



Acta Scientiarum. Technology

ISSN: 1806-2563

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá
Brasil

Gurgel Rodrigues, José Ariévilo; Gomes Quinderé, Ana Luíza; Lino de Queiroz, Ismael Nilo; Oliveira Coura, Chistiane; Souza Araújo, Gláicio; Barros Benevides, Norma Maria
Purificação, caracterização físico-química e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados
da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)
Acta Scientiarum. Technology, vol. 33, núm. 3, 2011, pp. 233-241
Universidade Estadual de Maringá
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303226532012>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Purificação, caracterização físico-química e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

José Ariévilo Gurgel Rodrigues¹, Ana Luíza Gomes Quinderé², Ismael Nilo Lino de Queiroz², Chistiane Oliveira Coura², Glácio Souza Araújo⁴ e Norma Maria Barros Benevides^{3*}

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. ²Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. ³Laboratório de Carboidratos e Lectinas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, s/n, 60455-970, Fortaleza, Ceará, Brasil. ⁴Programa de Pós-graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: nmbb@ufc.br

RESUMO. Os glicosaminoglicanos (GAGs) constituem a matriz extracelular de tecidos animais e os resíduos do processamento de peixes comercialmente cultivados podem oferecer novos agentes anticoagulantes em substituição à heparina (HEP) nas ciências médicas. Objetivou-se purificar, caracterizar físico-quimicamente e avaliar a atividade anticoagulante dos GAGs isolados da pele da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Os GAGs foram extraídos com papaína em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo cisteína e EDTA (5 mM), seguido por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-cellulose, utilizando um gradiente de NaCl. As frações obtidas foram lyophilizadas e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,5%. A atividade anticoagulante foi avaliada por meio do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), usando-se plasma humano normal e HEP padrão (193 UI mg⁻¹). O perfil cromatográfico mostrou a separação de duas diferentes frações de GAGs (F I e F II), eluídas com 0,50 e 0,75 M de NaCl, respectivamente, revelando, por eletroforese, frações distintas em densidade de cargas, porém ambas mostrando GAGs com mobilidades semelhantes ao dermatan sulfato (DS) padrão, sugerindo-se a identificação preliminar desse GAG. Os GAGs modificaram o TTPA, cujas atividades perifizeram, respectivamente, 4,72 (F I) e 23,80 (F II) UI mg⁻¹, e expressaram-se dose-dependente. Portanto, o DS anticoagulante da pele de *O. niloticus* sugere uma fonte interessante para estudos posteriores de atividade antitrombótica.

Palavras-chave: heteropolissacáideos sulfatados, *Oreochromis niloticus*, coagulação sanguínea, teste do TTPA.

ABSTRACT. **Purification, physical and chemical characterization, and anticoagulant activity of glycosaminoglycans isolated from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** Glycosaminoglycans (GAGs) comprise the extracellular matrix of animal tissues, and residues from processing fish commercially harvested may offer new anticoagulant agents to substitute the heparin (HEP) in medical sciences. The aim of this study was to purify, characterize physico-chemically and evaluate the anticoagulant activity of GAGs isolated from the skin of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. The GAGs were extracted with papain in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing cysteine and EDTA (5 mM), followed by ion-exchange chromatography on a DEAE-cellulose column using a NaCl gradient. The obtained fractions were lyophilized and submitted to 0.5% agarose gel electrophoresis. The anticoagulant activity was assessed by the activated partial thromboplastin time (APTT) using normal human plasma and HEP standard (193 IU mg⁻¹). The chromatographic profile separated into two different GAGs fractions (F I and F II) eluted at 0.50 and 0.75 M of NaCl, respectively, revealing fractions pattern distinct in the charge densities, but both showing GAGs with mobilities similar to standard dermatan sulfate (DS), suggesting the preliminary identification of this GAG. The GAGs modified the APTT, whose activities were, respectively, 4.72 (F I) and 23.80 (F II) IU mg⁻¹, and expressed themselves dose-dependent. Therefore, the anticoagulant DS from *O. niloticus* suggests an interesting source for posterior studies of antithrombotic activity.

Keywords: sulfated heteropolysaccharides, *Oreochromis niloticus*, blood coagulation, APTT test.

Introdução

Os polissacáideos sulfatados (PSs) são polímeros de açúcares complexos e heterogêneos carregados

negativamente pela presença de radicais sulfatados. Esses compostos apresentam-se na forma de galactanas sulfatadas nas algas marinhas

vermelhas (FARIAS et al., 2000; FONSECA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009a), de fucanas ou fucoidanas nas algas marinhas pardas ou marrons (SILVA et al., 2005; YOON et al., 2007); e nas algas marinhas verdes, os mais encontrados são as arabino-galactanas e as raminoses (ZHANG et al., 2008; MAO et al., 2009). PSs também estão presentes em gramíneas marinhas (AQUINO et al., 2005), enquanto nos animais (vertebrados e invertebrados) são denominados de GAGs (MEDEIROS et al., 2000; RODRIGUES et al., 2009b), destacando-se o DS, condroitim sulfato (CS), heparam sulfato (HS) e HEP, formando, em sua maioria, agregados poliméricos complexos denominados de proteoglicanos (NELSON; COX, 2005; WU et al., 2010). Acredita-se que os GAGs são encontrados em todos os filos do reino animal que apresentam organização tissular, sugerindo que eles se conservaram ao longo do processo evolutivo (MEDEIROS et al., 2000).

A HEP, uma mucilagem obtida comercialmente de animais (boi e porco) e encontrada como produto intracelular de células mastócitos, é constituída majoritariamente por unidades alternadas de ácido idurônico 2-sulfato e glucosamina N- e 6-disulfatada, podendo alguns resíduos de glucosamina estar N-acetilados (MELO et al., 2008). Ela é usada há mais de 50 anos como agente terapêutico (anticoagulante e antitrombótico) para tratamento e prevenção da trombose venosa profunda pós-cirúrgica e pós-parto, quando em pacientes acometidos por hipercoagulopatia ou trombose venosa causada por diferentes etiologias. Sua administração também se faz em circulação extracorpórea (cirurgia vascular e hemodiálise) (NADER et al., 2001).

Embora sendo mundialmente empregada em distúrbios tromboembólicos, a HEP também é conhecida pelos seus efeitos indesejáveis, citando-se, por exemplo, a hemorragia (principal efeito), trombocitopenia, plaquetopenia, osteoporose, hiperlipidemia e riscos de contaminação viral, já que é obtida de animais (NADER et al., 2001). Mais recentemente, pesquisas alertaram ainda para o fato da utilização de preparações de diferentes marcas comerciais de HEP contaminadas com dermatan sulfato ou condroitim sulfato oversulfatado, degradadas quimicamente e com significativa alteração do peso molecular (GUERRINI et al., 2008; MELO et al., 2008). Melo et al. (2008) também investigaram a atividade anticoagulante nas diferentes preparações de HEP utilizando o teste do TTPA, caracterizando-as estruturalmente por ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia de filtração em gel. Os resultados mostraram que, em algumas marcas comerciais, a atividade específica das HEPs mensuradas

por meio do TTPA foi significativamente menor do que a declarada e a alteração nas estruturas químicas também confirmaram a diminuição da atividade anticoagulante dos preparados comerciais utilizados. Todas as amostras estudadas não se mostraram apropriadas para uso em cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea.

Diversas atividades biológicas têm sido relacionadas aos GAGs, tais como antitumoral (BORSING et al., 2007), anti-inflamatória (BRITO et al., 2008), antitrombótica (NADER et al., 2001; SOUZA et al., 2007a), anticoagulante (MANSOUR et al., 2009; WU et al., 2010), dentre outras.

Em peixes, poucos ainda têm sido os registros sobre a ocorrência e da atividade anticoagulante de GAGs. Estudos com as espécies de raias brasileiras *Dasyatis americana* e *D. guttata*, Dellias et al. (2004) isolaram o DS da pele desses peixes com atividade anticoagulante. Souza et al. (2007a) reportaram um agente anticoagulante e antitrombótico (DS) isolado da pele da enguia elétrica *Electrophorus electricus*, habitante natural do rio Amazonas. Mais recentemente, Rodrigues et al. (2009b) detectaram a ocorrência de vários GAGs presentes na pele da carpa comum *Cyprinus carpio*, quando obtida de uma fazenda de cultivo comercial, com atividade anticoagulante. O estudo sugeriu a identificação preliminar de moléculas de DS e a preponderância de HS nesse vertebrado.

As tilápias são peixes onívoros, rústicos e que se adaptam facilmente ao confinamento em níveis diferentes de produtividade em água doce, salobra ou salgada, propiciando, assim, ganhos econômicos, sociais e ambientais, sendo a linhagem conhecida como Tailandesa da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a espécie mais cultivada no Brasil (MOREIRA et al., 2001; ARAÚJO et al., 2010). Este trabalho teve como objetivo relatar informações adicionais relacionadas à identificação de novos GAGs em vertebrados aquáticos e presentes na pele da tilápia do Nilo (*O. niloticus*), bem como realizar um comparativo com a espécie de carpa comum (*C. carpio*) de forma à caracterizar físico-quimicamente esses compostos de peixes teleósteos de água doce. O potencial anticoagulante dos GAGs isolados também foi avaliado, contribuindo com a bioprospecção de novos substitutos para HEP.

Material e métodos

Remoção da pele do músculo e tratamento preliminar

A pele da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) foi adquirida a partir de exemplares provenientes de uma fazenda de cultivo comercial desta espécie, localizada no município de Horizonte, Estado do

Ceará, Brasil (ARAÚJO et al., 2010). A pesquisa foi realizada no Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. No Laboratório, a pele, previamente removida do músculo dos peixes ainda na fazenda por meio do uso de bisturi, foi lavada com água destilada, desidratada ao sol, cortada em pequenos pedaços e armazenada em frasco fechado para posterior extração dos GAGs.

Extração dos GAGs da pele de *O. niloticus*

A extração dos GAGs foi realizada segundo metodologia de Farias et al. (2000), com algumas modificações (RODRIGUES et al., 2009b). Inicialmente, a pele desidratada ao sol e triturada (2 g) foi hidratada com 80 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína e EDTA (5 mM). Em seguida, foram adicionados 30% de papaína bruta, sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 6h. Após incubação, o material foi filtrado, centrifugado (5.000 × g; 4°C; 30 min.) e, ao sobrenadante, adicionados 14 mL de uma solução de cloreto cetilpiridinio (CCP) a 10% para precipitação dos GAGs (25°C; 98h). O precipitado obtido foi lavado com 80 mL de CCP 0,05%, dissolvido em 80 mL de NaCl 2 M: etanol absoluto (100:15; v:v) e submetido a uma nova precipitação (4°C; 98h), pela adição de 80 mL de etanol comercial. O precipitado obtido foi centrifugado (5.000 × g; 4°C; 20 min.), submetido a duas lavagens com 80 mL de etanol comercial a 80% e uma lavagem com o mesmo volume de etanol comercial e seco em estufa a 40°C por 3h.

Purificação dos GAGs por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose

O extrato total (2 mg mL⁻¹) foi dissolvido no tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) e submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) até a completa remoção dos polissacarídeos não-retidos. Os GAGs retidos na coluna foram eluídos com gradiente de NaCl, em tampão acetato, nas concentrações de 0,50 e 0,75 M. As frações (2,5 mL) obtidas foram monitoradas por meio da reação metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (FARNDALE et al., 1986). As frações metacromáticas de GAGs foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e lyophilizadas para utilização nos ensaios posteriores.

Caracterização físico-química dos GAGs por eletroforese em gel de agarose

Os GAGs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,5% para sua caracterização físico-química

quanto aos padrões e às densidades de cargas negativas. As frações de GAGs (25 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 o procedimento, os GAGs presentes no gel foram fixados com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilâmônio a 0,1% por 24h. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina a 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). Foram utilizados padrões de GAGs conhecidos: CS-4-sulfato de cartilagem de baleia (Sigma), DS de pele de porco e HS de pulmão de bovino (Sigma).

Análises químicas

O conteúdo de açúcares totais (AT) das frações foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) com placa de 96 poços (MASUKO et al., 2005) em leitor de ELISA (AMERSHAM BIOSCIENCES, modelo BIOTRAK II) ajustado a 492 nm, utilizando-se a D-galactose para a obtenção da curva-padrão. O conteúdo de proteínas totais (PT) foi estimado pelo método descrito por Bradford (1976), usando-se albumina sérica bovina como padrão. A presença de sulfato foi realizada por meio da medida da área metacromática integrada do perfil cromatográfico em DEAE-celulose, utilizando o programa ORIGIN 7.0 (RODRIGUES et al., 2009b). O teor de sulfato livre (SL) foi determinado pelo método gelatina-bário descrito por Dodgson e Price (1962), usando sulfato de sódio para a obtenção da curva-padrão (595 nm).

Atividade anticoagulante "in vitro"

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), obtido do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará (HEMOCE), 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 das soluções de GAGs 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 ($UI\ mg^{-1}$) utilizando como referência HEP não-fracionada ($193\ UI\ mg^{-1}$).

Resultados e discussão

Extração e purificação dos GAGs

A utilização da enzima papaína durante o processo de extração e o CCP na etapa de precipitação dos GAGs presentes na pele da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) resultou em 0,015 g de extrato total. A purificação dos polissacarídeos por cromatografia em DEAE-celulose resultou na separação de duas diferentes frações de GAGs (F I e F II), eluídas nas concentrações 0,50 e 0,75 M de NaCl, respectivamente (Figura 1). A maior metacromasia foi obtida para a fração F II, eluída com 0,75 M de NaCl. O maior rendimento (1,60 mg) de GAGs também foi obtido na F II quando comparada a F I (Tabela 1). O perfil cromatográfico de AT, quando determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico, foi semelhante ao metacromático de GAGs. 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.

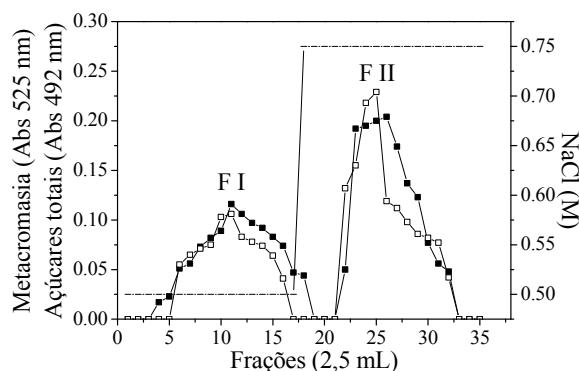


Figura 1. Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose do extrato total obtido da pele de tilápia do Nilo, (*O. niloticus*). A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0. Os GAGs adsorvidos no gel foram eluídos com adição de NaCl (0,50 e 0,75 M). (■—■) metacromasia; (○—○) açúcares totais; (—) concentração de NaCl (M).

A utilização da papaína no processo de extração e de CCP na etapa de precipitação de PS vem sendo bastante empregada em organismos aquáticos, incluindo algas marinhas, ascídias, esponjas, gramíneas marinhas e peixes (AQUINO et al., 2005; DELLIAS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2009a; RODRIGUES et al., 2011; SOUSA et al., 2007b; TINGHO et al., 2005; ZIERER; MOURÃO, 2000).

Rodrigues et al. (2009b), avaliando o resultado do fracionamento (DEAE-celulose) de GAGs isolados da pele da carpa comum (*C. carpio*) relataram a presença no extrato total de cinco diferentes frações de GAGs, eluídas com 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 e 1,50 M de NaCl, respectivamente. Os rendimentos para aquelas mensuráveis foram 2,70 (0,75 M); 1,30 (1,00 M) e 1,70 mg (1,25 M), respectivamente, totalizando, assim, 5,70 mg de GAGs.

Neste trabalho, o rendimento das frações de GAGs de *O. niloticus* foi 3,00 mg (Tabela 1). A comparação entre este estudo e o estudo de Rodrigues et al. (2009b) sugere que *C. carpio* é mais rica em GAGs em relação à *O. niloticus*. Contudo, pesquisas são necessárias para averiguar se os parâmetros de qualidade de água e o manejo intensivo no cultivo comercial dos peixes influenciam na produção de GAGs (ARAÚJO et al., 2010). Segundo Moreira et al. (2001), o estresse (agente imunossupressor) pode vir a favorecer a uma diminuição das defesas naturais dos organismos aquáticos, tornando-os suscetíveis aos micro-organismos patogênicos e causando doenças.

Caracterização físico-química dos GAGs por eletroforese em gel de agarose

As frações F I e F II foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,5%), como apresentados na Figura 2. O procedimento eletroforético das frações de *O. niloticus* mostrou um perfil migratório bastante similar ao padrão de DS. A fração F II revelou uma banda com intensa metacromasia (mais carregada) quando comparada à F I, sugerindo, a esta última, uma menor presença de grupos sulfatados na estrutura química desse polissacarídeo. Por outro lado, F I e F II apresentaram um padrão homogêneo de cargas negativas, o que pode ser o resultado do fracionamento destes GAGs em coluna de DEAE-celulose. A semelhança do padrão eletroforético (F I e F II) dos GAGs de *O. niloticus* sugere a ubiquidade preliminar da presença de DS na pele deste peixe estudado.

Tais características destes GAGs foram diferentes daquelas recentemente reportadas por Rodrigues et al. (2009b) que também utilizaram a protease cisteínica (papaína) e o procedimento cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) na extração e purificação desses compostos, revelando por eletroforese a ocorrência preliminar de DS e a preponderância de HS na pele da carpa comum (*C. carpio*).

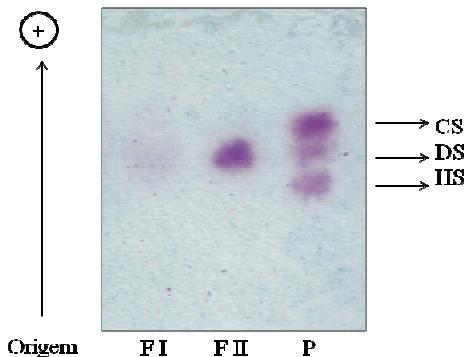


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose das frações F I e F II purificadas da pele da tilápia do Nilo (*O. niloticus*). As frações (F I e F II) e os padrões (P) de GAGs condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS) presentes no gel foram corados com azul de toluidina a 0,1%.

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

A diversidade de PSs sintetizados por diferentes espécies de esponjas marinhas foi relatada por Zierer e Mourão (2000). A pesquisa demonstrou que dentre as quatro espécies utilizadas (*Aplysina fulva*, *Chondrilla nucula*, *Dysidea fragilis* e *Hymeniacidon heliophila*), ocorre uma variação em composição química e massas moleculares dos PSs. Tais diferenças sugeriram para os autores um possível envolvimento desses compostos na agregação específica de células e/ou na integridade estrutural do filo porífera, semelhante quando comparados aos proteoglicanos de tecidos conectivos de mamíferos.

Os GAGs são distribuídos em uma variedade de tecidos de diferentes origens, sendo os principais constituintes do tecido conjuntivo de vertebrados. Geralmente, o DS é o glicosaminoglicano sulfatado predominante na pele de várias espécies de peixes (DELLIAS et al., 2004; MANSOUR et al., 2009; SAKAI et al., 2003; SOUZA et al., 2007a), enquanto o CS e HS podem ocorrer em outras (RODRIGUES et al., 2009b; SOUZA et al., 2007b). Contudo, pouco ainda se sabe sobre o papel biológico dos GAGs isolados de peixes. 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).

Estudando a distribuição de GAGs em diferentes órgãos elétricos da enguia elétrica *E. electricus*, Souza et al. (2007b) observaram que o CS ocorre como GAG principal. Foram identificadas também baixas concentrações de cadeias de híbridos CS/DS e HS. Para os autores da pesquisa, a detecção desses GAGs em diferentes órgãos da espécie sugere uma distribuição e localização do CS relacionado a diferentes funções biológicas do animal.

Mansour et al. (2009) isolaram duas frações de GAGs da pele da raia *Raja radula* diferentes entre si em pesos moleculares e cargas negativas. A caracterização físico-química dos polissacarídeos da espécie sugeriu a presença de DS e ácido hialurônico, este último destituído de grupamentos sulfatos. Mais recentemente, Rodrigues et al. (2009b) levantaram a hipótese que um estudo comparativo dessas moléculas isoladas da pele de diferentes espécies de peixes poderiam oferecer implicações na identificação desses vertebrados aquáticos, tendo em vista a maior estabilidade dos polissacarídeos frente às proteínas (NELSON; COX, 2005).

Análises químicas

A composição química das frações de GAGs isolados de *O. niloticus* também mostrou-se diferente quando comparada àquela obtida por Rodrigues et al. (2009b) para *C. carpio* (Tabela 1). A área metacromática integrada (58,11%) da F II (*O. niloticus*) indicou maior presença de GAGs comparada aquela de F II obtida de *C. carpio* (RODRIGUES et al., 2009b), quando representada pelo cromatograma de GAGs. O maior conteúdo de SL (16,21%) foi encontrado para F II. Este fato justifica sua maior metacromasia observada no procedimento de eletroforese (Figura 2). O conteúdo de AT também foi maior na F II (82,62%) quando comparada com F I (55,90%), superando os teores encontrados para as frações de GAGs obtidas por Rodrigues et al. (2009b), utilizando a espécie *C. carpio*.

Contudo, tais diferenças na composição química de GAGs entre as espécies não permitem assim serem comparadas, tendo em vista o método analítico usado para a determinação de AT nos estudos. Acredita-se que o método fenol-ácido sulfúrico modificado por Masuko et al. (2005), utilizado nesta pesquisa, seja mais eficiente na dosagem de AT comparado àquele de Dubois et al.

(1956), já que a adição prévia do ácido, que possui poder de hidrólise, favorece uma maior sensibilidade de detecção pelo fenol na quantificação de açúcares. A ausência de PT nas frações de GAGs de *O. niloticus* sugere a eficiência do método na digestão enzimática de proteínas pela papaína durante a extração dos polissacarídeos (RODRIGUES et al., 2010a e b), quando também comparadas para aquelas frações de GAGs obtidas de *C. carpio* (RODRIGUES et al., 2009b) (Tabela 1).

Tabela 1. Área metacromática integrada (AMI), açúcares totais (AT) e proteínas totais (PT) das frações de GAGs DEAE-celulose de *O. niloticus* comparadas aquelas de *C. carpio*.

Frações	NaCl	Rendimento (mg)	AMI %	AT %	SL %	PT %
<i>Oreochromis niloticus</i>						
F I	0,50 M	1,40	41,89	55,90	7,40	-
F II	0,75 M	1,60	58,11	82,62	16,21	-
<i>Cyprinus carpio</i> *						
F I	0,50 M	-	9,21	nd	nd	nd
F II	0,75 M	2,70	30,75	24,32	nd	1,84
F III	1,00 M	1,30	24,42	38,67	nd	-
F IV	1,25 M	1,70	20,53	28,45	nd	-
F V	1,50 M	-	15,09	nd	nd	nd

nd: não-determinado - : não-detectado; * Rodrigues et al. (2009b).

Atividade anticoagulante

O teste do TTPA detectou frações de GAGs isoladas da pele da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) capazes de alterar o tempo normal de coagulação (Figura 3). A concentração mínima de GAG capaz de prolongar o TTPA foi de $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$ na fração F II, cuja atividade foi da ordem de $23,80 \text{ UI mg}^{-1}$ comparada a HEP não-fracionada (193 UI mg^{-1}). A menor atividade anticoagulante ($4,72 \text{ UI mg}^{-1}$) foi detectada na fração F I, que a uma elevada concentração de polissacarídeo ($1,00 \text{ mg mL}^{-1}$), praticamente não alterou o TTPA. Nesse contexto, as frações de GAGs apresentaram TTPAs distintos entre si, prolongando o tempo de coagulação em 1,29 e 4,08 vezes (F I e F II, respectivamente) em relação ao controle (plasma). Desta forma, os GAGs de *O. niloticus* prolongaram o tempo normal de coagulação inferior a HEP padrão, sugerindo que essas moléculas inibiram a via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação sanguínea (RODRIGUES et al., 2009a, 2010a e b).

Os efeitos colaterais e o risco de contaminação da HEP (MELO et al., 2008; NADER et al., 2001) têm motivado a busca por novos anticoagulantes (RODRIGUES et al., 2009a e b; WU et al., 2010).

O potencial anticoagulante de GAGs isolados de peixes tem sido pouco estudado. Dellias et al. (2004) compararam o DS purificado da pele ventral de três espécies de raias (*Dasyatis americana*, *D. guttata* e *Aetobatus narinari*), nativas da costa brasileira, e daquela oriunda do rio Amazonas (*Potamotrygon motoro*). Os resultados indicaram que somente os DSs obtidos de

D. americana e *D. guttata* foram capazes de alterar o TTPA, e aquele de *D. americana* prolongou acentuadamente o TTPA e inibiu a trombina mediante o cofator II da heparina, enquanto o DS de *D. guttata* mostrou perfil de atividade semelhante ao DS de mamífero. *A. narinari* e *P. motoro* possuíram DSs destituídos de atividade anticoagulante. Parece que, mesmo esses compostos serem ricos em densidade de cargas negativas, a composição dissacarídica e o arranjo dessas moléculas sugerem ser importantes na ação anticoagulante.

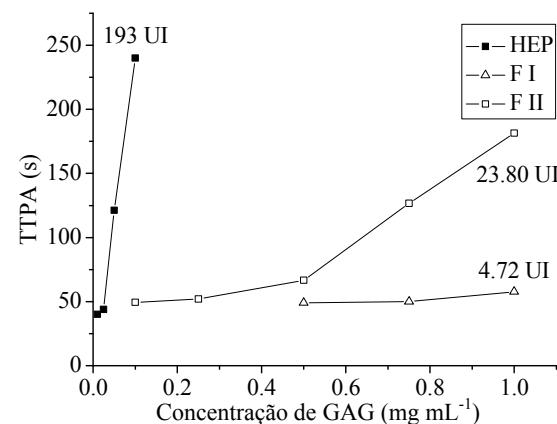


Figura 3. Atividade anticoagulante (TTPA) das frações de GAGs (F I e F II) obtidas de *O. niloticus* em relação a HEP não-fracionada. Os pontos representam os valores médios do TTPA a partir de duas determinações.

Uma atividade anticoagulante foi relatada para o DS obtido da enguia elétrica brasileira de água doce *E. electricus*, tendo como mediador inibitório o cofator II da heparina sobre a trombina. Esse GAG também apresentou efeito antitrombótico (dose-dependente) reduzindo a formação de trombos em ratos em até 50% (SOUZA et al., 2007a). Os pesquisadores também compararam o efeito desse GAG com aquele isolado de uma outra espécie de enguia (*Anguilla japonica*) por Sakai et al. (2003) e averiguaram que o DS isolado desta última não apresentou atividade anticoagulante, mesmo apresentando uma composição dissacarídica semelhante à espécie brasileira.

Neste trabalho, a diferença entre as atividades anticoagulantes das frações de GAGs obtidas de *O. niloticus* reforçam as observações apresentadas por eletroforese (Figura 3). A maior atividade foi verificada para dependente da fração de GAG que apresentou a maior densidade de cargas negativas no gel (Figura 2), enquanto a F I, a qual apresentou atividade anticoagulante de apenas $4,72 \text{ UI mg}^{-1}$, foi fracamente observada no perfil eletroforético. A maior intensidade metacromática da fração F II e os conteúdos de AT e SL (Figura 1 e Tabela 1) também

vêm a justificar sua maior atividade. Tal fato sugere a hipótese de Farias et al. (2000), em que a adição de dois ésteres de sulfatos a um único resíduo de D-galactose do PS isolado da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* promove um efeito “amplificador” sobre o tempo de coagulação sanguínea, cuja ação potencializadora ocorre mediante antitrombina e cofator II da heparina (reguladores fisiológicos da coagulação sanguínea) sobre a atividade inibitória da trombina. Portanto, estes fatos sugerem que o sulfato presente nos GAGs de *O. niloticus* é importante para modificar o TTPA.

Portanto, os GAGs de *O. niloticus* requerem estudos posteriores quanto seus mecanismos de ação anticoagulante e caracterização estrutural (WU et al., 2010), assim como o uso de enzimas de degradação específicas (DELLIAS et al., 2004). Mansour et al. (2009) isolaram um DS da pele da raia marinha (*R. radula*) com elevado teor de sulfato (29%), dosado pelo mesmo método utilizado neste estudo, e efeito anticoagulante. O polissacarídeo exerce sua potente atividade mediada pela antitrombina e cofator II da heparina. Recentemente, um GAG isolado, com o uso da digestão proteolítica (papaína), da pele da carpa comum (*C. carpio*) também apresentou atividade anticoagulante ($4,89 \text{ UI mg}^{-1}$) (RODRIGUES et al., 2009b). Porém, nesse último caso, a atividade foi inferior quando comparada a este trabalho (Figura 3).

Em suma, o presente estudo demonstrou que a utilização de resíduos oriundos do processamento da espécie *O. niloticus* sugere como uma fonte alternativa de GAGs para serem posteriormente testados em modelos experimentais de trombose em ratos. A investigação dessa hipótese poderia ajudar na melhor compreensão dos requerimentos necessários para correlacionar não apenas uma possível ação antitrombótica, mas também a persistência do efeito, níveis de circulação no plasma, disponibilidade e absorção quando a droga é administrada em diferentes rotas. Cada polissacarídeo pode exercer ações particularidades com os componentes do sistema sanguíneo (FONSECA et al., 2008).

Conclusão

O protocolo que utiliza a papaína para a extração dos glicosaminoglicanos presentes na pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) mostra-se eficaz. O procedimento de cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) resulta na separação de duas frações que revela, por eletroforese, moléculas distintas em densidade de carga e que possivelmente sejam dermatan sulfato. Os compostos apresentam-se capazes de exercer atividade anticoagulante “in vitro”, mas com efeitos inferiores à da heparina.

Agradecimentos

Ao Programa da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap), ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e ao Ministério da Saúde (MS).

Referências

- AQUINO, R. S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M.; VALENTE, A. P.; ANDRADE, L. R.; MOURÃO, P. A. S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycobiology*, v. 15, n. 1, p. 11-20, 2005.
- ARAÚJO, G. S.; RODRIGUES, J. A. G.; DA SILVA, J. W. A.; FARIAS, W. R. L. Cultivo da tilápia do Nilo em tanques-rede circulares em diferentes densidades de estocagem. *Bioscience Journal*, v. 26, n. 3, p. 428-434, 2010.
- BORSING, L.; WANG, L.; CALVACANTE, M. C. M.; CARDILO-REIS, L.; FERREIRA, P. L.; MOURÃO, P. A. S.; ESKO, J. D.; PAVÃO, M. S. G. Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber. Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 20, p. 1484-1491, 2007.
- 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. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRITO, A. S.; ARIMATÉIA, D. S.; SOUZA, L. R.; LIMA, M. A.; SANTOS, V. O.; MEDEIROS, V. P.; FERREIRA, P. A.; SILVA, R. A.; FERREIRA, C. V.; JUSTO, G. Z.; LEITE, E. L.; ANDRADE, G. P. V.; OLIVEIRA, F. W.; NADER, H. B.; CHAVANTE, S. F. Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 21, p. 9588-9595, 2008.
- DELLIAS, J. M. M.; ONOFRE, G. R.; WERNECK, C. C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M.; MELO, F. R.; FARIAS, W. R. L.; SILVA, L. C. F. 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. 9-10, p. 677-683, 2004.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Analytical Biochemistry*, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. *Biochemistry Journal*, v. 84, n. 1, p. 106-110, 1962.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for

- determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. 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.
- FARNDALE, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimistry et Biophysica Acta**, v. 883, n. 2, p. 173-177, 1986.
- FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. N. M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 3, p. 539-545, 2008.
- GUERRINI, M.; BECCATI, D.; SHRIVER, Z.; NAGGI, A.; VISWANATHAN, K.; BISIO, A.; CAPILA, I.; LAMSING, J. C.; GUGLIERI, S.; FRASER, B.; AL-HAKIN, A.; GUNAY, N. S.; ZHANG, Z.; ROBINSON, L.; BUHSE, L.; NASR, M.; WOODCOCK, J.; LANGER, R.; VENKATARAMAN, G.; LINHARDT, R. J.; CASU, B.; TORRI, G.; SASISEKHARAN, R. Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 669-675, 2008.
- MANSOUR, M. B.; MAJDOUB, H.; BATAILLE, I.; ROUDESLI, M. S.; HASSINE, M.; AJZENBERG, N.; CHAUBET, F.; MAAROUFI, R. M. Polysaccharides from the skin of the ray *Raja radula*. Partial characterization and anticoagulant activity. **Thrombosis Research**, v. 123, n. 4, p. 671-678, 2009.
- MAO, W.; LI, H.; ZHANG, H.; QI, X.; SUN, H. Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 1, p. 70-74, 2009.
- MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S. I.; LEE, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69-72, 2005.
- MEDEIROS, G. F.; MENDES, A.; CASTRO, R. A. B.; BAÚ, E. C.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1475, n. 3, p. 285-294, 2000.
- MELO, E. I.; PEREIRA, M. S.; CUNHA, R. S.; SÁ, M. P. L.; MOURÃO, P. A. S. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 23, n. 2, p. 169-174, 2008.
- MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ulbra, 2001.
- NADER, H. B.; PINHAL, M. A. S.; BAÚ, E. C.; CASTRO, R. A. B.; MEDEIROS, G. F.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L.; TRINDADE, E. S.; SHINJO, S. K.; ROCHA, H. A. O.; TERSARIOL, I. L. S.; MENDES, A.; DIETRICH, C. P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 6, p. 699-709, 2001.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005.
- RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacáridos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 2, p. 224-231, 2009a.
- RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUEIROZ, I. N. L.; QUINDERÉ, A. L. G.; BENEVIDES, N. M. B. Purificação e atividade anticoagulante de glicosaminoglycanos isolados da pele da carpa comum, *Cyprinus carpio*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 3, p. 381-387, 2009b.
- RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P. BENEVIDES, N. M. B. Polissacáridos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 113-120, 2010a.
- RODRIGUES, J. A. G.; ARAÚJO, I. W. F.; PAULA, G. A.; BESSA, E. F.; LIMA, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Isolamento, fracionamento e atividade anticoagulante de iota-carragenanas da *Solieria filiformis*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2310-2316, 2010b.
- RODRIGUES, J. A. G.; ARAÚJO, I. W. F.; PAULA, G. A.; BESSA, E. F.; LIMA, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, p. 137-144, 2011.
- SAKAI, S.; KIM, W. S.; LEE, I. S.; KIM, Y. S.; NAKAMURA, A.; TOIDA, T.; IMANARI, T. Purification and characterization of dermatan sulfate from the skin of the eel, *Anguilla japonica*. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 3, p. 263-269, 2003.
- SILVA, T. M. A.; ALVES, L. G.; QUEIROZ, K. C. S.; SANTOS, M. G. L.; MARQUES, C. T.; CHAVANTE, S. F.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 4, p. 523-533, 2005.
- SOUZA, M. L. S.; DELLIAS, J. M. M.; MELO, F. R.; SILVA, L. C. F. 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. 3, p. 387-394, 2007a.

SOUZA, M. L. S.; FREITAS, C. F.; DOMINGOS, M. A. O.; NUNES-TAVARES, N.; HASSON-VOLOCH, A.; NASCIUTTI, L. E.; SILVA, L. C. F. Identification and distribution of chondroitin sulfate in the three electric organs of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L.). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, n. 2, p. 227-233, 2007b.

TINGHO, M. G.; KOLSET, S. O.; OFSTAD, R.; ENERSEN, G.; HANNESSON, K. O. 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. 3, p. 349-357, 2005.

YOON, S. J.; PYUN, Y. R.; HWANG, J. K.; MOURÃO, P. A. S. A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichrioides* has mainly heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 15, p. 2326-2330, 2007.

WU, M.; XU, S.; ZHAO, J.; KANG, H.; DING, H. Physicochemical characteristics and anticoagulant

activities of low molecular weight fractions by free-radical depolymerization of a fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber *Thelenota ananas*. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 716-723, 2010.

ZIERER, M. S.; MOURÃO, P. A. S. A wide diversity of sulfated polysaccharides are synthesized by different species of marine sponges. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 2, p. 209-216, 2000.

ZHANG, H. J.; MAO, W. J.; FANG, F.; LI, H. Y.; SUN, H. H.; CHEN, Y.; QI, X. H. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 428-434, 2008.

Received on February 11, 2010.

Accepted on September 29, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.