

# Purificação e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele da carpa comum, *Cyprinus carpio*<sup>1</sup>

## Purification and anticoagulant activity of glycosaminoglycans isolated from the skin of common carp, *Cyprinus carpio*

José Ariévilto Gurgel Rodrigues<sup>2\*</sup>, Edfranck de Sousa Oliveira Vanderlei<sup>3</sup>, Ismael Nilo Lino de Queiroz<sup>4</sup>, Ana Luíza Gomes Quinderés<sup>5</sup> e Norma Maria Barros Benevides<sup>6</sup>

**Resumo** - Investigações bioquímicas são ferramentas importantes para a descoberta de novos agentes anticoagulantes presentes em uma grande variedade de organismos aquáticos e para uso em substituição à tradicional da heparina (HEP) na clínica médica. Objetivou-se purificar e avaliar a atividade anticoagulante dos glicosaminoglicanos (GAGs) isolados da pele da carpa comum *Cyprinus carpio*. Os GAGs foram extraídos com o uso de papaína bruta em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, seguido por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, na qual foram eluídas cinco frações (FI; FII; FIII; FIV e FV), utilizando um gradiente de NaCl. As frações foram concentradas por liofilização e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5%. A atividade anticoagulante foi avaliada através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), usando plasma humano normal e expressa em unidades internacionais por mg de polissacarídeo, utilizando HEP padrão (193 UI mg<sup>-1</sup>). A metodologia foi eficiente na extração e fracionamento dos GAGs, revelando, por eletroforese, a identificação preliminar de moléculas de dermatam sulfato e a preponderância de heparam sulfato. A atividade anticoagulante expressou-se dose-dependente, no entanto resultando em, no máximo, 4,89 UI mg<sup>-1</sup> em relação à HEP. Portanto, o emprego da digestão proteolítica no isolamento de GAGs presentes na pele de *C. carpio* sugere posteriores estudos quanto à caracterização do heparinóide, com a utilização de enzimas de degradação específicas. Estudos da técnica com outras espécies cultivadas também seriam indicados.

**Palavras-chave** - Glicosaminoglicanos sulfatados. *Cyprinus carpio*. Coagulação sanguínea. Teste do TTPA.

**Abstract** - Biochemical investigations are important tools for discovery of new anticoagulant agents present in a variety of aquatic organisms to substitute for the traditional use of heparin (HEP) in the medical clinic. The aim of this study was to purify and evaluate the anticoagulant activity of glycosaminoglycans (GAGs) isolated from the skin of the common carp *Cyprinus carpio*. GAGs were extracted with crude papain in 0.1 sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, followed by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose column where five fractions were eluted (F I; F II; F III; F IV e F V) using a NaCl gradient. The fractions were concentrated by lyophilization and submitted to 0.5% agarose gel electrophoresis. The anticoagulant activity was evaluated by the activated partial thromboplastin time (APTT) using normal human plasma and expressed in international units per mg of polysaccharide using standard HEP (193 IU mg<sup>-1</sup>). The methodology was efficient in the extraction and fractionation of GAGs, and the preliminary identification by electrophoresis suggested molecules of dermatan sulfate and preponderance of heparan sulfate. The anticoagulant activity expressed as dose-dependence manner, however resulting in a maximum of 4.89 IU mg<sup>-1</sup> compared to heparin. Therefore, the use of specific degradation enzymes to characterization of heparinoid obtained from the proteolytic digestion in isolation of GAGs presented in the skin of *C. carpio* suggests posterior studies. The employment of technique with other cultivated species will be also indicated.

**Key words** - Sulfated glycosaminoglycans. *Cyprinus carpio*. Blood coagulation. APTT test.

\* Autores para correspondência

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 23/03/2008; aprovado em 04/06/2009

Pesquisa desenvolvida no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Campus do Pici, Bl: 907, 60.451-970, Fortaleza-CE, Brasil arieviloengpesca@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Bioquímica, DBBM/CC/UFC, Fortaleza-CE, Brasil, edvanderlei2@hotmail.com

<sup>4</sup>Graduação em Eng. de Pesca, CCA/UFC, Fortaleza-CE, Brasil, mael.nilo@hotmail.com

<sup>5</sup>Programa de Pós-graduação em Bioquímica, DBBM/CC/UFC, Fortaleza-CE, Brasil, aninhaquindere@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Departamento Bioq. e Biologia Molecular, CC/UFC, Campus do Pici, Bl: 907, 60.451-970, Fortaleza-CE, Brasil, nmbb@ufc.br

## Introdução

Os polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas complexas formadas por unidades repetitivas de açúcares e carregadas negativamente devido à presença de radicais sulfatos. Esses compostos são encontrados em tecidos animais (vertebrados e invertebrados) (CÁSSARO; DIETRICH, 1977; MATHEWS, 1975) e vegetais (algas e gramíneas marinhas) (AQUINO et al., 2005; PERCIVAL; McDOWELL, 1967), formando, em sua maioria, agregados complexos denominados proteoglicanos.

Segundo Percival e McDowell (1967), os PS encontrados nas algas marinhas pardas (Phaeophyceae) podem estar na forma de fucanas, de galactanas nas algas vermelhas (Rhodophyceae) e, nas algas verdes (Chlorophyceae), os mais encontrados são as arabinogalactanas. Nos animais, os PS mais conhecidos são os glicosaminoglicanos (GAGs), sendo representados pelo condroitim sulfato (CS), heparim sulfato (HS), queratim sulfato, dermatim sulfato (DS) e heparina (HEP) (KJELLÉN; LINDAHL, 1991). Os GAGs são encontrados em todos os filos do reino animal que apresentam organização tissular (DIETRICH et al., 1976; MEDEIROS et al., 2000).

O interesse no estudo dessas macromoléculas nos diferentes organismos é justificado devido aos efeitos adversos da HEP (extraída de boi e porco), mundialmente utilizada como agente anticoagulante e antitrombótico, na prevenção e tratamento da trombose venosa. Entretanto, seu uso é limitado devido a seus efeitos colaterais tais como hemorragia, queda no número de plaquetas e risco de contaminação viral (THOMAS, 1997) em pacientes acometidos de hipercoagulopatia ou trombose venosa causada por diferentes etiologias (WEIZT, 1994). Embora a HEP de baixo peso molecular venha sendo utilizada atualmente, sua administração em elevadas doses ainda induzem alguns fatores de risco (THOMAS, 1997).

Vários PS de diferentes organismos aquáticos foram isolados e caracterizados no intuito de avaliar suas propriedades anticoagulantes, tais como algas marinhas (FARIAS et al., 2000), peixes (DELLIAS, et al., 2004; MANSOUR et al., 2009), dentre outros.

Em peixes, o DS é o GAG mais encontrado. DSs isolados de peles do atum *Katsuwonus pelamis* (BAÚ, 2003) e das espécies de raias da costa brasileira *Dasyatis americana*, *D. guttata* e *Aetobatus narinari* (DELLIAS et al., 2004) apresentaram atividade anticoagulante. Recentemente, Souza et al. (2007) relataram uma potente atividade anticoagulante do DS isolado da pele da espécie de enguia elétrica, *Electrophorus electricus*, habitante natural do Rio Amazonas. Os CS e HS, por

sua vez, ocorrem em baixas concentrações em várias espécies de peixes (BAÚ, 1998).

A carpa comum, *Cyprinus carpio*, é considerada o peixe de água doce mais cultivado na Ásia e, em menor escala, em alguns países da África e América Latina (especialmente no Brasil), podendo ser criada em sistemas de monocultivo ou policultivo (MOREIRA et al., 2001). Este estudo teve como objetivo relatar informações adicionais relacionadas à identificação de novos GAGs em vertebrados aquáticos e presentes na pele da carpa comum, *C. carpio*, e avaliar sua atividade anticoagulante de forma a contribuir com a bioprospecção de novos agentes farmacológicos.

## Material e métodos

### Remoção da pele do músculo e tratamento preliminar

Um exemplar adulto de carpa comum, *C. carpio* (LINNAEUS, 1758), foi doado de uma fazenda de cultivo comercial e a pesquisa desenvolvida no laboratório de Algas Marinhas II do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. A remoção da pele do músculo do peixe foi realizada com um bisturi, sendo, em seguida, lavada com água destilada, seca em estufa a 40 °C durante 48 h, cortada em pequenos pedaços e armazenada em frasco fechado para posterior extração dos glicosaminoglicanos (GAGs) totais.

### Extração dos GAGs da pele de *C. carpio*

Para a extração dos GAGs, a pele seca foi hidratada com 80 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM. Em seguida, foram adicionados 30% de papaína bruta. A mistura foi incubada em banho-maria a 60 °C por 48 h (SOUZA et al., 2007). Após incubação, o material foi filtrado, centrifugado (8.000 × g; 4 °C; 20 min) e, ao sobrenadante, adicionados 3,5 mL de uma solução de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10% para precipitação dos GAGs (25 °C; 72 h). O precipitado obtido foi lavado com 200 mL de CCP 0,05%, dissolvido em 100 mL de NaCl 2 M:etanol absoluto (100:15; v/v) e submetido a uma nova precipitação (4 °C; 24 h), através da adição de 80 mL de etanol absoluto. Posteriormente, o precipitado assim obtido foi centrifugado (8.000 × g; 4 °C; 20 min), submetido a duas lavagens com 100 mL de etanol 80% e uma outra lavagem com o mesmo volume de etanol absoluto, e, finalmente, seco em estufa a 40 °C por 48 h (FARIAS et al., 2000).

### Purificação dos GAGs por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose)

Inicialmente, o extrato total foi dissolvido no tampão de extração de GAGs e submetido à cromatografia

de troca iônica em coluna de DEAE-celulose equilibrada e eluída, também com mesmo tampão, até a completa remoção dos polissacarídeos não retidos. Os GAGs retidos na coluna foram eluídos através de fracionamento com NaCl, em tampão acetato, nas concentrações de 0,50; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,50 M. As frações obtidas foram monitoradas através da reação metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno a 525 nm (FARNDALÉ et al., 1986). As frações de GAGs obtidas foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e concentradas por liofilização para utilização em ensaios posteriores.

### Identificação dos GAGs por eletroforese em gel de agarose

Os GAGs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,5%, utilizando-se padrões de GAGs conhecidos: condroitim 4-sulfato (CS) de cartilagem de baleia, dermatam sulfato (DS) de pele de porco e heparan sulfato (HS) de pulmão de bovino (Sigma).

As frações de GAGs (15 µg) foram aplicadas no gel preparado em tampão 1,3 - acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0). A corrida foi realizada utilizando-se voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após a corrida, os GAGs presentes no gel foram fixados com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio 0,1% por 24 h. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% e descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95:4,95:0,1; v/v/v) (DIETRICH; DIETRICH, 1976).

### Análises químicas

O conteúdo de açúcares totais (AT) das frações foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando-se a D-galactose para a obtenção da curva padrão. O conteúdo de proteínas contaminantes (PC) foi estimado pelo método descrito por Bradford (1976), usando-se albumina sérica bovina como padrão. A determinação de sulfato foi realizada através da medida da área metacromática integrada do perfil cromatográfico em DEAE-celulose, utilizando-se o programa ORIGIN 5.0.

### Atividade anticoagulante

A avaliação da atividade anticoagulante foi realizada *in vitro*, pelo tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), segundo especificações do fabricante. Inicialmente, sangue de humano normal citratado (diferentes doadores) foi centrifugado (73,75 × g; 15 min) para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas. Para a realização do teste, 50 µL de plasma humano foram incubados a 37 °C por 3 min com 10 µL da solução de GAG e 50 µL do reagente TTPA (CLOT, Bios diagnóstica). Após a incubação, foram adicionados 50 µL de cloreto de cálcio 25 mM (CLOT, Bios diagnóstica) à mistura para ativar a cascata de coagulação. Os ensaios foram

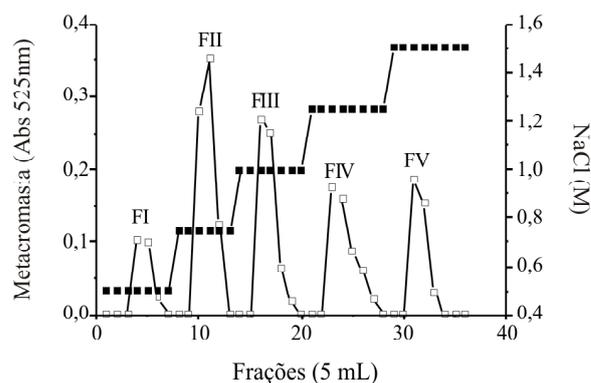
realizados em duplicata, sendo o tempo de coagulação registrado automaticamente em um coagulômetro (Drake, modelo Quick-timer) e a atividade anticoagulante expressa em unidades internacionais por mg (UI mg<sup>-1</sup>), utilizando-se como referência a HEP não-fracionada (193 UI mg<sup>-1</sup>).

## Resultados e discussões

### Extração e purificação dos GAGs

A utilização de enzimas proteolíticas (papaina) no processo de extração e de CCP na etapa de precipitação de PS vem sendo bastante empregada em organismos aquáticos, incluindo peixes e algas marinhas (DELLIAS et al., 2004; FARIAS et al., 2000; MANSOUR et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; SIKDER; DAS, 1979; SOUZA et al., 2007; TINGHO et al., 2005).

No presente estudo, o emprego da enzima papaina durante a extração e CCP na precipitação dos GAGs presentes na pele da carpa comum (*C. carpio*) mostrou ser eficiente. A purificação dos polissacarídeos por cromatografia em DEAE-celulose resultou em cinco frações (FI; FII; FIII, FIV e FV) de GAGs (Figura 1). A maior metacromasia foi obtida na fração FII, eluída com 0,75 M de NaCl, seguida das frações FIII e FIV (1,0 e 1,25 M), respectivamente. As frações FII; FIII e FIV foram liofilizadas e renderam 2,7; 1,3 e 1,7 mg, respectivamente. As frações FI e FV não foram reunidas devido à escassez de material para análise. Desta forma, a resina de troca iônica mostrou-se eficiente no fracionamento dessas macromoléculas, o que denota que a espécie de peixe estudada é rica em GAGs na pele.



**Figura 1** - Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose do extrato total obtido da pele de carpa comum, *Cyprinus carpio*. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM. Os GAGs adsorvidos no gel foram eluídos com adição de NaCl (0,50; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,50 M). (○—○) metacromasia; (■—■) concentração de NaCl (M)

Os mucopolissacarídeos (proteoglicanos) são encontrados nas cartilagens, na pele e no líquido sinovial. As funções dos GAGs estão relacionadas com a resistência à infecções devido a sua ação neutralizante, bactericida e fungicida (WARREN; GRANHAM, 1950); atividade anticoagulante (COLBURN; BUONASSI, 1982); divisão e crescimento celular (DIETRICH, 1984), dentre outras.

### Identificação dos GAGs

As frações (FII, FIII e FIV), ao serem submetidas ao procedimento eletroforético, mostraram um perfil migratório bastante similar ao padrão de HS (Figura 2). No entanto, a fração FII revelou a presença de distintos componentes durante sua migração eletroforética quando comparada a FIII e FIV. A mistura de GAGs encontrada apresentou bandas com perfis comparativamente semelhantes ao DS e HS e uma outra diferente banda (mais carregada), a qual se deslocou menos durante a migração e que, possivelmente, seja resíduo de DNA, já que a metodologia de extração é um pouco semelhante. Por outro lado, bandas homogêneas e bastante carregadas foram obtidas para as frações FIII e FIV, denotando um alto grau de purificação. A semelhança do padrão eletroforético (FIII e FIV) dos GAGs purificados sugere a identificação preliminar de moléculas predominantes de HS na pele de *C. carpio*.

Os GAGs são mundialmente distribuídos em uma variedade de tecidos de diferentes origens. Normalmente, o DS é o glicosaminoglicano sulfatado predominante na pele de várias espécies de peixes (BAÚ, 1998; BAÚ, 2003; DELLIAS et al., 2004; MANSOUR et al., 2009; SOUZA et al., 2007; SAKAI et al., 2003), enquanto o CS e HS ocorrem em baixas concentrações em outras (BAÚ, 1998). Sikder e Das (1979) isolaram uma mistura de GAGs (DS, CS e ácido hialurônico, este último destituído

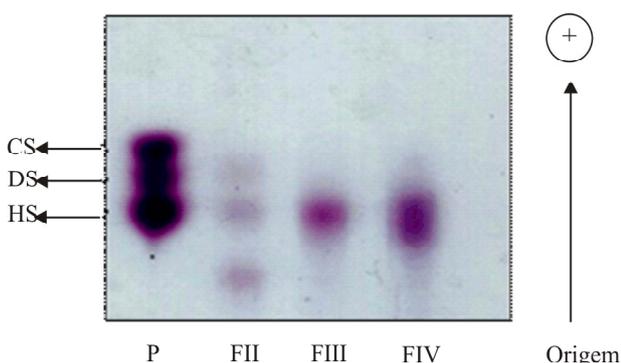
de grupamentos sulfatos) da espécie de carpa indiana *Labeo rohita*. GAGs isolados das peles de peixes de água doce (*Salmo salselinus* e *Icataturus* sp) e marinhos (*Tuna thynnus*, *Gadus morhua* e *Epinephalus* sp) apresentaram DS como polissacarídeo comum, sendo o HS e CS detectados em pequenas quantidades em algumas espécies e a HEP predominante nos peixes marinhos (BAÚ, 1998).

Avaliando a presença de GAGs em peixes (atum e tubarões), Baú (2003) relatou a presença do DS na pele da espécie de atum *K. pelamis* e do CS em cartilagens de nadadeiras e coluna vertebral nas dez espécies de tubarões. HSs identificados em duas espécies de peixes de regiões temperadas mostraram diferentes proporções no conteúdo de sulfato entre o bacalhau do Atlântico *Gadus morhua* comparado ao peixe lobo *Anarhichas minor* (TINGHO et al., 2005). Recentemente, Mansour et al. (2009) isolaram duas frações de GAGs diferentes entre si em pesos moleculares e cargas negativas da pele da raia marinha *Raja radula*. A caracterização físico-química dos polissacarídeos da espécie indicou a presença de DS e ácido hialurônico.

Em invertebrados, Medeiros et al. (2000) estudando a distribuição de GAGs presentes em 23 espécies de diferentes filos, observaram a presença de glicosaminoglicano HS em todas as espécies analisadas, o CS ausente em apenas três espécies e o DS presente somente no filo Urochordata. Os autores também relataram distintos padrões de migração eletroforética de HSs extraídos de diferentes organismos aquáticos (crustáceos, nematóides, cnidários e rotíferos), sugerindo uma possível diferença estrutural entre os GAGs avaliados e que eles poderiam estar envolvidos com a adesão e reconhecimento celular.

Neste trabalho, a análise por eletroforese revelou uma mistura de GAGs na fração FII e a preliminar ubiquidade de HS nas frações FIII e FIV isoladas da pele de *C. carpio* (Figura 2). Este fato reforça a elevada metacromasia encontrada na fração FII do perfil em DEAE-celulose (Figura 1). No entanto, em algumas espécies de peixes, certos GAGs são preponderantes na pele. As características desses compostos podem vir a ser utilizadas na identificação de unidades de estoque de populações de peixes em estudos de biologia pesqueira, tendo em vista que populações diferentes devem apresentar diferentes parâmetros biológicos. Geralmente, os caracteres de uso mais comum são a configuração protéica e a frequência de grupos sanguíneos, freqüentemente restritos pelas dificuldades de obtenção de material para análise e pela exigência de equipamentos complexos e de difícil manuseio, levando o material rapidamente a degradação (FONTELES-FILHO, 1989).

A utilização dessas macromoléculas poderia ajudar no processo de identificação de populações por si tratar de compostos mais estáveis do que as proteínas (NELSON;



**Figura 2** - Eletroforese em gel de agarose das frações FII, FIII e FIV purificadas da pele da carpa comum, *Cyprinus carpio*. As frações (FII; FIII e FIV) e os padrões (P) de GAGs condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparim sulfato (HS) presentes no gel foram corados com azul de toluidina 0,1%

COX, 2005). Para tanto, tal hipótese deve ser comprovada mediante estudos comparativos entre espécies selvagens de peixes. Segundo Medeiros et al. (2000), a ocorrência dos GAGs em todo o reino animal sugere que eles se conservaram ao longo do processo evolutivo.

### Composição química

Os GAGs são heteropolissacarídeos aniônicos, complexos e lineares, constituídos de seqüências dissacarídicas repetitivas, unidas por ligações glicosídicas, onde um dos resíduos é uma hexosamina (D-glicosamina ou D-galactosamina); e o outro, um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico) ou ainda unidades de D-galactose (DIETRICH et al., 1976; MEDEIROS et al., 2000). A composição química (Tabela 1) dos GAGs isolados de *C. carpio* foi semelhante entre as frações.

O conteúdo de AT foi maior na F III quando comparada com as demais frações, sendo nestas a PC praticamente não detectadas. A área metacromática integrada da FII indicou maior presença de GAGs seguida da FIII e FIV, respectivamente, quando representado pelo cromatograma de GAGs (Figura 1). O maior conteúdo de PC na fração FII também foi justificado pela presença das três diferentes bandas observadas durante a migração eletroforética (Figura 2).

**Tabela 1** - Área metacromática integrada, açúcares totais (AT) e proteínas contaminantes (PC) das frações de GAGs de *Cyprinus carpio*

Frações	Área		
	metacromática integrada (%)	AT (%)	PC (%)
FI	9,21	nd	nd
FII	30,75	24,32	1,84
FIII	24,42	38,67	-
FIV	20,53	28,45	-
FV	15,09	nd	nd

nd: não determinado; - : não detectado

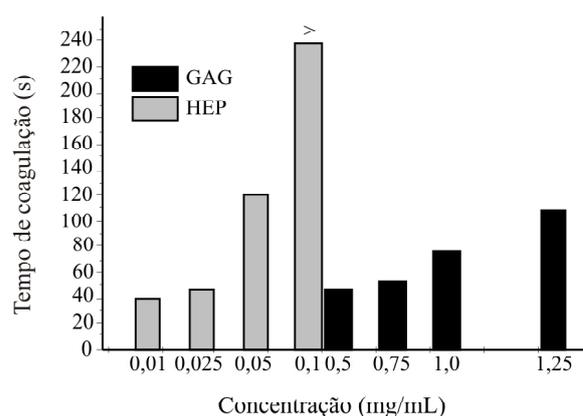
### Atividade anticoagulante

O teste do TTPA é um dos mais usados na mensuração de PS com atividade anticoagulante, indicando com precisão o potencial anticoagulante do composto isolado (MOURÃO; PEREIRA, 1999). As frações de GAGs isoladas da carpa comum (*C. carpio*) apresentaram atividade anticoagulante. As frações apresentaram TTPAs semelhantes entre si, prolongando o tempo de coagulação de 1,39 a 2,31 vezes (FIII e FIV, respectivamente) em relação ao controle. A atividade se

expressou de maneira dose-dependente (Figura 3), mas resultando em, no máximo, 4,89 UI mg<sup>-1</sup> (FIV) quando comparada a HEP (193 UI mg). Desta forma, os GAGs de *C. carpio* prolongaram minimamente o tempo normal de coagulação do plasma humano.

GAGs isolados de algumas espécies de peixes tem apresentado potentes atividades anticoagulantes. O DS isolado da pele ventral da raia habitante da costa cearense *Dasyatis americana* apresentou uma potente atividade anticoagulante (TTPA) mediante a ação potencializada do inibidor plasmático cofator II da heparina sobre a trombina (DELLIAS et al., 2004). Uma atividade anticoagulante (DS) foi relatada para a enguia elétrica brasileira de água doce (*Electrophorus electricus*) tendo como mediador inibitório o cofator II da heparina sobre a trombina. Esses GAGs também apresentaram efeito antitrombótico (dose-dependente), reduzindo a formação de trombos em até 50% em ratos (SOUZA et al., 2007). Os pesquisadores também compararam o efeito desses GAGs com aqueles isolados de uma outra espécie de enguia (*Anguilla japonica*) por Sakai et al. (2003) e relataram que o DS isolado desta última não apresentou atividade anticoagulante, mesmo apresentando uma composição dissacarídica semelhante à espécie brasileira. A ausência da atividade na espécie *A. japonica* talvez seja justificada pelo arranjo da molécula em promover a ação inibitória do cofator II da heparina sobre a trombina (SOUZA et al., 2007).

Os efeitos colaterais do uso da HEP motivam diferentes pesquisas utilizando uma grande variedade de organismos aquáticos, mas, no entanto, poucas informações científicas retratam quanto às funções biológicas em relação às estruturas químicas desses compostos (FARIAS et al., 2000; MANSOUR et al.,



**Figura 3** - Atividade anticoagulante (TTPA) das frações de GAGs (FIV) obtidas de *Cyprinus carpio* em relação a HEP não-fractionada. > além do limite de detecção; As barras representam os valores médios dos TTPAs a partir de três determinações

2009; MOURÃO; PEREIRA, 1999; SOUZA et al., 2007). O DS isolado do atum *K. pelamis* apresentou uma potente atividade anticoagulante via cofator II da heparina, sem exibir efeito hemorrágico (BAÚ, 2003).

Neste trabalho, mesmo apresentando um discreto prolongamento no tempo de coagulação, os GAGs isolados de *C. carpio* poderão ser utilizados em outros modelos biológicos, como antitrombótico (SOUZA et al., 2007), mas antes necessitando do conhecimento de sua estrutura química. Mourão e Pereira (1999) enfatizam que não basta apenas comparar uma requerida dose para uma ação antitrombótica, mas também a persistência do efeito, os níveis de circulação no plasma, a correlação entre a ação anticoagulante e antitrombótica e a disponibilidade e absorção quando a droga é administrada em diferentes rotas. Modelos de experimentação animal são ferramentas importantes na avaliação de diferentes polissacarídeos no desenvolvimento de novas drogas.

Desta forma, restritos são os estudos farmacológicos de GAGs extraídos de peixes, principalmente de água doce. No Brasil, muitas espécies dulcícolas são cultivadas para produção de alimento para a população. A indústria pesqueira também gera resíduos oriundos do processamento de pescado (marinho e água doce), desprezando-os, em muitos casos, pela falta de destino adequado (MOREIRA, et al., 2001). O estudo desses compostos isolados de diferentes espécies de peixes cultivadas e pescadas no País poderia resultar em aproveitamento futuro.

## Conclusão

O isolamento de Glicosaminoglicanos mediante digestão proteolítica (papaína) da carpa comum, *Cyprinus carpio*, seguido de procedimento cromatográfico em coluna de troca iônica (DEAE-celulose), revelou, por eletroforese, a identificação preliminar de heparan sulfato, porém com baixo potencial anticoagulante. Portanto, o tratamento com enzimas de degradação específicas para caracterização do composto sugere posteriores estudos. O emprego da técnica no isolamento de glicosaminoglicanos utilizando outras espécies de peixes também seria indicado.

## Agradecimentos

Ao Programa Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores também agradecem ao Engenheiro de Pesca Ricardo Lafaiete Moreira pelo exemplar de carpa comum doado para a realização desta pesquisa.

## Referências

- AQUINO, R. S. et al. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, v. 15, n. 01, p. 11-20, 2005.
- BAÚ, E. C. **Isolamento, purificação, caracterização e atividades farmacológicas de glicosaminoglicanos sulfatados de diferentes espécies marinhas**. 2003. 176 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
- BAÚ, E. C. **Glicosaminoglicanos de pele de peixes de diferentes salinidades: estrutura e atividades farmacológicas do dermatan sulfato de *Katsuwonus pelamis***. 1998. 141 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 01-02, p.248-254, 1976.
- CÁSSARO, C. M. F.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 07, p. 2254-2261, 1977.
- COLBURN, P.; BUONASSI, V. Anti-clotting activity of endothelial cell-cultures and heparin sulfate proteoglycans. **Biochemica et Biophysica Research Communication**, v. 104, n. 01, p. 220-227, 1982.
- DELLIAS, J. M. M. et al. Structural composition and differential anticoagulant activities of dermatan sulfates from the skin of four species of rays, *Dasyatis Americana*, *Dasyatis guttata*, *Aetobatus narinari* and *Potamotrygon motoro*. **Biochimie**, v. 86, n. 09-10, p. 677-683, 2004.
- DIETRICH, C. P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycan. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v. 17, n. 01, p. 05-15, 1984.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 02, p. 645-647, 1976.
- DIETRICH, C. P.; SAMPAIO, L. O.; TOLEDO, O. M. S. Characteristic distribution of sulfated mucopolysaccharides in different tissues and in their respective mitochondria. **Biochemistry and Biophysical Research Community**, v. 71, n. 01, p. 34-43, 1976.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 03, p. 350-356, 1956.
- FARIAS, W. R. L. et al. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.
- FARNDAL, R. W.; BUTTLE, DJ.; BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans

- by use of dimethylmethylene blue. **Biochimistry et Biophysica Acta**, v. 883, n. 02, p. 173-177, 1986.
- FONTENELES FILHO, A. A. **Recursos pesqueiros: biologia e dinâmica populacional**. Fortaleza: Imprensa Oficial do Ceará, 1989. 296 p.
- KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structure and interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 443-475, 1991.
- MANSOUR, M. B. et al. Polysaccharides from the skin of the ray *Raja radula*. Partial characterization and anticoagulant activity. **Thrombosis Research**, v. 123, n. 04, p. 671-678, 2009.
- MATHEWS, M. B. Polyanionic proteoglycans. In: KLEINZELLER; SPRINGER, G. F.; WITMANN, H. G. **Connective tissue: macromolecular structure and evolution**. Berlin: Springer-Verlag, 1975. p. 93-125.
- MEDEIROS, G. Fetal. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1475, n. 03, p. 285-294, 2000.
- MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends Cardiovascular Medicine**, v. 09, n. 08, p. 225-232, 1999.
- MOREIRA, H. L. M. et al. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ulbra, 2001. 200 p.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – principles of biochemistry**. 4. Ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2005. 1119 p.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. New York: Academic Press, 1967. 219 p.
- RODRIGUES, J. A. G. et al. Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofíceia *Halymenia pseudofloresia* mediante uma estratégia profilática. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 01, p. 71-78, 2009.
- SAKAI, S. et al. Purification and characterization of dermatan sulfate from the skin of the eel, *Anguilla japonica*. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 03, p. 263-269, 2003.
- SIKDER, S. K.; DAS, A. Isolation and characterization of glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) from the skin of the fish *Labeo rohita*. **Carbohydrate Research**, v. 71, n. 01, p. 273-285, 1979.
- SOUZA, M. L. S. et al. Structural composition and anticoagulant activity of dermatan sulfate from the skin of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 147, n. 03, p. 387-394, 2007.
- THOMAS, D. P. Does low molecular weight heparin cause less bleeding?. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, n. 06, p. 1422-1425, 1997.
- TINGHO, M. G. et al. Sulfated glycosaminoglycans in the extracellular matrix of muscle tissue in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Spotted wolffish (*Anarhichas minor*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 03, p. 349-357, 2005.
- WARREN, J. R.; GRANHAM, F. The effect of heparin on the growth of bacteria and yeasts. **Journal of Bacteriology**, v. 60, n. 02, p. 171-178, 1950.
- WEITZ, J. New anticoagulant strategies. Current status and future potentials. **Drugs**, v. 48, n. 04, p. 485-497, 1994.