



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

VANESSA OLINTO DOS SANTOS

**POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE INTERESSE
FARMACOLÓGICO NO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus
schmitti***

**NATAL
2006**

VANESSA OLINTO DOS SANTOS

**POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE INTERESSE
FARMACOLÓGICO NO CAMARÃO *Litopenaeus schmitti***

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Dr^a Suely Ferreira Chavante

**NATAL
2006**

Dedico esta obra

Ao meu Deus. Minha rocha eterna, meu refúgio, meu escudo, a força da minha vida.

Aos meus pais, Jonas & Erineide , pelo incentivo, amor, dedicação e apóio nos momentos de dúvida e dificuldades. Amo muito vocês.

Ao meu avô, João Celestino dos Santos (in memorian). Não estás presente para ver a realização deste sonho que junto comigo sonhastes, mas teu exemplo de garra, determinação, fé e esperança foram as alavancas para que isto pudesse se tornar uma realidade. Sei que um dia iremos nos encontrar e não mais estaremos limitados pelo tempo.

“ A vontade de se tornar algo melhor a cada dia é o que faz do ser humano uma máquina de sonhar. Projetar idéias, desejos e lutar para transformar o que um dia foi um simples pensamento em uma situação real. O ser humano sonha! Mas se ele apenas sonhasse nunca saberia do que é capaz, é preciso conquistar os sonhos”

(Anônimo)

Dedico esta obra

A minha orientadora Suely Ferreira Chavante, que me ensinou não apenas a sonhar, mas também a lutar para que eles se tornem realidade. Obrigada por acreditar no meu sonho e me auxiliar durante esta caminhada. As lições de bioquímica guardarei na minha memória, mas as de vida, estarão para sempre no meu coração.

AGRADECIMENTOS

A professora Fernanda Wanderley de Oliveira pela co-orientação, e por ter disponibilizado os reagentes necessários para a realização dos experimentos.

A professora Edda Lisboa Leite. Obrigada por ter cedido seu laboratório e seus reagentes para a realização dos experimentos de inflamação. Pela atenção e sugestões para este trabalho.

Aos meus atuais amigos (a) s de laboratório: Adriana , Ana katarina, Eliene (Li, obrigada por seu eterno bom humor, sua presença deixa o nosso laboratório mais alegre), Elizabeth (obrigada pelas palavras de apóio, incentivo e pela companhia desde a iniciação científica), Ismail (Obrigada pelo companheirismo e principalmente pela ajuda nos experimentos), Louise, Lucilla (Obrigada por sua amizade e pela disponibilidade em me ajudar no que for preciso) e a Marcelo.

Aos meus antigos amigos (a)s de laboratório: Lu Silva, Guiliana Paiva, Dácio Michel, Janice Cortez , Rodolfo e Cíntia , pelos ensinamentos iniciais na vida científica.

Aos meus amigo (a)s da pós graduação: Anne Shirley, Ádila Lorena(Barbie), Carol, Celina, Fabiano, Lúcia e Tarciana. Obrigada pela amizade, carinho, pelos momentos de descontração. Vocês estarão sempre no meu coração.

Aos professores da banca de qualificação: Elizeu Antunes e Maurício Sales. Obrigada pelas sugestões e pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

Aos professores do Departamento: Carlos, Hugo, Jacira, João, Felipe, José Femandes, Luciana Duarte, Luiz Roberto e Roberto Dimenstain.

As coordenadoras da pós-graduação: Dr^a Selma Jerônimo e Dr^a Dilma. Exemplos de competência e amor à pesquisa.

Ao Insituto Di Ricerche Chimiche e Biochimiche “G.Ronzoni”, obrigada pelas análises de espectroscopia de RMN e pelos experimentos de adesão celular.

A Carla Mara, obrigada pela ajuda nos experimentos da migração leucocitária.

A todos os meus amigos e funcionários do departamento de Bioquímica.

A secretária da pós-graduação: Margarita Mavromatis

A CAPES, pela bolsa concedida.

*“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram,
Nem jamais penetrou em coração humano o
que Deus tem preparado para aqueles que o amam”*

I Coríntios 2:9

RESUMO

Polissacarídeos sulfatados com características estruturais distintas e importantes atividades biológicas têm sido encontrados em uma diversidade de invertebrados marinhos. Por isso existe um grande interesse no campo da biotecnologia na pesquisa destes compostos sulfatados isolados de organismos aquáticos. No entanto, apesar da posição privilegiada do Brasil para a obtenção destes compostos, ainda são poucas as informações científicas sobre as substâncias isoladas e suas atividades biológicas. Diante do exposto, este presente trabalho teve por objetivos avaliar os potenciais farmacológicos dos glicosaminoglicanos (GAGs) isolados do camarão marinho *Litopenaeus schimitti*, sobre a hemostasia, coagulação sangüínea, migração leucocitária e adesão celular. Para isso os GAGs foram extraídos dos tecidos do crustáceo mediante proteólise, fracionamento com acetona e posteriormente submetidos aos ensaios farmacológicos. Os tecidos do crustáceo, abdômen e cefalotórax, apresentaram compostos semelhantes à heparina (heparinóides) com atividade anticoagulante de 45 UI/mg e 90 UI/mg, respectivamente. Estas moléculas apresentaram baixo efeito hemorrágico residual na concentração de 100 µg/mL, quando comparada com a heparina comercial não fracionada (HNF). Um outro composto semelhante ao dermatam sulfato (DS), constituído predominantemente por dissacarídeos dissulfatados foi isolado do abdômen do crustáceo. Este composto apresentou, na concentração de 15 µg/µL, uma inibição significativa ($P < 0.01$) da migração leucocitária, reduzindo a infiltração celular em 65% quando comparado com os animais controle. Nessa mesma concentração o DS reduziu em 60% a concentração de proteínas do lavado peritonial. As análises qualitativas da composição celular do exudato peritonial foram similares ao encontrado para os animais controles em todas as concentrações

testadas. Na concentração de 0,5 mg/mL foi capaz de reduzir em 40% a adesão das plaquetas aos leucócitos. Os dados obtidos demonstram que estes polissacarídeos sulfatados isolados do camarão *L.schmitti* podem vir a ser utilizados como compostos bioativos, podendo surgir como princípios ativos para o desenvolvimento de fármacos, anticoagulantes e moduladores da resposta inflamatória.

Palavras-chaves: Heparinóides; Dermatan Sulfato; Glicosaminoglicanos; Atividade anticoagulante; Atividade anti migratória; Adesão plaquetas/leucócitos; Camarão; Crustáceos.

ABSTRACT

Sulfated Polysaccharides with unique chemical structures and important biological activities has been found in a diversity of sea invertebrates. For that, to exist a huger interest on the biotechnology field in the research theses sulfated compounds isolated from sea organisms. Despite the privileged brazilian position for these compounds attainment, there are still a few scientific informations about the isolated substances and their biological activities. A head the displayed, the present work has for objectives, to evaluate the pharmacological properties of the glycosaminoglycans isolated from the sea shrimp *Litopenaeus schimitti* on homeostasis, blood coagulation, leukocytes migration and platelet/leukocyte adhesion. For this, yhe glycosaminoglycans were extracted from crustacean tissues by proteolysis, fractionation with acetone and later submitted to pharmacological assays. The crustacean tissues showed compounds heparin-like, with anticoagulant activity of 45 IU/mg and 90 IU/mg, respectively. These molecules showed low residual hemorrhagic effects in the tested concentration (100 µg/mL), when compared to unfractionated commercial heparin (UFH). Another dermatan sulfate-like compound, predominately constituted for disulfated disaccharides, was isolated from crustacean abdomen. This compound showed an efficient effect on leukocytes migration inhibition, in the concentration of 15 µg/mL, reducing the cellular infiltration in 65% when compared to the controlled animals. In this same concentration, the DS reduced in 60% the protein concentration of the peritoneal exudates. In the concentration, this compound of 0.5 mg/mL, it was capable to reduce in 40% platelet/leukocytes adhesion. Our data demonstrate that these sulfated polysaccharides isolated from the shrimp *L. schimitti* will can be used as bioactive

compounds, appearing as active principles for pharmacological development, anticoagulants and inflammatory response regulators.

Work-keys: Heparinoids; Dermatan Sulfate; Glycosaminoglycans; Anticoagulant Activity; Antimigratory Activity; Platelets/Leukocytes Adhesion; Shrimp, Crustacean.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos (VOLPI; MACARI, 2006).....	22
Figura 2: Distribuição dos glicosaminoglicanos sulfatados no reino animal (MEDEIROS, 2000).....	23
Figura 3: Esquema da cascata de coagulação sangüínea.....	29
Figura 4: Esquema da resposta inflamatória (Davidson.Chemokin2. jpg. Disponível em < http://www.bio.davison.edu/ >. Acesso em : 18 Jan/2006).....	32
Figura 5: Camarão da espécie <i>Litopenaeus schmitti</i>	35
Figura 6: Esquema de extração dos GAGS do crustáceo.....	39
Figura 7: Esquema de purificação dos GAGS com acetona.....	40
Figura 8: Esquema da atividade hemorrágica residual da heparina.....	44
Figura 9: Modelo de peritonite induzida por tioglicolato.....	46
Figura 10: Eletroforeses das frações R2 e R3 isolados do camarão <i>L.schmitti</i>	50
Figura 11: Eletroforese das frações R2 e R3, após purificação com acetona...51	
Figura 12: Efeito hemorrágico residual dos heparinóides A e C.....	53
Figura 13: Purificação e identificação do DS após cromatografia de troca-iônica DEAE-Sephacel.....	54
Figura 14: Degradação enzimática da fração R3 do abdômen do crustáceo....55	
Figura 15: Espectroscopia de RMN ¹³ C A 125 MHz do DS do camarão.....	59
Figura 16: Espectro HSQC do DS isolado do camarão.....	59

Figura 17: Curva dose-resposta do DS do camarão <i>L. schmitti</i> sobre a migração leucocitária.....	61
Figura 18: Efeito do DS do camarão sobre a concentração total de proteínas do lavado peritoneal.....	62
Figura 19: Efeito do DS isolado do camarão sobre a composição celular do lavado peritoneal.....	63
Figura 20: Efeito inibitório do dermatam sulfato isolado do camarão sobre a adesão plaquetas/leucócitos.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade Anticoagulante dos heparinóides isolados do camarão <i>Litopenaeus schmitti</i>.....	52
Tabela 2: Sinais Químicos do proton ^1H para os resíduos de IdoA e GalNAc dos DS de mamíferos e do camarão <i>Litopenaeus schmitti</i>.....	57
Tabela 3: Sinais Químicos ^{13}C para os resíduos de IdoA e GalNAc dos DS de mamíferos e do camarão <i>Litopenaeus schmitti</i>.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

GAGS: Glicosaminoglicanos Sulfatados

GAINAc: N-acetil-galactosamina

GlcN: N-acetil-glucosamina

IdoA: Ácido Idurônico

GlcA: Ácido Glucurônico

IdoA2SO₃ : Ácido Idurônico sulfatado na posição C-2

GlcN3,6SO₃ : Glucosamina sulfatado na posição C-3 e C-6

Δ-Di4S: Dissacarídeos sulfatados na posição C-4

Δ-DiOS: Dissacarídeo não sulfatado

Gal: Galactose

GalNAc4S: N-acetil-galactosamina sulfatada na posição C-4

GalNAc6S: N-acetil-galactosamina sulfatada na posição C-6

GalNAc4S,6S: N-acetil-galactosamina sulfatada na posição C-4 e C-6

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

HSQC: Espectroscopia de ressonância nuclear magnética bidimensional

ANS: Glucosamina N-sulfatada

ANAc: N-acetil- glucosamina

TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

i.p: Intraperitonealmente

EDTA: Etileno-diamino tetra acetato

PRP: Plasma rico em plaquetas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	36
2.1	GERAL	36
2.2	ESPECÍFICOS	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	ANIMAIS	37
3.2	REAGENTES	37
3.3	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS	38
3.4	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.	40
3.5	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO R3 DO ABDOMÊN DO CAMARÃO.	41
3.6	DESPOLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA COM CONDROITINASES AC E ABC	41
3.7	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	41
3.8	ANÁLISES FARMACOLÓGICAS	42
3.8.1	Atividade Anticoagulante dos heparinóides, avaliadas pelo TTPA	42
3.8.2	Avaliação do efeito hemorrágico residual dos heparinóides	42
3.8.3	Avaliação do DS isolado do camarão sobre a migração leucocitária em um modelo de inflamação peritoneal induzida por tioglicolato	45
3.8.3.1	Contagem total e diferencial de leucócitos	46
3.8.3.2.	Dosagem protéica do liquido peritoneal	47
3.8.4.	TESTE DE AGREGAÇÃO PLAQUETAS-LEUCÓCITOS	47
3.8.4.1.	Preparação do plasma RPR	46
3.8.4.2.	Condições experimentais	47

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	48
4 RESULTADOS	49
4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS GAGS ISOLADOS DO CAMARÃO	49
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DOS HEPARINÓIDES	51
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMORRÁGICO RESIDUAL DOS HEPARINÓIDES	52
4.4. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA FRAÇÃO R3 DO ABDÔMEN	53
4.5 EFEITO DO DS SOBRE A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA NA CAVIDADE PERITONIAL	60
4.6. EFEITO DO TRATAMENTO DO DS DO CAMARÃO SOBRE OS NÍVEIS PROTEÍNA TOTAL NO LAVADO PERITONIAL	61
4.7. EFEITO DO DS SOBRE A COMPOSIÇÃO CELULAR SANGUINEA APÓS INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO COM TIOGLICOLATO	62
4.8. INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETAS-LEUCÓCITOS PELO DS ISOLADO DO CAMARÃO	63
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos sulfatados constituem um grupo complexo de macromoléculas que estão amplamente distribuídos na natureza, ocorrendo em muitas espécies de plantas e animais (SANTOS *et al.*, 1992; DIETRICH *et al.*, 1995; MOURÃO *et al.*, 1996; MOURÃO *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2002; VOLPI, 2005). Estes polímeros aniônicos participam de inúmeros processos fisiológicos e patológicos importantes, como: proliferação celular, morfogênese, angiogênese e câncer, além de patologias microbianas (RAMAN *et al.*, 2005). Por isso existe um grande interesse no campo da biotecnologia na pesquisa destes compostos obtidos a partir de fontes naturais.

Polissacarídeos sulfatados com características estruturais distintas e importantes atividades biológicas têm sido encontrados em uma diversidade de organismos marinhos (DIETRICH *et al.*, 1985; ALBANO; MOURÃO, 1986; JORDAN *et al.*, 1986; MOURÃO; PERLIN, 1987; VIEIRA; MOURÃO *et al.*, 1988; BOISSON-VIDAL *et al.*, 1995; DURING *et al.*, 1997; PAVÃO *et al.*, 1998; CHAVANTE *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2000, VILELA-SILVA *et al.*, 2001; CESSARETTI *et al.*, 2004; LUPPI *et al.*, 2005). Como exemplos temos as fucanas, que apresentam como característica estrutural mais marcante a presença de L-fucose sulfatada. Estas moléculas são encontradas em algas marrons (Phaeophyceae) e ouriços do mar (equinodermos). As fucanas, isoladas de algas, apresentam importantes atividades farmacológicas, como atividade angiogênica (SOEDA *et al.*, 2000), anti migratória (SOEDA *et al.*, 1997, 2000; GIRAUX *et al.*, 1998), anticoagulante (HAROUN-BOUHEDJA *et al.*, 2000; NISHINO *et al.*, 1991; USUI *et al.*, 1980), antitrombótica (ROCHA, 2002; Riou *et al.*, 1996; ZHUANG *et al.*, 1995), antiproliferativa (ROCHA,

2002, RIOU *et al.*, 1996; ELLOUALI *et al.*, 1994; DESLANDES *et al.*, 2000), antimetastática (COOMBE *et al.*, 1987). No entanto, apesar da biodisponibilidade para a obtenção destes compostos a partir das algas, são os invertebrados marinhos os principais reservatórios de polissacarídeos sulfatados (PAVÃO *et al.*, 1996). Fucanas isoladas de alguns invertebrados marinhos apresentam estruturas químicas mais simples, sendo constituídas de unidades repetitivas com diferentes padrões de sulfatação. (MULLOY *et al.*, 1994; ALVES *et al.*, 1997, 1998, VILELA-SILVA *et al.*, 1999). Nos ouriços do mar, estão relacionadas com a ativação da reação acrossômica durante o processo de fecundação (ALVES *et al.*, 1997). Outro importante grupo de polissacarídeos sulfatados isolados de organismos marinhos são os glicosaminoglicanos (GAGs), que são compostos heterogêneos constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas, contendo uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) e um açúcar não nitrogenado: ácido urônico (ácido-D-glucurônico-GlcA ou ácido L-idurônico-IdoA) ou ainda galactose, unidos por ligação glicosídica. Além disso, pode apresentar grupos ésteres de sulfato, que juntamente com as carboxilas, concedem a estes compostos uma elevada densidade de cargas negativas, favorecendo interações com uma diversidade de proteínas, envolvidas em processos biológicos importantes, como: adesão celular (ESKO, 1991; IOZZO; MURDUCH, 1996; IOZZO, 1999), fibrilogênese (KRUSIUS; RUOSLAHTI, 1986), proliferação e diferenciação celular (IOZZO, 1998; TSEN *et al.*, 1995), coagulação sanguínea (BERFIELD *et al.*, 1992; BERNFIELD *et al.*, 1999; NADER *et al.*, 1991; NADER *et al.*, 1989; 1991; PINHAL *et al.*, 1994a, 1995), angiogênese (FOLMAN; INGBER, 1989), metástase (NAKAMORI *et al.*, 1997) e inflamação (KOENING *et al.*, 1998; XIE *et al.*, 2000; BORSING, 2004; WANG *et al.*, 2005; CRIPPS *et al.*, 2005).

Por isso é crescente o interesse da indústria farmacêutica na pesquisa destes compostos sulfatados isolados de organismos aquáticos.

Seis tipos principais de GAG são encontrados nos tecidos animais: ácido hialurônico (AH), queratam sulfato (QS), condroitim sulfato (CS), heparam sulfato (HS), heparina e dermatam sulfato (DS). Estes compostos são diferenciados quanto ao tipo de hexosamina, o tipo de açúcar urônico, quantidade e posição de grupos sulfatos e ainda quanto ao tipo de ligação glicosídica (α ou β) (Figura 1).

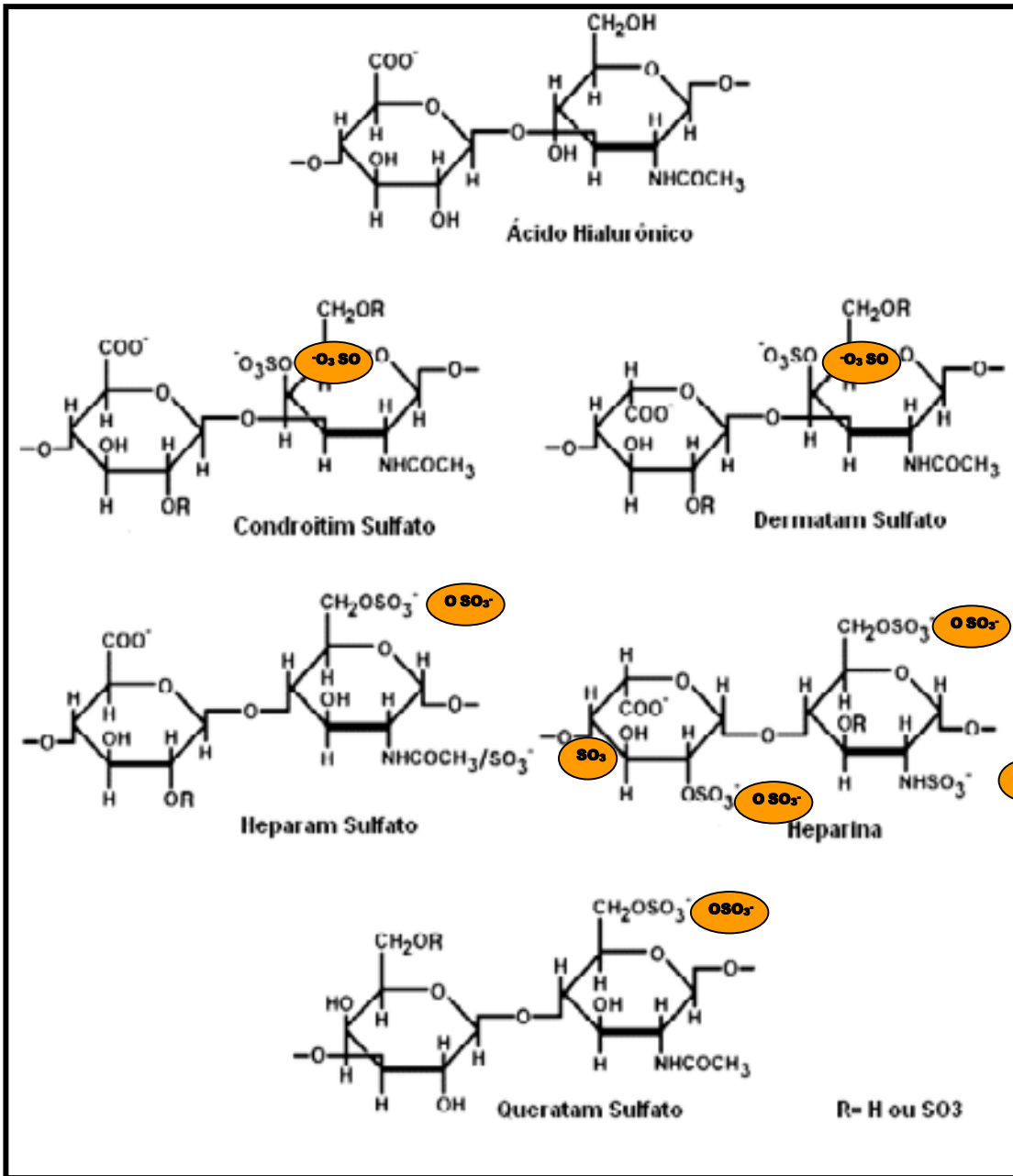


Figura 1: Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos (VOLPI; MACARI, 2006)

A ocorrência destes compostos em todo o reino animal indica que eles são conservados ao longo do processo evolutivo (MEDEIROS *et al.*, 2000) (Figura 2) e que participam de processos biológicos importantes relacionados ao desenvolvimento animal (PAVÃO *et al.*, 1996).

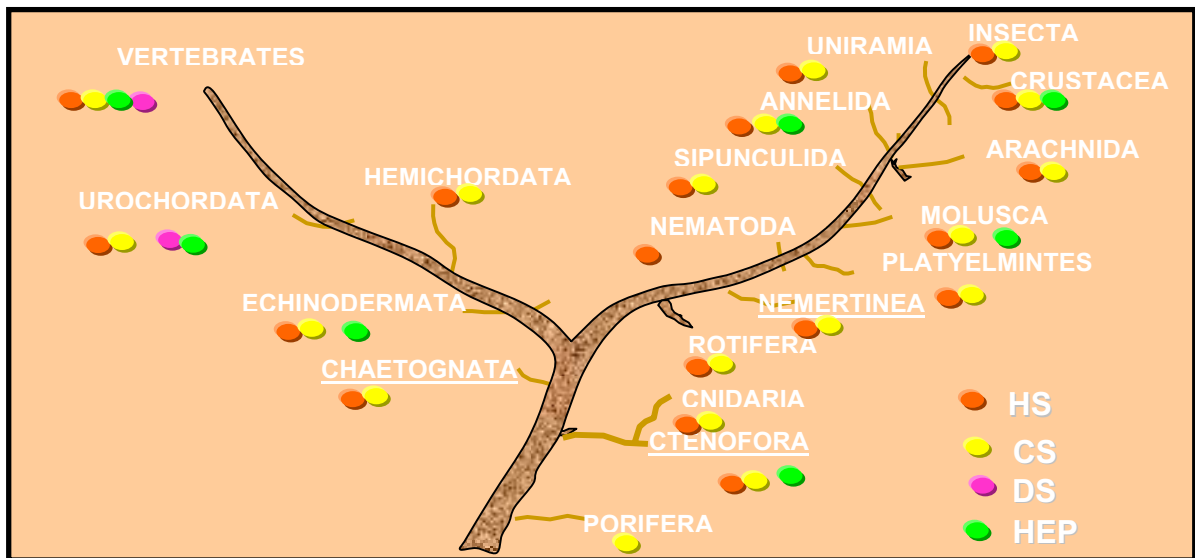


Figura 2 : Distribuição dos Glicosaminoglicanos Sulfatados no reino animal (MEDEIROS, 2000)

Além da heparina que apresenta importantes atividades farmacológicas, uma ênfase especial vem sendo dado ao dermatam sulfato (DS), por ser um importante candidato a agente antitrombótico (TROWBRIDGE; GALLO, 2002). Além disso, o DS tem sido utilizado como agente terapêutico experimental para modulação de diversos eventos biológicos, relacionados principalmente a interação célula-célula e célula-matriz (SAKAI *et al.*, 2002). O dermatam sulfato é constituído predominantemente por unidades dissacarídicas contendo, N-acetil-galactosamina-4S(GalNAc4S) e ácido idurônico (IdoA). No entanto, dissacarídeos dissulfatados podem ser encontrados na cadeia polissacarídica, tais como: Ido2SO₃ unido a GalNAc4S, Ido2SO₃-GalNAc6S ou IdoA- GalNAc4S,6S. Podem ainda apresentar dissacarídeos constituídos por resíduos de ácido glucurônico (GlcA) (TOWBRIDGE; GALLO, 2002).

A elucidação da estrutura do dermatan sulfato foi possível a partir de análises químicas, físico-químicas e degradações enzimáticas por ação das condroitinases AC e ABC isoladas de *Flavobacterium heparinum* e *Proteus vulgaris* (YAMATA *et al.*, 1968). A condroitinase ABC cliva as ligações glicosídicas entre os resíduos de N-acetil galactosamina (GalNAc) e ácido glucurônico (GlcA) ou ácido idurônico (IdoA). Logo, age especificamente sobre o DS, CS e o AH. Contrariamente, a condroitinase AC degrada exclusivamente condroitim 4S e 6S, visto que cliva cadeias polissacarídicas contendo ligações 1-4 entre a GalNAc e resíduos de ácido glucurônico.

A habilidade demonstrada pelo dermatam sulfato em interagir com proteínas envolvidas nos processos inflamatórios e na coagulação sanguínea tem ampliado as perspectivas para sua utilização como fármaco para o tratamento de diversas patologias, como desordens inflamatórias e doenças trombóticas. Bartoluccic *et al.*, 1993 demonstraram que o DS, constituído, principalmente por IdoA e GalNAc4S, inibe eficientemente a atividade da elastase de leucócitos humanos (HLE), uma potente serino protease, encontrada na forma de grânulos nos neutrófilos. A elastase participa da etiologia de inúmeros distúrbios inflamatórios, como: enfisema, arteriosclerose e artrite reumatóide. Por isso, sugere-se que a ação do DS sobre a atividade elastásica, farmacologicamente poderia minimizar estes efeitos indesejáveis. Tollefsen *et al.*, 1992, demonstraram que o DS é capaz de inibir a ação da trombina, mediada pela interação com o cofator II da heparina (HC-II), um importante inibidor natural da coagulação sanguínea. Esta interação resulta na formação de um complexo estável com a trombina. Acredita-se que o DS acelere a formação desse complexo, por fornecer uma superfície sobre a qual o inibidor e a protease interagem.

A ocorrência de compostos semelhantes ao dermatam sulfato isolados de fontes marinhas, que apresentam potente atividade anticoagulante, mediada pela ação do cofator II da heparina (PAVÃO *et al.*, 1998), sugere que estes compostos poderiam ser utilizados promissora e como drogas anticoagulantes. Os mais conhecidos foram isolados das ascídias *Styela plicata*, *Halochyntia pyriformis* e *Ascidian nigra* (PAVÃO *et al.*, 1996) que revelaram a presença predominante de resíduos de idurônico 2-sulfato, porém as N-acetilgalactosaminas apresentaram padrões de sulfatação distintos, na posição 4-O-sulfato ou 6-O-sulfato. Os dermatam sulfatos isolados dos ovos dos ouriços-do-mar, *Pseudocentrotus depressus*, *Stronglylocentrotus purpuratus* (YAMAGATA; OKAZAKI, 1974; VILELA-SILVA *et al.*, 2001) revelaram que são constituídos principalmente por resíduos de galactosamina 4 e 6-sulfato, diferente dos encontrados nos tecidos de vertebrados. Estudando a fase de blástula na embriogenia do *S. purpuratus*, (SOLURSH; KATOW, 1982), encontraram o dermatam sulfato e o condroitim sulfato como sendo os mais abundantes componentes polissacarídicos. Além disso, experimentos de inibição do metabolismo dos glicosaminoglicanos, na fase embrionária destes organismos, resultaram no bloqueio do desenvolvimento celular ainda na fase de blástula, confirmando a importância destes compostos para o desenvolvimento biológico (LANE; SOLURSH, 1991).

O principal exemplo do potencial farmacológico dos glicosaminoglicanos é atribuído a heparina. Visto que, tem sido amplamente utilizada como agente anticoagulante e antitrombótico, por apresentar características estruturais específicas que favorecem sua interação com proteínas inibidoras da coagulação sangüínea, como a antitrombina (AT) (SHOENMAKERS *et al.*, 2005). Apesar disso, o uso da heparina tem sofrido algumas restrições, quanto à possível contaminação

por patógenos, pois em virtude de ser extraída de vísceras bovinas, as chances de contaminação com o príon causador da doença da vaca louca estariam aumentadas. Outra importante fonte de obtenção deste polissacarídeo são os suínos, que também, apresentam restrições, principalmente religiosas para a sua utilização (CESSARETTI *et al.*, 2004). Por isso têm sido investigadas fontes alternativas para a obtenção de compostos anticoagulantes.

Polissacarídeos semelhantes à heparina tem sido relatadas em muitas espécies de invertebrados marinhos, como nos bivalves, *Anomalocardia brasiliiana*, *Mercenaria mercenaria* e *Tivela mactroides* (DIETRICH *et al.*, 1985; JORDAN *et al.*, 1986; PEJLER *et al.*, 1987), nos crustáceos *Penaeus brasiliensis*, *Ucides cordatus* (DIETRICH *et al.*, 1999; MEDEIROS *et al.*, 2000) e no equinoderma *Mellita quinquisperforata* (MEDEIROS *et al.*, 2000). Estes compostos apresentaram importantes ações farmacológicas, principalmente na inibição da coagulação, podendo futuramente ser utilizados como fontes alternativas de obtenção de análogos da heparina para a indústria farmacêutica. A análise estrutural e a avaliação farmacológica desses compostos constituem uma etapa inicial e fundamental para a viabilidade comercial destes polissacarídeos.

A caracterização estrutural detalhada desses carboidratos complexos tem sido possível pelo emprego de técnicas de espectroscopia, como a ressonância magnética nuclear (RMN) (YAMADA *et al.*, 1992; MULLOY *et al.*, 1996; MULLOY *et al.*, 2000;) monodimensional (^1H e ^{13}C) e bidimensional, como a HSQC (Heteronuclear single quantum coherence) (GUERRINI *et al.*, 2005). A partir da definição precisa da estrutura destes polissacarídeos é possível compreender os requisitos mínimos necessários para uma determinada atividade biológica.

Apesar, das importantes ações farmacológicas atribuídas a heparina, sua utilização clínica, resulta em efeitos colaterais indesejáveis, como as complicações hemorrágicas. Acredita-se, que este efeito esteja relacionado a uma interferência da heparina no “equilíbrio hemostático”, ocasionado, provavelmente, pela indução da trombocitopenia, ou seja, diminuição na concentração plaquetária (DAY *et al.*, 2004), como consequência da interação com o fator plaquetário (PF4). A formação do complexo: PF4-heparina é reconhecido pelas imunoglobulinas (IG) na superfície celular das plaquetas resultando na destruição plaquetária. No entanto, outros pesquisadores, sugerem que a atividade antihemostática da heparina seja independente das plaquetas (CRUZ *et al.*, 1967). Trabalhos posteriores sugerem que essa atividade estaria relacionada à interação com moléculas semelhantes a miosina na parede das células musculares, inibindo a contratilidade dos vasos e assim causando a hemorragia (NADER *et al.*, 1989; TERSARIOL *et al.*, 1997). Nader *et al.*, 1989, demonstraram que a estrutura mínima dos glicosaminoglicanos sulfatados necessária para a ruptura da hemostasia era um dissacarídeo que contém um resíduo de ácido urônico insaturado, unido através de ligação glicosídica α 1-4 a uma glucosamina N-sulfatada na posição C-6 (GluN6S). Em outro experimento foi avaliada a ação da massa molecular sobre a hemostasia. Os resultados obtidos demonstraram que uma determinada heparina com 3,8 Kda, destituída de atividade anticoagulante, apresentou efeito hemorrágico. O mesmo não ocorreu para a heparina de 7 Kda, que apresentava uma eficiente atividade. A análise dos dados obtidos sugere que a ação hemorrágica, do composto testado, depende de uma estrutura molecular específica e da sua carga global e não do seu efeito anticoagulante.

Os mecanismos da coagulação sangüínea estão baseados no modelo de cascata introduzido desde 1960. Tradicionalmente, a coagulação foi dividida em “via extrínseca”, “via intrínseca” e “via comum”. A “via intrínseca” é iniciada pela ativação dos fatores de contato e envolve a ativação subsequente da kalicreína e dos fatores XII, XI e IX, resultando na ativação do fator X. A “via extrínseca” é iniciada pelo fator tecidual (FT), expresso sobre o tecido injuriado, este interage com o VII, formando um complexo que resulta na ativação do fator X. Na “via comum” o fator X ativo interage sobre a protrombina ativando-a e conseqüentemente resultando na formação da fibrina (Figura 3).

Apesar do conceito distinto das vias “intrínseca” e “extrínseca” da coagulação ter servido durante muitos anos como um modelo de sucesso para a coagulação, as vias não existem em separados, pelo contrário estão interconectadas (SHOENMAKERS *et al.*, 2005). Isto foi evidenciado em pacientes com deficiências severas no fator VII. Estes apresentam hemorragias, mesmo estando intacta a “via instrínseca” (PEYVANI *et al.*, 2002). A hipótese atual acerca do início da coagulação sangüínea, afirma que após a injúria vascular o fator tecidual (FT) é exposto e forma um complexo com o fator VII, este ativa o X diretamente (“via extrínseca”) ou indiretamente através da ativação do IX (“via intrínseca”), resultando na clivagem da protrombina em trombina, esta cliva o fibrinogênio em fibrina. Inicialmente, os monômeros de fibrina formam uma rede instável, logo em seguida a rede de fibrina estável é constituída. Além disso, a trombina ativa o XI, VII e V, resultando no aumento da produção dos fatores ativos IX e X e conseqüentemente amplificando a formação de trombina (SHOENMAKERS *et al.*, 2005).

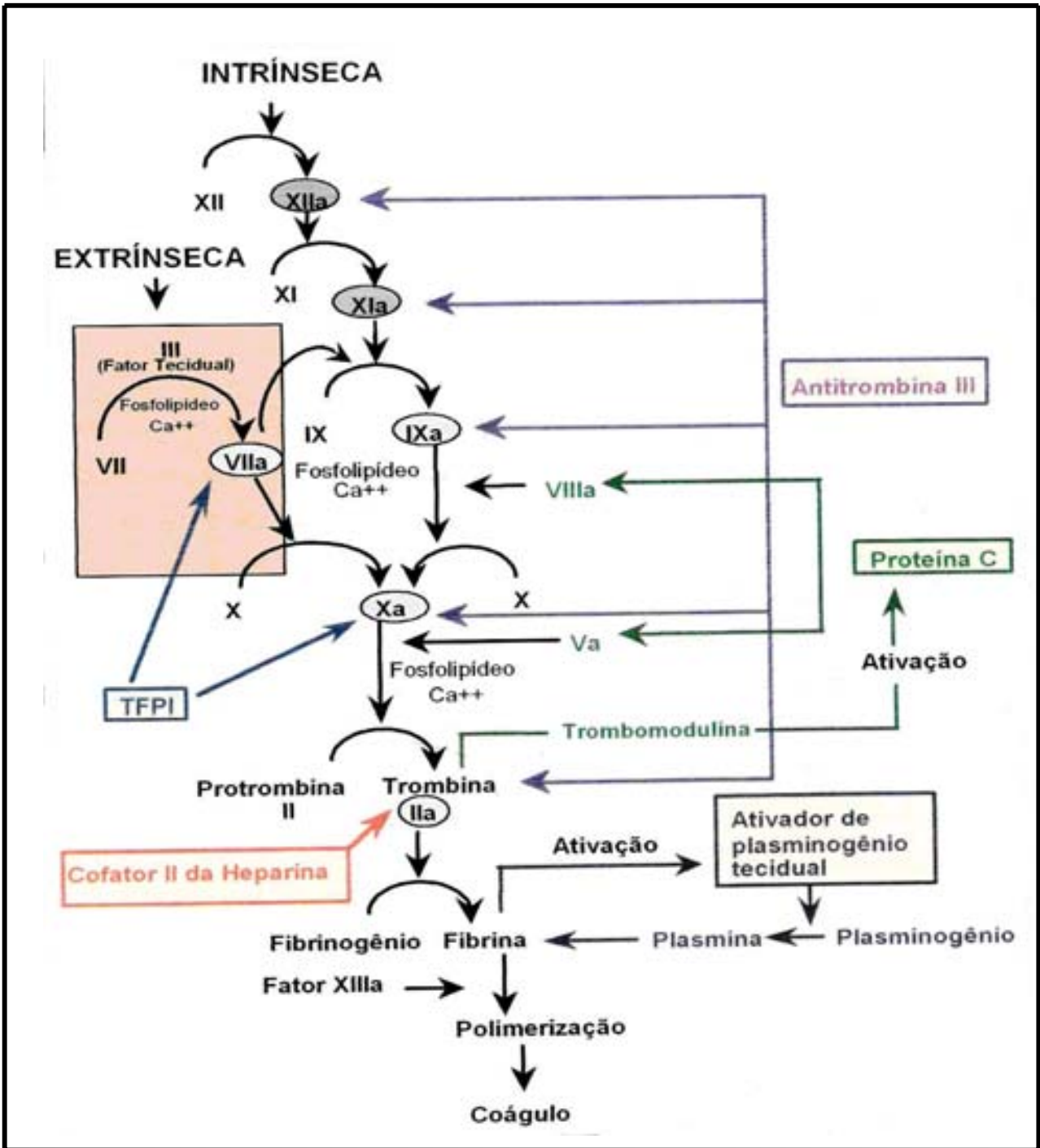


Figura 3: Esquema da Cascata da Coagulação Sangüínea

A ativação da cascata de coagulação apresenta importantes efeitos sobre a resposta pro-inflamatória. A trombina e o complexo: fator tecidual/VII pode induzir a produção de citocinas nas células endoteliais, como o fator de necrose tumoral (TNF α), através da interação com receptores ativos de proteases na superfície destas células (SHERWOOD *et al.*, 2005). Logo, a ativação da cascata de coagulação induz a ativação da resposta inflamatória. Por isso existem diversos mecanismos regulatórios que envolvem proteínas anticoagulantes, como a antitrombina (AT) e o cofator II da heparina (HCII), que auxiliam na prevenção de complicações trombóticas e inflamatórias.

A resposta inflamatória tem início com a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular. Este processo é intensamente regulado por interações específicas receptor/ligante e ocorre numa seqüência ordenada de eventos. A interação inicial dos leucócitos com o endotélio é mediada pelas selectinas, em uma interação de baixa afinidade. Em seguida, deslocam-se linearmente sobre o endotélio ativado (fenômeno conhecido como rolamento), este evento constitui uma etapa importante porque facilita a ativação dos leucócitos por quimiocinas, produzidas pelo endotélio, resultando no aumento dos níveis de expressão das integrinas, que se ligam fortemente as moléculas de adesão intercelular da família das imunoglobulinas (IgCAMs) resultando na firme adesão dos leucócitos ao endotélio, favorecendo desta forma, sua migração para o espaço extravascular (EVANGELISTA *et al.*,1999; SIMON *et al.*, 2000) (Figura 4).

As selectinas são glicoproteínas transmembranas expressas na superfície celular de leucócitos, endotélio e plaquetas (LEY, 2003). A P-selectina, foi primeiramente identificada nos grânulos secretórios de plaquetas. No endotélio vascular estes grânulos são conhecidos como corpos de Weibel-Palade. Quando as

células endoteliais ou as plaquetas são estimuladas a P-selectina é translocada para a superfície celular como parte do processo secretório exocítico (WHELAN, 1996). A L-selectina está constitutivamente, presente em neutrófilos, monócitos, eosinófilos e nos linfócitos. A E-selectina é encontrada exclusivamente nas células endoteliais sendo sintetizada algumas horas após estímulos de mediadores inflamatórios sobre o endotélio (WHELAN, 1996).

As interações mediadas pelas selectinas envolvem o reconhecimento, cálcio-dependente, de carboidratos específicos presentes na superfície celular. Algumas evidências sugerem que as selectinas também participariam dos eventos primários de adesão nos processos de metástases de certos cânceres epiteliais (NAKAMORI *et al.*, 1997). Por isso muitos trabalhos estão sendo realizados com o intuito de encontrar moléculas de carboidratos que sirvam como inibidores competitivos para o bloqueio destas interações. Compostos análogos ao Sle^x são estudados e desenvolvidos por apresentarem os ligantes necessários para as interações com as selectinas. Assim, a pesquisa por outras classes de carboidratos que interajam com as selectinas tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. Alguns trabalhos têm evidenciado a capacidade de compostos semelhantes à heparina e ao heparan sulfato em interagir com as selectinas (KOENING *et al.*, 1998; XIE *et al.*, 2000; BORSING, 2004; WANG *et al.*, 2005; CRIPPS *et al.*, 2005). Em modelos de inflamação experimentais com ratos deficientes em E-selectina foi demonstrado que os derivados de heparina (tetrassacarídeos hexasulfatados) inibiam a adesão inicial dos leucócitos ao endotélio. Por outro lado, em ratos deficientes de P-selectina e L-selectina não foi observado a mesma inibição, indicativo que a heparina apresenta afinidade por estas selectinas, provavelmente por estar mimetizando as cargas negativas dos seus ligantes naturais (NELSON *et al.*, 1993). Outras pesquisas sobre

os aspectos estruturais das interações da heparina com as selectinas, evidenciaram a importância da 6-O-sulfatação nos resíduos de glucosamina para a ligação com as selectinas (WANG *et al.*, 2002).

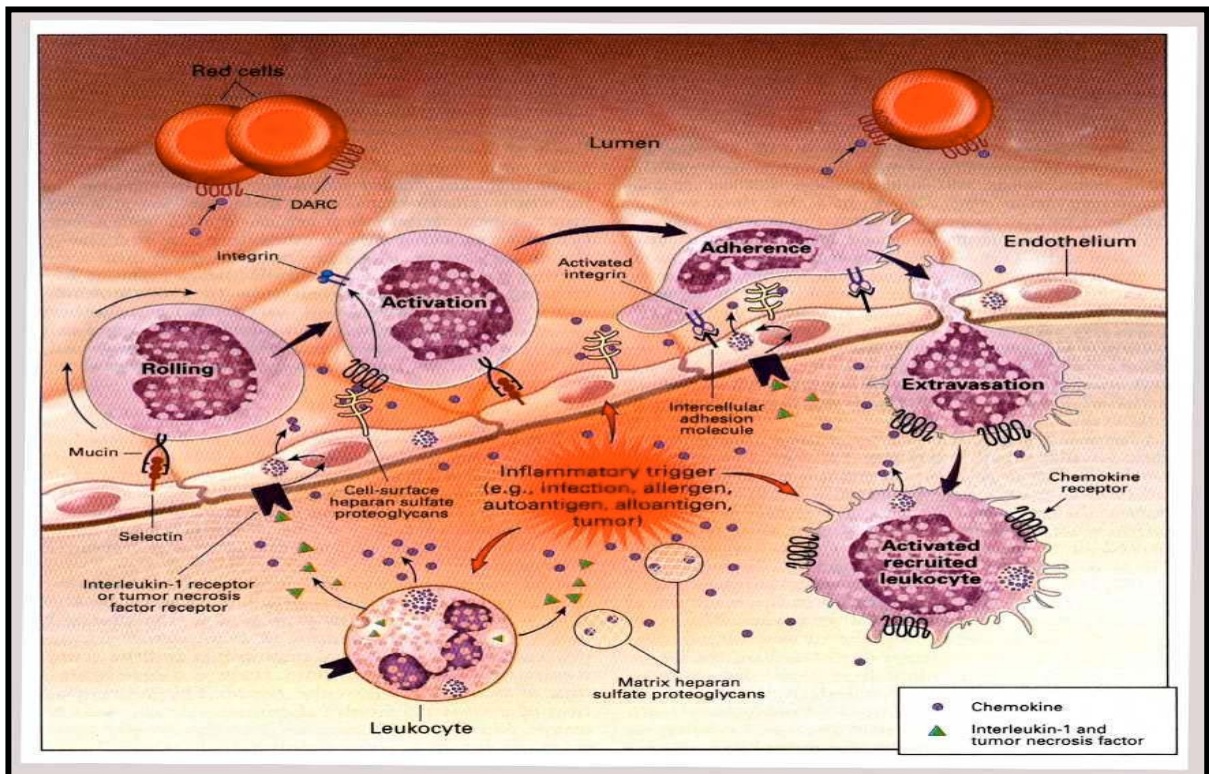


Figura 4: Esquema da resposta inflamatória. Davidson. **Chemokin2.jpg**.Disponível em: <<http://www.bio.davidson.edu/>>. Acesso em: 18 Jan /2006.

As plaquetas aderidas à superfície de um vaso lesado substituem as células endoteliais permitindo o recrutamento e migração dos leucócitos através da parede do vaso. Esses eventos podem contribuir tanto para a manutenção da integridade vascular quanto para o surgimento das doenças trombóticas e inflamatórias, em decorrência do acúmulo de leucócitos o que contribui para o crescimento do trombo (SHOENMAKERS *et al.*, 2005). Estas plaquetas permanecem ativas e expressam conseqüentemente, não apenas a P-selectina, mas também ligantes para as integrinas, incluindo o fibrinogênio e as moléculas de adesão intercelular (ICAM).

Além disso, as plaquetas ativas liberam o fator de ativação plaquetária (PAF), aminas vasoativas e quimiocinas. Todos estes produtos são potentes ativadores de leucócitos e alguns deles podem estar envolvidos na interação das integrinas dos leucócitos com ligantes específicos presentes na superfície das plaquetas (SHOENMAKERS *et al.*, 2005).

Estudos anteriores evidenciam que a P-selectina, sozinha ou em combinação com quimiocinas, estimula diferentes respostas nos leucócitos, sugerindo que algumas destas respostas agiriam diretamente na expressão das moléculas de adesão, principalmente as integrinas CD11b/CD18 (EVANGELISTA *et al.*, 1999). O ligante específico para a P-selectina (PSGL-1), expresso na superfície dos leucócitos após interagir com o seu receptor, ativa mecanismos de transdução de sinal, resultando na liberação de interleucina 8 (IL-8) e conseqüentemente estimulando a migração leucocitária, visto que esta interleucina é um importante agente quimiotático para os neutrófilos (SHERWOOD *et al.*, 2004).

Compostos isolados de invertebrados marinhos demonstraram propriedades antiinflamatórias bastante significativas (HERENCIA *et al.*, 1998). Alguns destes metabólitos inibem a atividade das enzimas envolvidas na liberação do ácido araquidônico e na formação de mediadores lipídicos (FERRANIZ *et al.*, 1994; GIL *et al.*, 1995). Estes resultados ampliam as perspectivas para a obtenção de novos produtos naturais, com importantes atividades farmacológicas, a partir de fontes marinhas.

O Brasil com a grandeza do seu litoral, cerca de 8 mil quilômetros de costa contínua, associado a grande biodiversidade existente, não pode abdicar da vocação para produtos naturais. É uma posição privilegiada para a obtenção de compostos bioativos a partir de recursos marinhos. No entanto, ainda são poucas as

informações científicas sobre as substâncias isoladas e a atividade biológica dos produtos naturais de organismos marinhos obtidos ao longo da costa brasileira.

O nosso laboratório tem isolado compostos híbridos de heparina e heparam sulfato, com eficiente atividade anticoagulante, em diversas espécies de crustáceos incluindo lagostas (*Panulirus laevicauda* e *Panulirus argus*), artemia (*Artemia franciscana*), caranguejo (*Ucides cordatus*) e camarões (*Litopenaeus brasiliensis*, *Litopenaeus subtilis*, *Litopenaeus vanammei*). Muitos destes polissacarídeos sulfatados apresentam características estruturais distintas dos encontrados em tecidos de mamíferos e peculiares até mesmo entre os invertebrados marinhos. Como vem sendo sugerido um papel diferenciado para cada tipo de polissacarídeo descoberto, estas peculiaridades podem conduzir a descoberta de novos agentes farmacológicos.

No intuito de fornecer subsídios para ampliar o conhecimento sobre a distribuição dos glicosaminoglicanos nos crustáceos, propusemos investigar a ocorrência destes compostos no camarão marinho da espécie *Litopenaeus schimitti*, (Figura 5) amplamente encontrado no litoral do Rio Grande do Norte.



Superfilo: Artropoda

Filo: Crustacea

Classe: Malacostraca

Ordem: Decapoda

Família: Litopenaidae

Gênero: *Litopenaeus*

Espécie: *Litopenaeus schimitti*

Figura 5: Camarão da espécie *Litopenaeus schimitti*

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos glicosaminoglicanos isolados do camarão *Litopenaeus schmitti* sobre a hemostasia, coagulação sanguínea, migração leucocitária e adesão celular.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar dos principais glicosaminoglicanos isolados do abdômen e cefalotórax do camarão marinho *L.schmitti*;
- Avaliar a Atividade Anticoagulante e o efeito hemorrágico destes polissacarídeos sulfatados;
- Caracterizar estruturalmente os principais glicosaminoglicanos isolados do crustáceo;
- Avaliar o efeito destes glicosaminoglicanos sobre a migração leucocitária e a concentração protéica durante a resposta inflamatória aguda induzida por tioglicolato;
- Avaliar o efeito destes glicosaminoglicanos sobre a agregação plaquetas-leucócitos.

3. MATERIAL& MÉTODOS

3.1. Animais

Os experimentos utilizando o modelo de inflamação (peritonite) induzida por tioglicolato de sódio foram realizados em ratos da linhagem *Wistar* (6-8 semanas de idade, 180-200g), obtidos no biotério do departamento de Bioquímica-UFRN, Natal/RN. Para a avaliação da atividade hemorrágica foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* (16-24 semanas de idade, 300-350g) do biotério do departamento de Bioquímica. Todos os animais utilizados durante os experimentos foram mantidos em gaiolas individuais submetidos à dieta e água *ad libitum* em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/ escuro) e temperatura (25°C).

3. 2. Reagentes

O condroitim 4-sulfato (CS-4), condroitim 6-sulfato (CS-6) e o dermatam sulfato (DS) foram obtidos do Miles Laboratories. O Heparam sulfato (HS) e a heparina (179 UI/mg), utilizadas nos experimentos da avaliação da atividade anticoagulante, foram adquiridos do laboratório LAOB (Barueri, SP). A Heparina clínica, utilizada nos experimentos da atividade hemorrágica residual, foi a Lique mine® (Roche, Brasil). As condroitinases AC (EC 4.2.2.5) *Artrobacter aurecences* e a condroitinase ABC (E.C 4.2.2.4) *Proteus vulgaris* adquiridos da Sigma-Aldrich. Agarose (Bio-Rad). O kit APTTest elágico do laboratório Wiener foi utilizado para avaliar a atividade anticoagulante. O tioglicato de sódio foi proveniente da Sigma-Aldrich. Para a cromatografia de troca iônica foi utilizada a DEAE-Sephacel adquirida da Pharmacia.

3.3. Extração e purificação dos glicosaminoglicanos

Realizado segundo descrito por Dietrich, 1999. Inicialmente, os tecidos do cefalotórax (2kg) e abdômen (5kg), do crustáceo foram separadas e em seguida delipidadas com acetona durante 7 dias, com trocas diárias do solvente. Após trituração e secagem, o pó resultante foi solubilizado com NaCl 1,0 M, o pH ajustado para 8,0 e adicionado 20mg da enzima proteolítica (superase) para cada 1g de pó cetônico. Após incubação a 60°C, durante 24h, com agitação periódica, a suspensão foi filtrada. Ao filtrado foi adicionado 50 ml de resina Lewatit para cada Kg de tecido e a suspensão foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, por 24 h. Em seguida, a resina foi ressuspensa em NaCl 1,0 M, agitada durante 4 h à temperatura ambiente e filtrada. Este procedimento foi repetido com molaridades crescentes de NaCl (2,0 M e 3,0 M). Aos filtrados obtidos, frações R2 e R3, respectivamente, foram adicionados dois volumes de metanol e mantidos a 4°C por 18 h. Os precipitados formados foram coletados por centrifugação (5000 x g, 30 min), dializados e liofilizados. Em seguida, ressuspensos com água destilada, na concentração de 50 µg/µL e submetido a análises eletroforéticas (Figura 6).

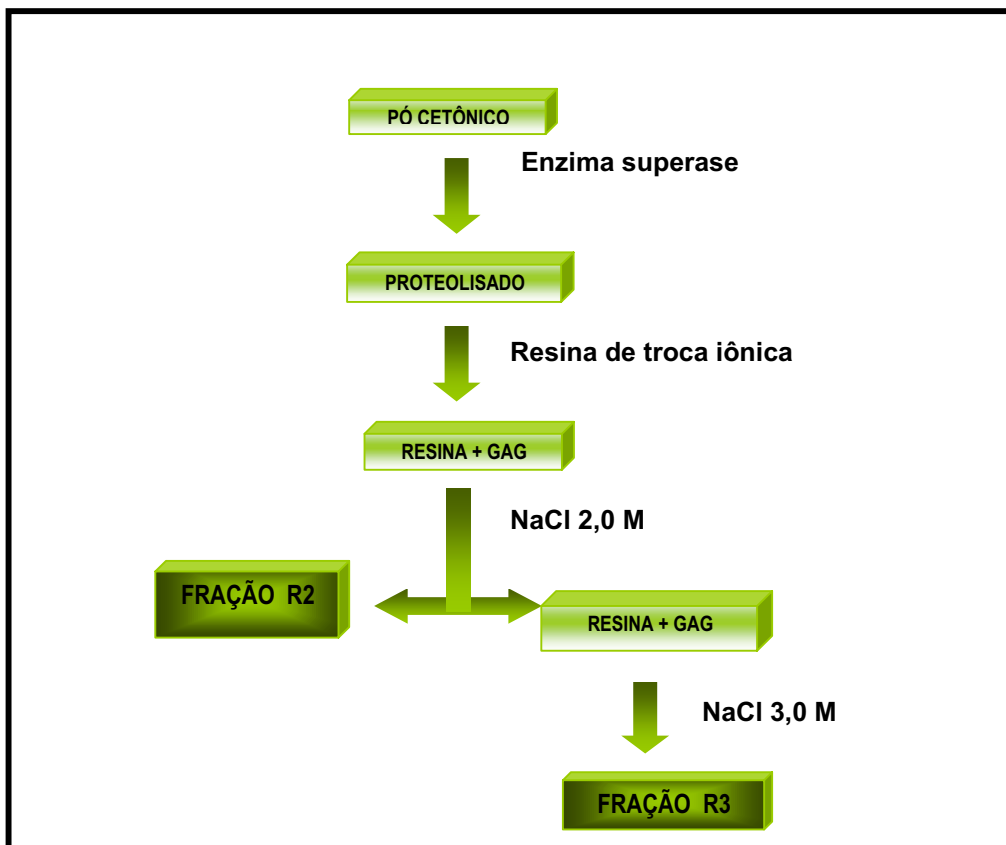


Figura 6: Esquema de extração dos GAGS do crustáceo.

As frações R2 e R3 foram posteriormente submetidas ao tratamento utilizando volumes crescentes de acetona, de acordo com Dietrich, 1999. Para isso, 500 mg do material seco foi dissolvido em 10 ml de NaCl 0,2 M e adicionado acetona na proporção de 0,5:1 (v/v). A solução foi mantida a 4°C por 24 h. Os precipitados foram coletados como F(0,5). Ao sobrenadante foi adicionada acetona na proporção de 0,7:1 (v/v) e o mesmo procedimento anteriormente descrito foi realizado. O precipitado obtido foi identificado como F(0,7). Esta operação foi repetida sucessivamente para a obtenção das frações F(0,9), F(1,0) e F(2,0). Os precipitados resultantes foram secos e submetidos a análises eletroforéticas e ensaios farmacológicos posteriores (Figura 7).

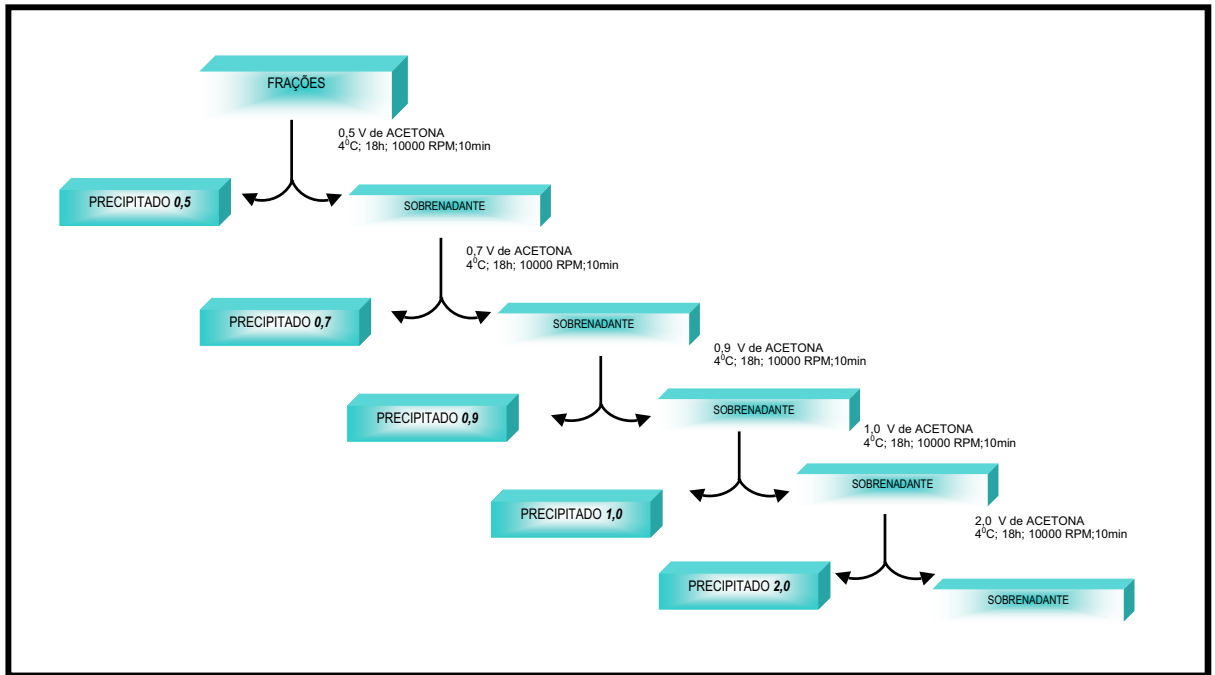


Figura 7: Esquema de purificação dos GAGS com proporções crescentes de acetona³

3.4. Eletroforeses em gel de agarose

Os glicosaminoglicanos (5-15 µg) foram aplicados em gel de agarose (0,6%) em diferentes sistemas de tampões, 1,3 diaminopropano/acetato (PDA) 0,05M pH9,0, acetato de bário/ PDA 0,04M, pH 5,8 e tris/acetato 0,05M por 1h a 100V e 75V respectivamente. Os glicosaminoglicanos no gel foram fixados com Cetavlon® 0,1% secos sob corrente de ar, corados com azul de toluidina 0,1% (ácido acético/etanol/água) e em seguida o gel foi lavado com solução de ácido acético/etanol/água (Dietrich, 1977).

3.5. Purificação da fração R3 do abdômen do camarão

A fração R3 após tratamento com acetona na proporção 1:1 (v/v) (R3F1) foi submetida a cromatografia de troca-iônica na coluna de DEAE-Sephacel e eluída com 2 volumes de NaCl 0,5M, 0,8M e 1M. As frações eluídas foram precipitadas com 85% de etanol e então centrifugadas a 1,500 x g por 20 minutos. Os precipitados foram quantificados por dosagem de urônico, segundo Dische, 1974.

3.6. Despolimerização enzimática com condroitinases AC e ABC

A fração eluída da coluna de DEAE-Sephacel com NaCl 0,8 M, foi submetida a digestão enzimática com as condroitinases AC e ABC, como descrito anteriormente por Yamagata, 1968. Para isso, 100 µg da fração foi incubada com 0,05 unidades das liases AC ou ABC em 25µl do tampão acetato de sódio 20 mM, pH 6,0 ou tampão tris/HCl 50 mM, pH 8,0. Após incubação a 37°C por 18 h, alíquotas foram retiradas, analisadas por eletroforese no sistema PDA e em cromatografia de papel, no solvente isobutírico amônia 1,25 M, por 18h, para avaliação dos produtos insaturados formados após digestão.

3.7. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

100 mg da fração R3F1 purificada, como descrito anteriormente, foram dissolvidas em D₂O e os espectros de ¹³C foram obtidos a 125 MHz com o espectrômetro Bruker AMX a 40°C. Os espectros de ¹H das amostras (15-30 mg) foram obtidos a 500 MHz com o espectrômetro Bruker AMX a 40°C. Os espectros bidimensionais HSQC foram realizados segundo Guerrini *et al.*, 2005

3.8. Análises farmacológicas

3.8.1. Atividade Anticoagulante dos heparinóides, obtidos do cefalotórax e abdômen, avaliados pelo TTPA.

O plasma humano citratado (90µl) foi incubado com 10µl da solução de heparinóides (compostos tipo heparina isolados do camarão) (0-50µg) e 100µl de cefalina + ácido elágico. Após 3 minutos de incubação a 37°C, 100µl de CaCl₂ 0,025 M foi adicionado e o tempo de coagulação foi marcado. A atividade foi expressa por unidades internacionais/mg, utilizando a curva padrão internacional da heparina (179 UI/mg).

3.8.2. Avaliação do efeito hemorrágico residual dos heparinóides

A observação do efeito hemorrágico dos heparinóides em aplicações tópicas na escarificação (lesão), mesmo após extensivas lavagens da cauda com solução salina (efeito hemorrágico residual) foi realizado com algumas modificações, como descrito por Cruz e Dietrich, (1967). Inicialmente, foi realizada uma tricotomia da parte terminal da cauda de rato, seguida de uma escarificação utilizando uma lâmina de tricotomia específica. Em seguida, a cauda escarificada foi introduzida em tubos de ensaio contendo 2 mL de soro fisiológico à 37°C e durante 4 minutos o sangramento foi acompanhado. A seguir, por estímulo mecânico (esfregando uma gaze sobre a escarificação) obteve-se novo sangramento e a cauda foi, então, mergulhada numa nova solução de soro fisiológico. A quantidade de proteína liberada da lesão, neste processo, serve como controle para os ensaios posteriores.

Após os 3 estímulos mecânicos, a cauda foi mergulhada numa solução contendo as frações a serem analisadas, durante 2 minutos. Decorrido o tempo determinado, a cauda foi removida da solução e lavada intensamente com solução salina, e o efeito hemorrágico residual observado, mergulhando-se a cauda numa solução salina nova sem a droga. Em seguida foi realizada a dosagem de proteínas liberadas da lesão, após o contato com a fração testada, pelo método de Bradford (1976). Os resultados foram expressos pela razão cumulativa da taxa de proteínas liberadas da lesão antes e após o contato com droga em estudo (Figura 8).

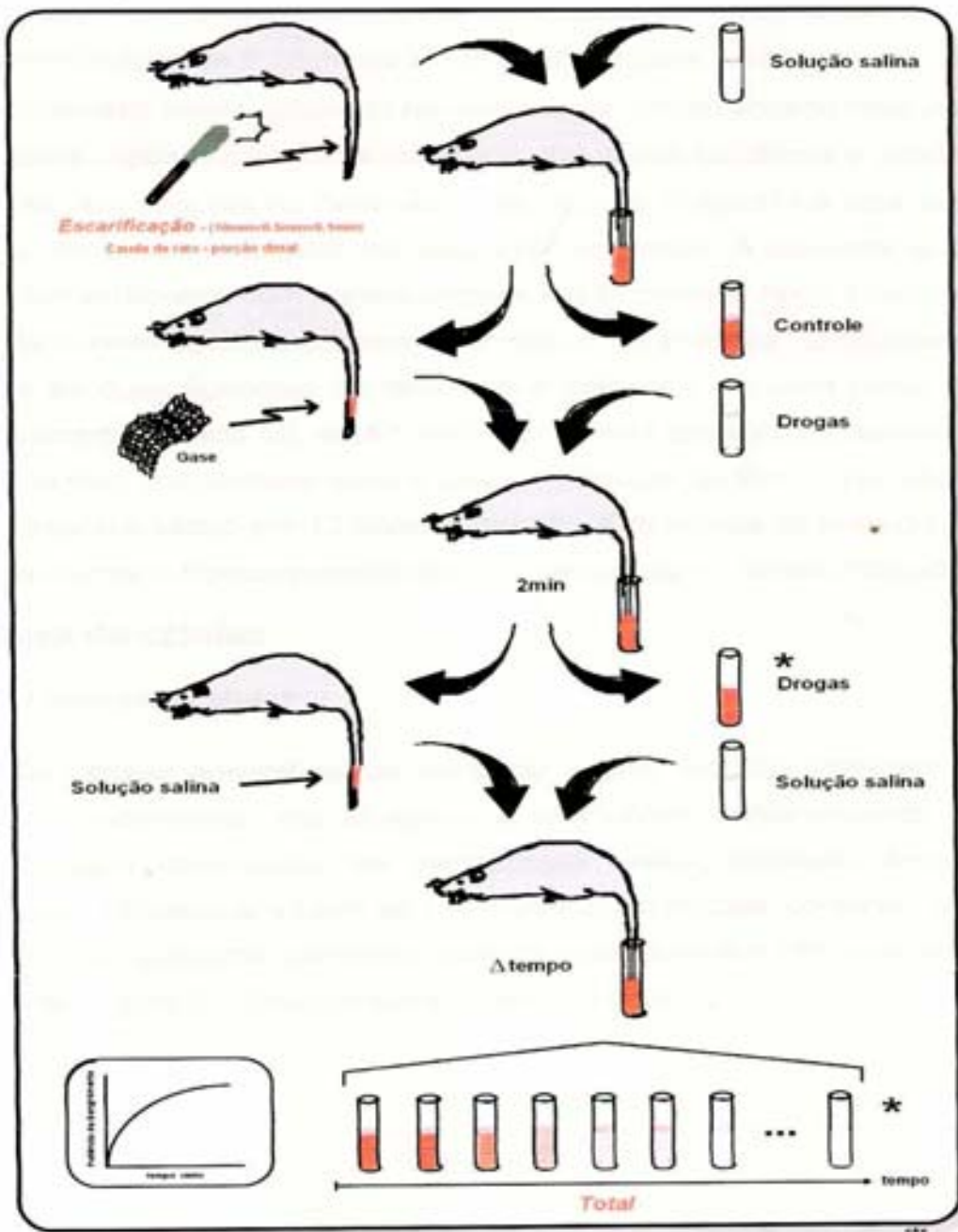


Figura 8: Esquema da atividade hemorrágica residual da heparina

3.8.3. Avaliação do DS isolado do camarão sobre a migração leucocitária no modelo de inflamação peritonial induzida por tioglicolato

Este experimento foi realizado de acordo com o modelo de peritonite desenvolvido por Xie, 2000. Inicialmente, os animais foram tratados profilaticamente através de injeções subcutâneas de 0,5 ml de soro fisiológico contendo ou não o DS em diferentes concentrações (D5 µg, D10µg e D15 µg/kg). Após 30 minutos, estes animais receberam intraperitonealmente (i.p), 2 ml de 3% tioglicolato (controle positivo) ou soro fisiológico (controle negativo). Decorridas 3 horas, os animais foram sacrificados e as cavidades peritoneais lavadas com 10 ml de soro fisiológico. Em seguida, após uma suave massagem realizada neste local, o líquido peritonial foi coletado em tubos contendo EDTA 3mM. O material foi então centrifugado a 300 x g por 5 minutos a 4°C para a separação das células e o sobrenadante, armazenado a -20°C até a análise posterior (Figura 9).

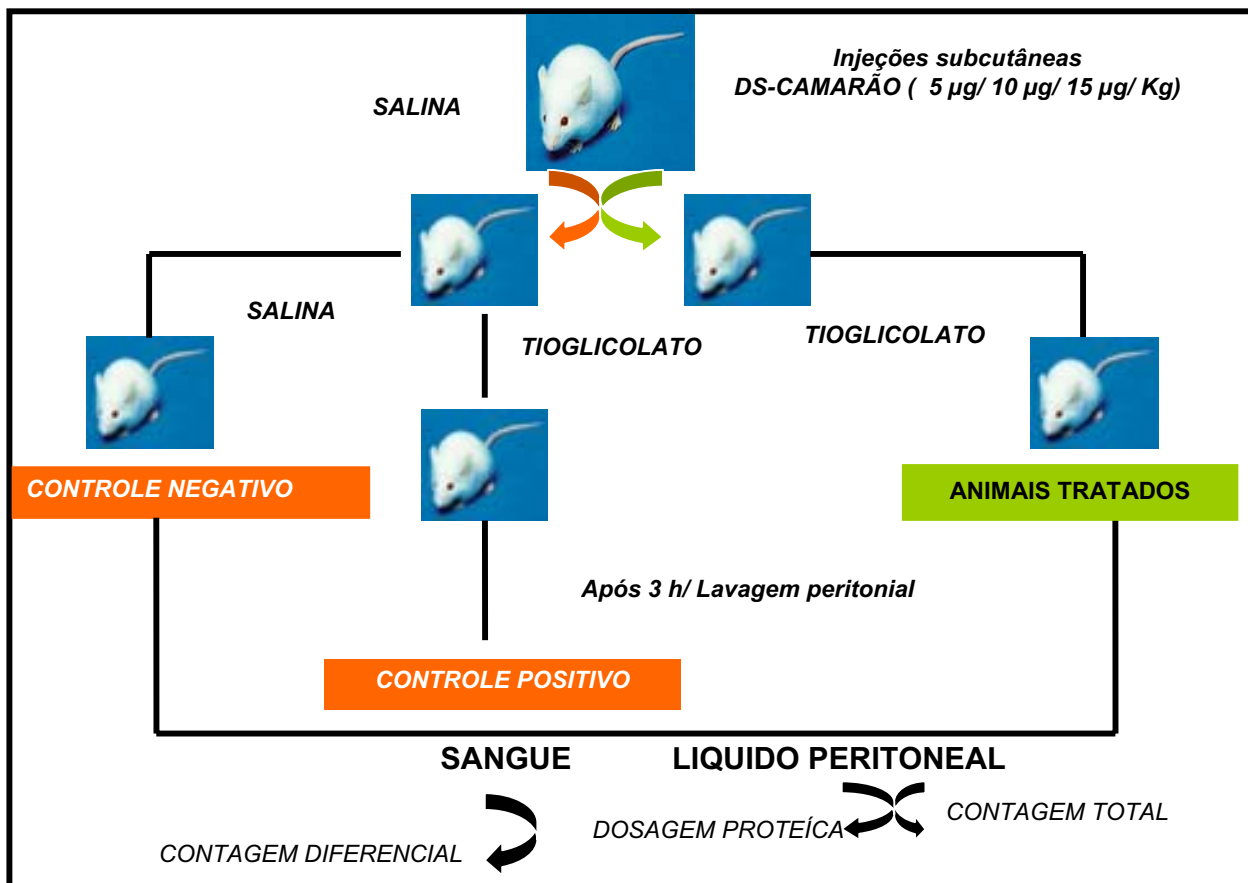


Figura 9: Modelo de peritonite induzida por tioglicolato de sódio

3.8.3.1. Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem total de leucócitos foi realizada a partir do fluído peritoneal, obtido como descrito anteriormente. Alíquotas de 20µl do exudato foram diluídos em 400µl da solução de Turck e em seguida examinados por microscopia óptica.

Para a contagem diferencial da subpopulação de leucócitos, nos animais submetidos à peritonite, 1ml de sangue foram coletados e acondicionados em tubos de ensaio contendo EDTA 3mM, para prevenir a formação do coágulo. Em seguida, foram utilizados alíquotas (10µl) do material para a realização do esfregaço em lâminas histológicas específicas, posteriormente fixadas, coradas e examinadas por microscopia.

3.8.3.2. Dosagem protéica do líquido peritoneal

Os sobrenadantes obtidos após centrifugação do fluido peritoneal, como descrito anteriormente, foram descongelados e alíquotas de 100µl foram utilizadas para determinar a concentração de proteína no exudato peritoneal, de acordo com o método de Bradford, 1976.

3.8.4. Teste de agregação plaquetas-leucócitos

3.8.4.1. Preparação do plasma RPR

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado após centrifugação, do sangue citratado, a 200x g por 15 minutos a 4°C. O plasma retirado e o remanescente sangüíneo submetido à sedimentação por dextran, seguido pelo gradiente Ficoll-Hypaque, para isolar os leucócitos. Para os experimentos de adesão, os leucócitos foram marcados com o fluorescente vermelho hidrotidina (HE). As plaquetas foram estimuladas com trombina, para expressar P-selectina e em seguida marcadas com o fluorocromo BCECF-AM, como descritos por Evangelista *et al.*, 1996 .

3.8.4.2. Condições experimentais

Todos os experimentos foram desenvolvidos observando as seguintes condições padrões: leucócitos sozinhos ou misturados com plaquetas (1/5 ou 1/10) foram incubados, para um volume final de 500µl, no agregômetro a 37°C sob agitação, durante 15 minutos. Os leucócitos e plaquetas marcados foram incubados seguindo as condições padrões acima descritas, no entanto, a estas interações foi adicionada o DS isolado do camarão em diferentes concentrações (0,02 mg, 0,1 mg

e 0,5 mg), com o intuito de avaliar a capacidade deste polissacarídeo em inibir a interação natural dos leucócitos com as plaquetas. Posteriormente as amostras foram mantidas a 4°C no escuro e analisadas por citometria de fluxo após 1h. Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.9 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm DP e analisados pelo método estatístico ANOVA. A diferença entre os grupos foi realizada pelo teste de Tukey-Kramer. O valor de $p < 0.001$ é considerado extremamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação dos GAGs isolados do camarão.

Os glicosamonoglicanos isolados após proteólise e complexação com resina de troca iônica foram analisados por eletroforeses nos sistemas diaminopropanoacetato (PDA) e descontínuo acetato de bário/PDA (Figura 10). As frações R2 e R3, tanto do abdômen quanto proveniente do cefalotórax do camarão, apresentaram, no sistema PDA, uma predominância de compostos com mobilidade eletroforética semelhante ao heparam sulfato (HS). No sistema Ba/PDA, que fraciona a heparina em seus componentes de migração rápida e lenta, observou-se que as frações R2 e R3 oriundas do cefalotórax apresentaram comportamento semelhante à heparina de mamíferos e por isso foram reunidas, denominadas heparinóide C (cefalotórax) e posteriormente submetidas a ensaios farmacológicos. Por outro lado, apenas a fração R2 isolada do abdômen fracionou como a heparina padrão. Esta fração apresentou ainda, compostos tipo condroitim sulfato (CS) e por isso foi submetida ao tratamento com acetona, no intuito de purificar os compostos tipo heparina (heparinóides). A figura 11 mostra o perfil eletroforético dos glicosaminoglicanos isolados do abdômen, após purificação parcial com proporções crescentes de acetona.

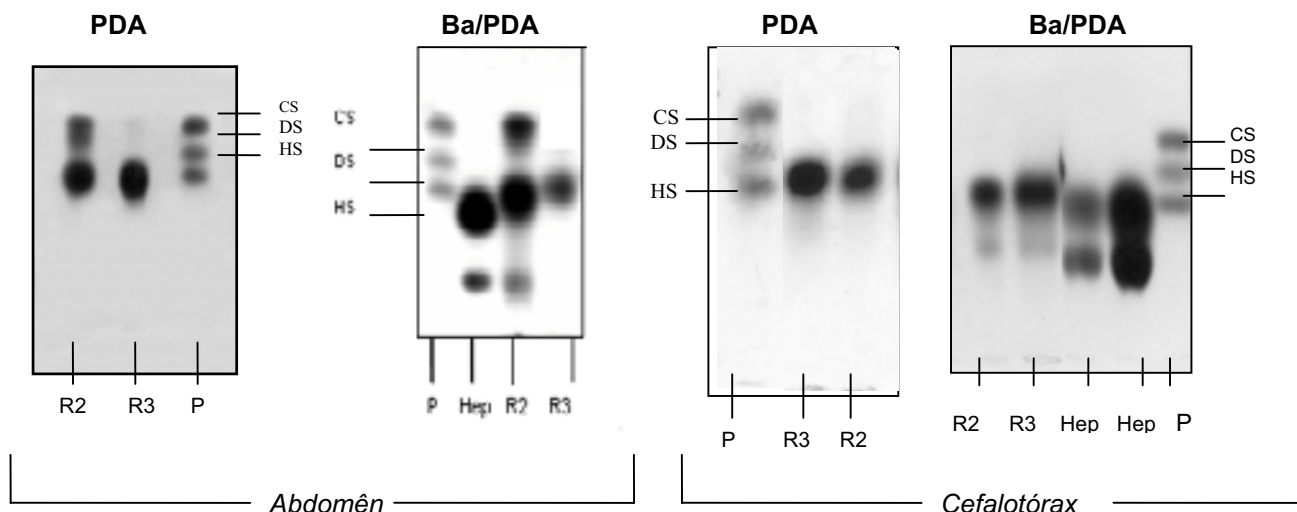


Figura 10: Eletroforeses das frações R2 e R3 isoladas do camarão *L. schimitti*, P= padrão de glicosaminoglicanos (CS, DS, HS) Hep= Heparina de mucosa bovina

Um composto semelhante à heparina de mamíferos foi isolado da fração R2 do abdômen, utilizando 0,7 (v/v) de acetona, este apresentou os componentes de migração rápida e lenta, típicos da heparina padrão e por isso foi denominado heparinóide A (Abdômen). A fração F(0,9) apresentou, predominantemente, compostos tipo HS e DS. Uma mistura de compostos tipo CS, DS e HS foi observada na fração F(1,0). A fração R3 proveniente do abdômen foi submetida diretamente ao tratamento com acetona na proporção 1:1 (v/v) e 2:1 (v/v), no entanto, a maioria dos GAG precipitou na fração F(1,0) e apresentou um perfil eletroforético peculiar, migrando entre DS e HS no sistema descontínuo acetato de bário/PDA (Figura 11). Porém, quando analisado no sistema tris-acetato, que separa os glicosaminoglicanos por teor de cargas negativas, esta fração apresentou uma mobilidade semelhante aos padrões de CS e DS (Figura 11). Diante destas peculiaridades a fração R3 foi escolhida para estudos adicionais sobre a estrutura química e ações farmacológicas.

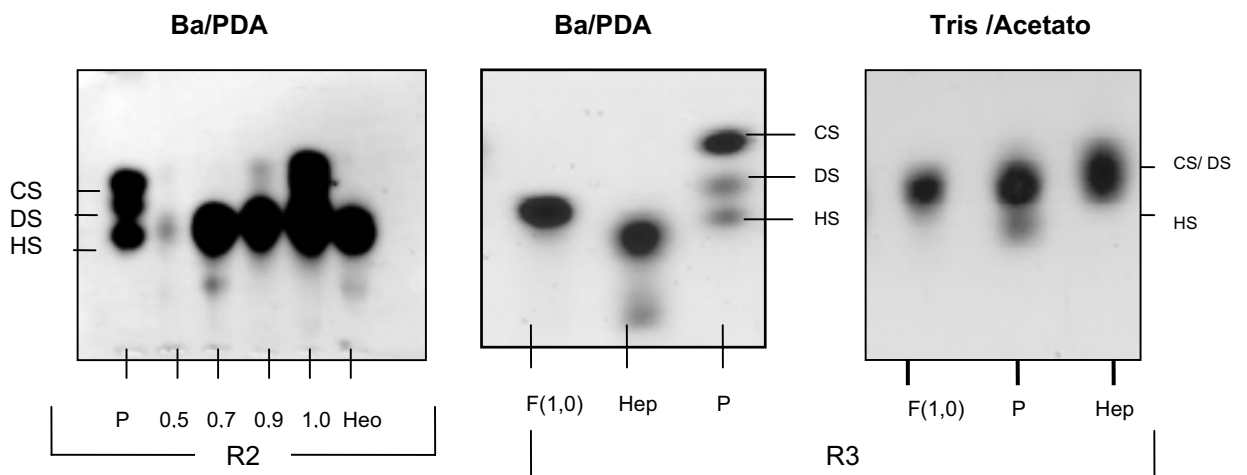


Figura 11: Eletroforeses das frações R2 e R3 do abdômen, após purificação com acetona. P= padrão de glicosaminoglicanos (CS, DS, HS). Hep= heparina de mucosa bovina.

4.2. Avaliação da atividade anticoagulante dos heparinóides.

Como parâmetro para avaliar o efeito anticoagulante destes compostos, foi utilizado o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e o resultado expresso em Unidades Internacionais (UI/mg) (Tabela 1). O heparinóide C apresentou uma atividade anticoagulante de 90 UI/mg menor, quando comparada com a heparina padrão não fracionada (179 UI/mg), no entanto, sua atividade anticoagulante foi superior quando comparada com o heparinoide A (45 UI/mg).

Tabela 1

Atividade Anticoagulante dos heparinóides isoladas do camarão *L. schimitti*

<i>Compostos</i>	Atividade Anticoagulante UI*/mg
<i>Heparina não fracionada (HNF)</i>	179
<i>Heparinóide A</i>	45
<i>Heparinoide C</i>	90

* Unidade Internacional (UI) é definida como a quantidade de heparina que mantém 1 mL de plasma fluido por 1 hora após adição de CaCl₂.

4.3 Avaliação do efeito hemorrágico residual dos heparinóides

Um dos efeitos indesejáveis da ação da heparina *in vivo* é a sua atividade hemorrágica, por isso foi avaliado o potencial de sangramento dos heparinóides do camarão, através do modelo de cauda escarificada em ratos, desenvolvido por Cruz e Dietrich, (1967). Com a finalidade de comparar as atividades hemorrágicas residuais dos heparinóides com a heparina de vertebrados, os experimento foram realizados com a concentração de 100µg/mL. Esta concentração foi escolhida baseada em experimentos anteriores de curva dose resposta utilizando a heparina não fracionada Liquemine®. Os resultados demonstraram que esta concentração de heparina é suficiente para desencadear um potente efeito hemorrágico. Como demonstrado na figura 12, o heparinóide C, apresentou uma intensa atividade hemorrágica, nos primeiros 15 minutos, mas que depois diminuiu, igualando-se ao potencial de sangramento final encontrado para o heparinóide A. Entretanto, estes compostos apresentaram efeito hemorrágico residual aproximadamente, três vezes menor ao encontrado para a heparina padrão, isolada de vertebrados.

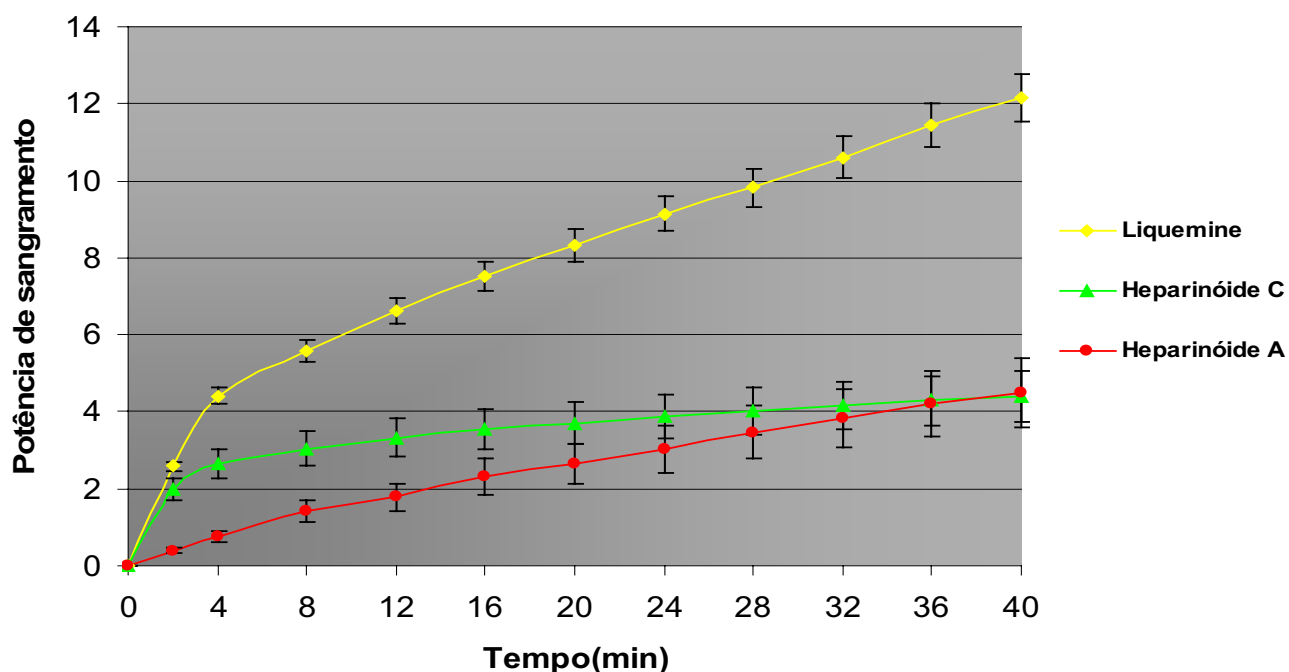


Figura 12: Efeito Hemorrágico residual dos heparinóides A e C. Após contato com a heparina não fracionada Liquemine®, ou com cada um dos heparinóides A e C, a cauda escarificada foi intensamente lavada com soro fisiológico e reintroduzida em meio sem heparina por 50 minutos. A proteína total liberada da lesão foi expressa em potência de sangramento conforme descrito em métodos. Cada curva corresponde a uma média \pm DP de experimentos realizados com 5 ratos.

4.4. Caracterização estrutural da fração R3 do abdômen

Com o intuito de elucidar a estrutura química, a fração de glicosaminoglicano híbrido isolada do abdômen foi submetida a espectroscopias de ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C . Os resultados revelaram a presença de sinais característicos para a galactosamina, glucosamina, ácido idurônico 2-O-sulfato e ácido glucurônico, indicando ser uma mistura de GAG. Por isso a fração R3 foi submetida a uma cromatografia de troca-iônica em DEAE-sephacel, eluída com molaridades crescentes de NaCl 0,5M, 0,8M e 1M e monitorado pela dosagem de urônico. Como demonstrado na Figura 12, a maior concentração de GAG foi obtido após eluição com 0,8M NaCl. Os glicosaminoglicanos presentes nesta fração foram identificados por eletroforese e apresentaram uma única banda com comportamento intermediário entre DS ou HS. Os principais dissacarídeos constituintes desse GAG

foram identificados após incubação com as condroitinases ABC e AC, específicas para o DS e CS, respectivamente. Os resultados foram analisados por eletroforese no sistema PDA e por cromatografia em papel, para avaliar os produtos liberados pela ação das enzimas. Como demonstrado na Figura 13 esta fração foi susceptível a digestão com a liase ABC, liberando principalmente dissacarídeos dissulfatados (Δ Didi). No entanto, não foi sensível a condroitinase AC. Estes resultados caracterizam esta fração como um dermatam sulfato (DS), porém apresentando características estruturais distintas quando comparado aos dermatam sulfatos de mamíferos, que é constituído principalmente de dissacarídeos 4-sulfato (Δ Di4S). Para elucidar a estrutura desse novo DS isolado do camarão a fração foi submetida ao estudo de espectroscopia de RMN monodimensional (^{13}C) e bidimensional HSQC (Heteronuclear Single Quantum coherence). Além disso, foi submetida a ensaios farmacológicos sobre a migração leucocitária e adesão celular.

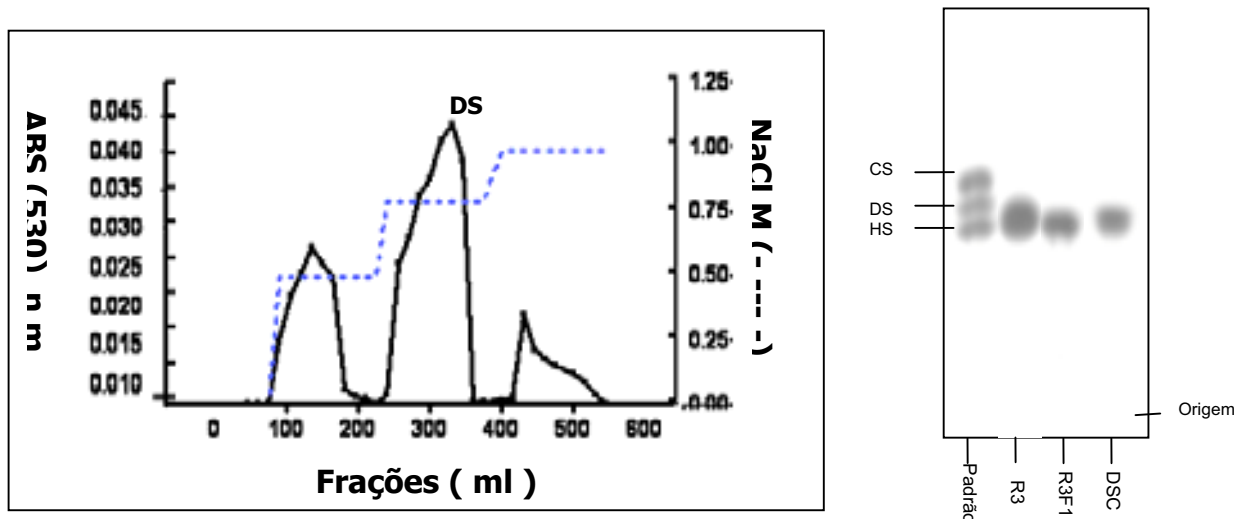


Figura 13: Purificação e Identificação do DS do camarão após cromatografia de troca iônica DEAE-Sephacel. A linha pontilhada indica o gradiente de NaCl utilizado. Todas as frações foram monitoradas a 530 nm pela dosagem de urônico. R3=Extrato bruto; R3F1= após purificação parcial com acetona; DSC= Dermatam sulfato do camarão após eluição da coluna de troca-iônica.

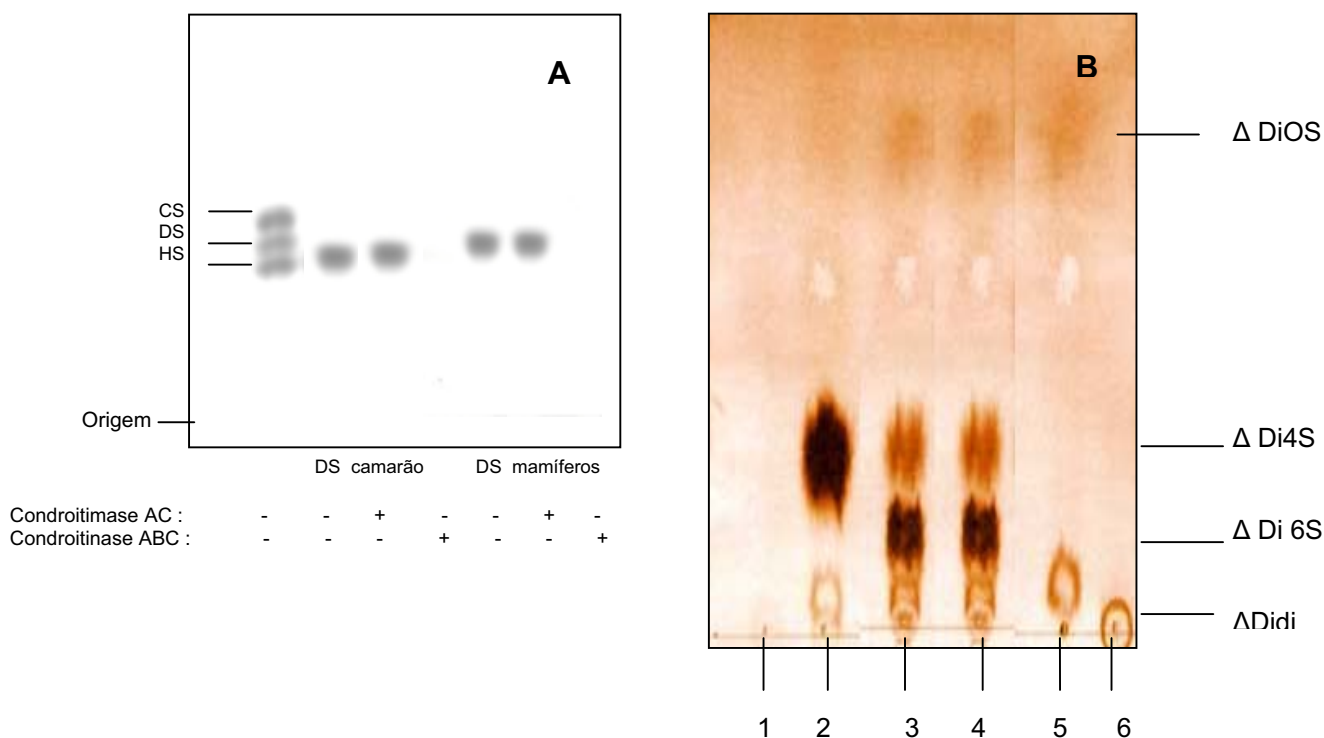


Figura 14: Degradação enzimática da fração R3 do abdômen do crustáceo. A- eletroforese no sistema PDA; B- Cromatograma em papel descendente Whatman nº1, solvente isobutírico 1,25 N amônia (5:3). 1- DS padrão +AC; 2-DS padrão+ABC; 3-CS padrão+AC; 4-CS padrão+ABC; 5-R3F1+ABC; 6-R3F1+ AC.ΔDiOS = dissacarídeo não sulfatado; ΔDi4S= dissacarídeo sulfatado em C-4; ΔDi6S= dissacarídeo sulfatado em C-6; ΔDidi= dissacarídeo dissulfatado.

O espectro do DS isolado do camarão foram assinalados de acordo com os sinais descritos na literatura para o dermatam sulfato de mamíferos (Bossennec *et al.*, 1990) (Tabelas 2 e 3). Os principais sinais anoméricos identificados para o DS do crustáceo são ácido glucurônico (GlcA) (106,0 ppm), galactosamina N-acetilada, (Gal_{NAC, x}), (103,0 ppm), que pode estar ou não, sulfatada em C-4 e/ou C-6 e ácido idurônico 2-O-sulfato (I_{2S}) (102.0 ppm) (Figuras 15 e 16). Além disso, é claramente evidente na região do C-2, o sinal mais intenso, atribuído a Gal_{NAC} sulfatada em C-4 (Gal_{NAC,4S}) (54,2 ppm) em comparação com aquela sulfatada em C6 (Gal_{NAC,6S}) (53,3 ppm). Adicionalmente, na região C-6, também é evidente a maior intensidade do sinal correspondente a Gal_{NAC} livre de substituição em C6 (Gal_{NAC, 6OH}) (63,2 ppm)

comparado ao sinal do Gal_{NAC, 6S}. É bem evidente, também a 75,0 ppm, o sinal característico correspondente ao C-2 dos resíduos de GlcA (G2). A análise mais detalhada da estrutura desse DS isolado do camarão foi obtida por espectroscopia bidimensional HSQC, que mostra os sinais de correlação entre os picos do espectro ¹H-RMN com os picos do espectro ¹³C-RMN (Figura 16). Na região anomérica é evidente a predominância dos resíduos de GlcA (4,58 ppm/ 106,0 ppm) em relação aqueles de I_{2S} (5,22 ppm/102,0 ppm). Além disso, não são identificados os sinais de correlação dos resíduos de ácido idurônico (I). Na região H-2/C-2 do espectro, fica evidente a predominância de resíduos de GalNAc4S (4,0 ppm/54,0 ppm) em relação aqueles do GalNAc6S (4,02 ppm/53,8 ppm).

Embora a presença de alguns sinais menores, possa ser indicativo da ocorrência de outros glicosaminoglicanos, o sinal intenso visualizados em torno de 25 ppm, atribuído ao grupo acetil (CH₃CO⁻), comprova que o dermatam sulfato, é de fato o GAG predominante nesta fração.

Tabela 2

Sinais Químicos do próton ^1H para os resíduos de IdoA e GalNAc dos DS de mamíferos e do camarão *Litopenaus schimitti*

Unid.	Próton	Sinais Químicos		
		Mamíferos ^a	Valores da literatura Ascidian ^b	Camarão
α -L-D- IdoA-(2SO ₄)	H1	5.22	5.2	5.22
	H2	4.4	4.33	Ni
	H3	4.2	4.20	Ni
	H4	4.1	4.06	Ni
	H5	4.8	4.80	4.79
α -L- IdoA	H1	5.0	4.96	Ni
	H2	3.53	3.52	Ni
	H3	3.90	4.06	Ni
	H4	4.10	4.06	Ni
	H5	4.72	4.80	Ni
β -D-GalNAc-(4SO ₄)	H1	4.70	4.88 ^c	4.6
	H2	4.05	4.02 ^c	4.0
	H3	4.03	4.01 ^c	Ni
	H4	4.69	4.64 ^c	4.71
	H5	3.80	3.80 ^c	Ni
	H6	3.79	3.79 ^c	Ni
β -D-GalNAc-(6SO ₄)	H1		4.64	4.65
	H2		4.02	4.02
	H3		3.86	Ni
	H4		4.15	4.15
	H5		3.86	Ni
	H6		4.25	4.2
GlcA ^d	H1	4.506		4.5
	H2	3.371		3.4
	H3	3.521		Ni
	H4	3.521		Ni
	H5	3.766		Ni

^a Valores para o DS de mamíferos a 37°C- Bossennec *et al.*, 1990.

^b Valores para o DS *Ascidian.nigra* a 60°C Pavão *et al.*, 1995

^c Valores para o DS *H.pyriformis* a 60°C., 1996. Pavão *et al.*, 1996

^d Iacomini *et al.*, 1999

* Valores para o DS *L.schimitti* a 40°C.

Ni – Não identificado

Tabela 3

Sinais Químicos ^{13}C para os resíduos de IdoA e GalNAc dos DS de mamíferos e do camarão *Litopenaeus schimitti*

Unid.	Carbono	Sinais Químicos		
		Mamíferos ^a	Valores da literatura Ascidian ^b	Camarão
α -L-D- IdoA-(2SO ₄)	C1	101.4	101.3	102.0
	C2	78.3	77.7	Ni
	C3	69.0	71.0	Ni
	C4	79.2	80.3	Ni
	C5	71.7	71.1	72.0
α -L- IdoA	C1	105.7		Ni
	C2	72.0		Ni
	C3	73.7		Ni
	C4	82.7		Ni
	C5	72.0		Ni
β -D-GalNAc-(4SO ₄)	C1	104.7	105.3 ^c	104.0
	C2	54.8	54.2 ^c	54.0
	C3	78.1	77.8 ^c	Ni
	C4	78.9	78.5 ^c	79.0
	C5	77.3	77.0 ^c	Ni
	C6	63.7	63.5 ^c	63.5
β -D-GalNAc-(6SO ₄)	C1		104.0	103.0
	C2		54.2	53.8
	C3		82.5	Ni
	C4		70.4	Ni
	C5		76.5	Ni
	C6		69.7	70.0
GlcA ^d	C1	104.9		106.3
	C2	75.6		75.0
	C3	78.0		Ni
	C4	74.3		Ni
	C5	78.6		Ni
	C6	177		Ni

^a Valores para o DS de mamífero. Bossennec *et al.*, 1990

^b Valores para o DS *A. nigra* a 60°C. Pavão *et al.*, 1995.

^c Valores para o DS *H. pyriformis* a 60°C Pavão *et al.*, 1996

^d Iacomi *et al.*, 1999

* Valores para o DS *L. schimitti* a 40°C.

Ni – Não identificado

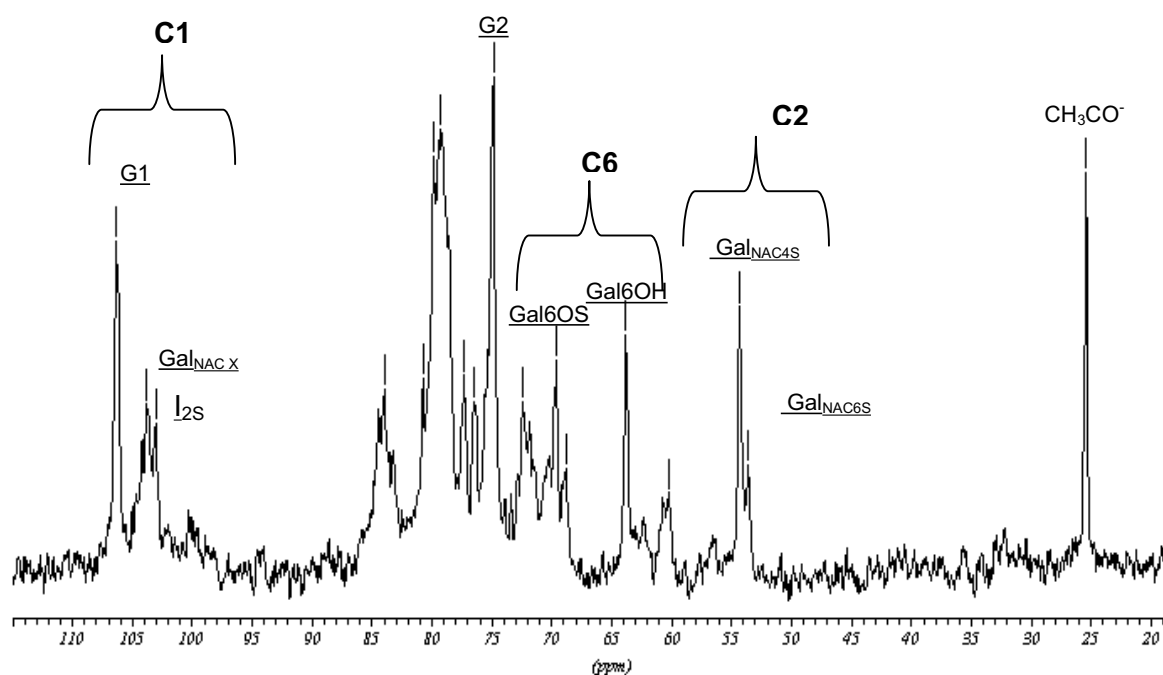


Figura 15: Espectroscopia de RNM ^{13}C a 125 MHz do DS isolado do camarão. G= Ácido glucurônico, I= Ácido idurônico.

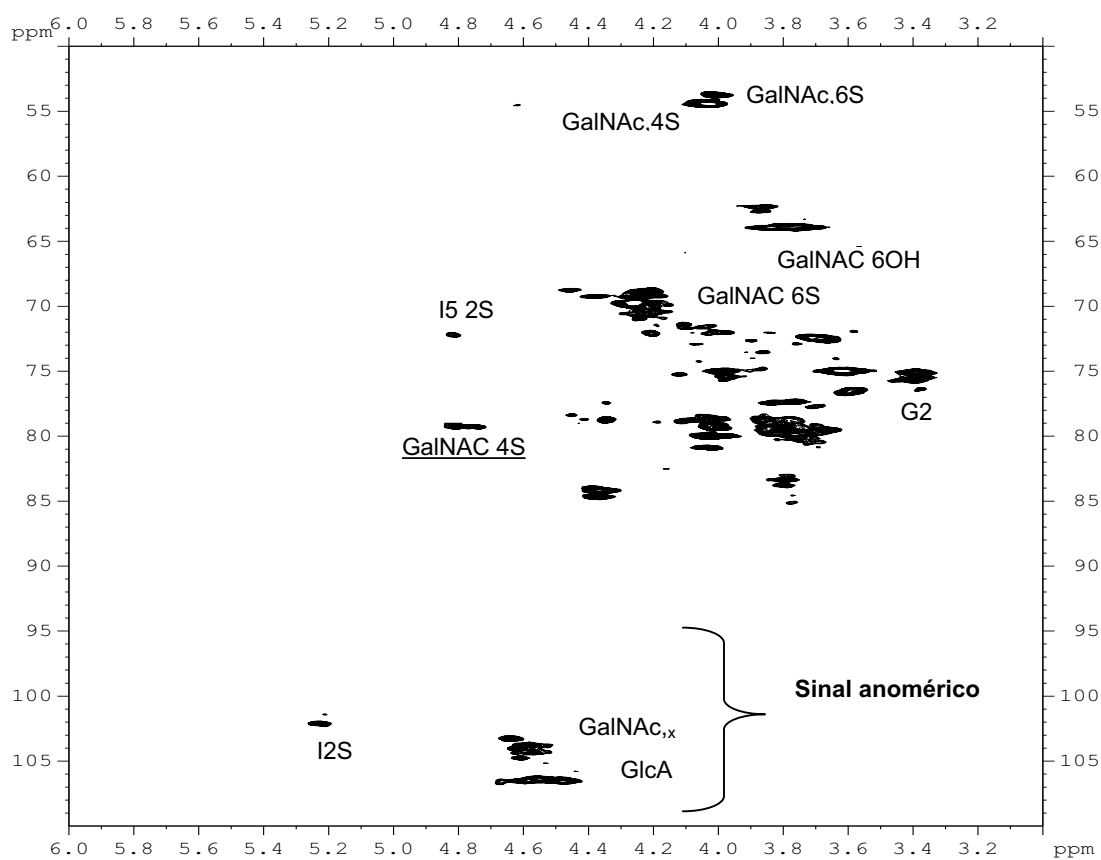


Figura 16: Espectro HSQC do DS isolado do camarão. A= Glucosamina, G = ácido glucurônico, GalNac= N-acetil galactosamina, I= ácido idurônico.

4.5. Efeito do DS sobre a migração leucocitária na cavidade peritoneal

O dermatam sulfato isolado do corpo do camarão *L.schmitti* foi submetido a ensaios farmacológicos para avaliar seu efeito na migração leucocitária durante uma resposta inflamatória aguda. A inflamação peritoneal foi induzida por injeção de tioglicolato e o número de células recrutadas para a cavidade peritoneal foi medida como um indicativo do grau da inflamação (Figura 16). O número basal das células residentes na cavidade peritoneal foi determinado pela administração de soro fisiológico. Após induzir a inflamação com o tioglicolato, o qual promove uma reação inflamatória aguda, caracterizada pela infiltração de granulócitos e macrófago, ocorreu um aumento significativo do número de células inflamatórias no local da injúria. Após tratamento com o dermatam sulfato, em concentrações crescentes, D5, D10 e D15 µg/kg animal, foi observada uma redução no recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal. No entanto, essa redução foi mais significativa ($P < 0,001$) na concentração de 15 µg/kg, quando comparado com os animais controle (apenas com o tioglicolato), chegando a reduzir a infiltração celular em 65%. Nas demais concentrações avaliadas a redução não foi significativa apresentando uma redução na infiltração celular de 19% e 28% , respectivamente (Figura 17).

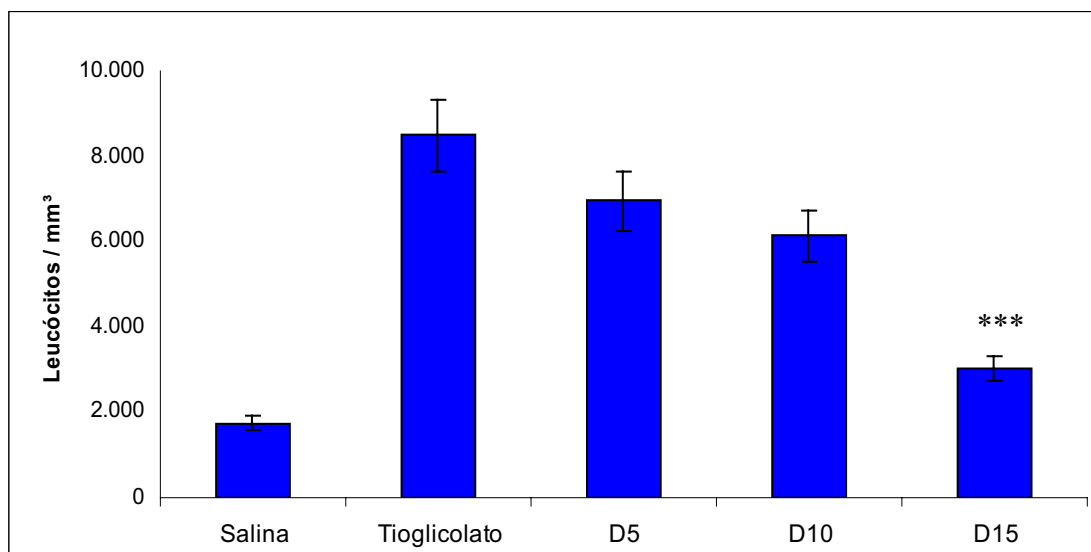


Figura 17: Curva dose-resposta do DS do camarão *L. schimitti* sobre a migração leucocitária. Foi utilizado o modelo inflamatório de peritonite induzida por injeção de tioglicolato em ratos da linhagem *Wistar*. Cada coluna representa os valores médio \pm DP; n=5 (***) $P < 0.001$.

4.6. Efeito do tratamento do DS do camarão sobre os níveis de proteína total no lavado peritonial

Os níveis de proteína no lavado peritonial nos animais tratados com o DS foram significativamente menores ($P < 0,001$) quando comparados com os animais controle, no modelo induzido por tioglicolato, como demonstrado, na figura 18. Entre os animais tratados não houve diferença significativa na concentração de proteínas, sugerindo que o DS independente das concentrações testadas (D5, D10 e D15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ animal), atenuaria o acúmulo de proteínas no local da injúria durante a resposta inflamatória, chegando a reduzir os níveis de proteína no exudato peritonial, nas concentrações testadas, em aproximadamente 50%. A diminuição na concentração de proteínas no lavado peritonial foi observada para todas as concentrações testadas do dermatam sulfato, porém na concentração de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ apresentou uma inibição superior quando comparada às demais doses, reduzindo aproximadamente 60% à passagem de proteínas plasmáticas para o exudato peritonial.

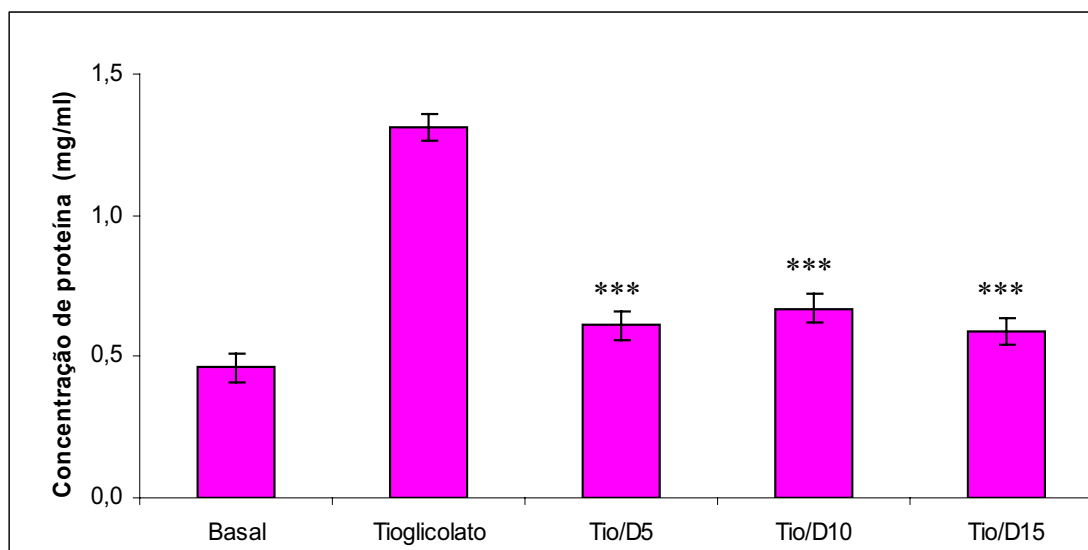


Figura 18: Efeito do DS do camarão sobre a concentração total de proteínas do lavado peritoneal. D5 (5µg/kg), D10 (10µg/kg) e D15(15µg/kg) Os sobrenadantes foram preparado após centrifugação do lavado peritoneal. A quantificação protéica foi realizada utilizando o método de Bradford. Cada coluna representa os valores médio ± DP; n=5 e (***)P< 0,001).

4.7. Efeito do dermatam sulfato sobre a composição celular sangüínea após indução da inflamação com tioglicolato

A redução observada no número total de células no exudato peritoneal proporcionou a avaliação do efeito preferencial do dermatam sulfato isolado do camarão sobre uma específica subpopulação de leucócitos. Para analisar este efeito, a contagem diferencial de leucócitos no lavado peritoneal foi realizada. Como apresentado na Figura 19, a análise qualitativa da composição celular sangüínea dos animais tratados foi basicamente similar ao encontrado para os animais controles, sugerindo que o influxo de toda a subpopulação leucocitária foi igualmente afetada pelo tratamento com o dermatam sulfato.

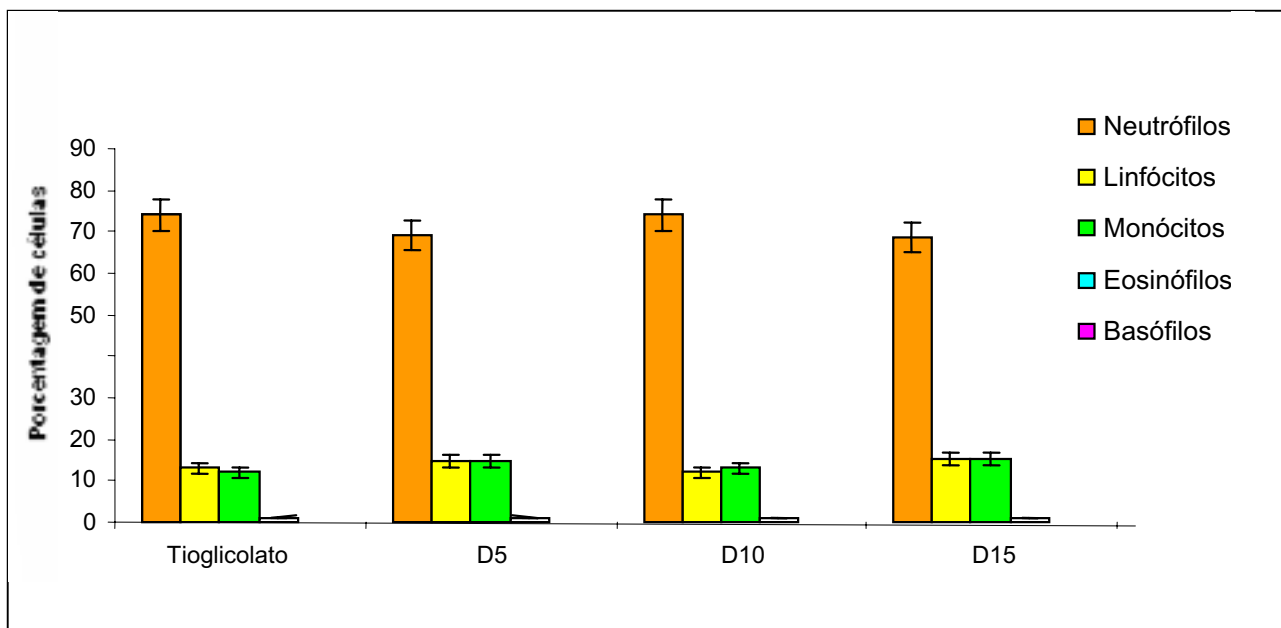


Figura 19: Efeito do DS isolado do camarão sobre a composição celular sangüínea após indução da peritonite em ratos *Wistar*. Amostras de sangue (1 ml) foram coletados da veia porta dos ratos tratados com o DS do camarão *L. schmitii* em diferentes proporções D5 (5 μ g), D10 (10 μ g) e D15 (15 μ g) e dos animais controle (tioglicolato). Após preparação do esfregaço sangüíneo, a composição celular foi examinada por microscopia óptica. N=3.

4.8. Inibição da agregação plaquetas-leucócitos pelo DS isolado do camarão.

Para avaliar a habilidade do dermatam sulfato, isolado do camarão, em inibir a interação celular foi realizado o ensaio de adesão plaquetas-leucócitos. Os resultados demonstraram que este polissacarídeo é capaz de inibir a adesão destas células em torno de 40%, utilizando uma concentração de 0,5 mg/mL. Além disso, podemos sugerir que esta interação é dose dependente, visto que em concentrações menores, (0,02 mg/mL) já ocorre redução, de aproximadamente 20%, na adesão celular (Figura 20).

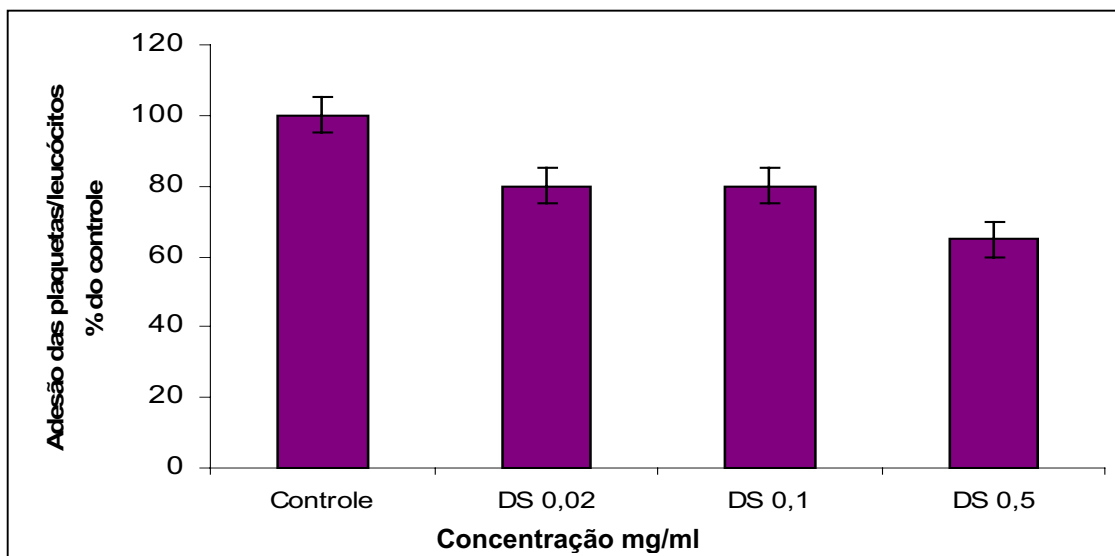


Figura 20: Efeito inibitório do dermatam sulfato isolado do camarão sobre a adesão plaquetas/leucócitos. O controle corresponde a adesão dos leucócitos as plaquetas na proporção de 1/10 sem o DS. DS 0,02 (0,02mg/ml), DS 0,1(0,1mg/ml)

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho relatamos a presença predominante de compostos semelhantes a heparina de mamíferos (heparinóides) no abdômen e principalmente, no cefalotórax do camarão marinho *Litopenaeus schmitti*. Estes compostos foram identificados por análises eletroforéticas no sistema descontínuo acetato de bário/PDA, que distingue a heparina dos demais GAG por fracioná-la em seus compostos de migração rápida e lenta. Os heparinóides isolados do camarão apresentam predominantemente os componentes de migração rápida, indicando que são constituídos por dissacarídeos pouco sulfatados. Visto que, nesse sistema, heparinas de migração rápida apresentam uma menor massa molecular e são constituídas predominantemente por dissacarídeos não sulfatados ou dissulfatados (Volpi, 1993). Entretanto, as heparinas de migração lenta, são predominantemente constituídas por dissacarídeos trissulfatados (56%), e apresentam uma maior massa molecular (VOLPI, 1993). Além disso, o comportamento eletroforético apresentado pelos heparinóides isolados do camarão é semelhante ao encontrado em outras espécies de crustáceos como o camarão *Litopenaeus vanammei* (BRITO, 2005), a lagosta *Panulirus laevicauda* (SILVA, 2003) e o caranguejo *Goenopsis cruetata* (Andrade,2006).

A atividade anticoagulante do heparinóide proveniente do cefalotórax do camarão (heparinóide C) (90UI/mg) foi maior quando comparado com heparinóides isolados de outras espécies de crustáceos, como o *Ucides cordatus* (60 UI/mg), *Dendrocephalus brasiliensis* (52 UI/mg) e praticamente equivalente à heparina de baixo peso molecular isolada do cefalotórax do camarão *Penaeus brasiliensis* (95

UI/mg) (DIETRICH *et al.*, 1999). No entanto, apresenta menores valores quando comparada à atividade anticoagulante da heparina não fracionada de mamíferos (179UI/mg). A predominância de compostos de migração rápida encontrada para o heparinóide C, sugere que este composto seja constituído, principalmente, por dissacarídeos dissulfatados, sendo um indicativo da escassez da seqüência pentassacarídica específica para a interação com a AT (CAVALCANTE *et al.*, 2000). O heparinóide isolado do abdômen do camarão (heparinóide A) apresentou uma atividade anticoagulante ainda menor (45 UI/mg) quando comparada com o heparinóide C, sugerindo que seja constituído principalmente por dissacarídeos não sulfatados. Heparinóides com características estruturais distintas e eficiente atividade anticoagulante, via cofator II da heparina (HCII) foram identificados na *Artemia franciscana* (CHAVANTE *et al.*, 2000). Este composto apresentava características estruturais distintas para o HS isolado de mamíferos, apresentando-se predominantemente constituído por dissacarídeos contendo ácido glucurônico unido a glucosamina N-sulfato e 6-sulfato (GluA-GlcNS,6S) e ácido idurônico unido a glucosamina N-sulfato.

A presença de compostos em invertebrados marinhos que agem sobre proteínas do sistema de coagulação de mamíferos, é extraordinária, visto que esses animais não possuem um sistema de coagulação tão complexo e envolve proteínas totalmente diferentes. A função biológica da heparina nesses animais ainda é enigmática. Alguns pesquisadores têm sugerido que o papel desses compostos anticoagulantes, em animais marinhos, está relacionado a mecanismos de defesa, principalmente na imobilização de microorganismos ou patógenos que invadem o corpo destes animais (CAVALCANTE *et al.*, 2000). A função biológica da heparina, mesmo em mamíferos, ainda não está completamente elucidada, visto que,

diferentemente dos demais glicosaminoglicanos, foi encontrada exclusivamente no interior dos mastócitos (KITAMURA; GO, 1979; MARSHALL *et al.*, 1994) sendo liberada destas células em resposta a agentes inflamatórios específicos. Além disso, tecidos que estão em contato com o meio externo, como pele, pulmão e intestino, e órgãos de defesa, como o timo, nódulos linfáticos apresentam elevadas concentrações de heparina (NADER *et al.*, 1999) sugerindo que este GAG estaria associada a mecanismos de defesa e seus efeitos exógenos são conseqüências desta ação principal.

Utilizando o modelo da cauda escarificada em ratos, desenvolvido por Cruz e Dietrich, (1967) foi avaliado o efeito hemorrágico residual dos heparinóides A e C isolados dos tecidos do camarão. Neste experimento, a aplicação tópica da heparina na lesão causa um intenso sangramento, mesmo após a cauda ser intensamente lavada com soro fisiológico, por isso esse efeito foi denominado de efeito hemorrágico residual. Os resultados obtidos confirmam a hipótese de que a ação hemorrágica é independente da atividade anticoagulante, visto que o heparinóide C apresentou uma atividade anticoagulante maior quando que o heparinóide A, no entanto ambas apresentaram potenciais de sangramento equivalentes. Além disso, ratifica a hipótese de que estes heparinóides são constituídos predominantemente por dissacarídeos pouco sulfatados, visto que estudos anteriores relatam a importância de dissacarídeos trissulfatados para desencadear um efeito hemorrágico significativo (DIETRICH *et al.*, 1999).

Nenhum trabalho anterior relata a presença de compostos tipo DS em crustáceos, embora tenha sido descrito em outros invertebrados marinhos, como nas ascídias e ouriços do mar (PAVÃO *et al.*, 1995; PAVÃO *et al.*, 1996; VILELA-SILVA *et al.*, 2000). O dermatam sulfato isolado dos tecidos do camarão *L.schmitti*

apresenta-se constituído predominantemente por dissacarídeos dissulfatados diferindo do DS de mamíferos, constituído principalmente por IdoA-GalNAC_{4S} (LINHARDT; HILEMAN, 1995). As análises de espectroscopias de RMN revelaram a presença de sinais atribuídos ao ácido glucurônico, idurônico 2-O-sulfato, N-acetil-galactosamina 4-O-sulfato e 6-O-sulfato. Estes dados sugerem que o DS do camarão é constituído por: GlcA-GalNAC_{4,6S}; IdoA_{2S}-GalNAC_{4S} e GalNAC_{6S}. A elevada proporção de resíduos de ácido glucurônico e a ausência de sinais químicos atribuídos ao ácido idurônico não sulfatados, revela que a cadeia do DS do camarão apresenta características estruturais distintas quando comparado com os de mamíferos e de outros invertebrados marinhos. Alguns autores têm demonstrado que a proporção de ácido glucurônico nas cadeias do dermatam sulfato é dependente do tecido de origem (THEOCHARIS *et al.*, 2001). Por exemplo, o DS isolado da pele bovina é constituído, em 84% por unidades dissacarídicas contendo IdoA-GalNAC_{4S}, entretanto, o DS isolado da cartilagem é constituído, em 75% por dissacarídeos contendo GlcA-GalNAC_{4S} (CHOI *et al.*, 1989). Além disso, o DS isolado de outras espécies marinhas, também apresenta características estruturais peculiares. Os DS isolados das ascídias que apresentam exclusivamente, resíduos de IdoA_{2S}, porém diferentes padrões de sulfatação para as unidades de GalNAC. As ascídias *Stela plicata* e *Holocynthia pyriformis* tem unidades de galactosamina 4-O-sulfatadas, entretanto *Ascidian nigra* apresenta-se 6-O-sulfatadas, além disso, embriões do ouriço do mar *Strongylocentrotus purpuratus* sintetizam um DS com unidades GalNAC_{4S6S} (PAVÃO *et al.*, 1995; 1996; 1998).

A investigação do efeito do DS do camarão sobre a migração leucocitária foi avaliada através do modelo de inflamação aguda induzida por tioglicolato. Os resultados obtidos demonstram a capacidade deste composto em reduzir a migração

dos leucócitos. Provavelmente, pela interação com as citocinas e quimiocinas, encontradas na superfície das células endoteliais ou na matriz extracelular, onde promovem a migração e ativação leucocitária (CRIPPS *et al.*, 2005). O DS, como o principal GAG encontrado na matriz, estaria envolvido diretamente na interação com estas proteínas, no entanto o efeito adicional do DS do camarão neste modelo experimental proporcionaria uma inibição da interação das citocinas e quimiocinas com seus receptores específicos diminuindo assim o recrutamento de leucócitos para o local da injúria. Outra hipótese sugerida seja a interação deste glicosaminoglicano com as proteínas de adesão, especialmente a P-e a L-selectina. Estas moléculas medeiam os eventos iniciais do rolamento dos leucócitos (WANG *et al.*, 2005). Logo, compostos que bloqueiem esta interação impedem os eventos subsequentes culminando na redução da passagem destas células do espaço vascular para o sítio inflamatório. (NELSON *et al.*, 1993; WANG, 2005; XIE, 2000; WANG 2002) relatam a heparina 6-O-sulfatada como um potente inibidor da infiltração leucocitária, mediado pela interação com as selectinas. Acredita-se que esta interação seja mediada pelo teor de sulfatação apresentado por este glicosaminoglicano, que pode estar mimetizando as cargas negativas dos ligantes específicos para estas moléculas de adesão (LEY, 2000). Apesar da notável habilidade da heparina em interagir com estas moléculas de adesão, nenhum outro GAG havia sido avaliado neste processo. Por isso os resultados obtidos para o DS isolado do camarão são promissores, além de ampliar as perspectivas para a procura de novos agentes farmacológicos.

Outro parâmetro utilizado para avaliar a influência do DS do camarão sobre a resposta inflamatória foi a determinação da concentração de proteínas no exudato peritoneal. Os resultados obtidos demonstraram a eficiência deste polissacarídeo na

redução dos níveis protéicos durante o processo inflamatório no modelo biológico escolhido. Dados na literatura afirmam que as citocinas e/ou quimiocinas promovem a rápida expressão de P-selectinas sobre as células endoteliais alterando a permeabilidade vascular e permitindo a passagem de proteínas do plasma para o local da injúria. (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Diante do exposto, acredita-se que o efeito do DS do camarão sobre os níveis de protéicos do exudato peritoneal poderia ser reflexo da interação deste composto com as citocinas/quimiocinas. Por isso drogas que diminuam a permeabilidade vascular e a migração celular, poderiam auxiliar no controle da resposta inflamatória (SHERWOOD;TOLIVER-KINSKY 2004).

O efeito inibitório do DS do camarão sobre a adesão de plaquetas/leucócitos, corrobora com a hipótese de que este polissacarídeo também possa está interagindo com as selectinas, especialmente neste caso com a P-selectina, visto que estudos têm evidenciado que a P-selectina e as integrinas β_2 (CD11b/CD18) estão envolvidas diretamente na adesão destas células (EVANGELISTA *et al.*, 1999). Por isso, é sugerido que o DS isolado do crustáceo interagiria com esta molécula de adesão resultando no bloqueio do sítio de ligação para os seus ligantes específicos e conseqüentemente favorecendo a modulação da resposta inflamatória.

Quanto mais se conhece a biodiversidade marinha, maior a probabilidade da descoberta de novas substâncias com potenciais farmacológicos (MUNRO *et al.*, 1999), pois a diversidade química está diretamente ligada à biológica, e neste aspecto merecem ser destacados os invertebrados marinhos, pois estes organismos são fontes promissoras de compostos biologicamente ativos.

6. CONCLUSÕES

Com base na análise dos dados obtidos podemos concluir que:

- Os heparinóides são os glicosaminoglicanos predominantes no cefalotórax e no abdômen do crustáceo.
- O heparinóide C apresentou uma atividade anticoagulante superior ao heparinóide A, entretanto, ambos apresentaram um baixo efeito hemorrágico residual.
- As análises de espectroscopia de RNM do DS isolado do camarão revelaram a predominância de sinais químicos característicos para os resíduos de GlcA, IdoA2S, e GalNAC,4S.
- O DS do camarão reduziu significativamente a infiltração celular e a concentração protéica no exsudato peritonial durante a resposta inflamatória aguda e a adesão plaquetas/leucócitos *in vitro*.
- Os glicosaminoglicanos sulfatados isolados do camarão *L. schmitti* podem servir como fonte alternativa para a obtenção de compostos bioativos, com importantes ações farmacológicas sobre a coagulação sanguínea e a migração leucocitária, podendo surgir como princípios ativos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

REFERÊNCIAS

ALBANO, R. M & MOURÃO, P. A. S. 1986. Isolation, fraction, and preliminary characterization of a novel class of sulfated glycans from the tunic of *Styela plicata* (Chordata Tunicata). **J. Biol. Chem.** 261, 758–765.

ALVES *et al.*, 1998. Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structures of their egg jelly sulfated fucans. **Glycobiology**. 8, 939-946.

ALVES *et al.*, 1997. Sulfated Polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. **Journal Biological Chemistry**. 14, 6965-6971.

BARTOLUCCI, *et al.*, 1995. Inhibition of human leukocyte elastase by chemically and naturally oversulfated galactosaminoglycans. **Carbohydrate Research**. 276, 401-408.

BERNFIELD *et al.*, 1999. Functions of cell surface heparin sulfate proteoglycans. **Annu. Rev. Biochem.** 68. 729-777.

BERNFIELD *et al.*, 1992. Biology of the siNecan: a family of transmembrane heparin sulfate proteoglycans. **Annu. Rev. Cell. Biol.** 8, 365-369.

BORSIG, L. 2004. Selectins facilitates carcinoma metastasis and heparin can prevent them. **News Physiol Sci**. 19, 16-21.

BOSENNEC; PETITOU; PERLY. 1990. ¹H-NMR, investigation of naturally occurring and chemically oversulphated dermatan sulphates. **Biochem. J.** 267, 625–630.

BOISSON-VIDAL *et al.*, 1995. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs of the future**. 20, 1237-1249.

BRITO, A.S. 2005- Aproveitamento do cefalotórax do *Litopenaeus vannamei* para a obtenção da heparina – Monografia. Departamento de Bioquímica-UFRN Natal/RN

CAVALCANTE, *et al.*, 2000. Occurrence of heparin in the invertebrate *Styela plicata* (Tunicata) is restricted to cell layers facing the outside environment. **Journal Biological Chemistry**. 275, 36189-36196.

CESSARETTI *et al.*, 2004. Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from the clam *Tapes philippinarum*. Evidence for the presence of a high content of antithrombin III-binding site. **Glycobiology** 14, 1275-1284.

CHAVANTE *et al.*, 2000. A novel heparan sulphate with high degree of N-sulphation and high heparin cofactor-II activity from the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Int. J. Biol. Macromol.** 27, 49-57.

CHOI *et al.*, 1989. Characterization of the Dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. **J. Biol. Chem** 264, 2876-2884.

COOMBE *et al.*, 1987. Analysis of the inhibition of tumor metastasis by sulphated polysaccharides. **Int. J. Cancer.** 39, 82-88.

CRIPPS *et al.*, 2005. Modulation of acute inflammation by targeting glycosaminoglycan-Cytokine interactions. **International Immunopharmacology.** 5, 1622-1632.

CRUZ; DIETRICH 1967. Antihemostatic effect of heparin counteracted by adenosine triphosphate. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 126, 420-426.

DAY; LANDANDIS; TAYLOR. 2004. Heparin Is Much More Than Just an anticoagulant. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia,** 18, 93-100.

DESLANDIES *et al.*, 2000. Preliminary study of the in vitro antiproliferative effect of a hydroethanolic extracts from the subtropical seaweed *Turbinaria ornata* on a human non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line (NSCLC-N6). **J. Appl. Phycol.** 12, 257-262.

DIETRICH *et al.*, 1985. Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliensis*. **Biochim. Biophys. Acta.** 843, 1-7.

DIETRICH *et al.*, 1999. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. **Biochimica et Biophysica.** 1428, 273-283.

DIETRICH *et al.*, 1999. Structural features and bleeding activity of commercial low molecular weight heparins: Neutralization by ATP and protamine. **Seminars Thrombosis and Hemostasis.** 25, 43-50.

DIETRICH *et al.*, 1995. A new approach for the characterization of polysaccharides from algae : presence of four main acids polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**. 108, 143-153.

DISHE,, Z. 1947. A new specific color reaction of hexuronic acid. **J.Biol.Chem.** 167, 189-198.

DURIG *et al.*, 1997. Anticoagulant fucoidan fractions from *Fucus vesiculosos* induce platelet activation in vitro. **Trombosis Research**.85, 479-491.

ELLOUALI; BOISSON-VIDAL; JOZEFONVISCZ. 1994. Antiproliferative effect and interaction of fucans with cells. **Colloids Surf B: Biointerfaces**. 2, 305-314.

ESKO, J.D. 1991. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 3, 805-816.

EVANGELISTA *et al.*, 1999. Platelet/Polymorphonuclear Leukocyte interactions : P-selectin triggers protein-Tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD 18 adhesion: Role of PSGL-1 as a Signaling molecule. **Blood**. 93, 876-885.

FAURSCHOU; BORREGAARD. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and infection** 5, 1317-1327.

FERRANDIZ *et al.*, 1994. Avarol and avaronetwo new anti-inflammatory agents of marine origin. **Eur. J.Pharmacol.** 253, 75-82.

FOLSKAMN; INGBER. 1989. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. **J. Cell. Biol.** 109. 317-330.

GUERINNI *et al.*, 2005. Complex glycosaminoglycans: profiling substitution patterns by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytical Biochemistry**. 337, 34-47.

GIL *et al.*, 1995.Effects of marine 2-polyprenyl-1,4-hydroquinones on phospholipase A₂ activity and some inflammatory responses. **European Journal of Pharmacology**. 285, 281-288.

GIRAUX *et al.*, 1998. Modulation of human endothelial cell proliferation and migration by fucoidan and heparin. **Eur. J.Cell. Biol.** 77, 352-359.

HAROUAND-BOUHEJA *et al.*, 2000. Relation between sulfate groups and biologicval activities of fucans. **Tromb. Res.** 100. 453-459.

HERENCIA *et al.*,1998. Anti- Inflammatory activity in mice of extracts from Mediterranean marine invertebrate. **Life Science.** 62, 115-120.

IACOMINI *et al.*,1999. "Linkage Region " Sequences of Heparins and Heparan Sulfates: Detection and Quantification by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Analytical Biochemistry** 274, 50-58.

IOZZO; MURDUCH. 1996. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene aNi protein side offer novel perspectives in molecular diversity and fuction. **FASEB J.** 10, 598-614.

IOZZO, R.V. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular functions. **Annu. Rev. Biochem.** 67, 609-652.

IOZZO, R.V. 1999.The biological of the small leucine-rich proteoglycans. **J.Biol.Chem.** 274, 18843-18846.

JORDAN; MARCUM.1986. Anticoagulant active heparin from clam (*Mercenaria mercenaria*). **Arch.Biochem.Byophys.** 248.690-695.

KITAMURA; GO. 1979. Decreased production of mast cells in S1/S1d anemic mice. **Blood** 53, 492-497.

KOENING *et al.*, 1998. Differential interactions of Heparin and Heparan Sulfate glycosaminoglycans with the selectins implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. **Journal Clinical Investigation.** 101, 877-889.

KRUSIUS; RUOSLAHTI. 1986. Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83, 7683-7628.

LANE; SORLURSCH. 1991.Primary mesenchyme cell migration requires a chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan. **Dev.Bio.**143, 389-397

LEY, K. 2003. The role of selectins in inflammation and disease. **Trends Molecular Medicine**, 9, 263-268.

LINHARDT; HILEMAN. 1995. Dermatan Sulfate as potential therapeutic agent. **Gen. Pharmac** 26, 443-451.

LUPPI; CESARETTI; VOLPI. 2005. Purification and characterization of heparin from the italian clam *Callista chione*. **Biomacromolecules**. 6, 1672-1678.

MARSHALL *et al.*, 1994. Morphological and Functional characteristic of peritoneal mast cells from young rats. **Cell Tissues Res** 276, 565-570.

MEDEIROS *et al.*, 2000. Distribution of sulfated Glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta*.1475, 287-294.

MOURÃO *et al.*, 1996. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm: sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. **Journal Biological Chemistry**. 27, 23973-23984.

MOURÃO *et al.*, 1998. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. **Br.J. Haematol**. 101, 647-652.

MOURÃO; PERLIN. 1987. Structural features of sulfated glycans from the tunic of *Stela plicata* (Chordata-Tunicata): A unique occurrence of L-galactose in sulfated polysaccharides. **Eur. J. Biochem**. 166, 431 -436.

MULLOY *et al.*, 1994. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0-2 and 0-4 positions. **Journal Biological Chemistry**. 2, 22113-22123.

MULLOY, B. 1996. High-field NMR as a technique for the determination of polysaccharides structure. **Mol. Biotechnol** 6, 241-265.

MULLOY; MOURÃO; GRAY. 2000. Structure/functions studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **Jounal Biotechnology**. 77, 123-135.

MUNRO *et al.*, 1999. The discovery and development of marine compound with pharmaceutical potential. **Journal of Biotechnology**. 70, 15-25.

NADER; TERSARIOL; DIETRICH. 1989. Antihemostatic activity of heparin disaccharides and oligosaccharides obtained by chemical and enzymatic fragmentation: Reversal of the hemorrhagic activity by ATP and myosin. 1989. **Tromb. Res.** 54. 207-214.

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

NADER; DIETRICH. 1989. Natural occurrence and possible biological role of heparin. In heparin: chemical and biological properties. **Edward Arnold Ltd.** London, pp. 81-96.

NAKAMORI *et al.*, 1997. Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis^x in colorectal cancer metastasis. **Springer.** 40, 420-431.

NELSON *et al.*, 1993. Heparin Oligosaccharides BiNi L- and P-Selectin and Inhibit Acute Inflammation. 1993. **Blood.** 82, 3253-3258.

NISHINO; AIZU; NAGUMO. 1991. An anticoagulant fucoidan from brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Phytochemistry.** 30. 535-539.

PAVÃO; MOURÃO. 1995. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from Ascidian. Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. **Journal Biological Chemistry.** 29, 31027-31036.

PAVÃO, M.S, 1996. Unique sulfated polysaccharides from ascidians (Chordata, Tunicata). **Braz.J.Med Biol Res.** 29, 1227-1233.

PAVÃO *et al.*, PA. 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from Ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. **J.Biol.Chem.** 273, 27848-57.

PEIJLER *et al.*, 1987. Structure and antithrombin-binding properties of heparin isolated from the clams *Anomalocardia brasiliensis* and *Tivela mactroides*. **J. Biol. Chem.** 262, 11413-11421.

PEREIRA *et al.*, 1999. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans: Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. **Journal Biological Chemistry.** 19, 7656-7667.

PEYVANDI *et al.*, 2002. Rare coagulation deficiencies. **Blackwell Publishing.** 8, 308-321.

PINHAL *et al.*, 1994a. Binding of heparin molecules able to produce the accumulation and change of the sulfation pattern of an antithrombotic heparan sulfate proteoglycan. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 27, 2191-2195.

PINHAL *et al.*, 1995. Minimum fragments of the heparin molecules able to produce the accumulation and change of sulfation pattern of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial cells. **Thromb. Haemost.** 74, 1169-1174.

RAMAN; SASISEKHARAN. 2006. Review structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interaction. **Chemistry & Biology**, 12, 267-277.

RIOU *et al.*, 1996. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. **Anticancer Res.** 16, 1213-1218.

ROCHA, H.A.O., 2002. Caracterização de uma fucana da alga *Spatoglossum schroederi* e análise de suas atividades anti-adesiva, antimigratória, antiproliferativa e antituberculosa. São Paulo-SP [Tese-Doutorado- Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina- Depto. Bioquímica.

SAKAI *et al.*, 2003. Purification and characterization of dermatan sulfate from the skin of the eel, *Anguilla japonica*. **Carbohydrate Research** 338, 263-269.

SANTOS *et al.*, 2002. Mast cell are present in epithelial layers of different tissues of mollusc *Anomalocardia brasiliensis*. In situ Characterization of heparin and a correlation of heparin and histamine concentration. **Histochemical Journal**. 34, 553-558.

SANTOS *et al.*, 1992. Structural diversity among sulfated alpha-L-galactans from ascidians (tunicates). Studies on the species *Ciona intestinalis* and *Herdmania monus*. **European Journal of Biochemistry**. 204, 669-677.

SCHOENMARKERS; REITSMA; SPEK. 2005. Blood coagulation factors as inflammatory mediators. **Blood Cell Mol Dis.**34, 30-37.

SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY. 2004. Mechanism on the inflammatory response. **Best Practice e Research Clinical Anaesthesiology**. 18, 385-405.

SIMON *et al.*, 2000. Acute severe thrombocytopenia after c7E3 Fab (abciximab) therapy in a patient with unstable angina and stenting of the right coronary artery occurrence of subacute stent thrombosis and safe readministration of the GPIIb/ IIIa inhibitor tirofiban. **Inst.J.Cardiovascular Intervent.** 3,185-188.

SOEDA *et al.*, 2000. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. **Biochem. Biophys. Acta.**1497, 127-134.

SOEDA; OHMAGUGI; SHIMENO. 1997. Inibitory effect of oversulfated fucoidan on tube formation by human vascular eNiothelial cells. **Biol. Pharm. Bull.** 20, 1131-1135.

SORLURSH; KATOW. 1982. Initial characterization of sulfated macromolecules in the blastocoels of mesenchyme blastulae of *Strongylocentrotus purpuratus* and *Lytechinus pictus*. **Dev Bio.** 94, 326-336.

TERSARIOL; DIETRICH;NADER. 1992. Interaction ofheparin with myosin ATPase: Possible involvement with the hemorrhagic activity and a correlation with antithrombin III high affinity-heparin molecules. **Throm. Res** 68, 247-258.

THEOCARIS *et al.*,2001. Determination and structural characterization of Dermatan sulfate in the presence of other galactosaminoglycans. **J. Chromatography B** 754, 297-309.

TOLLEFSEN; MAJERUS; BLANK. 1982. Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. **J Biol Chem.** 257, 2162-69.

TROWBRIDGE; GALLO. 2002. Dermatan sulfate: new functions from old glycosaminoglycan. **Glycobiology.** 12, 117-125.

TSEN *et al.*, 1995. Agrin is a new heparin sulfate proteoglycan. **J. Biol. Chem.** 270, 3392-3399

USUI; ASARI; MIZUNO. 1980. Isolation of highly purified fucoidan from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities. **Agric. Biol. Chem.** 44, 1965-1966.

VILELA-SILVA *et al.*, 1999. Structure of sulfated α -L-fucan from the eggs jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscana* patterns of preferential 2-O and 4-O-sulfatation determine spem cell recognition. **Glycobiology.** 9, 927-933.

VILELA-SILVA *et al.*, 2001. Embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* synthesize a dermatam sulfate enriched in 4-O- and 6-O-disulfated galactosamine units. **Glycobiology.** 11, 433-440.

VIEIRA; MOURÃO.1988. Occurrence of a unique fucose-branched choNiroitin sulfate in the body wall of a sea cucumber. **J.Biol.Chem.**263,18176-18183.

VOLPI, N. 2005. Occurrence and structural characterization of heparin from mollusks. **ISJ**. 2, 6-16.

VOLPI, N. 1993. "Fast moving" and "slow moving" heparins, dermatan sulfate, and chondroitin sulfate: qualitative and quantitative analysis by agarose-gel-electrophoresis. *Carbohydrate Research*, 247, 263-278.

XIE *et al.*, 2000. Inhibition of selectin-mediated cell adhesion and prevention of acute inflammation by nonanticoagulant sulfated saccharides. Studies with carboxyl-reduced and sulfated heparin and with Trestatin A Sulfate. **Journal of Biological Chemistry**. 275, 34818-34825.

Yamagata *et al.*, 1968. Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. **Journal of Biological Chemistry**. 243, 1523-1535.

YAMADA; OKASAKI. 1974. Occurrence of dermatan sulfate isomer in sea urchin larvae. **Biochim.Biophys.Acta**.372, 469-473.

YAMADA *et al.*, 1992. One- and two-dimensional ¹H-NMR characterization of two series of sulfated disaccharides prepared from chondroitin sulfate and heparan sulfate/heparin by bacterial eliminase digestion. **J. Biochem.**, 112, 440-447.

WANG *et al.*, 2002. Heparin's anti-inflammatory effects and mediated by blockade of L- and P-selectins. **Journal Clinical Investigation**.110, 127-136.

WANG *et al.*, 2005. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. **Nature Immunology**. 6, 902-910.

WHELAN, J. 1996. Selectin synthesis and Inflammation. 1996. **TIBS**. 21, 65-69.

ZHUANG *et al.*, 1995. Antitumor active fucoidan from brown seaweed *Umitoranoo* (*Sargassum thumbergii*). **Biosci. Biotech. Biochem.** 59, 563-567.

