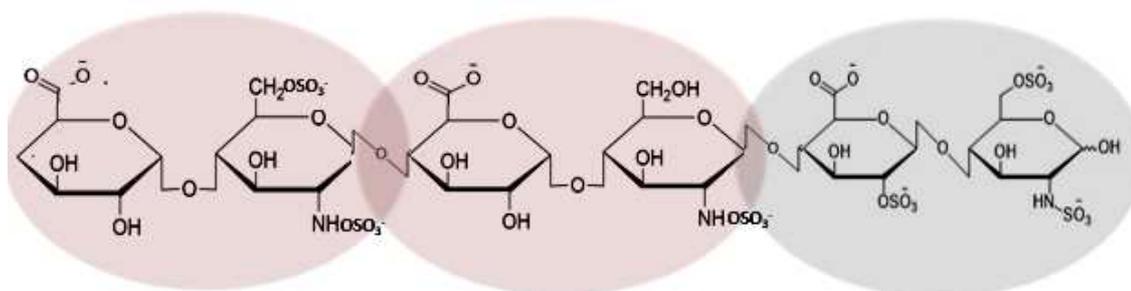
**NOTA:** (A) Cromatografia descente em papel dos produtos formados a partir da degradação enzimática da fração F2M, HS e heparina. (B) Dissacarídeo insaturado ácido urônico–D-glucosamina N-sulfatada. (C) Dissacarídeo insaturado dissulfatado ácido urônico–D-glucosamina N-sulfatada, 6-sulfatda. (1) Controle–fração F2M, (2) – fração F2M + heparitinase I, (3)–fração F2M + heparitinase II, (4)–fração F2M + heparitinase I e II, (5)–fração F2M + heparinase, (6)–fração F2M + heparinase + heparitinase II. (7) Controle – HS, (8) - HS + heparitinase I, (9) - HS + heparitinase II, (10) - HS + heparitinase I e II, (11) – HS +heparinase, (12) – HS + heparinase e heparitinase II, (13) - Controle – heparina, (14) - heparina + heparitinase I, (15) – heparina + Heparitinase II, (16) - heparina + heparitinase I e heparitinase II, (17) heparina + heparinase, (18) heparina + heparinase e heparitinase II. Fonte: elaborado pela própria autora.

Com base nos resultados obtidos a partir da despolimerização enzimática e nos trabalhos apresentados, podemos sugerir que a fração F2M seja composta por um heparinóide estruturalmente similar ao HS de animal terrestre, porém como já é sugerido para estes compostos de origem marinha, apresentam algumas distinções estruturais,

apresentando um dissacarídeo trissulfatado, comumente encontrado em heparina de origem suína e dois dissacarídeos comuns à molécula de HS de origem bovina.

Abaixo, na Figura 23 está esquematizado uma sugestão da estrutura do heparinóide encontrado na F2M obtida do camarão *F.brasiliensis*

**Figura 23 – Proposta de heparam sulfato presente na fração F2M obtida do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis*.**



NOTA: Fonte: elaborado pela própria autora.

### 6.1.5 Análise por espectroscopia infravermelho e RAMAN da fração F2M do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis*

As técnicas espectroscópicas Raman e Infravermelho estão correlacionadas a energia vibracional das ligações químicas entre diferentes elementos, permitindo identificar grupos funcionais presentes em moléculas, e fornecendo informações para elucidação estrutural (PAVIA *et al.*, 2008).

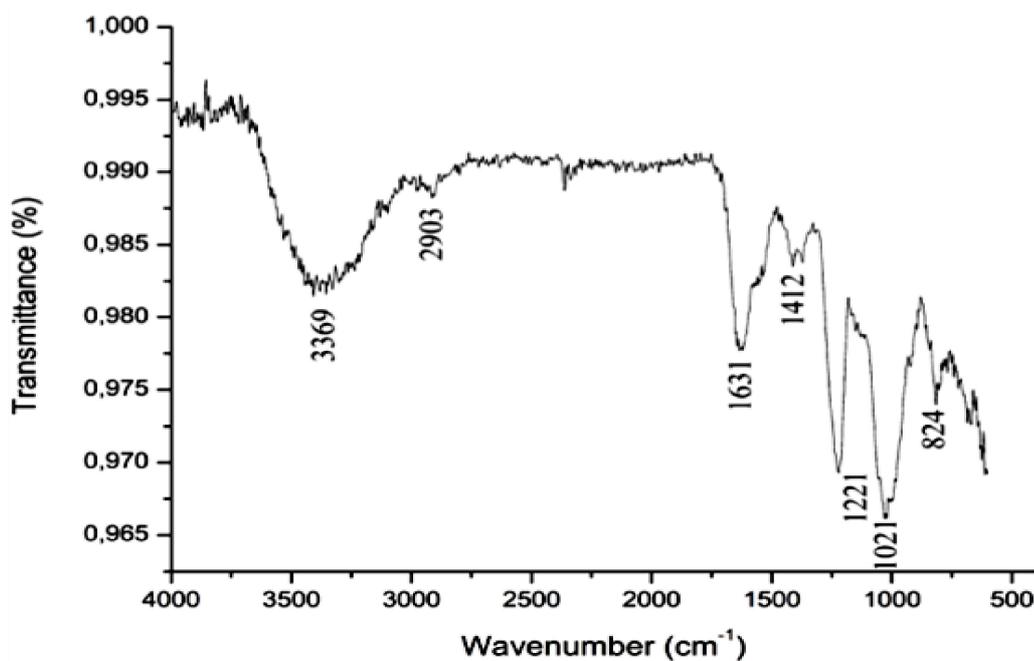
A análise do espectro de Infravermelho obtidos da fração F2M do cefalotórax do camarão *F.brasiliensis* foi realizada por tentativa de comparação entre as principais bandas vibracionais apresentadas no espectro e dados da literatura (Tabela 2). A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*FT-IR*) foi realizada na região de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

De acordo com a Figura 24, a banda observada em 3369  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a vibração por estiramento de O-H, e a vibração por estiramento N-H dos substituintes n-acetil dos resíduos de glucosamina (SYNYTSYA *et al.*, 2002; KANCHANAN *et al.*, 2013). A banda observada em 2903  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento assimétrico de carbono  $\text{sp}^3$ , comumente encontrado em ácidos urônicos e glucosaminas (SYNYTSYA *et al.*, 2002;

KANCHANAN *et al.*, 2013). A banda  $1631\text{ cm}^{-1}$ , segundo Alves, Souza e Reis (2013) deve-se ao estiramento assimétrico do grupamento  $\text{COO}^-$  de ácidos urônicos. A banda observada em  $1412\text{ cm}^{-1}$ , é atribuída na literatura aos grupos éster sulfato, característica marcante dos GAGs. A absorção próximo a  $1021\text{ cm}^{-1}$ , é correlacionada as unidades piranosídicas dos polissacarídeos (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2011).

Várias bandas de absorção na região de  $800\text{ a }820\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao éster sulfato de acordo com Grant e colaboradores (1991) e a banda a  $824\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a C-O-S, predominantemente grupos equatoriais 2-O e 3-O-sulfato nos resíduos de glucuronato (SANDERSON *et al.*, 1987).

**Figura 24 – Espectro de Infravermelho da fração F2M**



Fonte: elaborado pela própria autora.

**Tabela 2: Atribuições das bandas de Infravermelho**

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
3369	<b>Estiramento O-H e N-H</b> (SANTHIYA, D., SUBRAMANIAN, S., NATARAJAN, I., <i>et al.</i> , 2002; Kanchanan <i>et al.</i> , 2013)
2903	<b>Estiramento de C<sub>sp</sub><sup>3</sup> – H</b> (Krichen <i>et al.</i> , 2015)
1631	<b>Estiramento NH<sub>2</sub> e C=O de carboxila ácida</b> (Krichen <i>et al.</i> , 2015)
1412	<b>Estiramento de S=O</b> (Krichen <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: elaborada pela própria autora.

A espectroscopia RAMAN é um método espectroscópico rápido, não destrutivo e não necessita de marcadores externos, tornando-se uma importante técnica para análise de substâncias. A análise do espectro de RAMAN da fração F2M do camarão *F. brasiliensis* (Figura 25) foi realizada pela comparação entre as principais bandas apresentadas nos espectros obtidos e dados da literatura (Tabela 3).

A espectroscopia de RAMAN ainda é pouco utilizada para a análise de polissacarídeos, portanto não foram encontradas análises por esta técnica de amostras de HS oriundas de crustáceos, para tanto a análise das principais bandas obtidas para a fração F2M, foi feita utilizando dados referentes a polissacarídeos de ordem geral.

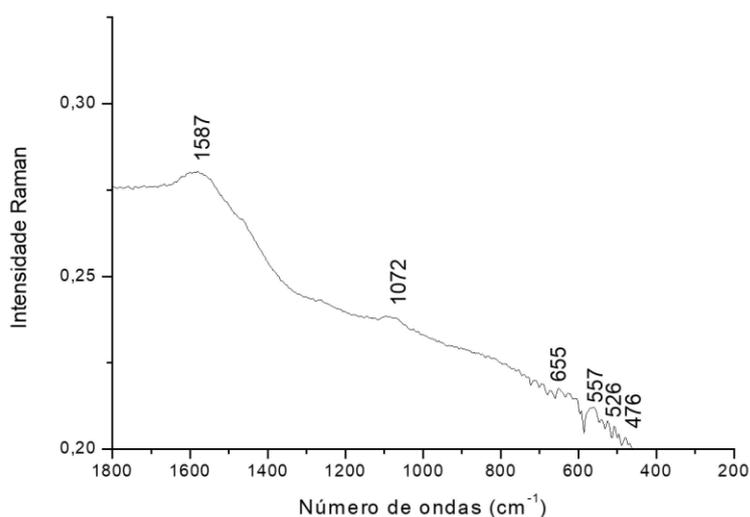
A banda de absorção detectada em 1072 cm<sup>-1</sup> é atribuída tanto deformação C-OH (KACURAKOVA, MATHLOUTHI, 1996), quanto a vibrações de ligações de grupamentos sulfato (BANSIL *et al.*, 1978). Ambas as ligações presentes em GAGs, principalmente na molécula de HS.

Na literatura é atribuída a absorção próxima a 1415 cm<sup>-1</sup> a vibração de grupos carboxilas (COO<sup>-</sup>) de resíduos de glucuronatos, no entanto a banda de absorção mais próxima detectada no espectro de RAMAN para a fração F2M foi de 1587 cm<sup>-1</sup>. Em contrapartida, pela análise do espectro de infravermelho (Figura 24), foi possível identificar a presença de carboxilas (COO<sup>-</sup>) na fração F2M obtida do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis*.

Para as demais bandas de absorção detectadas entre 655 e 476 cm<sup>-1</sup> não foram encontrados dados na literatura sobre a atribuição dessas bandas a polissacarídeos.

Para a fração F2M de vísceras do camarão *F. brasiliensis*, a técnica espectroscópica RAMAN não foi tão eficiente, provavelmente devido a coloração escura dessa amostra, que interfere no espalhamento de luz necessário a análise. Apesar disso, foi possível ainda realizar a detecção de bandas coerentes com os resultados anteriores.

**Figura 25 – Espectro RAMAN da fração F2M obtida do cefalotórax de *F. brasiliensis*.**



Fonte: elaborado pela própria autora.

**Tabela 3: Atribuições das bandas RAMAN**

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições
1587	<b>COO<sup>-</sup></b> (BANSIL <i>et al.</i> , 1978)
1072	<b>Estiramento C-O-H</b> (KACURAKOVA, MATHLOUTHI, 1996) e <b>Estiramento SO<sub>4</sub></b> (BANSIL <i>et al.</i> , 1978)

Fonte: elaborado pela própria autora.

## 6.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 6.2.1 Atividade anticoagulante *in vitro*

#### a) Método USP (1965)

A atividade anticoagulante da fração F2M obtida do camarão *F.brasiliensis* foi inicialmente explorada pelo método USP (1965), que avalia visualmente o retardo na formação do coágulo formado em plasma e pode ser considerado um método qualitativo de caráter indicativo e sugestivo para atividade anticoagulante.

Conforme pode ser verificado pela análise da Tabela 4, a atividade anticoagulante foi determinada em triplicata em presença de 27,5 µg da fração F2M, como controle positivo utilizou-se a heparina 165 UI (1,5 µg) e como controle negativo o plasma na ausência de amostra (fração F2M).

**Tabela 4 – Atividade anticoagulante – USP (1965)**

Amostras	Massa (µg)	Triplicata		
		A	B	C
Plasma	-	-	-	-
Heparina	0,5	+	+	+
	0,7	++	++	++
	1,0	++	++	++
	1,5	++	+++	+++
	1,8	+++	+++	+++
	2,0	+++	+++	+++
	2,2	+++	+++	+++
Fração F2M	27,5	++	+++	++

Fonte: elaborado pela própria autora.

De acordo com a tabela 4, a heparina, promove a retração total do coágulo a partir de 1,5 µg de massa, a partir da qual se observa um platô para sua ação anticoagulante. Sendo, portanto, considerado o melhor ponto de atuação da mesma, para tanto os demais experimentos foram executados tomando como base atividade da heparina em 1,5 µg.

A fração F2M obtida do cefalotórax do camarão *F.brasiliensis* com a massa de 27,5 µg, foi capaz de retrain a formação do coágulo como a heparina na concentração. Este resultado é um indicativo preliminar que sugere uma possível atividade anticoagulante exercida pela fração F2M.

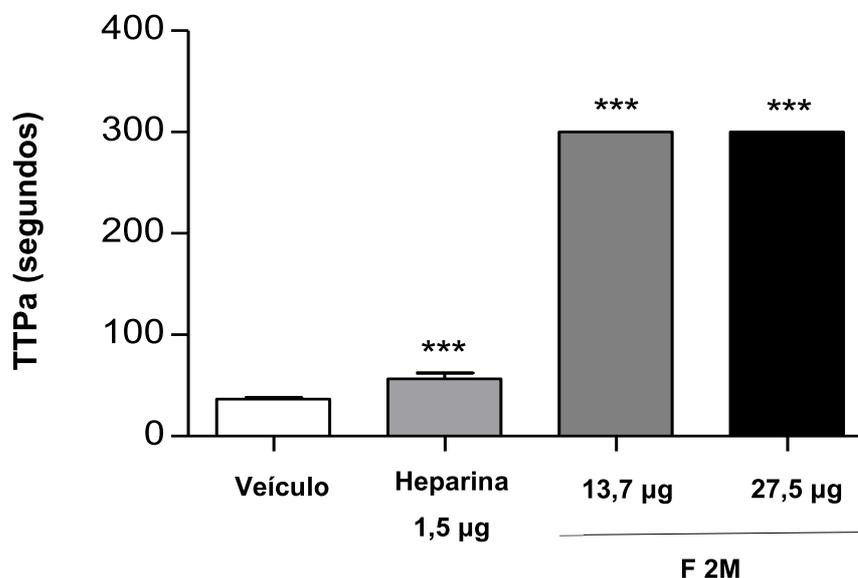
#### **b) Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e fibrinogênio**

Os testes de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de fibrinogênio foram realizados afim de investigar a atuação da fração F2M obtida do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis* sobre os fatores envolvidos no processo de coagulação. TTPa e tempo de fibrinogênio fazem parte de uma série de testes que são utilizados na prática clínica com o objetivo de avaliar as serino proteases que participam da homeostasia secundária. Para tanto, estes testes foram realizados como descrito em Métodos no tópico 4.2.7.1.

O efeito da fração F2M obtida de cefalotórax de camarão *F. brasiliensis* sobre o TTPa está apresentado na Figura 26. Podemos observar que a fração F2M em ambas as concentrações 27,5 e 55 µg/mL, prolongou de maneira significativa (cerca de 1,5 e 8 vezes, respectivamente) ( $p < 0,0001$ ) o tempo de formação do coágulo em relação ao controle negativo (plasma). A heparina (1,5 µg/mL), como previsto, prolongou o tempo de formação do coágulo em mais de 8 vezes em relação ao controle negativo (plasma), prolongando em mais de 300 segundos o tempo de formação do coágulo.

Retomando o tópico 2.2, sabe-se que o TTPa é o tempo de formação do coágulo a partir da ativação do fator XII, por meio de cargas negativas, e ativação subsequentemente dos fatores XI, IX, X, V e II (protrombina).

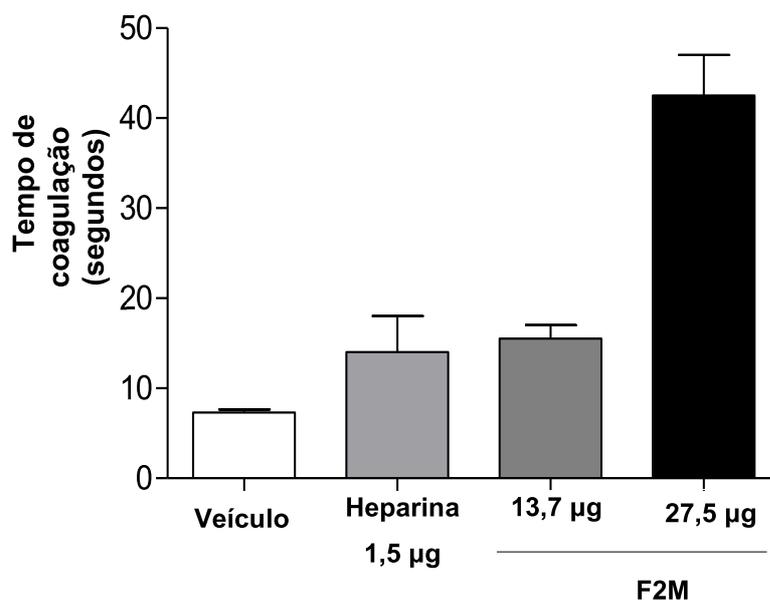
**Figura 26 – Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) da fração F2M de *F. brasiliensis***



**NOTA:** F2M, glicosaminoglicano do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis*. As análises foram obtidas por one-way ANOVA seguida de Bonferroni, n=3 \*\*\* p<0,005 vs veículo (controle -).  
Fonte: elaborado pela própria autora.

O resultado referente ao tempo de fibrinogênio encontra-se na Figura 27. Analisando-a, notamos que a fração F2M não prolongou, nas concentrações testadas (27,5 e 55 µg/mL), de maneira significativa, o tempo de formação do coágulo em relação ao controle negativo (plasma). A heparina, controle positivo, na concentração de 1,5 µg/mL, aumentou cerca de 6 vezes o tempo de coagulação em relação ao controle negativo (p<0,001).

**Figura 27 – Tempo de fibrinogênio da fração F2M**



**NOTA:** F2M, glicosaminoglicano do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis*. As análises foram obtidas por one-way ANOVA seguida de Bonferroni, n=3. \*\* p<0,005 vs veículo (controle -).  
Fonte: elaborado pela própria autora.

Sabe-se que via intrínseca é iniciada pela ativação de contato do fator XII numa reação envolvendo a ativação subsequente de diversas serino proteases culminando na protrombina (II) (WU *et al.*, 2010).

Considerando os resultados obtidos nos testes TTPa e fibrinogênio, sugerimos que a fração F2M obtida a partir do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis* apresenta atividade anticoagulante por prolongar o tempo de coagulação em mais de 2,5 vezes em relação ao controle negativo (plasma) e, que essa ação esteja relacionada com a inibição, de pelo menos uma, das serino proteases envolvidas na via intrínseca do processo de coagulação. Além disso, pode-se notar que a fração F2M apresenta um efeito anticoagulante dose dependente, com maior prolongamento do tempo de formação do coágulo quanto maior a dose testada.

Além disso, as análises químicas e espectrocópicas, já apresentadas neste estudo, evidenciaram a presença de elevada densidade aniônica no HS presente na fração F2M, em virtude dos grupamentos  $\text{SO}_3^-$  e  $\text{CCO}^-$ . Sabe-se que as atividades biológicas desempenhadas pelos GAGs, dentre elas, a atividade anticoagulante, está relacionada com o grau e distribuição de cargas negativas nesses compostos (POMIN, 2014).

Portanto, sugerimos que o efeito anticoagulante observado para fração F2M também está intimamente relacionado com sua composição química.

Brito e colaboradores (2014) demonstraram que o composto híbrido de HS/heparina, na concentração de 10 µg/mL, prolongou o TTPa em tempo similar a heparina suína, o que está em consonância com o prolongamento encontrado para fração F2M sugerindo sua ação inibitória em algum dos fatores envolvidos na via intrínseca da coagulação.

Kritchen e colaboradores (2017) demonstram atividade nos fatores envolvidos no processo de coagulação de GAGs obtidos a partir da pele dos peixes *B. capriscuse* e *M. mustelus*. Os GAGs oriundos de ambas as espécies prolongaram cerca de 1.66 e 1.24 vezes, respectivamente, o TTPa em relação ao controle negativo na concentração de 100 µg/mL. Os GAGs provenientes das duas espécies também prolongaram o tempo de coagulação do tempo de fibrinogênio, porém na concentração de 500 µg/mL.

Dietrich e colaboradores (1999) relataram que o GAG extraído da mesma espécie de trabalho deste estudo (*F. brasiliensis*) também prolongou de maneira significativa o TTPa (<300 segundos) na concentração de 50 µg/mL em relação ao controle negativo, e foi observado prolongamento significativo no tempo de fibrinogênio (<300 segundos) em concentração superior (100 µg/mL), fundamentando os resultados encontrados para fração F2M obtida neste estudo.

Até o momento não foi realizado o tempo de fibrinogênio em concentrações superiores a 55 µg/mL, no entanto sugere-se que a fração F2M obtida do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis* possa prolongar, de forma significativa, o tempo de coagulação envolvendo os fatores avaliados por esse teste, em concentrações maiores do que as já testadas.

Além disso, estudos demonstraram que existem vias alternativas de manutenção do coágulo, não dependente de trombina (FIIa).

Portanto, sugerimos que a fração F2M obtida do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis* apresenta atividade inibitória em algum dos fatores envolvidos na via intrínseca do processo de coagulação, e que essa atividade está relacionada tanto com a composição química quanto a dose.

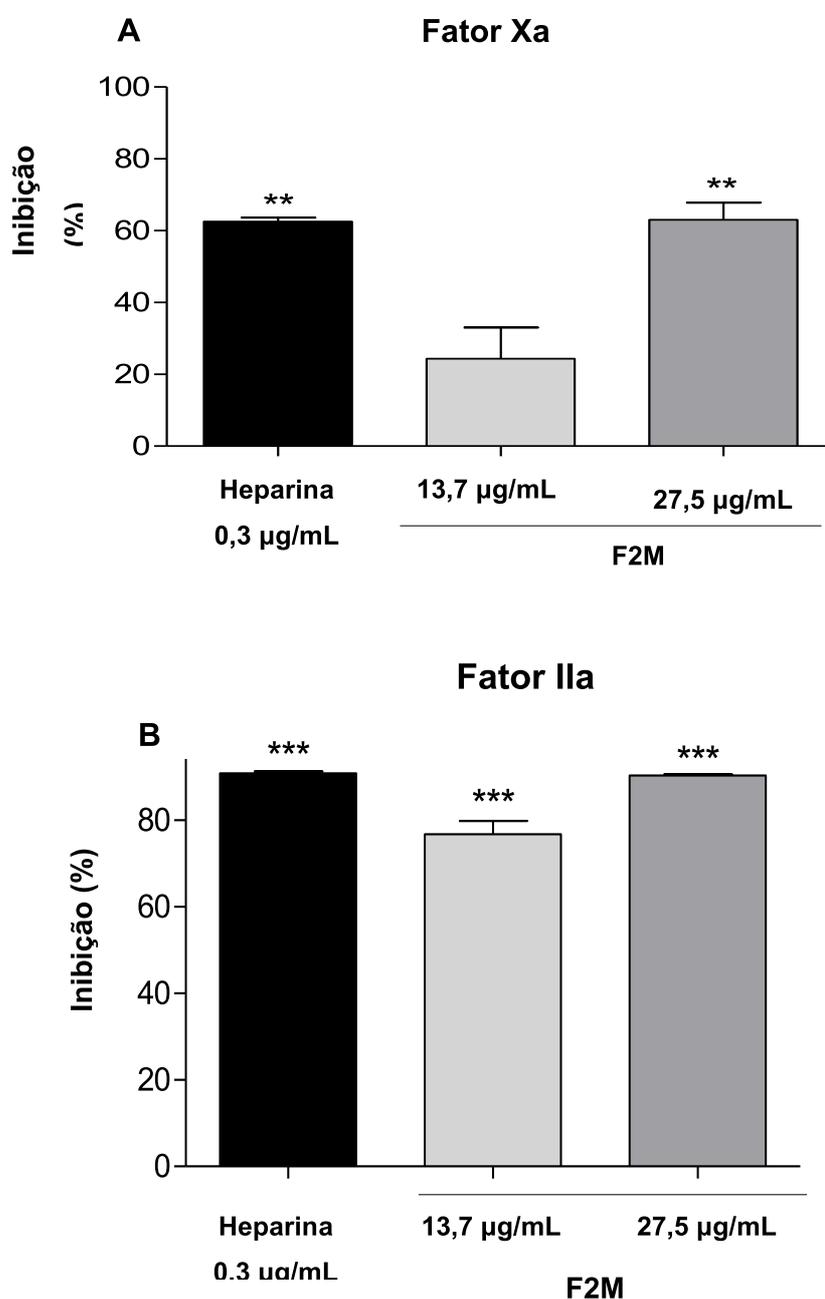
### C) Ensaios cromogênicos (FXa e FIIa)

Considerando os resultados preliminares obtidos com as análises anteriores e, com o objetivo que aprofundar a investigação sobre a papel da fração F2M frente a inibição dos fatores envolvidas na cascata de coagulação, foram realizados os testes cromogênicos FXa e FIIa. Estes são fatores fundamentais na cascata da coagulação, envolvidas na formação do coágulo de fibrina a partir de fibrinogênio (MACKMAN, 2008), a avaliação da inibição destes pela fração F2M é importante no entendimento de seu mecanismo anticoagulante. O resultado encontra-se na Figura 28.

Analisando a Figura 28–A, observa-se que a fração F2M na maior concentração (27,5 µg/mL) foi capaz de inibir significativamente a atividade do fator Xa em 64% em relação ao controle negativo (plasma) ( $p < 0,001$ ). E, além disso, observa-se na Figura 28-B, que a fração F2M inibiu significativamente a atividade do fator IIa (trombina) em ambas as concentrações, 13,7 µg/mL e 27,5 µg/mL, inibindo 77% e 90%, respectivamente ( $p < 0,0001$ ).

A heparina na concentração de 0,3 µg/mL inibiu de forma significativa a atividade do fator IIa em cerca de 91% ( $p < 0,0001$ ), e a atividade do fator Xa aproximadamente em 63% ( $p < 0,001$ ).

**Figura 28 – Inibição dos fatores Xa e IIa pela fração F2M obtida do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis*.**



**NOTA:** (A) Porcentagem de inibição do Fator Xa. (B) Porcentagem de inibição do Fator IIa (trombina). Os resultados foram expressos como a percentagem de inibição das respectivas proteases (FXa e FIIa), em relação ao branco de cada um dos fatores. O branco não está descrito no gráfico uma vez que a inibição foi de zero. As análises foram obtidas por one-way ANOVA seguida de Bonferroni, n=3. \*\* p<0,001, \*\*\* p<0,0001. Fonte: elaborado pela própria autora.

O fator Xa, conhecido por ser o ponto de convergência entre as duas vias (intrínseca e extrínseca) no antigo modelo de “cascata de coagulação, apresenta papel importante neste processo. O FXa juntamente com o FVa forma o complexo prototrombinase, responsável por ativar a protrombina em trombina, que catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina. O fator IIa (trombina), é a serino protease envolvida diretamente na conversão de fibrinogênio em fibrina (VERSTEEG *et al*, 2013).

Portanto, estes resultados sugerem que a fração F2M, atua sobre estes fatores envolvidos no processo de coagulação, com maior especificidade pelo IIa, uma vez que na mesma concentração (27,5 µg/mL), a fração F2M foi capaz de inibir cerca de 30% a mais o FIIa em relação ao FXa. Resultados semelhantes também foram encontrados por Brito e colaboradores (2014) e Dietrich e colaboradores (1999). Sugerimos que a fração F2M exerça sua atividade anticoagulante através da inibição dos fatores Xa e IIa, o que justifica o prolongamento no tempo de tromboplastina parcial ativada, uma vez que os fatores Xa e IIa fazem parte da via intrínseca do processo de coagulação sanguínea. No entanto, não se pode afirmar se essa inibição ocorre via antitrombina ou diretamente sobre estes fatores ativados, uma vez que a heparina exerce ação anticoagulante por ambos os mecanismos. Para tanto, novos testes precisam ser realizados.

### **6.2.2. Teste de redução do MTT**

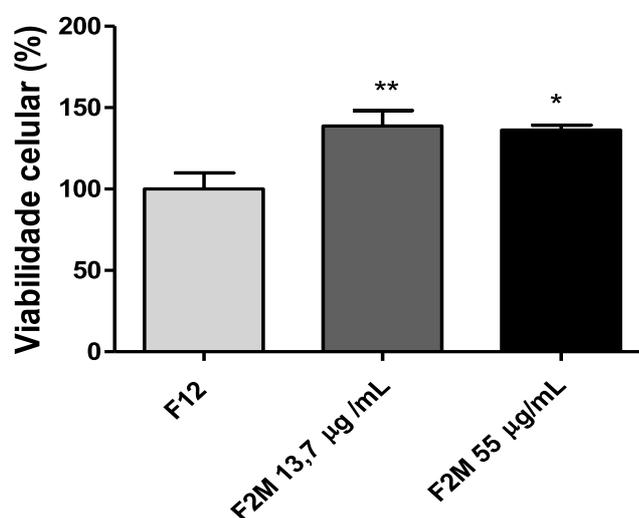
Com bases nos resultados preliminares encontrados *in vitro*, e com a intenção de investigar a atividade antitrombótica *in vivo* da fração F2M obtida das vísceras do camarão *F. brasiliensis*, o trabalho teve como prosseguimento avaliar o possível efeito citotóxico da fração F2M em células endoteliais de aorta de coelho.

O teste escolhido para tal análise foi o ensaio colorimétrico de redução do MTT proposto por Mosmann (1983). Este teste permite quantificar o número células viáveis por meio da atividade mitocondrial destas e inferir sobre a capacidade de compostos alterarem a viabilidade de linhagens celulares. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), tem a capacidade de permear as membranas celulares e ser reduzido a cristais, parcialmente solúveis de formazan. No entanto, apenas células metabolicamente ativas são capazes de reduzir o MTT, uma vez que essa reação depende diretamente da ação de desidrogenases mitocondriais. Desta forma, a metabolização do MTT em cristais de formazan é proporcional à atividade mitocondrial e, por conseqüentemente, à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Foi avaliado se a fração F2M nas concentrações de 13,7 e 27,5 $\mu$ g/mL, as quais demonstraram melhor resposta nos testes *in vitro* realizados, após 24 horas de incubação seria capaz de reduzir a capacidade de metabolização do MTT por células endoteliais de aorta de coelho. Sendo possível inferir sobre a citotoxicidade da fração F2M.

A Figura 29 mostra que após 24 horas de incubação, a fração F2M oriunda das vísceras do camarão *F.brasiliensis* parece não ter reduzido a capacidade mitocondrial de metabolização do MTT em nenhuma das concentrações testadas; o que pode indicar ausência ou baixa citotoxicidade da fração F2M às células endoteliais de aorta de Coelho. No entanto foi possível observar um aumento da viabilidade desta linhagem de células e ambas as concentrações analisadas, isso pode indicar proliferação celular ou aumento da atividade mitocondrial. Apesar do resultado, acreditamos que as concentrações testadas (13,7 e 27,5 $\mu$ g/mL) poderiam ser consideradas seguras para o prosseguimento das atividades em cultura de células e, para testes *in vivo*.

**Figura 29 – Viabilidade celular de células endoteliais de aorta de coelho (RAEC) após estímulo com F2M.**



**NOTA:** Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle. Como controle foi utilizado células cultivadas somente em meio F12. 10.000 células/poço. Os resultados foram expressos como +/-DP, n=6. \*p<0,05, \*\*p<0,01. Fonte: elaborado pela própria autora.

### 6.2.3 Síntese de PGHS por células de aorta de coelho após estímulo com F2M do camarão *F.brasiliensis*.

As células endoteliais dos vasos sanguíneos apresentam o PGHS que tem a capacidade de potencializar a inibição da trombinha e fator Xa por meio do aumento da interação da AT com estas serino proteases. A heparina é capaz de estimular a síntese deste PG peculiar nas células endoteliais de aorta de coelho (RAEC). Acredita-se que o efeito inibitório da heparina nas serino proteases envolvidas no processo de coagulação esteja parcialmente relacionado com tal indução (TRINDADE *et al.*, 2008; BOUÇAS *et al.*, 2012).

Para avaliar se a fração F2M também apresenta a capacidade de estimular a síntese de PGHS presente no endotélio vascular, foi realizado o ensaio utilizando marcação metabólica por sulfato radioativo em células endoteliais conforme descrito em Material e Métodos 4.2.7.3.

As células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), no estado de subconfluência (80% da confluência) foram estimuladas ou não (controle) com diferentes concentrações de F2M (13,7 e 27,5 µg/mL) em presença de 150 µCi/mL de [<sup>35</sup>S]-sulfato de sódio. Após 24 horas de incubação com a fração F2M, o PGHS sintetizado e liberado para o meio pelas células endoteliais foi quantificado.

De acordo com a Figura 30, nota-se que em ambas as concentrações (13,7 e 27,5 µg/mL) houve aumento significativo na síntese de PGHS em relação à célula não estimulada (\*\*\* p <0,001, \*\* p <0,01, respectivamente). A fração F2M na concentração de 13,7 µg/mL aumentou cerca de 5 vezes, em relação ao basal, a síntese de PGHS secretado para o meio. Com o aumento da concentração para 27,5 µg/mL da fração F2M, foi observado um aumento de cerca de 12 vezes na síntese de PGHS secretado para o meio. Sugerindo que a fração F2M estimule a síntese de PGHS em células endoteliais de aorta de coelho de maneira dose dependente.

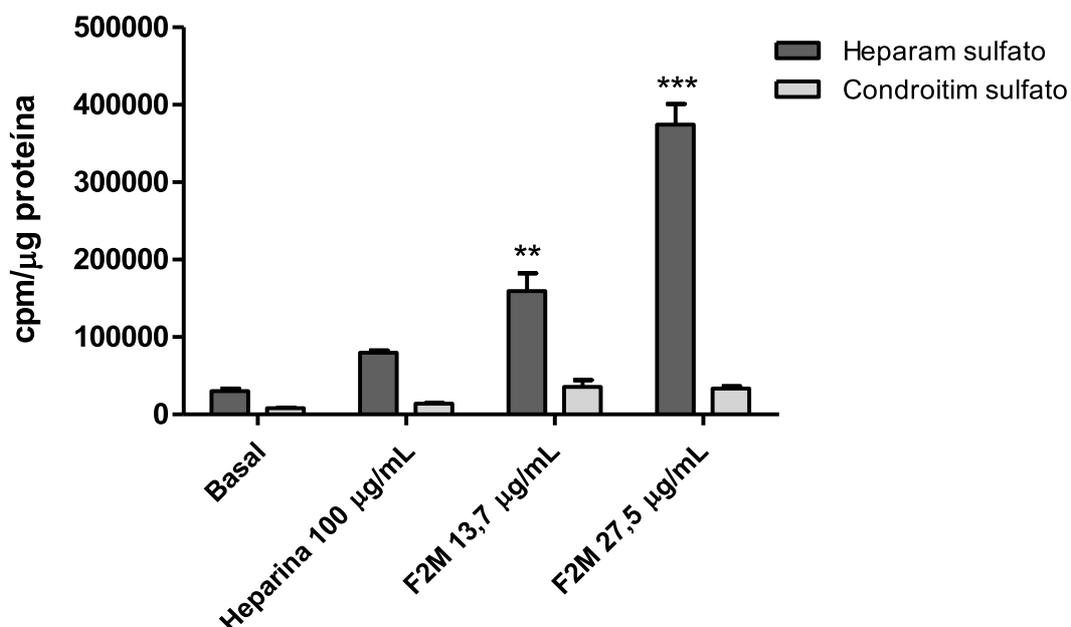
Nenhum relato na literatura foi encontrado sobre o estímulo na síntese de PGHS antitrombótico em RAEC por HS obtido a partir da espécie de camarão *F. brasiliensis*. Entretanto, Brito e colaboradores (2018) encontraram resultado similar para o composto híbrido do camarão *L.vannamei*, este também foi capaz de estimular a síntese do PGHS em RAEC nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL.

Como descrito por Nader e colaboradores (1991), as células endoteliais de aorta de coelho expressam em sua superfície o PGHS e, como foi sugerido por Colburn e

Buonassisi (1982) e Nader e colaboradores (2001), este PGHS apresentam atividades antitrombótica por aumentar a afinidade da AT aos fatores envolvidos no processo de coagulação. Além disso, foi evidenciado que tanto a heparina quanto compostos semelhantes à heparina são capazes de estimular a síntese do PGHS em células endoteliais de aorta de coelho (NADER *et al* 2001). Portanto, considerando os estudos previamente citados, pode-se sugerir que a fração F2M pode apresentar atividade antitrombótica indireta por regular positivamente a síntese do PGHS antitrombótico em células endoteliais de aorta de coelho.

Esse aumento significativo na produção de PGHS em RAEC sob estímulo da fração F2M sugere que esta fração pode apresentar um efeito antitrombótico indireto, uma vez que esta atividade já é caracterizada para este PGHS de célula endotelial de aorta de coelho (NADER *et al.*, 1991; NADER *et al.*, 2001). No entanto, assim como a heparina pode estimular a síntese e induzir mudanças estruturais (padrão de sulfatação, por exemplo) das cadeias de GAGs neste PG, podemos sugerir que a fração F2M pode levar a este tipo de alteração, intensificando a atividade antitrombótica.

**Figura 30 – Produção de PGHS por células endoteliais de aorta de coelho estimuladas com fração F2M.**



**NOTA:** \*p,0,05 e \*\*\* z. As análises foram feitas por one-way ANOVA seguida de Bonferroni, n=6 . Fonte: elaborado pela própria autora.

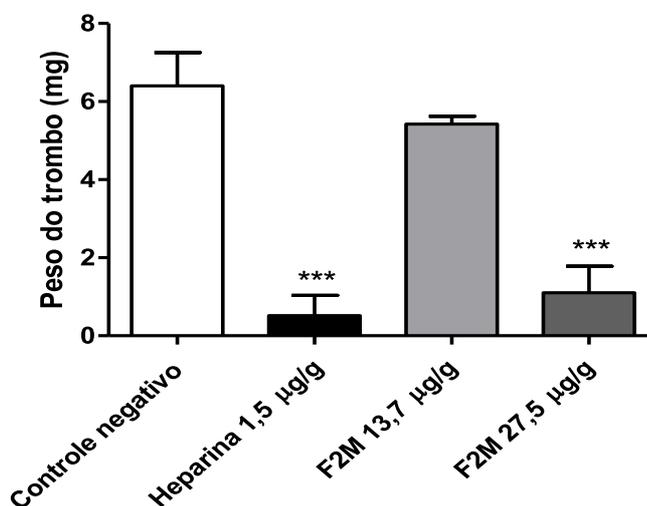
### 6.2.4 Atividade antitrombótica *in vivo*

A atividade antitrombótica, conforme descrito em material e métodos, foi avaliada em ratos machos *Wistar* pesando entre 200 – 260g, com 75 dias de idade, em modelo de trombose induzida por ligadura da veia cava inferior. O resultado encontrado está na Figura 31.

O efeito da fração foi avaliado 1 hora após administração venosa (veia caudal) da fração F2M na dose de 13,75  $\mu\text{g/g}$  e 27,5  $\mu\text{g/g}$ . Conforme pode ser verificado pela análise da figura 30, a fração F2M na dose de 27,5 $\mu\text{g/g}$  foi capaz de reduzir de forma significativa ( $p<0,05$ ) em 81,7% o peso dos trombos formados por ligadura da veia cava inferior, em relação ao controle negativo.

A heparina, utilizada como controle positivo, na concentração de 1,5  $\mu\text{g/g}$ , após uma hora de administração, como já era esperado em virtude da sua atividade anticoagulante/antitrombótica, reduziu, significativamente, o peso dos trombos em cerca de 91,3% ( $p<0,05$ ), em relação ao controle negativo.

**Figura 31 – Atividade antitrombótica *in vivo* da fração F2M obtida do camarão *F.brasiliensis*.**



**NOTA:** As amostras na concentração de 13,7  $\mu\text{g/g}$  e 27,5  $\mu\text{g/g}$  foram avaliadas após 1 hora de exposição. Como controle positivo foi utilizada a heparina 165 UI (1,5  $\mu\text{g/g}$ ) após 1 hora de administração e como controle negativo animais submetidos a ligadura da veia cava inferior na ausência da aplicação de amostra. F2M: Fração F2M de *F. brasiliensis*; Hep, heparina. \*\*\* $p<0,05$  em relação ao controle negativo. As análises foram feitas por one-way ANOVA seguida de Newman-Keuls,  $n=5$ . Fonte: elaborado pela própria autora.

Esse resultado está em consonância com os resultados anteriormente encontrados *in vitro*. A concentração relativa a 27,5 µg/mL da fração F2M demonstrou atividade anticoagulante tanto no Tempo de Tromboplastina parcial ativada, quanto no estímulo na síntese de PGHS antitrombótico em RAEC.

Não há relatos na literatura de avaliação da atividade antitrombótica *in vivo*, pelo modelo de trombose induzida pela ligadura da veia cava, para HS obtido do camarão *F. brasiliensis*. No entanto, esta foi avaliada pelo modelo de trombose induzida por laser, o qual indicou atividade antitrombótica para o GAG isolado do camarão *F. brasiliensis* (DIETRICH *et al.*, 1999).

O modelo de indução de trombose por ligadura da veia cava inferior, pode contribuir para a ativação por contato da via intrínseca da coagulação, por meio da exposição de superfícies carregadas negativamente quando a ligadura da veia cava é realizada. Os fatores FXII e FXI podem ser ativados e desencadeiam a cascata de coagulação. Existem diversos modelos *in vivo* utilizados para reproduzir tanto trombose arterial quanto venosa. Além disso, Zhou e colaboradores demonstraram que o modelo de ligadura da veia cava inferior induz rapidamente a expressão de TF e P-selectina na membrana de células endoteliais e, evidenciaram que 60 minutos foi suficiente para a formação de trombos compostos por fibrina, plaquetas e leucócitos. Dessa maneira, podemos sugerir que o modelo utilizado é eficiente para mimetizar eventos de trombose venosa profunda (ZHOU, J *et al.*, 2009)

Levando em consideração o resultado obtido no ensaio TTPa, que avalia a via intrínseca da coagulação (FXII, FXI, FIX, FX, FV, FII e FIIa), sugere-se que a atividade antitrombótica observada para a fração F2M obtida a partir do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis* pode estar relacionada com a inibição de, pelo menos uma, serino protease da via intrínseca da coagulação.

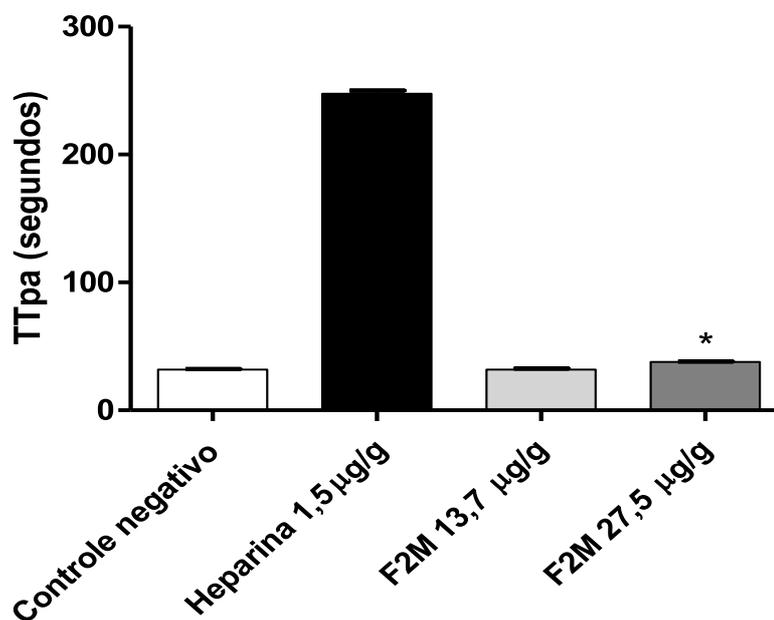
A heparina, como mencionado anteriormente no item 2.5, potencializa a inibição de serino proteases envolvidas no processo de coagulação por interação via antitrombina. Além disso, a heparina promove o aumento da síntese de proteoglicano de heparan sulfato, que apresenta sequência pentassacarídica específica, responsável também por potencializar o efeito inibitório da antitrombina mediante os fatores envolvidos na cascata de coagulação. Estes, portanto, são os meios mais comumente discutidos e apontados para a atividade anticoagulante e antitrombótica da heparina. (COLBURN, BUONASSISI, 1982; NADER *et al.*, 2004; CASU, NAGGI; TORRI, 2010; MEDEIROS *et al.*, 2012).

O resultado encontrado para atividade antitrombótica *in vivo* ratifica os resultados encontrados *in vitro*, demonstrando que a fração F2M obtida do cefalotórax do camarão *F. brasiliensis* apresenta atividade antitrombótica, avaliada em modelo *in vivo*, e atividade anticoagulante, demonstrada *in vitro*.

#### 6.2.5. Tempo de tromboplastina parcial ativada no plasma dos ratos

O tempo de tromboplastina parcial ativado foi avaliado no plasma dos animais submetidos ao modelo de trombose induzida pela ligadura da veia cava. O principal objetivo desse experimento foi observar a ativação dos fatores envolvidos na cascata de coagulação (XIIa, XIa, IXa, VIIIa, Xa, Va, IIa, fibrinogênio e fibrina) e correlacionar com a atividade antitrombótica observada *in vivo*. O resultado encontra-se na Figura 32.

**Figura 32 – Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) no plasma de ratos**



**NOTA:** F2M: Fração 2M de *F. brasiliensis*. \* $p < 0,05$  em relação ao controle negativo. As análises foram feitas por one-way ANOVA,  $n=3$ . **Fonte:** elaborado pela própria autora.

De acordo com o gráfico acima podemos observar que não houve um prolongamento significativo do TTPa no plasma coletado dos animais tratados com a fração F2M, em

nenhuma das concentrações testadas, em relação àqueles animais não tratados (nos quais foram injetados apenas solução salina NaCl 0.9%).

O TTPa medido no plasma dos animais não se mostrou alterado em relação ao controle negativo (branco), sugerindo que *in vivo* a ação antitrombótica da fração F2M esteja ocorrendo decorrente de outros mecanismos responsáveis pela hemostase: plaquetas, produção pelo endotélio de óxido nítrico, trombomodulina e trombospondina.

Com base nesses resultados sugerimos que a atividade antitrombótica exercida pela fração F2M pode não ser consequência de sua atividade anticoagulante, ou seja, a atividade antitrombótica pode estar relacionada com outros fatores além da inibição das serino proteases envolvidas na cascata de coagulação

Zhigang e colaboradores demonstraram que a atividade antitrombótica, a qual foi avaliada *in vivo*, do polissacarídeo sulfatado obtido da *Laminaria japonica* estava associada a inibição da agregação plaquetária, indução de óxido nítrico por meio da ativação da eNos e inibição de TXA<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> (XU, Z *et al.*, 2020).

Assim como a fração F2M, o polissacarídeo avaliado por esse grupo, também exerceu atividade inibitória sobre os fatores envolvidos na cascata de coagulação. Portanto sugerimos que possivelmente a atividade antitrombótica da fração F2M possa estar relacionada a outros mecanismos, tais como influência sobre a produção endógena de óxido nítrico.

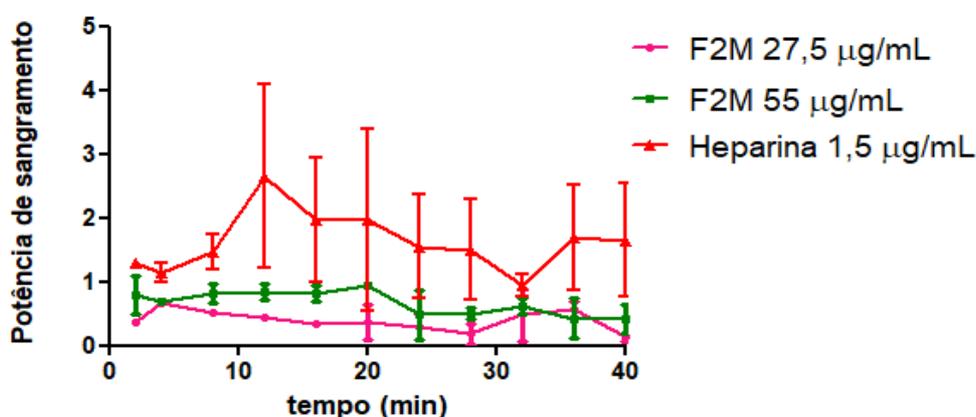
Medeiros e colaboradores (2012) demonstraram que o aumento intracelular de Ca<sup>+2</sup>, consequente ativação da eNOS e síntese do HSPG estão relacionados à ativação de fosfolipase C (PCL $\gamma$ ). Sendo que essa pode ser ativada por heparina, levando a produção de IP<sub>3</sub>, que se liga a receptores no retículo endoplasmático, resultando na liberação de Ca<sup>+2</sup>. Esse aumento desencadeia a ativação da eNOs, por meio de calmodulina, culminando no aumento da produção de NO.

Resultados encontrados anteriormente em nosso grupo demonstraram que polissacarídeos sulfatados da alga verde *Ulva lactuca* foram capazes estimular a produção óxido nítrico em células endoteliais de aorta de coelho (ANDRADE, R.G.C, 2019). E assim como o GAG do presente trabalho, este polissacarídeo apresenta atividade antitrombótica indireta ao estimular a síntese e expressão de PGHS nesta mesma linhagem de células.

### 6.2.6 Atividade hemorrágica *in vivo*

A atividade hemorrágica foi determinada, utilizando o método de CRUZ e Dietrich (1967), com algumas modificações, seguindo o modelo experimental exposto em MÉTODOS 4.3.1.5. A Figura 33 mostra o resultado desse teste.

**Figura 33 – Atividade hemorrágica *in vivo* da fração F2M obtida do camarão *F.brasiliensis***



**NOTA:** F2M: Fração 2M *F. brasiliensis*, n=5. Fonte: Elaborado pela própria autora.

Este modelo permite a avaliação da hemostasia a nível microvascular, e, portanto, sugerimos que a Fração F2M não impede o restabelecimento da hemostasia por meio da vasoconstrição local. De com o resultado acima (Figura 33), a fração F2M, em nenhuma das concentrações, apresentou efeito hemorrágico residual comparado a heparina. Sugere-se que esse resultado está associado às diferenças estruturais encontradas entre a heparina utilizada neste estudo e o GAG presente na fração F2M.

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados e discutidos neste trabalho, concluímos que:

- Pelo perfil de migração eletroforético (PDA e Ba/PDA), degradação enzimática e dosagens químicas, sugerimos que o GAG presente na F2M obtido de cefalotórax do camarão *F.brasiliensis* seja um heparan sulfato, no entanto apresenta distinção estrutural, quanto ao grau de sulfatação e composição dissacarídica dos heparan sulfato encontrados em tecido de animais terrestre.
- As análises espectroscópicas (IR-TFe RAMAN), sugerem a presença de GAG na fração F2M, uma vez que foi possível identificar bandas de absorção relativas vibrações de ligações comumente encontradas nestes compostos, como: O-H, COO<sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>.
- Pelos testes *in vitro* (USP 1965, TTPa, Tempo de Fibrinogênio) sugerimos que a fração F2M obtida do cefalotórax do camarão *F.brasiliensis* apresenta atividade anticoagulante, e que esta ação esta associada a inibição de, pelo menos uma, serino protease da via intrínseca da cascata de coagulação. Sugerimos também que esta ação seja proporcional a dose, e é justificada pela composição química do HS presente na fração F2M.
- Os testes cromogênicos demonstraram que a fração F2M inibe os fatores Xa e IIa, na concentração de 27 µg/mL.
- F2M obtida do cefalotórax de camarão *F.brasiliensis* apresentou atividade antitrombótica na concentração de 27 µg/mL, ao reduzir cerca de 80% o peso do trombo formado em relação ao controle negativo. E nesta mesma concentração, a fração F2M estimulou a síntese de PGHS em RACE, o que pode estar relacionada, de maneira indireta, com o mecanismo de atividade antitrombótica.
- Sugere-se que a atividade antitrombótica da fração F2M esteja relacionada não somente com a inibição de fatores envolvidos na cascata de coagulação, mas também com a interação fração F2M-endotélio e fração F2M-plaquetas.
- A fração F2M não apresenta um efeito hemorrágico a nível microvascular. Considerando a atividade antitrombótica, sugere se que para esse fim a fração F2M não apresenta o efeito hemorrágico como o causado pela Heparina, portanto sugerimos que a fração F2M é para testes posteriores para melhor entendimento e elucidação de sua atividade antitrombótica.

**REFERÊNCIAS**

AFRATIS, N. *et al.* Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. **FEBS J**, v. 279, p. 1177–1197, 2012.

ANDERSON, D.R. *et al.* American Society of Hematology 2019 guidelines for management of venous thromboembolism: prevention of venous Thromboembolism in surgical hospitalized patients. **Blood Advances**, v. 3, p. 3898 – 3944, 2019.

ANDRADE, R.G.C. **Efeito do polissacarídeo sulfatado da alga verde *Ulva lactuca* L. sobre a sinalização celular da síntese do heparam sulfato antitrombótico produzido por linhagem endotelial.** 2019. 130 f. Tese (Mestrado acadêmico) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019

BACH, M. E. *et al.*, 2019. Store-operated calcium entry in thrombosis and thromboinflammation. **Cell Calcium**, v. 77, p. 39-48, 2019.

BIANCHINI, P. *et al.* Fractionation and identification of heparin and other acidic mucopolysaccharides by a new discontinuous electrophoretic method. **Journal of Chromatography A**, v. 196, p. 455–462, 1980.

BOUÇAS, R. L. *et al.* Heparin and heparin derivatives and their effect on hemostasis. **Transworld Research Network; Verli, H, Ed.; Insights Into Carbohydrate Structure And Biological Function.**, Kerala, Índia, p.145-159, 2006.

BOUÇAS, R.L. *et al.* Novas drogas antitrombóticas: comparação das atividades anticoagulante, antitrombótica e hemorrágica. **Science in health**, v. 3, n. 2, p. 104-108, 2012.

BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, 248-254, 1976.

BRITO, A.S., *et al.* A non-hemorrhagic hybrid heparina/heparan sulfate with anticoagulant potential. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 372-378, 2014.

BRITO, A.S., *et al* Anti-IIa activity and antitumor properties of a hybrid heparin/heparan sulfate compound from *Litopenaus vannamei* shrimp. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.

BRITO, A.S., *et al* Anti-inflammatory properties of a heparina-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from marine shrimp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p. 9588-9595, 2008.

CHAPIN, J, C e HAJJAR,K. A Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Reviews**, v. 29, p. 17-24, 2015.

CHAVANTE, S. F. *et al.* A novel heparan sulfate with high degree of *N*-sulphation and high heparina cofactor-II activity from the brine shrimp *Artemia franciscana*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 49-57, 2000.

COLBURN, P.; BUONASSISI, V. Anti-clotting activity of endothelial cell cultures and heparan sulfate proteoglycans. **Biochemical And Biophysical Research Communication**, California, San Diego, v. 104, n. 1, p. 220-227, 1982.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DIETRICH, C.P, *et al* Cell Recognition and adhesiveness. A possible biological role for the sulfated mucopolysaccharides. **Biochem. Biophys. Res. Comm**, v. 75, p. 329-336, 1977.

DIETRICH, C.P, *et al* Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin. **Biochem. Biophys. Res. Commun** v. 111. p. 865-871, 1983

DIETRICH, C.P, *et al* Structural features and anticoagulant activities of novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1428, p. 273-283, 1999.

DIETRICH, C.P. *et al* A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz.J. Med. Biol. Res**, v. 17, p. 5-15, 1984.

DIETRICH, C.P. *et al.* Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 843, p. 1-7, 1985.

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and nonenzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 78, n. 2, 312-319, 1961.

DREYFUSS, J. L. *et al.* A heparin mimetic isolated from a marine shrimp suppresses neovascularization. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, p. 1828–1837, 2010.

GUERRINI, M., *et al.* Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. **Nat. Biotechnol.**, v.26, p. 669–675, 2008.

GUSMÃO J, LAZOSKI C and SOLÉ-CAVA AM. Population genetic structure of Brazilian shrimp species (*Farfantepenaeus* sp., *F. brasiliensis*, *F. paulensis* and *Litopenaeus schmitti*: Decapoda: Penaeidae). **Genet Mol Biol**, v. 28(1), p. 165-171, 2005.

HADINGHAM, T.E. & FOSANG, A. J. Proteoglycans: many forms and many functions. **FASEB J**, v. 6, p. 861-870, 1992.

JIMÉNEZ, C. Marine Natural Products in Medicinal Chemistry. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v.9, p. 959-961, 2018.

KAČURÁKOVÁ, M.; MATHLOUTHI, M. FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: characterization of the glycosidic bond, **Carbohydrate Research**, v. 2, p.145-157, 1996.

KNELSON, E.H., NEE, J.C., BLOBE, G.C. Heparan sulfate signaling in cancer. **Trends Biochem. Sci**, v. 39, p.277–288, 2014.

KRICHEN, F. *et al.* Extraction, characterization and antimicrobial activity of sulfated polysaccharides from fish skin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 283-289, 2015.

KRICHEN, F. *et al.* In vitro and in vivo anti-coagulant activity and toxicological studies

of marine sulfated glycosaminoglycans. **Exp. Toxicol Pathol**, v. 69, p. 45-53, 2017.

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

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

MEDEIROS, V. P. et al Heparin-integrin interaction in endothelial cells: Downstream signaling and heparan sulfate expression. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 227, n. 6, p.2740-2749, 2012.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MÜLLER, F.; GAILANI, D.; RENNÉ, T. Factor XI and XII as antithrombotic targets. **Current Opinion in Hematology** , v. 18, n. 5, p. 349-355, 2011.

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**, São Paulo, v. 34, p. 699-709, 2001.

NADER, H.B & DIETRICH, C.P. Natural occurrence and possible biological role of heparina. In Heparin: chemical and biological properties. **Eds.D.A. Lane**, p. 81-86, 1989

NADER, H.B. *et al* Effect of heparin and dextran on the synthesis and structure of heparan sulfate from cultured endothelial cells. **Semin. Thromb. Hemost**, v.17, p. 46-56, 1991.

NADER, H.B. *et al* Heparins and heparinoids: Occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Curr Pharm Des**, v. 10, p. 951–966, 2004.

NORTH AMERICAN TROMBOSIS FORUM, 2018. Acesso em 23/03/2020./natfonline.org/patients/what-is-thrombosis/.

OWENS, A. P.; MACKMAN, N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 104, n. 3, p. 432-439, 2010.

PINHAL, M. A. S. et al Antithrombotic agents stimulate the synthesis and modify the sulfation pattern of a heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. **Thrombosis Research**, v. 74, n. 2, p.143-153, 1994.

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. *Farmacologia*. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 804 p.

REIS, S.E., ANDRADE, R.G.C., ACCARDO, C. M., MAIA, L. F., OLIVEIRA, L.F.C., NADER, H. B., AGUIAR, J.A.K MEDEIROS, V.P. Influence of sulfated polysaccharides from *Ulva lactuca* L. upon Xa and IIa coagulation factors and on venous blood clot formation. **Algal Research**, v. 45, 2020.

REYS. M, R, 2019 Chapter 91- Overview of the coagulation system. **Transfusion Medicine and Hemostasis (Third Edition)**, p. 559-564, 2019.

RODRIGUES, E. S. *et al*. *Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, p. 218-233, 2012.

SAMPAIO, L. O. *et al*. Heparins and heparan sulfates. Structure, distribution and protein interactions. **Transworld Research Network.**: Verli, H, Ed.: **Insights into Carbohydrate Structure and Biological Function**, Kerala, India, 2006.

SANTHIYA, D., SUBRAMANIAN, S., NATARAJAN, I., Surface Chemical Studies oh Sphalerite and Galena Using Extracellular Polysaccharides Isolated from *Bacillus polymyxa*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 256, p. 237–248, 2002

SOKOLOVA., *et al* Influence of red algal sulfated polysaccharides on blood coagulation and platelets activation in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 104 A, p. 1431-1438, 2014.

TRINDADE, E. S. *et al* The binding of heparin to the extracellular matrix of endothelial cells up-regulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate proteoglycan. **J Cell Physiol**, v. 217, p.328–337, 2008.

TSAI, C. T., ZULETA, M. M.L., HUNG, S.C. Synthetic heparin and heparan sulfate: probes defining biological functions. **Current opinion in Chemical Biology**, v. 40, p. 152-159, 2017.

USP – The Pharmacopeia of the United States of America. 17ª Revisão. Easton: Mack Printing Company, p. 609-611, 1965.

VALCARCEL, J. *et al* Glycosaminoglycans from marine sources as therapeutic agents. **Biotechnology Advances**, v. 35, p. 711-725, 2017.

VALENTINI, H. *et al* Evolução da pescaria industrial de camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis* e *F. paulensis*) na costa Sudeste e Sul do Brasil – 1968-1989. **Atlântica**, v.34, p. 157-171, 2012.

VERSTEEG, H.H, *et al* New fundamentals in Hemostasis. **Physiological Reviews**, v. 93, p. 327-358, 2013.

WANG, M. *et al* Glycosaminoglycans (GAGS) and GAG mimetics regulate the behavior of stem cell differentiation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p. 175-182, 2017.

WEITZ, J. New anticoagulant strategies. Current status and future potential. **Drugs**, v. 48, n. 4, p. 485-97, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021. Acesso em: 08/05/2022. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

XU, Z. *et al* The Antithrombotic Effects of Low Molecular Weight Fragment from Enzymatically Modified of Laminaria Japonica Polysaccharide. **Medical Science Monitor**, v. 26, p. 221-1 – 221-1, 2020.

**ANEXOS****Anexo I**

  
**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA**

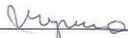
**CERTIFICADO**

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 07/05/2019, analisou o protocolo nº. 014/2019 intitulado "Análise da atividade antitrombótica de carboidratos complexos de matriz extracelular", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Valquíria Pereira de Medeiros e colaboração de Jair Adriano Kopke de Aguiar e Tayná Rodrigues Coelho, a ser realizado no período de 07/07/2019 a 07/07/2021. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 156 ratos Wistar machos de 2 a 3 meses, projeto a ser realizado no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol n. 014/2019 - CEUA about "Análise da atividade antitrombótica de carboidratos complexos de matriz extracelular", under responsibility of Valquíria Pereira de Medeiros and collaboration of Jair Adriano Kopke de Aguiar and Tayná Rodrigues Coelho, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 07/05/2019. For the development of this research 156 males of Wistar rats will be delivered as requested in the period of 07/07/2019 to 07/07/2021. The Project will be performed at Biochemistry Department located at Federal University of Juiz de Fora-MG. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of validity.

Juiz de Fora 21 de maio de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
187 Coordenadora  
CEUA

  
\_\_\_\_\_  
Vice-Coordenadora  
CEUA

## Anexo II



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

**CERTIFICADO**

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/07/2019, analisou o protocolo nº. 022/2019 intitulado “Análise da atividade anti-hemostática de polissacarídeos complexos de matriz extracelular”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Valquíria Pereira de Medeiros e colaboração de Jair Adriano Kopke de Aguiar e Tayná Rodrigues Coelho, a ser realizado no período de 01/09/2019 a 01/09/2021. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 66 ratos Wistar machos com 2-3 meses de idade, projeto a ser realizado Sala de experimentação animal do Departamento de Bioquímica. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº. 022/2019-CEUA about “Análise da atividade anti-hemostática de polissacarídeos complexos de matriz extracelular”, under responsibility of Valquíria Pereira de Medeiros and collaboration of Jair Adriano Kopke de Aguiar and Tayná Rodrigues Coelho is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 07/02/2019. For the development of this research 66 males of Wistar rats with 2-3 months old will be delivered as requested in the period of 09/01/2019 to 09/01/2021. The Project will be performed at Biochemistry Department located at Federal University of Juiz de Fora-MG. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of validity.

Juiz de Fora, 04 de julho de 2019.

Coordenadora  
CEUA

Vice-Coordenadora  
CEUA