



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**ADRIANA DA SILVA BRITO**

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE UM HEPARINÓIDE  
ISOLADO DO INVERTEBRADO MARINHO *Litopenaeus  
vannamei***

**NATAL  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ADRIANA DA SILVA BRITO**

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE UM HEPARINÓIDE  
ISOLADO DO INVERTEBRADO MARINHO *Litopenaeus  
vannamei***

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 (a): Dra. Suely Ferreira Chavante  
Co-orientador: Dr. Elizeu Antunes dos Santos

**NATAL  
2008**

Divisão de Serviços Técnicos  
Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Brito, Adriana da Silva.

Potencial terapêutico de um heparinóide isolado do invertebrado marinho *Litopenaeus vannamei* / Adriana da Silva Brito. – Natal [RN], 2008.

84 f.

Orientador: Suely Ferreira Chavante.

Co-orientador: Elizeu Antunes dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. Heparina - *Litopenaeus vannamei* - Dissertação. 2. Compostos bioativos - Dissertação. 3. Heparinóide - Dissertação. 4. Inflamação – Dissertação. I. Chavante, Suely Ferreira. II. Santos, Elizeu Antunes dos. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 547.995: 639.512(043.3)

ADRIANA DA SILVA BRITO

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE UM HEPARINÓIDE  
ISOLADO DO INVERTEBRADO MARINHO  
*Litopenaeus vannamei***

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.

Aprovado em: 13 / 06 /2008

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suely Ferreira Chavante  
Departamento de Bioquímica - UFRN  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leny Toma  
Departamento de Bioquímica - UNIFESP  
1<sup>o</sup> Examinador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Wanderley Oliveira  
Departamento de Bioquímica - UFRN  
2<sup>o</sup> Examinador

## **Dedico este trabalho**

Aos meus pais, Vonarte e Fátima, pelo amor e dedicação e por terem me criado em um lar bem estruturado, moldando o meu caráter e minha personalidade. Amo muito vocês!

Aos meus avós, Celina Neci e Agostinho Brito (*in memoriam*), por terem investido, desde cedo, na minha educação. Gostaria que ainda estivessem aqui para que pudessem ver a realização de um sonho que eles ajudaram a construir.

A todos da minha querida família

“A Família não nasce pronta; constrói-se aos poucos, e é o melhor laboratório do amor. Em casa, entre pais e filhos, pode-se aprender a amar, pode-se experimentar com profundidade a grande aventura de amar sem medo. A família pode ser o ambiente mais apropriado para uma maravilhosa experiência de amor”.

Mazenildo Feliciano Pereira

## **Dedico este trabalho**

À minha orientadora Suely Ferreira Chavante por me dar a oportunidade de desfrutar de seus ensinamentos e companhia; Por ter sido mais do que uma orientadora. Por acreditar em mim e por me ensinar a ir adiante. Por ter se tornado, durante esses seis agradáveis anos de convivência, um grande exemplo em minha vida. Um exemplo de força, garra e determinação; de amor à pesquisa, de profissionalismo e de respeito.

Por me incentivar. Por todo o seu empenho e luta em me ajudar na realização de um grande sonho. Na verdade, as palavras são muito simples para expressar a minha imensa gratidão, mas espero que a mesma possa ser sentida.

**“Professores ideais são os que fazem pontes, que convidam os alunos a atravessarem, e, depois, tendo facilitado a travessia, desmoronam-se com prazer, encorajando-os a criarem suas próprias pontes”.**

## **Dedico este trabalho**

A todas as pessoas que fizeram ou fazem parte do Departamento de Bioquímica da UFRN, professores, funcionários e alunos, que conviveram comigo durante esses anos dando-me lições de amizade, companheirismo, força de vontade e profissionalismo.

Aos meus amigos Dayse, Lucilla e Marcelo que contribuíram imensamente para a realização desse trabalho e que sempre me socorreram quando eu mais precisei.

À minha amiga Paula Anastácia, uma grande pesquisadora, determinada, batalhadora e dedicada, que muitas vezes deixou de realizar seus próprios experimentos para me ajudar na realização dos meus.

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que elas acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

## AGRADECIMENTOS

- A **Deus**, que por sua infinita bondade permitiu essa vitória.
- Às professoras **Dra. Helena B. Nader** (UNIFESP) e **Dra. Carmen F. Veríssima** (UNICAMP), pela oportunidade de estagiar em seus laboratórios e realizar experimentos fundamentais para a finalização desse trabalho.
- À **Valquíria Medeiros**, pela grande ajuda na realização dos experimentos na UNIFESP.
- À **Isabel** (UNIFESP) pelo apoio técnico na realização do trabalho com as células endoteliais.
- Aos meus amigos da “República do Victor”: **Géssika, Alexandre, Alex, Paula, Rodrigo e Antônio**, por terem me recebido carinhosamente em sua república no período em que estive na UNICAMP.
- Aos colegas do Laboratório de Transdução de Sinal (UNICAMP) pela ótima convivência e pela imensa simpatia com que me receberam. Um agradecimento especial à **Paula, Rodrigo, Daisy Machado e Roberta**, que não apenas me ensinaram as metodologias necessárias para a realização dos experimentos, como também me auxiliaram na realização dos mesmos.
- À minha amiga **Cynthia Cardoso**, por ter me recebido em sua casa no período em que estive na UNIFESP.
- Aos amigos da minha turma de mestrado, por terem estado ao meu lado em momentos de dificuldades e sacrifícios. Obrigada pela amizade e pela alegria em todas as horas. Obrigada, **Lissandra, Micheline, Ana Celly, Dani, Videanny, Virgínia, Sérgio, Rodrigo Aquino, Ludovico, Juliana (Juju), Pablo e Cleysyvan** (que cursou algumas disciplinas com a turma).
- À professora **Fernanda Wanderley**, pelo seu apoio e dedicação ao Laboratório de Gliconjugados Bioativos I.
- Aos professores Maurício Sales e Edda Lisboa, que fizeram parte da banca de pré-qualificação, aos professores Hugo Alexandre e Luciana Duarte (banca de qualificação), e às professoras **Leny Toma** (UNIFESP) e **Fernanda Wanderley**, por darem grandes contribuições para a finalização desse trabalho.
- À dona **Margarita**, secretária do curso de pós-graduação em Bioquímica, por toda sua competência e agilidade.
- Aos mestres **Celton** e **Vanessa** pelos ensinamentos e amizade.

- A minha querida amiga **Eliene** pelo seu magnífico dom de transmitir alegria em todos os momentos.
- A todos que fizeram ou fazem parte do laboratório de Glicoconjugados Bioativos I: **Ana Katarina, Lucilla, Dayse, Tássia, Ana Karla, Ismail, Vanessa, Louise, Elisabeth, Marcelo, Yuri e Cecília**. Obrigada pela demonstração de garra e força para vencer as dificuldades e obstáculos que cruzaram nosso caminho. Pude aprender muito com vocês.
- Às empresas **Potiguar** e **Produmar** por terem fornecido o material biológico necessário para a realização desse trabalho.
- Aos professores **Hugo Alexandre, Dilma Ferreira, Suely Chavante, Elizeu Antunes, Edda Leite, Luiz Roberto, João Felipe, Fernanda Wanderley, Jacira Andrade, Selma Jerônimo** e **Maurício Sales** por terem me ensinado os princípios da Bioquímica.
- Ao **programa de pós-graduação em Bioquímica** pelos recursos concedidos para que eu pudesse realizar os experimentos em São Paulo.
- À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelos recursos concedidos para elaboração desse trabalho.
- Às pessoas que sempre estiveram e que estão ao meu lado, de forma incondicional, me apoiando e me estimulando e a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho. Obrigada!

“...Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando. Porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu”.

Luiz Fernando Veríssimo

## RESUMO

A ocorrência de compostos bioativos em representantes da biodiversidade marinha vem despertando o interesse da indústria farmacêutica. Heparina, um polissacarídeo sulfatado cuja presença já foi identificada em vários invertebrados marinhos, destaca-se por sua extraordinária versatilidade funcional. Além de interferir na coagulação sanguínea, essa molécula possui grande potencial antiinflamatório. No entanto, sua forte atividade anticoagulante dificulta o aproveitamento clínico de sua propriedade antiinflamatória, o que estimula a pesquisa por análogos de heparina com efeitos colaterais reduzidos. Diante disso, este trabalho teve por objetivos avaliar o efeito de um composto semelhante à heparina (heparinóide), isolado do cefalotórax do camarão *Litopenaeus vannamei*, sobre a resposta inflamatória, hemostasia e síntese de heparan sulfato antitrombótico pelas células endoteliais, além de estudar alguns aspectos relevantes a cerca de sua estrutura. O heparinóide purificado foi estruturalmente caracterizado seguindo uma abordagem analítica, envolvendo eletroforeses e cromatografias. As análises estruturais mostraram que esse composto possui um elevado conteúdo de resíduos de ácido glucurônico e de dissacarídeos dissulfatados. Ao contrário da heparina de mamíferos, o heparinóide foi incapaz de estimular a síntese de heparan sulfato pelas células endoteliais nas concentrações testadas, além de apresentar atividade anticoagulante *in vitro* e efeito hemorrágico reduzidos. Em um modelo de inflamação aguda, o composto isolado do camarão reduziu mais de 50% da infiltração celular. Além de reduzir a atividade de MMP-9 e proMMP-2 no lavado peritoneal dos animais submetidos ao modelo de inflamação, o heparinóide também reduziu a atividade de MMP-9 secretada por leucócitos humanos ativados. Esses resultados demonstram o potencial do heparinóide de *L. vannamei* em interferir em vários eventos da resposta inflamatória. Por possuir atividade anticoagulante e efeito hemorrágico reduzidos, esse composto pode servir como um modelo estrutural para direcionar o desenvolvimento de agentes terapêuticos mais específicos para o tratamento de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*. Compostos bioativos. Heparina. Heparinóide. Inflamação.

## ABSTRACT

The occurrence of bioactive compounds in marine organisms comes awakening the interest of the pharmaceutical industry. Heparin, a sulfated polysaccharide whose presence was already identified in several marine invertebrates, is very attractive due to its remarkable functional versatility. Besides to intervene in blood coagulation, this molecule has a great anti-inflammatory potential. However, its strong anticoagulant activity difficult the clinical exploitation of its anti-inflammatory properties. Thus, the aims of this work were to evaluate the effect of a heparin-like compound (heparinoid), isolated from the cephalothorax of the *Litopenaeus vannamei* shrimp, on the inflammatory response, hemostasis and synthesis of antithrombotic heparan sulfate by endothelial cells, besides studying some aspects concerning its structure. The purified heparinoid was structurally characterized following an analytical procedure, involving electrophoresis and chromatography. The structural analysis have shown that this compound possess a high content of glucuronic acid residues and disulfated disaccharide units. In contrast to mammalian heparin, the heparinoid was incapable to stimulate the synthesis of heparan sulfate by endothelial cells in the tested concentrations, beyond to show reduced anticoagulant activity and hemorrhagic effect. In a model of acute inflammation, the compound isolated from the shrimp reduced more than 50% of the cellular infiltration. Besides reduce the activity of MMP-9 and proMMP-2 of the peritoneal lavage of inflamed animals, the heparinoid also reduced the activity of MMP-9 secreted by activated human leukocytes. These results demonstrate the potential of heparinoid from *L. vannamei* to intervene in the inflammatory response. For possessing reduced anticoagulant activity and hemorrhagic effect, this compound can serve as a structural model to direct the development of more specific therapeutical agents to the treatment of inflammatory diseases.

Key-words: *Litopenaeus vannamei*. Bioactive compounds. Heparin. Heparinoid. Inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 1:  | Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos sulfatados.....   | 21 |
| Figura 2:  | Modo de ação da heparinase e heparitinase II.....   | 23 |
| Figura 3:  | Representação idealizada da cadeia de heparina, mostrando os domínios N-acetilado (NA), N-acetilado/N-sulfatado (NA/NS) e N-sulfatado (NS).....                     | 24 |
| Figura 4:  | Esquema do processo de rolamento e transmigração dos leucócitos.....  | 27 |
| Figura 5:  | Camarão da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i> .....  | 31 |
| Figura 6:  | Esquema de extração e fracionamento dos GAGs do cefalotórax de <i>L. vannamei</i> .....   | 37 |
| Figura 7:  | Fracionamento, com acetona, dos GAGs do cefalotórax de <i>L. vannamei</i> .....   | 38 |
| Figura 8:  | Purificação do heparinóide de camarão por cromatografia de troca-iônica em DEAE-Sephacel.....   | 40 |
| Figura 9:  | Esquema do ensaio de atividade anti-hemostática.....  | 42 |
| Figura 10: | Peritonite induzida por tioglicolato de sódio.....  | 45 |
| Figura 11: | Comportamento eletroforético em sistema PDA dos GAGs do cefalotórax de <i>L. vannamei</i> após complexação com resina de troca iônica.....                          | 48 |
| Figura 12: | Comportamento eletroforético no sistema PDA (A) e Ba/PDA (B) da fração F-0,5, obtida após tratamento .....  | 49 |
| Figura 13: | Purificação do heparinóide de camarão por cromatografia de troca-iônica em DEAE-sephacel.....   | 50 |
| Figura 14: | Cromatografia em papel dos produtos obtidos após ação da heparinase e da heparitinase II.....   | 51 |
| Figura 15: | Cromatografia em papel dos produtos obtidos após ação da heparitinase I e da heparitinase II.....   | 52 |
| Figura 16: | Atividade anticoagulante <i>in vitro</i> do heparinóide de camarão pelo ensaio de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT).....                               | 53 |
| Figura 17: | Ensaio da atividade hemorrágica da heparina e heparinóide do camarão.....   | 54 |
| Figura 18: | Quantificação dos GAGs secretados para o meio de cultura.....   | 55 |
| Figura 19: | Efeito do heparinóide de camarão sobre a migração leucocitária.....   | 56 |
| Figura 20: | Zimografia para determinação da atividade gelatinolítica das MMP-9 e proMMP-2 presentes no líquido peritoneal dos animais tratados com heparina ou heparinóide..... | 58 |
| Figura 21: | Zimografia para determinação das atividades de MMP-9 liberada por leucócitos humanos ativados com fitohemaglutinina (PHA).....                                      | 60 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>Tabela 1:</b> | <b>Metaloproteinases de matriz encontradas em mamíferos.....</b> | <b>28</b> |
|------------------|--|-----------|

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                         |  |
|-------------------------|--|
| $\Delta$                | Presença de insaturação entre C-4 e C-5 do resíduo de ácido urônico                |
| $\Delta U, 2S-GlcNS$    | Dissacarídeo insaturado dissulfatado   |
| $\Delta U, 2S-GlcNS,6S$ | Dissacarídeo insaturado trissulfatado  |
| $\Delta U-GlcNAc$       | Dissacarídeo insaturado N-acetilado  |
| $\Delta U-GlcNAc,6S$    | Dissacarídeo insaturado N-acetilado-6-sulfatado                                    |
| $\Delta U-GlcNS$        | Dissacarídeo insaturado N-sulfatado  |
| $\Delta U-GlcNS,6S$     | Dissacarídeo insaturado N,6-dissulfatado   |
| aPTT                    | Tempo de tromboplastina parcial ativada  |
| AT                      | Antitrombina   |
| Ba/PDA                  | Sistema descontínuo em tampão acetato de bário e tampão 1,3 diaminopropano acetato |
| CETAVLON                | Brometo de cetiltrimetilamônio   |
| cpm                     | Cintilações por minuto   |
| CS-4                    | Condroitim 4-sulfato   |
| CS-6                    | Condroitim 6-sulfato   |
| DEAE                    | Dietilaminoetil acetato  |
| DS                      | Dermatam sulfato   |
| EDA                     | Tampão 1,2 diaminoetano  |
| EDTA                    | Ácido etilenodiamino tetra-acético   |
| F-0,5                   | Fração obtida após precipitação com acetona na proporção 0,5:1                     |
| F-0,7                   | Fração obtida após precipitação com acetona na proporção 0,7:1                     |
| F-1,0                   | Fração obtida após precipitação com acetona na proporção 1:1                       |
| F-3,0 M                 | Fração 3,0 molar   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>GAGs</b>     | <b>Glicosaminoglicanos Sulfatados</b>            |
| <b>Glc</b>      | <b>Glucosamina</b>                               |
| <b>GlcNS</b>    | <b>Glucosamina N-sulfatada</b>                   |
| <b>HC</b>       | <b>Heparinóide do camarão <i>L. vannamei</i></b> |
| <b>HEP</b>      | <b>Heparina de mamíferos</b>                     |
| <b>HS</b>       | <b>Heparam sulfato</b>                           |
| <b>IdoA</b>     | <b>Ácido L-idurônico</b>                         |
| <b>IdoA2SO3</b> | <b>Ácido L- idurônico 2-sulfato</b>              |
| <b>LR</b>       | <b>Região de ligação</b>                         |
| <b>MMPs</b>     | <b>Metaloproteinases de Matriz</b>               |
| <b>NA/NS</b>    | <b>Domínios N-acetilados e N-sulfatados</b>      |
| <b>NS</b>       | <b>Domínio N-sulfatado</b>                       |
| <b>PDA</b>      | <b>1,3 diaminopropano acetato</b>                |
| <b>RMN</b>      | <b>Ressonância Magnética Nuclear</b>             |
| <b>SDS</b>      | <b>Dodecilsulfato de sódio</b>                   |
| <b>SFB</b>      | <b>Soro fetal bovino</b>                         |
| <b>UI</b>       | <b>Unidade internacional</b>                     |
| <b>UV</b>       | <b>Ultravioleta</b>                              |
| <b>v/v</b>      | <b>Volume/volume</b>                             |

## SUMARIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 20 |
| <b>2. OBJETIVOS</b>  |    |
| 2.1 Objetivo geral.....  | 32 |
| 2.2 Objetivos específicos.....   | 32 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>   |    |
| 3.1 Animais.....   | 34 |
| 3.2 Reagentes.....   | 34 |
| 3.3 Aparelhos.....   | 35 |
| 3.4 Extração dos glicosaminoglicanos sulfatados de <i>Litopenaeus vannamei</i> ..  | 36 |
| 3.5 Fracionamento com acetona.....   | 37 |
| 3.6 Comportamento eletroforético.....  | 38 |
| 3.7 Ressonância Magnética Nuclear.....   | 39 |
| 3.8 Purificação por cromatografia de troca-iônica.....   | 39 |
| 3.9 Degradação enzimática.....   | 40 |
| 3.10 Cromatografia em papel.....   | 40 |
| 3.11 Atividade anticoagulante.....   | 41 |
| 3.12 Atividade antihemostática.....  | 41 |
| 3.13 Efeito do heparinóide sobre a síntese de HS antitrombótico pelas células endoteliais.....                           | 43 |
| 3.14 Peritonite induzida por Tioglicolato de sódio.....  | 43 |
| 3.15 Zimografia.....   | 45 |
| 3.16 Cultura de leucócitos humanos.....  | 46 |
| 3.17 Efeito do heparinóide de camarão sobre a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) de leucócitos humanos..... | 46 |
| 3.18 Análise Estatística.....  | 46 |
| <b>4. RESULTADOS</b>   |    |
| 4.1 Identificação dos GAGs isolados do cefalotórax de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....                                  | 48 |
| 4.2 Purificação do heparinóide de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....  | 50 |
| 4.3 Degradação enzimática do heparinóide de <i>L. vannamei</i> .....   | 50 |
| 4.4 Atividade anticoagulante <i>in vitro</i> do heparinóide isolado do camarão.....                                      | 52 |
| 4.5 Avaliação do efeito hemorrágico residual do heparinóide de <i>L. vannamei</i> .....                                  | 53 |
| 4.6 Efeito do heparinóide de camarão sobre a síntese de GAGs pelas células endoteliais.....                              | 54 |
| 4.7 Efeito do heparinóide sobre o influxo de células à cavidade peritoneal.....  | 55 |
| 4.8 Efeito do Heparinóide sobre a Atividade das MMPs no Líquido Peritoneal   | 57 |
| 4.9 Efeito do heparinóide de camarão sobre a atividade da MMP-9 de leucócitos humanos.....                               | 59 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....  | 61 |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....   | 68 |

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>7. REFERÊNCIAS.....</b> | <b>70</b> |
| <b>8. APÊNDICE.....</b>    | <b>82</b> |

# **1. INTRODUÇÃO**

## Introdução

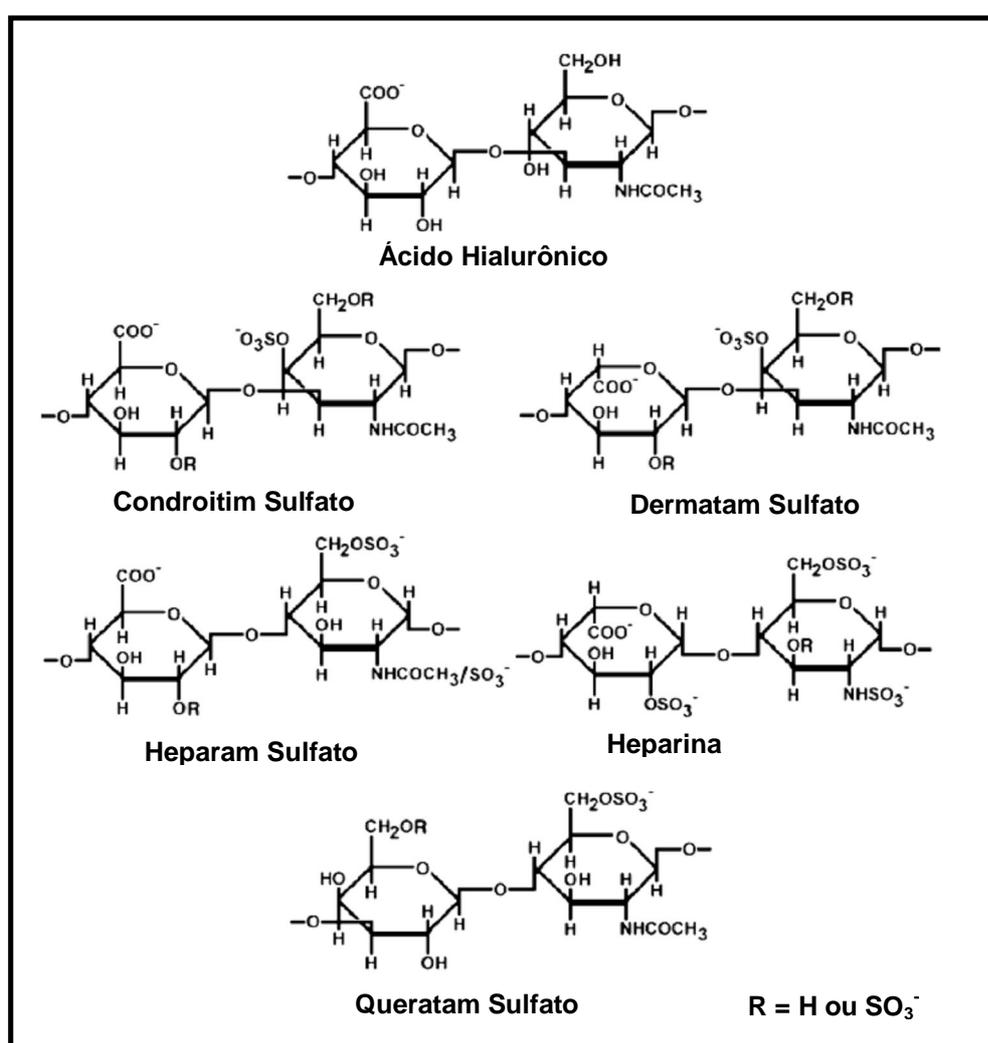
---

A possibilidade de extrair compostos naturais com potencial terapêutico a partir de organismos marinhos já vem sendo explorada pelo homem há mais de 50 anos (MUNRO et al., 1999). Diferentes compostos bioativos capazes de agir sobre processos biológicos distintos já foram descobertos em diversos representantes da biodiversidade marinha (MAYER et al., 2007). Produtos naturais com atividade antifúngica, por exemplo, estão presentes na cianobactéria *Lynbya majuscula* (MILLIGAN et al., 2000). Recentemente, foi descrito em esponjas marinhas a ocorrência de compostos com efeito citotóxico sobre bactérias gram-negativas, como *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (MOURA et al., 2006) e sobre uma variedade de células tumorais (TAKEMOTO et al., 2007).

Em outros processos biológicos importantes, como coagulação, angiogênese e proliferação celular, uma classe de compostos que se destaca pela sua importante participação é a dos polissacarídeos sulfatados (RAMAN; SASISEKHARAN, 2005), o que desperta o interesse da indústria farmacêutica pela sua pesquisa em fontes naturais. O estudo dessas moléculas isoladas de organismos marinhos revelou que estes podem representar uma fonte promissora de novos agentes terapêuticos. Farias et al. (2000) caracterizaram uma D-galactana sulfatada da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* e descobriram que essa molécula possui uma potente atividade anticoagulante. Polissacarídeos com propriedades farmacológicas também foram encontrados nas algas *Spatoglossum schroederi* (ROCHA et al., 2005; BARROSO et al., 2008) e *Codium pungiformis* (MATSUBARA et al., 2000).

Outro polissacarídeo sulfatado que vem sendo alvo de diversas pesquisas devido a sua grande versatilidade funcional é a heparina. Além de ser amplamente usada no tratamento e prevenção de eventos trombóticos, alguns aspectos estruturais dessa molécula, como sua grande densidade de cargas negativas, contribuem para sua interação com diversas proteínas, permitindo a interferência em vários processos biológicos importantes, além da coagulação. Apesar de sua produção comercial ser realizada a partir de órgãos de mamíferos, como o boi e o porco, a presença de compostos semelhantes à heparina (heparinóides) já foi identificada em diversos invertebrados marinhos (CASSARO; DIETRICH, 1977; DIETRICH et al., 1985; NADER et al., 1984; SANTOS et al., 2002).

A heparina, juntamente com outras moléculas como ácido hialurônico, condroitim 4- e 6-sulfatos, dermatam sulfato, heparam sulfato, faz parte de uma família de carboidratos complexos, denominada glicosaminoglicanos (GAGs). Essas moléculas diferenciam-se pelos tipos de açúcares constituintes, presença e posição de grupos sulfato e tipo de ligação glicosídica entre os resíduos (Figura 1) (FRANSON; HAVSMARK, 1970; FRANSON et al., 1974). Com exceção do ácido hialurônico, as cadeias de GAGs encontram-se ligadas através de ligações N- ou O-glicosídicas a esqueletos protéicos formando compostos conhecidos como proteoglicanos (JACKSON; BUSCH; CARDIN, 1991; KJELLEN; LINDAHL, 1991).



**Figura 1:** Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos sulfatados. Adaptada de Volpi e Maccari, 2006.

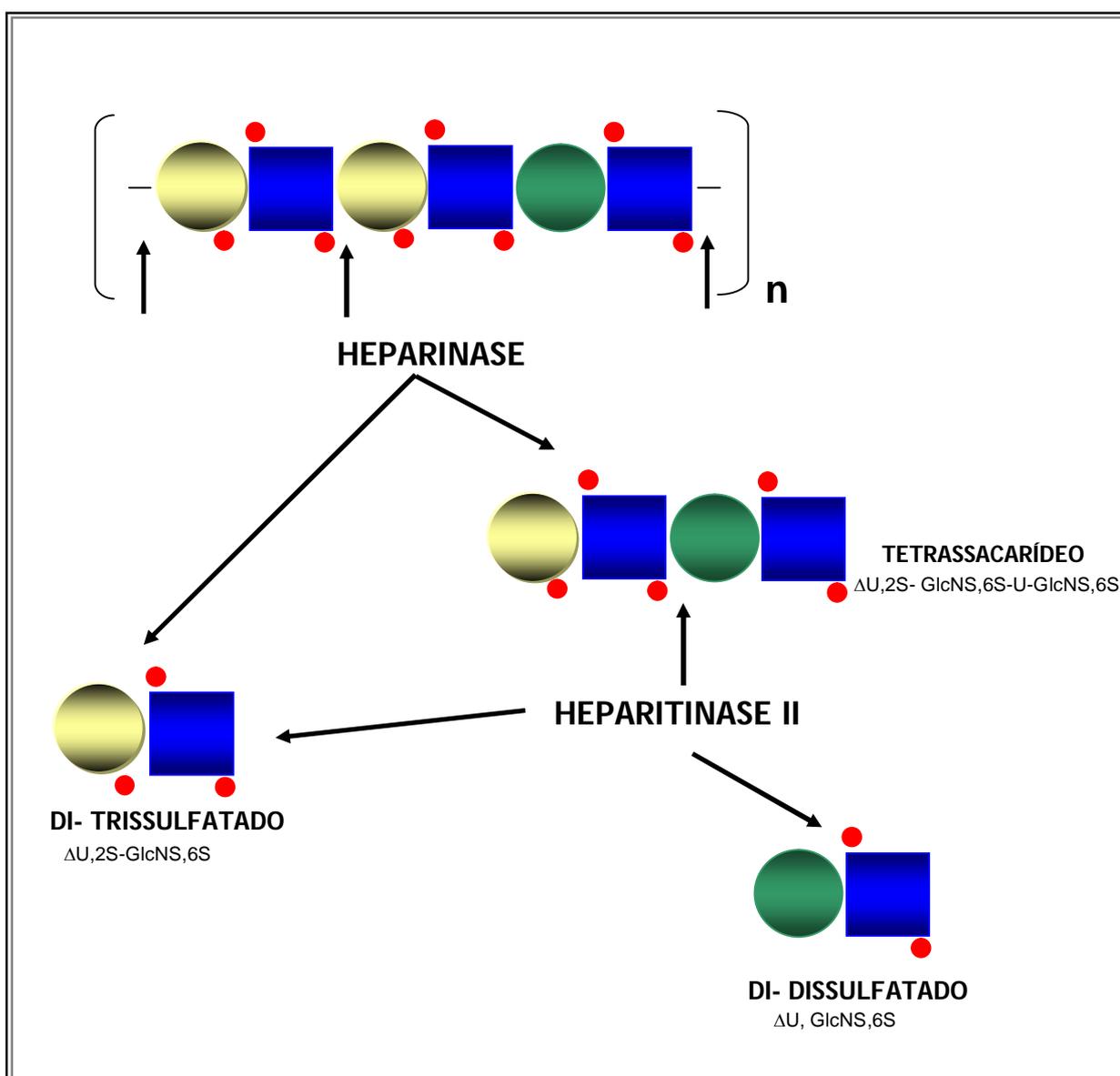
A estrutura química da heparina é caracterizada pela presença de unidades dissacarídicas onde se alternam um açúcar aminado (glucosamina) e um açúcar não aminado (ácido urônico). A maior parte dos resíduos de ácido urônico corresponde

ao ácido L-idurônico (IdoA), o qual se encontra ligado ao resíduo de glucosamina (Glc) por meio de uma ligação do tipo  $\alpha(1-4)$  (PERLIN; MACKIE; DIETRICH, 1971). Em menor proporção na molécula estão os resíduos de ácido glucurônico (GlcA), que se encontram ligados à Glc por uma ligação  $\beta(1-4)$  (HELTING; LINDAHL, 1971). Variações estruturais fazem da heparina uma molécula bastante heterogênea, como por exemplo, a presença de O-sulfatação no carbono 2 (C-2) dos resíduos de ácido urônico e em C-3 e/ou C-6 da glucosamina. Além do mais, o nitrogênio desse açúcar aminado pode encontrar-se sulfatado (GlcNSO<sub>3</sub>), acetilado (GlcNAc) ou, menos frequentemente, permanecer sem substituição (NOTI, SEEBERGER, 2005; CAPILA, LINHARDT, 2002).

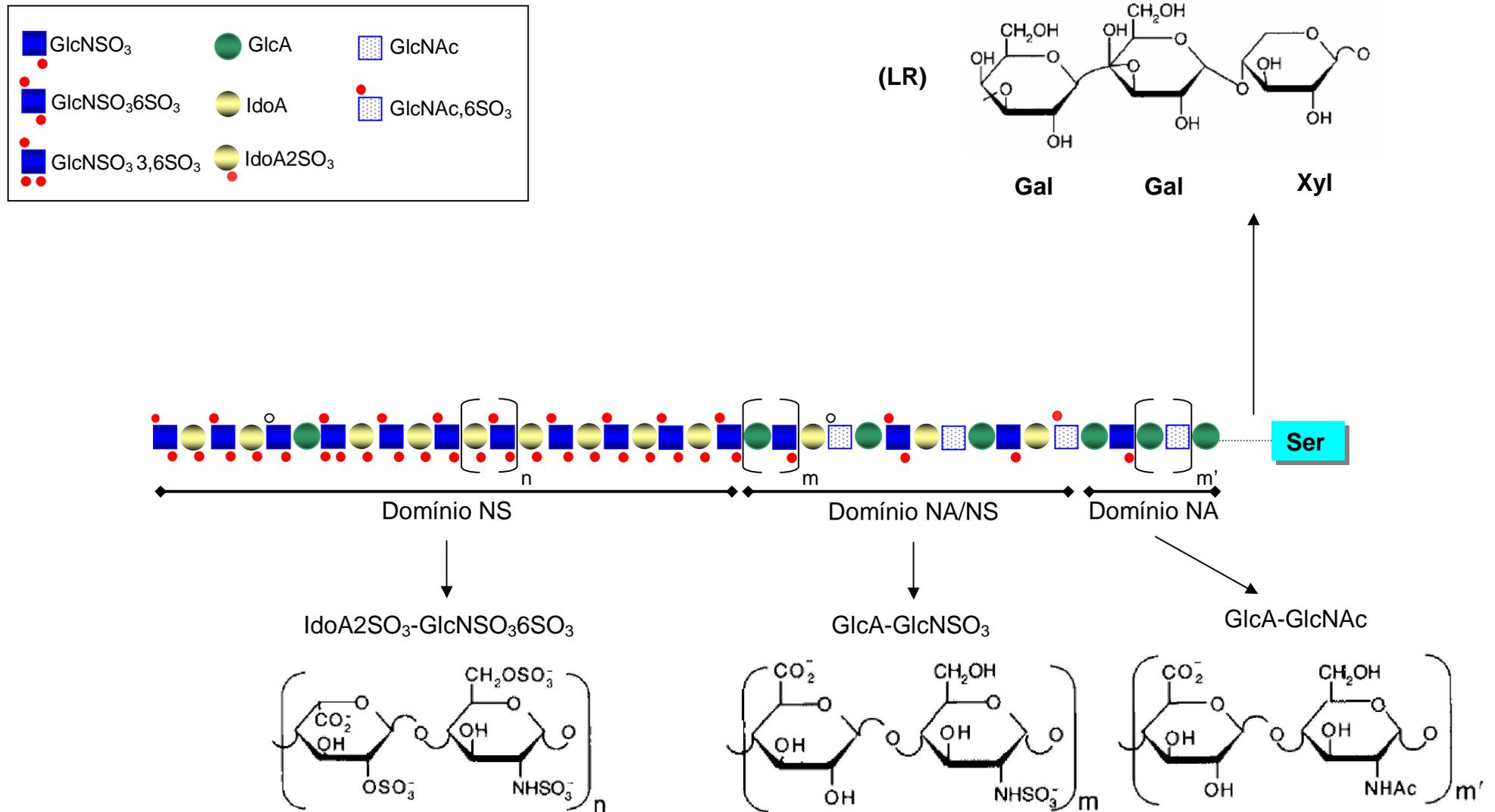
A composição das cadeias de heparina geralmente é expressa com relação ao conteúdo de suas unidades dissacarídicas, as quais podem ser identificadas através da despolimerização com heparinase e heparitinase II, enzimas específicas, provenientes de *Flavobacterium heparinum* (SILVA; DIETRICH, 1975). A heparinase reconhece as ligações glicosídicas do tipo  $\alpha(1-4)$  entre a GlcNSO<sub>3</sub> ou GlcNS,6S e ácido L-idurônico 2-sulfato (IdoA2SO<sub>3</sub>), liberando como produtos dissacarídeos trissulfatados e tetrassacarídeos. Por outro lado, a heparitinase II age sobre as ligações do tipo  $\alpha(1-4)$  entre a GlcNSO<sub>3</sub> ou GlcNAc e ácido L-idurônico (IdoA), podendo atuar também sobre ligações envolvendo a Glc e GlcA, desde que a glucosamina esteja sulfatada em C-6 (NADER et al., 1990). Os principais produtos gerados por ação conjunta dessas enzimas são dissacarídeos dissulfatados e trissulfatados (Figura 2).

A principal unidade dissacarídica da heparina são os dissacarídeos trissulfatados ( $\Delta U,2S\text{-GlcNS,6S}$ ), os quais representam cerca de 60-75% das heparinas obtidas de mucosa suína (GUERRINI; BISIO; TORRI, 2001; SUDO et al., 2001). Essas unidades são encontradas frequentemente em regiões onde os resíduos de glucosamina são N-sulfatados, denominadas de domínios N-sulfatados (NS). Essas regiões altamente sulfatadas também são conhecidas como “regiões regulares” e são as principais responsáveis pelas propriedades farmacológicas da heparina. Uma região híbrida, menos sulfatada, caracterizada pela presença de domínios N-acetilados e N-sulfatados (NA/NS) contendo principalmente o dissacarídeo monossulfatado GlcA-GlcNSO<sub>3</sub> também pode ser observada. A região NA/NS também pode conter resíduos de IdoA2SO<sub>3</sub> e glucosamina N-sulfatada e N-

acetilada (GlcNSO<sub>3</sub>/NAc). Próximo à região de ligação (LR) com o esqueleto protéico, existe um domínio NA marcado pela presença predominante das unidades dissacarídicas não sulfatadas GlcA-GlcNAc, embora alguns resíduos de glucosamina N-sulfatada, 6-O-sulfatada também possam ser encontrados nessa região (Figura 3).



**Figura 2:** Modo de ação da heparinase e heparitinase II (SILVA; DIETRICH, 1975). Em verde está representado o resíduo de ácido glucurônico; em amarelo o resíduo de ácido idurônico, em azul a glucosamina e em vermelho os grupos sulfato.



**Figura 3:** Representação hipotética da cadeia de heparina, mostrando os domínios N-acetilado (NA), N-acetilado/N-sulfatado (NA/NS) e N-sulfatado (NS). (LR) – Região de ligação; Ser – Serina; Gal – galactose; Xyl – xilose. Modificada de CASU, B., 2005.

Acredita-se que a atividade anticoagulante da heparina esteja relacionada à sua capacidade de interagir com a antitrombina (AT) e potencializar seu efeito inibitório sobre as proteases da cascata de coagulação (ROSENBERG; DAMUS, 1973; TAKAHASHI; NADER; DIETRICH, 1981; BIANCHINI et al., 1982; CHOAY; PETITOU, 1986). Uma vez ligada à heparina, a AT sofre uma mudança conformacional que aumenta cerca de 1000 vezes a sua capacidade de inibir as serinoproteases envolvidas na coagulação (ROSENBERG; BAUER, 1992).

Apesar de interferir no processo de coagulação, sua distribuição peculiar nos tecidos de animais, bem como sua localização intracelular sugerem que o papel biológico da heparina esteja relacionado com outros mecanismos. Em tecidos de mamíferos e outros vertebrados, bem como em invertebrados, a heparina está localizada, preferencialmente, em regiões que estão em contato com o meio externo, tais como pele, pulmão e intestino, ou em órgãos que atuam na defesa do organismo, como timo e gânglios linfáticos (NADER et al., 1980, 1982, 1999, 2004). Em diferentes tecidos do molusco *Anomalocardia brasiliiana* também foi verificado a presença de altas concentrações de heparinóides nos tecidos que estão em contato com o meio (SANTOS et al., 2002). Esses dados levantam a hipótese da participação de heparina em mecanismos de defesa. Essa hipótese é reforçada pela presença de heparinóides em invertebrados marinhos, uma vez que esses organismos não apresentam sistema de coagulação dependente de AT (NADER et al., 1980; DIETRICH et al., 1985, 1989; NADER; DIETRICH, 1989). Neles, o mecanismo de coagulação, além de prevenir a perda de hemolinfa, também atua como mecanismo de defesa, imobilizando microorganismos que invadem o corpo (CAVALCANTE et al., 2000) e as proteínas envolvidas nesse processo são totalmente diferentes daquelas que agem na coagulação sanguínea dos vertebrados (IWANAGA, 1993).

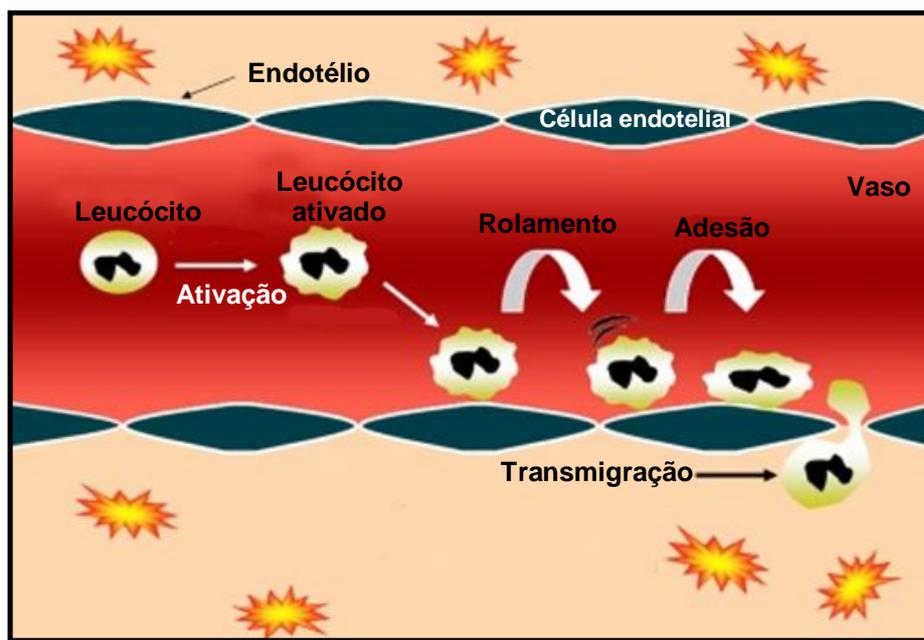
As propriedades polianiónicas da heparina permitem que essa molécula seja capaz de interagir com uma diversidade de proteínas, além da AT (CAPILA; LINHARDT, 2002). Muitas dessas interações envolvem proteínas crucialmente envolvidas na resposta inflamatória, como moléculas de adesão (KOENIG et al., 1998; DIAMOND et al., 1995; SKINNER et al., 1991), citocinas (LEVER; PAGE, 2002; CAPILA; LINHARDT, 2002), fatores de crescimento e quimiocinas (TYRREL et al., 1999). Desse modo, a heparina pode ter um grande potencial como moduladora

do processo de inflamação, o que é muito interessante do ponto de vista biotecnológico.

A resposta inflamatória pode ser entendida como uma reação altamente complexa de um organismo contra estímulos endógenos ou exógenos que podem causar algum tipo de injúria celular (GÖTTE, 2003). Participa desse processo uma ampla variedade de células circulantes e do tecido conjuntivo. As células circulantes compreendem neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. Já as do tecido conjuntivo incluem mastócitos, que estão intimamente ligados aos vasos sanguíneos, os fibroblastos e macrófagos residentes (KUMAR et al., 2005). Além das células, uma série de proteínas inflamatórias como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, componentes do sistema complemento e moléculas de adesão, como selectinas e integrinas, estão envolvidas na resposta inflamatória.

Uma das etapas centrais da resposta inflamatória envolve as interações entre leucócitos e células endoteliais, que levam à ativação e recrutamento dessas células aos tecidos inflamados. O recrutamento de leucócitos ocorre em várias etapas, que incluem o rolamento seguido pela firme adesão e transmigração para os tecidos afetados (Figura 4). Esse processo é regulado por uma variedade de moléculas de adesão e fatores inflamatórios (SPRINGER, 1994), onde membros da família das selectinas (L-, P-, e E-selectina) são essenciais, mediando os eventos iniciais de adesão.

Todas as três selectinas reconhecem em seus ligantes regiões contendo carboidratos relacionados com o sialil Lewis<sup>x</sup> (VARKI, 1994; ROSEN; BERTOZZI, 1994). A interação entre as selectinas e seus ligantes, que parece envolver a participação de resíduos de sulfato presentes nos carboidratos ou na própria selectina (LEPPANEN et al., 2000), resulta na diminuição da velocidade do fluxo de leucócitos, proporcionando o rolamento destes ao longo do endotélio. A interação com a superfície endotelial, bem como o rolamento dos leucócitos ao longo desta superfície, proporcionam um maior contato daquelas células com a parede vascular, o que facilita sua ativação por moléculas liberadas pelo endotélio (LOWE, 2003). Uma vez ativados, os leucócitos passam a expressar níveis elevados de integrinas, uma outra classe de moléculas de adesão responsáveis pela firme adesão destes à parede vascular. Uma vez aderidos firmemente ao endotélio, os leucócitos atravessam a membrana basal e se deslocam até o local da injúria (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema do processo de rolamento e transmigração dos leucócitos.

A maneira pela qual os diferentes tipos de células de defesa conseguem atravessar a membrana basal ainda não é completamente compreendido, mas acredita-se que esse processo requer a degradação proteolítica dos componentes da membrana basal. Nesse sentido, destaca-se um outro grupo de proteínas, denominadas Metaloproteinases de Matriz (MMPs), uma família de endopeptidases zinco e cálcio dependentes capazes de degradar proteoliticamente muitos componentes da matriz extracelular (NAGASE, 1997). São encontradas 25 MMPs em vertebrados, as quais, de acordo com a especificidade do substrato e a homologia de seus domínios, são subdivididas em collagenases, gelatinases, estromelisinases e MMPs de membrana (Tabela 1) (BENAUD; DICKISON; THOMPSON, 1998).

Além de serem produzidas por células estruturais como fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais (MURPHY; DOCHERTY, 1992; YAO et al., 1997), as MMPs são produzidas também por células inflamatórias como macrófagos (MATUTINO et al., 1997), linfócitos (LEPPERT et al., 1995), neutrófilos (DELCAUX et al., 1996) e eosinófilos (STAHL-BACKDAHL et al., 1994), podendo contribuir para a migração dessas células através da membrana basal. MMP-2 e MMP-9, por exemplo, que possuem seletividade proteolítica por colágenos da lâmina basal, foram identificadas como sendo cruciais para a transmigração de linfócitos

(LEPPERT et al., 1995) e para a transmigração *in vitro* de eosinófilos (OKADA et al., 1997).

No entanto, os componentes da matriz não são os únicos alvos dessas enzimas. Estudos têm mostrado que as MMPs podem modular a atividade de várias proteínas envolvidas na resposta inflamatória, como citocinas e quimiocinas. A MMP-2, por exemplo, possui efeito pro-inflamatório ao contribuir para a formação de gradiente da quimiocina CCL11 (eotaxina) (CORRY et al., 2002). Além disso, MMP-2, MMP-3 e MMP-9 são capazes de clivar e ativar o precursor de IL-1 $\beta$ , uma potente citocina pro-inflamatória (SCHONBECK et al., 1998). Um outro mediador pro-inflamatório essencial, cuja atividade também é regulada por MMPs é o fator de necrose tumoral (TNF), o qual é produzido como uma proteína de 26 kDa associada à membrana (proTNF), sendo clivado por uma enzima específica para transformar-se na citocina solúvel (17,5 kDa). Várias MMPs, incluindo MMP-1, -2, -3, -9 e -17, podem converter o proTNF em sua forma ativa (MOHAN et al., 2002; ENGLISH et al., 2000), contribuindo assim para a resposta inflamatória.

**Tabela 1: Metaloproteínases de matriz encontradas em mamíferos (PARKS et al., 2004).**

| <b>TIPOS DE MMPs</b>    | <b>EXEMPLOS</b>                       |
|-------------------------|---------------------------------------|
| <b>Colagenases</b>      | <b>MMP-1, MMP-8, MMP-13</b>           |
| <b>Gelatinases</b>      | <b>MMP-2, MMP-9</b>                   |
| <b>Estromelisinases</b> | <b>MMP-3, MMP-10, MMP-11</b>          |
| <b>MMPs de membrana</b> | <b>MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24</b> |

Apesar de ser um importante mecanismo de defesa do organismo, é necessário que o processo de inflamação seja regulado de forma eficiente, uma vez que uma resposta inflamatória exagerada ou descontrolada pode ocasionar o desenvolvimento de doenças, trazendo transtornos severos, que podem culminar com a perda de função do órgão ou tecido afetado. Por esse motivo, algumas vezes é necessária intervenção no processo inflamatório com a utilização de fármacos. Entretanto, o uso prolongado de alguns anti-inflamatórios comuns provoca efeitos indesejáveis, como perfurações gástricas, úlceras, toxicidade hepática e renal e

gastroenterite hemorrágica. Algumas dessas drogas, como os antiinflamatórios não esteroidais (AINE'S), também podem se acumular nas células gástricas, levando à morte celular. Por esses motivos, muitos estudos vêm se intensificando na busca e desenvolvimento de compostos para a substituição destes medicamentos.

A habilidade de interferir em várias etapas da resposta inflamatória faz da heparina um importante alvo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. De fato, diversas pesquisas têm acumulado evidências a respeito da ação da heparina sobre alguns eventos da inflamação. Experimentalmente foi mostrado que a heparina inibe a ativação de células inflamatórias (TYRRELL et al., 1999) e sua adesão às células endoteliais (LEVER; HOULT; PAGE, 2000; SMILBEGOVIC; LEVER; PAGE, 2001; SILVESTRO et al., 1994; XIE et al., 1997). Em modelos animais a heparina foi capaz de reduzir o rolamento de leucócitos mediado pelas selectinas (AHMED et al., 1994; 1997; PREUSS; PAGE, 2000). Heparina também inibe a ativação do sistema complemento (WEILER et al., 1992; TEIXEIRA et al., 1996), protege o endotélio contra a ação de radicais livres e proteínas catiônicas lisossomais (ENGELBERG, 1985; TANAKA et al., 1993; WEBB et al., 1993) e também é capaz de inativar o NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição responsável pela regulação de muitos genes envolvidos em respostas inflamatórias (THOURANI et al., 2000). A Administração de heparina também inibe experimentalmente doenças autoimunes mediada por linfócitos T (LIDER et al., 1989). Em modelos animais de hepatite, heparina também foi capaz de reduzir a inflamação por aumentar as concentrações de IL-10 (HERSHKOVIZ et al., 1999), uma citocina antiinflamatória, que inibe a transcrição e tradução de uma variedade de citocinas inflamatórias (ZHANG; EDWARDS; MOSSER, 2006). Outros trabalhos já mostraram que a heparina também é capaz diminuir os níveis de IL-6, IL-1 e IL-8, citocinas que desempenham um papel importante na inflamação aguda (FEGHALI; WRIGHT, 1997). Heparina também é capaz de inibir a transcrição gênica da MMP-9 e de outras metaloproteinases (KENAGY et al., 1994), o que é extremamente importante, uma vez que níveis elevados de MMPs e a atividade proteolítica exagerada podem ser prejudiciais para a integridade do sistema vascular e está relacionada com muitas doenças inflamatórias.

Todos esses exemplos citados demonstram o grande potencial terapêutico da heparina como antiinflamatório, no entanto, a sua utilização para esse fim é limitada. Como a resposta antiinflamatória só é satisfatória em elevadas concentrações de

heparina, sua utilização leva a complicações hemorrágicas devido a sua potente atividade anticoagulante e sua capacidade de interferir no equilíbrio hemostático, provavelmente por interagir com moléculas semelhantes à miosina na parede das células musculares, inibindo a contração dos vasos sanguíneos (CRUZ; DIETRICH, 1967; NADER; TERSARIOL; DIETRICH, 1989). Por essa razão, análogos de heparina, com efeitos colaterais reduzidos, obtidos a partir de síntese ou modificação química, vêm sendo amplamente estudados. Entretanto, a obtenção desses derivados requer técnicas altamente específicas e tem a desvantagem de ser onerosa para a produção das quantidades requeridas para uso terapêutico. No entanto, a ocorrência de heparinóides com reduzida atividade anticoagulante em invertebrados marinhos pode fazer desses organismos uma fonte atrativa para o desenvolvimento de compostos capazes de interferir na inflamação.

Trabalhos relacionados com a distribuição, isolamento e caracterização estrutural de heparinóides no filo Crustacea são escassos na literatura científica. No caranguejo *Ucides cordatus* foi encontrado um heparinóide com características semelhantes as da heparina de mamíferos, porém com reduzida atividade anticoagulante (52UI/mg) (MEDEIROS et al., 2000). Heparinóides com algumas peculiaridades estruturais também foram encontrados nos camarões *Penaeus brasiliensis* e *Litopenaeus schimitti* (DIETRICH et al., 1999; SANTOS, 2006) e no caranguejo *Goniopsis cruentata* (ANDRADE, 2006).

No cefalotórax do camarão cinza, *Litopenaeus vannamei* (Figura 5), também foram encontrados compostos semelhantes à heparina (BRITO, 2005). O estudo de compostos bioativos nessa espécie de crustáceo é de grande relevância, uma vez que o *L. vannamei* representa a principal espécie da carcinicultura brasileira, uma atividade bastante atrativa economicamente e que possui na região Nordeste as melhores condições de cultivo (QUAGLIA, 1993).

Como a principal forma de exportação de camarões é sob a forma de camarões inteiros congelados e de camarões descabeçados, durante a etapa de processamento são geradas grandes quantidades de resíduos sólidos orgânicos, uma vez que o cefalotórax, conhecido popularmente como cabeça, e as cascas correspondem a aproximadamente 40% de seu peso total (GILDBERG; STENBERG, 2001). Esses resíduos do processamento são geralmente enterrados ou jogados em rios, ocasionando problemas ambientais, principalmente em países onde não há

rigor na fiscalização ambiental. Portanto, a descoberta de um composto bioativo no cefalotórax do camarão cinza, além de poder levar à descoberta de novos agentes terapêuticos, pode contribuir também para a redução dos impactos ambientais provocados pelo descarte desse resíduo, agregando valor sócio-econômico a este subproduto da carcinicultura.



**Figura 5:** Camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*. Disponível em: <<http://www.broodstock.com/close0.jpg>>. Acesso em 25 mar /2008.

É de nosso interesse, então, investigar o potencial terapêutico do heparinóide isolado de *L. vannamei* em um estudo comparativo com a heparina de mamíferos. Por se tratar de um análogo de heparina, será necessário também avaliar suas atividades anticoagulante, antitrombótica e anti-hemostática.

## 2. Objetivos

---

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do heparinóide isolado do camarão *Litopenaeus vannamei* sobre a resposta inflamatória e sobre alguns eventos da hemostasia.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Purificar o heparinóide a partir do cefalotórax do camarão *L. vannamei*;
- Identificar as principais unidades dissacarídicas que compõem o heparinóide de *L. vannamei*.
- Avaliar sua atividade anticoagulante *in vitro*;
- Avaliar seu efeito sobre a síntese de heparan sulfato antitrombótico pelas células endoteliais;
- Avaliar sua atividade anti-hemostática;
- Avaliar sua capacidade de interferir na migração leucocitária e na atividade de metaloproteinases de matriz em um modelo de inflamação aguda;
- Avaliar seu efeito sobre a atividade de metaloproteinases de leucócitos humanos ativados.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

## Material e Métodos

---

### 3.1. Animais

Os animais utilizados no modelo de inflamação aguda induzida por tioglicolato de sódio foram ratos da linhagem Wistar (6-8 semanas de idade, 180-200g), obtidos no biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Para avaliação da atividade hemorrágica também foram utilizados ratos da linhagem Wistar (16-24 semanas de idade, 300-350g) provenientes do mesmo biotério. Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais submetidos à dieta e água *ad libitum* em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 hs claro/escuro) e temperatura (25°C).

### 3.2. Reagentes

#### 3.2.1. Glicosaminoglicanos

Condroitim 4-sulfato e condroitim 6-sulfato, extraídos de cartilagem de baleia e dermatam sulfato, extraído de pele de porco, foram adquiridos da SIGMA (EUA). Heparan sulfato de pulmão bovino foi gentilmente cedido por HB Nader. Heparina de mucosa intestinal bovina da LAOB Laboratórios (Barueri, SP).

#### 3.2.2. Dissacarídeos

Os dissacarídeos dissulfatados ( $\Delta$ U-GlcNS,6S), N-sulfatado ( $\Delta$ U-GlcNS) e N-acetilado ( $\Delta$ U-GlcNAc) foram obtidos após degradação enzimática de heparan sulfato de pâncreas bovino com heparitinasas I e II. O dissacarídeo trissulfatado ( $\Delta$ U,2S-GlcNS,6S) e o tetrassacarídeo pentassulfatado ( $\Delta$ U,2S-GlcNS,6S-U-GlcNS,6S) foram obtidos por degradação da heparina.

#### 3.2.3. Enzimas

Heparitinasas I e II e heparinase foram purificadas do extrato bruto induzido de *Flavobacterium heparinum*, como descrito por Nader et al. (1990). Superase foi adquirida da Prozyn Indústria e Comércio Ltda. (São Paulo, SP)

#### 3.2.4. Outros Reagentes

- [<sup>35</sup>S]-sulfato de sódio, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN (São Paulo, SP, Brasil).

- 1,2 diaminoetano acetato (EDA), 1,3-diaminopropano acetato (PDA), ácido isobutírico, brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON), e tolueno da Aldrich Chemical Co. Inc. (Milwaukee, WI, EUA).
- Acetona, metanol, etanol, e benzina da Cromato Produtos Químicos Ltda. (Diadema – SP)
- Ácido acético, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e nitrato de prata, da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Acrilamida e bisacrilamida da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- Agarose (Standard-Low-Mr) foi adquirida da BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA).
- Azul de toluidina, vermelho de cresol, Tris (hidroximetilamino metano), Amberlit IRA 900 da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).
- Carbazol, da JT-Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ, EUA).
- DEAE-Sephacel adquirida da Pharmacia.
- Kit para ensaio de APTT da Wiener Laboratórios S.A.I.C. (Rpsario-Argentina).
- Líquido de cintilação Ultima Gold, da Packard Instruments Company Inc. (Downers Grove, IL, EUA).
- Papel Whatman nº 1 da W.& R. Balston Ltda. (Maidstone, Inglaterra).
- Persulfato de amônio, da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- TEMED – N,N,N',N'-Tetrametilenodiamino da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- Uréia ultra pura, da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Os demais reagentes e materiais utilizados foram da melhor qualidade disponível.

### 3.3. Aparelhos

- Agitador de tubos Phoenix da Marte Balanças e Equipamentos (São Paulo, SP).  
Além dos aparelhos usuais de laboratório, foram utilizados:
- Banho maria metabólico Dubnoff, modelo TE-053, mesa agitadora modelo TE-140 e balança modelo B-TEC-2200 da TECNAL – Equipamentos para Laboratórios Ltda. (Piracicaba, SP).
- Câmara para eletroforese em gel de agarose (Técnica Permatron Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

- Centrífuga refrigerada, modelo CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltda. (Tóquio, Japão).
- Coagulômetro Quick Timer da Drake Eletrônica Comércio Ltda. (São José do Rio Preto, SP).
- Contador de cintilação em meio líquido, modelo 2100TR/2300TR, da Packard Instrument Company (Meriden, CT, EUA).
- Fontes de corrente contínua regulável, desenvolvidas pelo Dr. H. Rzeppa, Técnica Permatron Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Leitor de radioatividade Cyclone – Sistema de estoque de fósforo, da Packard Instrument Company (Meriden, CT, EUA).
- Medidor de pH modelo FTP 125 da IMPRINT do Brasil Ltda. (Campinas, SP)
- Microscópio de luz Olympus, modelo BX – 41 (Tokyo, Japão).
- Microscópio invertido AFM invertido de campo claro e contraste de fase, da Nikon, Nippon Kogakuk (Tóquio, Japão).

#### **3.4. Extração dos glicosaminoglicanos sulfatados de *Litopenaeus vannamei***

Inicialmente, o material biológico (10 Kg de cabeças) foi triturado e submetido à delipidação com acetona durante uma semana, com trocas diárias de solvente. Após trituração e secagem, foi obtido um pó cetônico (955,86 g), o qual foi homogeneizado com NaCl 1,0 M e submetido à degradação proteolítica pela adição de Superase (38,2 mg). Após 24 horas a 60°C, a mistura foi filtrada e, ao filtrado obtido, foi adicionada resina de troca iônica para complexação dos GAGs. A suspensão foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A seguir, a resina foi filtrada e lavada com água a 50°C. Para descomplexar os GAGs, a resina foi submetida à eluição com NaCl 3,0 M. Ao filtrado obtido foi adicionado metanol para a precipitação dos GAGs e o material foi mantido a 4°C por 18 horas. Após esse período, os precipitados formados foram coletados por centrifugação (5000 x g, 30 min) e solubilizados, obtendo-se a fração F-3,0 M (Figura 6), a qual foi submetida às análises subseqüentes.

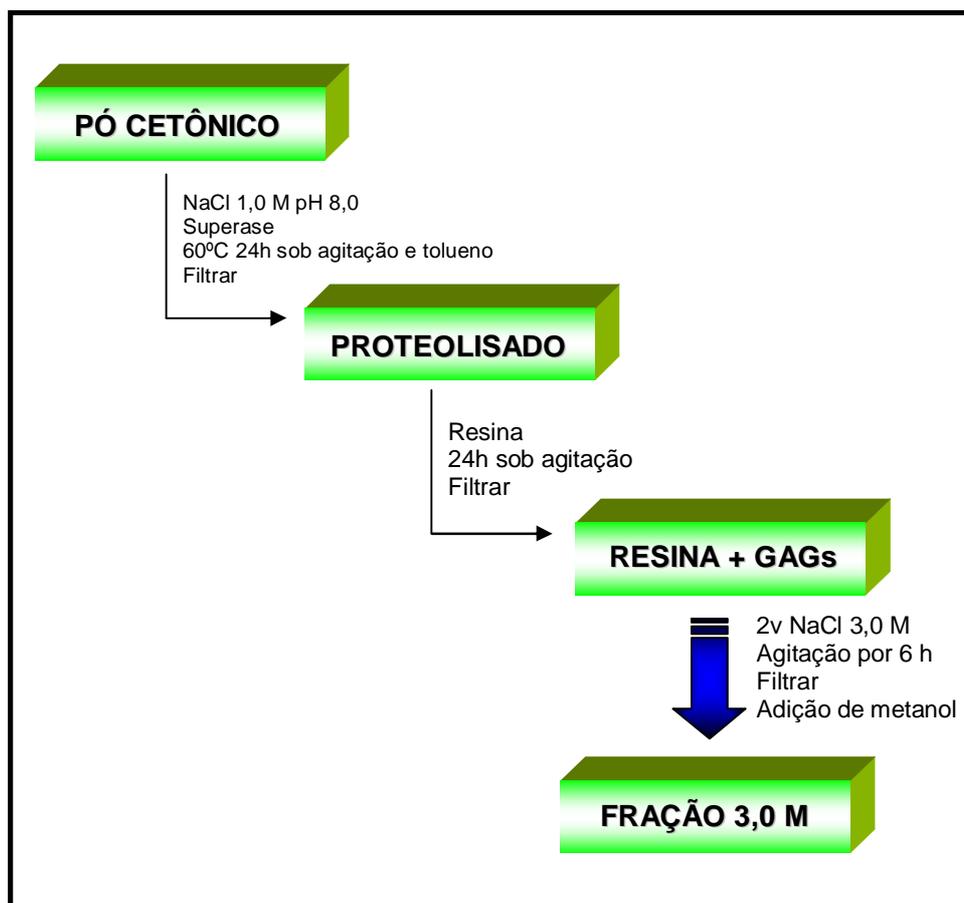
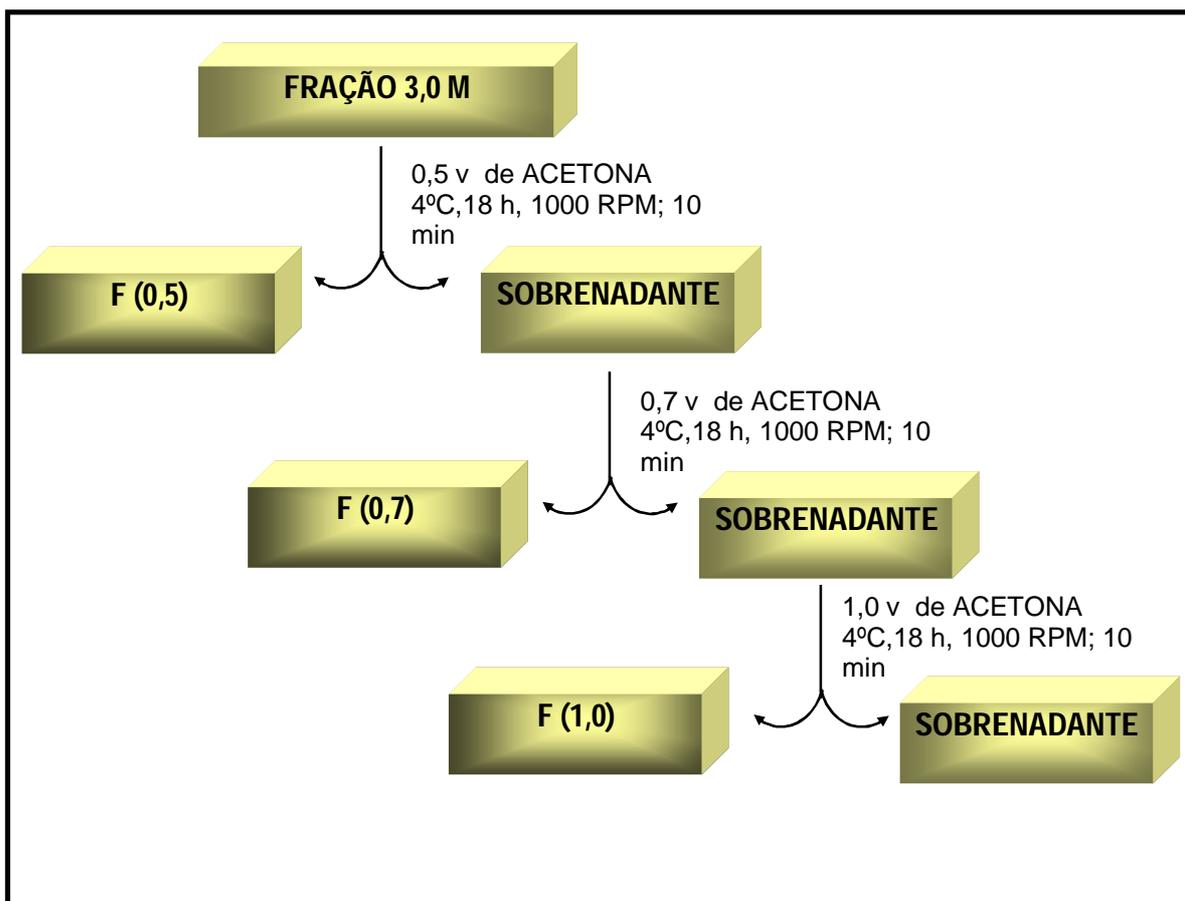


Figura 6: Esquema de extração e fracionamento dos GAGs do cefalotórax de *L. vannamei*.

### 3.5. Fracionamento com acetona

A fração F-3,0 M foi submetida a fracionamento usando volumes crescentes de acetona, de acordo com Dietrich et al., (1999). Inicialmente foi adicionada acetona na proporção 0,5:1 (v/v). O material foi mantido a 4°C por 18hs, sendo posteriormente coletado por centrifugação e seco a vácuo. O precipitado obtido foi identificado como F-0,5 e ao sobrenadante foi adicionado acetona para um volume final de 0,7 (com relação ao volume inicial). Após 18hs sob 4°C o precipitado obtido por centrifugação foi denominado F-0,7. O mesmo procedimento foi repetido com acetona na proporção 1:1 (v/v) para obter a fração denominada F-1,0 (Figura 7).



**Figura 7:** Fracionamento, com acetona, dos GAGs isolado do cefalotórax de *L. vannamei*.

### 3.6. Comportamento eletroforético

Após fracionamento com acetona as frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose em dois sistemas de tampões:

#### a) Sistema 1,3- diaminopropano acetato (PDA)

As amostras foram aplicadas em lâminas de gel de agarose (0,6%) no tampão PDA 0,05 M, pH 9,0. O sistema PDA, de acordo com o grau de interação da diamina com os glicosaminoglicanos, permite discriminar por ordem decrescente de migração: Condroitim sulfato 4- e 6-sulfatos (CS), Dermatom sulfato (DS), Heparan sulfato (HS) juntamente com Heparina, ou seja, os compostos que mais interagem com a diamina apresentam menor mobilidade eletroforética. O gel foi submetido a 100V em cuba refrigerada a 4°C utilizando-se como indicador de corrida o vermelho de cresol.

Após a corrida o gel foi fixado com CETAVLON (0,1%) por no mínimo 2 horas, seco sob corrente de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1% em ácido

acético 1% e etanol 50%. Depois de retirado o excesso com solução descorante, o gel foi seco a temperatura ambiente.

#### **b) Sistema descontínuo Acetato de Bário/PDA**

As amostras foram aplicadas em lâmina de gel de agarose em tampão acetato de bário 0,04 M, pH 5,8, submetido a 75V, durante 10 minutos em cuba refrigerada a 4°C e em seguida transferida para outra cuba (com tampão PDA), onde é mantida em repouso durante 15 minutos a 4°C e depois submetido a 100V.

Nesse sistema a heparina é fracionada em seus componentes de migração rápida e lenta, ocorrendo diferenciação dos outros GAGs, que apresentam comportamento eletroforético como no sistema PDA.

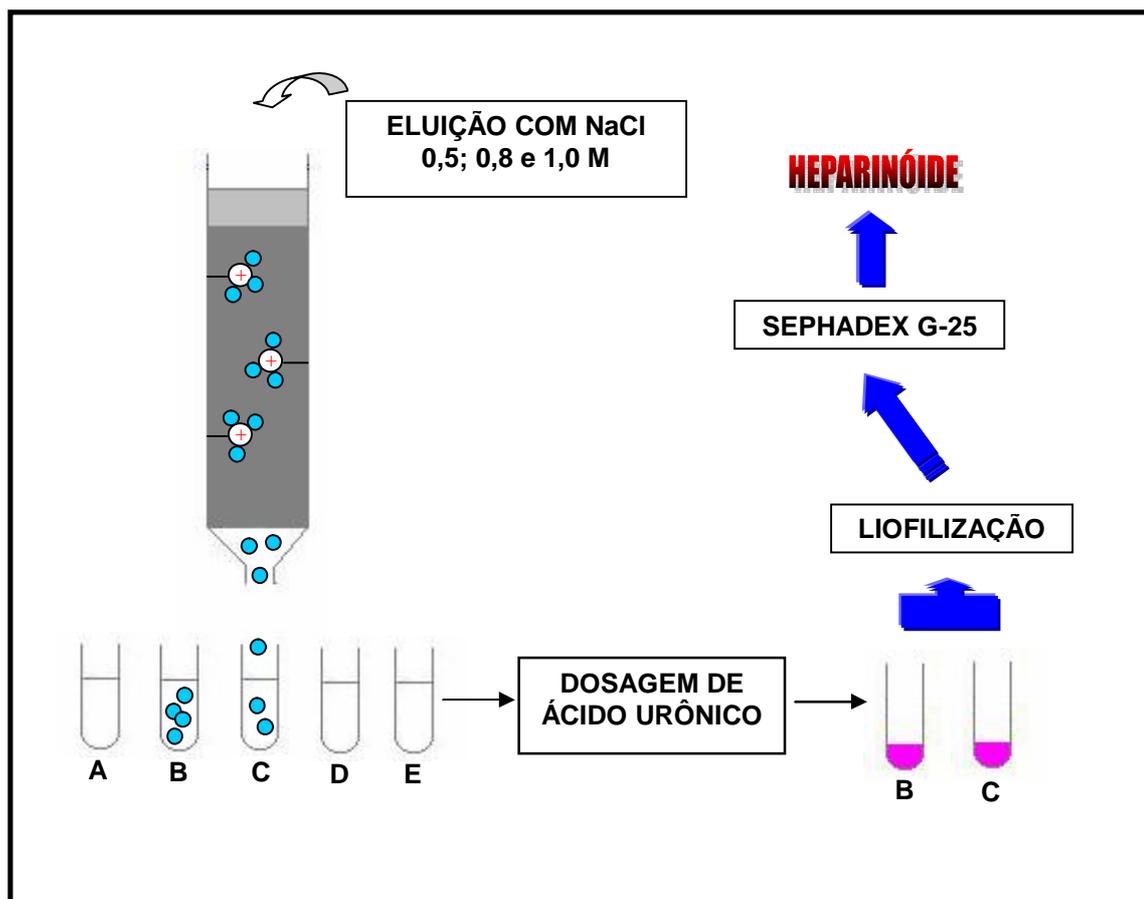
Os procedimentos de fixação e coloração empregados no sistema Ba/PDA são os mesmos utilizados anteriormente.

### **3.7. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

As amostras provenientes do fracionamento com acetona foram dissolvidas em água deuterada (D<sub>2</sub>O) e os espectros de <sup>13</sup>C foram obtidos a 125 MHz com o espectrômetro Bruker AMX , a 40°C.

### **3.8. Purificação por cromatografia de troca-iônica**

A fim de purificar o heparinóide de camarão, as frações que apresentaram compostos com migração eletroforética semelhantes à heparina de mamíferos foram aplicadas em uma coluna DEAE-Sephacel e eluídas com NaCl nas molaridades de 0,5, 0,8 e 1,0 M. As frações obtidas foram monitoradas por dosagem de ácido urônico, de acordo com DISCHE (1947), para detectar a presença de glicosaminoglicanos. As frações nas quais foi detectada a presença de GAGs foram reunidas, liofilizadas e submetidas posteriormente à cromatografia de gel filtração em Sephadex G-25 para a retirada do excesso de sal, como resumido na figura 8.



**Figura 8:** Purificação do heparinóide de camarão por cromatografia de troca-iônica em DEAE-Sephacel.

### 3.9. Degradação enzimática

Cerca de 100 $\mu$ g de heparina ou heparinóide de camarão foram incubados com 0,1 unidade de heparinase e heparitinases preparadas de *Flavobacterium heparinum* em tampão etilenodiamino acetato (EDA) 0,06 M e pH 7,0. Para a incubação com heparinase foi ainda adicionado acetato de cálcio para uma molaridade final de 10 mM. As misturas foram incubadas por 18 horas a 30°C. Para identificar os produtos obtidos após degradação enzimática, as amostras foram submetidas à cromatografia descendente em papel.

### 3.10. Cromatografia em papel

As amostras são aplicadas em papel Whatman nº 1 sob corrente de ar quente e colocado em solvente ácido isobutírico: amônia 1,25 M, nas proporções 5:3 ou 5:3,6 (v/v). Os produtos insaturados foram visualizados por absorção de U.V (232

nm) (DIETRICH, 1968) e pelo poder redutor após reação com nitrato de prata em meio alcalino.

### **3.11. Atividade anticoagulante**

A atividade anticoagulante foi verificada através do ensaio de aPTT (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada). Para isso, 100µl de plasma humano citratado contendo várias concentrações de heparina padrão ou heparinóide de camarão foram incubados a 37°C durante um minuto. Em seguida, 100µl de cefalina foram adicionados e a mistura foi incubada a 37°C por três minutos. Após a incubação, 100µl de CaCl<sub>2</sub> 0,025 mol/l pré-aquecido foram adicionados e o tempo de coagulação foi medido no coagulômetro Quick Timer (Drake Eletrônica Comércio Ltda, São Paulo, Brasil).

### **3.12. Atividade antihemostática**

Para verificar o possível efeito hemorrágico do heparinóide do camarão, foi utilizado o modelo da cauda escarificada desenvolvido por Cruz e Dietrich (1967). Nesse modelo, uma ruptura do sistema hemostático é provocada por uma leve escarificação na cauda de ratos. A cauda escarificada foi mergulhada verticalmente em um tubo contendo 2mL de solução salina e o processo de sangramento foi acompanhado durante cinco minutos. Em seguida, a cauda foi retirada e submetida a um estímulo mecânico (esfregando uma gaze sobre a escarificação) para obter um novo sangramento. A cauda é, então, mergulhada em uma nova solução salina. Depois de cinco minutos, o processo é realizado mais uma vez e a quantidade de proteína liberada (BRADFORD, 1976) serve como controle para os ensaios posteriores.

Após os três estímulos mecânicos a cauda foi mergulhada em uma solução salina contendo heparina de mamíferos ou o heparinóide do camarão, nas concentrações de 100 e 400µg/mL. Para cada concentração foram usados grupos de 3 animais. Após dois minutos a cauda foi retirada e lavada intensamente com solução salina, e o efeito hemorrágico residual foi observado mergulhando-se a cauda em soluções salina sem os compostos em intervalos de tempo determinados.

Os resultados foram expressos pela razão entre a soma cumulativa da quantidade de proteína liberada da lesão antes e após o contato com os compostos estudados. A figura 9 ilustra o procedimento realizado.

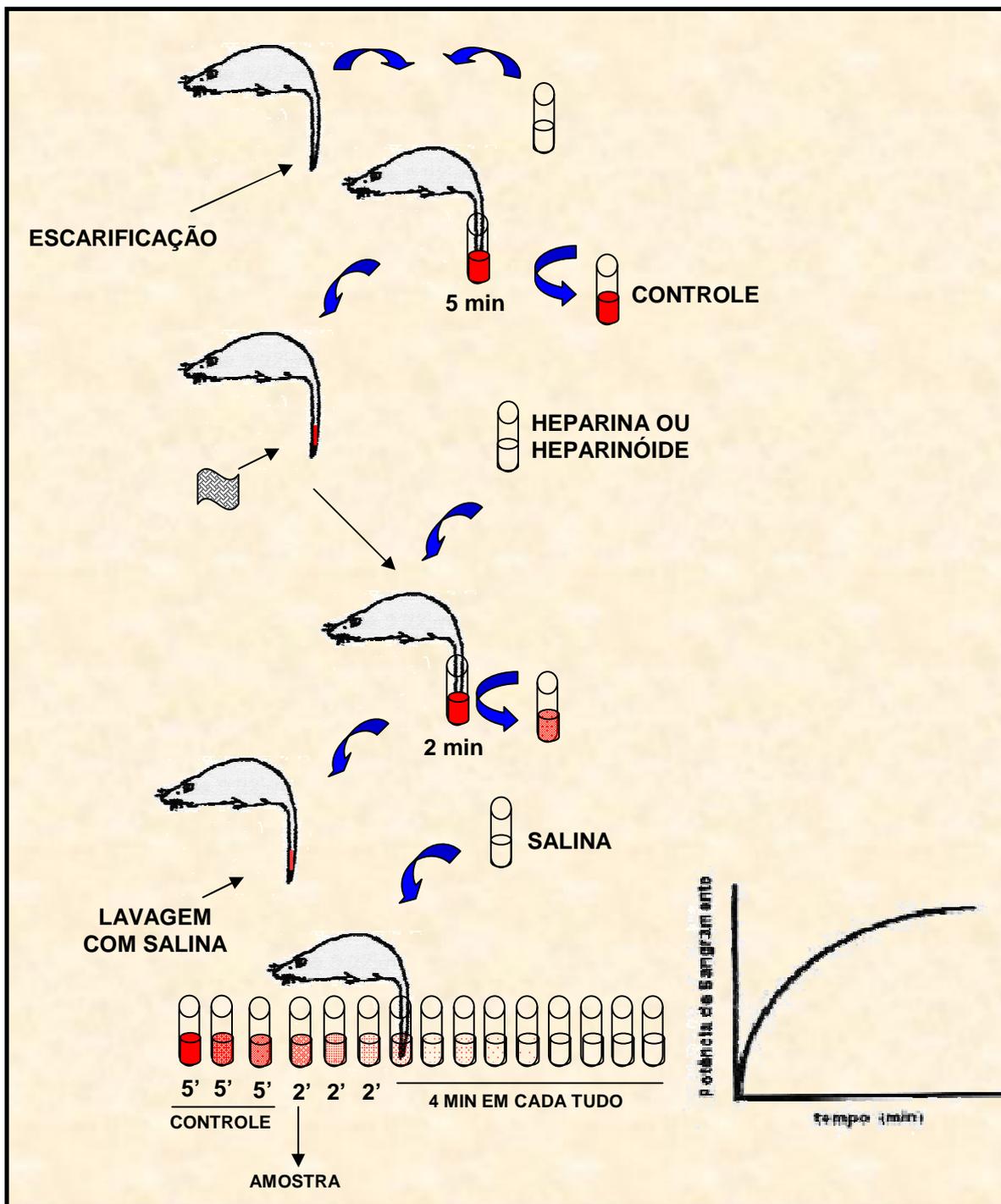


Figura 9: Esquema do ensaio de atividade anti-hemostática.

### 3.13. Efeito do heparinóide sobre a síntese de HS antitrombótico pelas células endoteliais.

Células endoteliais da aorta de coelho foram cultivadas em placas multipoços (24 poços, 10000 células/poço). Após atingir a confluência as células foram lavadas três vezes com meio F-12 na ausência de soro fetal bovino (SFB) e adicionado novo meio contendo 150  $\mu\text{Ci/mL}$  de  $^{35}\text{S}$  – sulfato de sódio na presença ou ausência de heparina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou do heparinóide de *L. vannamei* (12,5; 25; 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). As células foram mantidas por cerca de 20 horas na estufa a 37°C e em atmosfera de 2,5% de  $\text{CO}_2$ .

Após o tempo de incubação, o meio foi coletado em banho de gelo e armazenado em tubos de microcentrífuga de 2 mL a -20°C. As células foram lavadas 3 três vezes com PBS em banho de gelo e removidas com 150  $\mu\text{L}$  de uma solução de uréia 7,0 M em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,8 com o auxílio de um “scraper”. Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  foi separada para a dosagem de proteínas, utilizando-se o reagente Coomassie Brilliant Blue G (SPECTOR, 1978). Condroitim sulfato e heparim sulfato sintetizados e liberados para o meio foram extraídos por proteólise durante 24 horas, a 60°C, com uma solução de maxatase 4mg/mL em Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 1,0M. Após o período de incubação os produtos foram analisados quanto ao conteúdo de glicosaminoglicanos sulfatados por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05M, pH 9,0. Após a corrida eletroforética os compostos foram precipitados por CETAVLON por duas horas.

O gel foi seco em presença de corrente de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1 % por, aproximadamente, 15 minutos. Em seguida o gel foi exposto a um filme radiosensível que excita íons de fósforo. O filme sensibilizado foi submetido à varredura a laser no aparelho Cyclone<sup>TM</sup>, o qual faz a leitura do fósforo excitado e o quantifica como unidade de luminescência. Amostra de radioatividade conhecida é impressionada no mesmo filme (1 $\mu\text{L}$  de tinta radioativa) e a quantificação da radioatividade de cada banda de glicosaminoglicano é determinada utilizando o software OptiQuant<sup>TM</sup>.

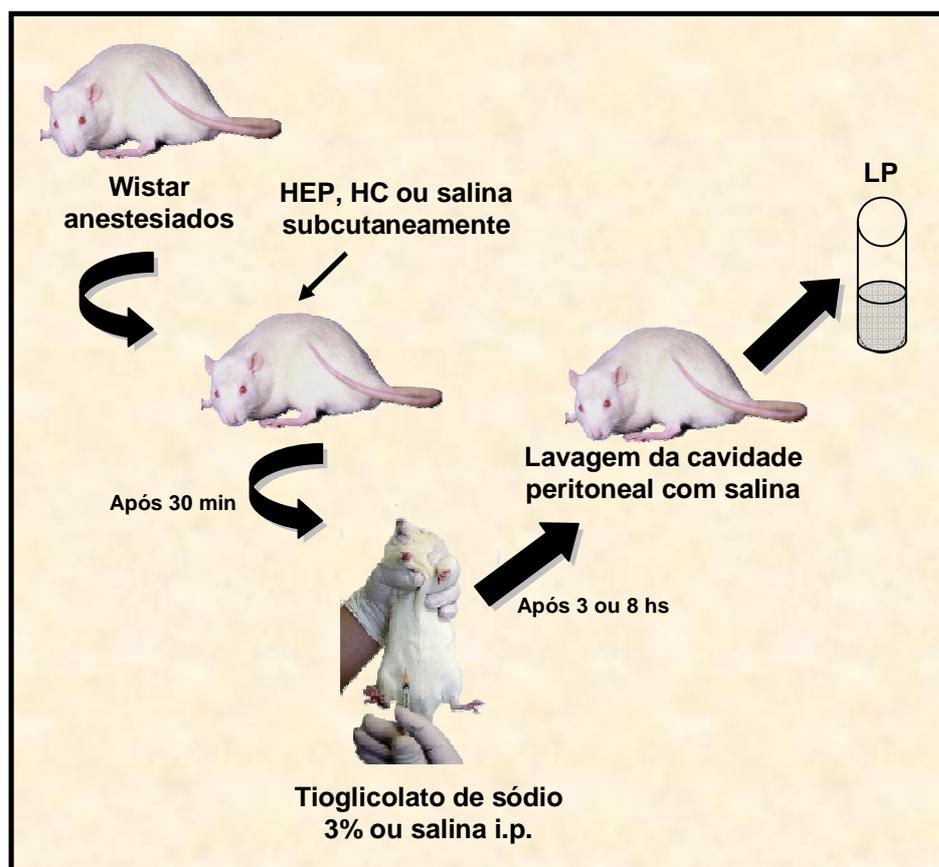
### 3.14. Peritonite induzida por tioglicolato de sódio

As propriedades antiinflamatórias do heparinóide obtido foram avaliadas através do modelo de peritonite induzida por tioglicolato de sódio (Figura 10) onde grupos de 5 ratos da linhagem Wistar com dois meses de idade foram submetidos a

uma injeção subcutânea de 1 mL de solução salina estéril contendo heparinóide de camarão ou heparina padrão nas doses de 5, 10 e 15  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de animal. O grupo controle recebeu uma injeção de 1 mL de solução salina estéril 0.9%.

Após 30 minutos foi administrada nos animais uma injeção intraperitoneal contendo 2 mL de tioglicolato de sódio 3%, que induz uma inflamação aguda na cavidade peritoneal com a infiltração de neutrófilos. Os ratos foram mantidos com água e dieta *ad libitum*, sendo sacrificados após três horas e submetidos à lavagem da cavidade peritoneal com solução salina 0,9%. Em um outro experimento os ratos tratados com heparinóide na dose de 15  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  do animal foram sacrificados após oito horas da indução da inflamação. O líquido peritoneal foi colhido e centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C para separar as células do sobrenadante, o qual foi submetido à zimografia para avaliar a atividade de metaloproteinases de matriz.

O precipitado celular foi ressuspenso em 500 $\mu\text{l}$  de solução salina e alíquotas de 20  $\mu\text{l}$  foram coradas pela solução de Turck e então contadas em câmara de Neubauer. O número total de células recrutadas à cavidade peritoneal foi utilizado como uma indicação do grau de inflamação. A viabilidade celular foi analisada utilizando-se a técnica exclusão com Azul de Tripán (WALLUM, STRENBORG, JENSEN, 1990), onde apenas as células não viáveis adquirem coloração azul. Foram retirados 20 $\mu\text{L}$  da suspensão celular, os quais foram misturados a 20 $\mu\text{L}$  de uma solução de azul de Tripán. A porcentagem das células viáveis foi determinada a partir de contagem diferencial em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio de luz.



**Figura 10:** Peritonite induzida por tioglicolato de sódio. LP – Líquido peritoneal.

### 3.15. Zimografia

O efeito do heparinóide sobre a atividade gelatinolítica das MMP-2 e MMP-9 foi analisado por zimografia de gelatina. Para as amostras do líquido peritoneal foram retiradas alíquotas para dosagem de proteína pelo método de Lowry (LOWRY, ROXBROUGH, 1951). Após a dosagem foi realizada a normalização do conteúdo protéico e quantidades iguais de proteína foram submetidas à eletroforese, em condições não redutoras, em gel de poliacrilamida 10% contendo 1,5 mg/mL de gelatina. O experimento foi realizado em duplicata. Após a corrida eletroforética, os géis foram lavados durante 40 minutos com uma solução renaturante de Triton X-100 a 2% para remover o SDS. Após esse período, um gel foi então incubado “overnight” a 37°C em tampão Tris-HCl 50mM contendo  $\text{CaCl}_2$  a 10 mM, pH 7,4 e o outro gel foi incubado com o mesmo tampão contendo EDTA (15mM). Após o período de incubação os géis foram corados com Coomassie Blue G-250 e a hidrólise da gelatina pode ser visualizada pelo aparecimento de bandas claras no

“background” azul. A intensidade das bandas digeridas foi estimada por densitometria através do software Scion Image Beta 4.03 (Scion Corporation, EUA).

### **3.16. Cultura de leucócitos humanos**

Leucócitos humanos foram obtidos do sangue de voluntários saudáveis que não estavam fazendo uso de medicamentos, fumo ou álcool. O sangue total coletado foi homogeneizado por inversão e diluído com meio de cultura RPMI não suplementado na proporção 1:1 (v/v). O sangue diluído foi colocado lentamente em tubos de centrifuga estéreis contendo 3 mL de Ficoll-Paque<sup>TM</sup> plus e centrifugado por 30 minutos a 1500 rpm. Em seguida a nuvem leucocitária foi retirada com pipeta Pasteur estéril e lavada 2 vezes com meio RPMI não suplementado. Cada lavagem foi acompanhada por uma centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos. Após as lavagens os leucócitos foram plaqueados numa densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL em placas de seis poços e mantidos em meio de cultura RPMI suplementado (10% SFB, fungizone,  $\beta$ -mercaptoetanol e antibiótico).

### **3.17. Efeito do heparinóide de camarão sobre a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) de leucócitos humanos**

Os leucócitos plaqueados como descrito no item anterior foram incubados na ausência ou presença de heparina ou heparinóide (10 e 100  $\mu$ g/mL) por 2 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período foi adicionado meio RPMI contendo fitohemaglutinina (5  $\mu$ g/mL). Após 48 horas na estufa as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm 4°C. O sobrenadante foi coletado e foi analisado com relação à atividade de MMPs por zimografia, como descrito no item 3.14.

### **3.18. Análise Estatística**

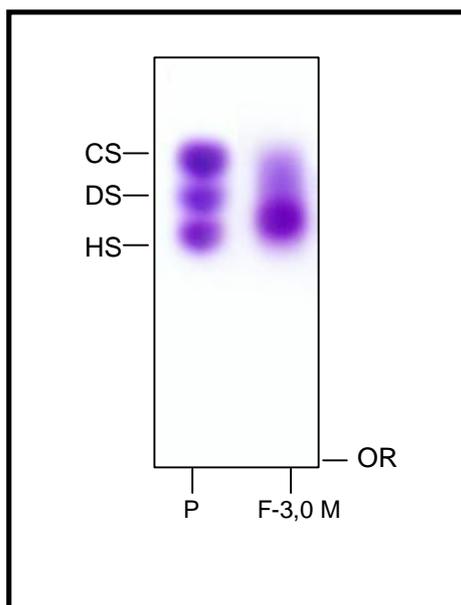
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SD e analisados por ANOVA. A diferença entre os grupos foi realizada pelo teste de Tukey-Kramer. O valor de  $p < 0,001$  é considerado extremamente significativo.

## **4. RESULTADOS**

## Resultados

### 4.1. Identificação dos GAGs isolados do cefalotórax de *Litopenaeus vannamei*

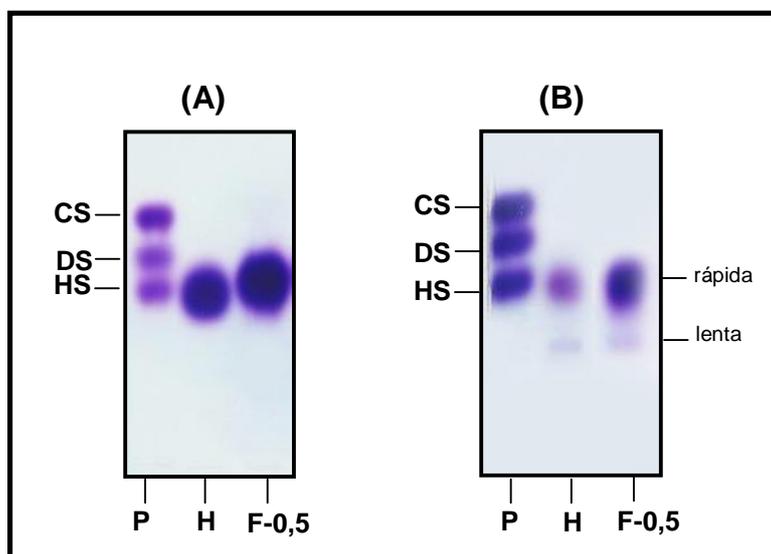
Os glicosaminoglicanos isolados após proteólise e fracionamento com resina de troca-iônica foram eluídos com NaCl 3,0 M para a obtenção da fração F-3,0 M. A análise dessa fração por eletroforese em gel de agarose no sistema PDA revela a predominância de compostos com migração intermediária entre o HS e o DS (Figura 11). A fim de separar os GAGs presentes na fração F-3,0 M, esta foi submetida ao fracionamento com acetona em diferentes proporções, para obtenção das frações F-0,5; F-0,7 e F-1,0. A fração precipitada com acetona na proporção 0,5:1 (v/v) (F-0,5) apresentou uma banda metacromática com migração ligeiramente superior à migração da heparina/HS no sistema PDA (Figura 12A). Quando analisada no sistema descontínuo de Ba/PDA, observa-se que essa fração apresenta os componentes de migração rápida e lenta, característicos da heparina de mamíferos, embora o componente de migração rápida seja predominante (Figura 12B).



**Figura 11:** Comportamento eletroforético em sistema PDA dos GAGs do cefalotórax do *L. vannamei* após complexação com resina de troca iônica. Cerca de 10µg de cada fração foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, tampão PDA 0,05M, pH 9,0. Os compostos foram fixados com CETAVLON 0,1% e corados com solução de azul de toluidina. OR- origem, P- padrão contendo 5µg de condroitim 4/6 sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS).

Esse resultado indica que a fração F-0,5 apresenta compostos semelhantes à heparina, heparinóides, o que é confirmado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A análise do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN mostra que essa

fração apresenta os sinais anoméricos correspondentes à glucosamina N-sulfatada (100.5 ppm), ácido idurônico 2-sulfatado (102.8 ppm) e ácido glucurônico (105 ppm), que são típicos da heparina de mamíferos (Dados não mostrados).

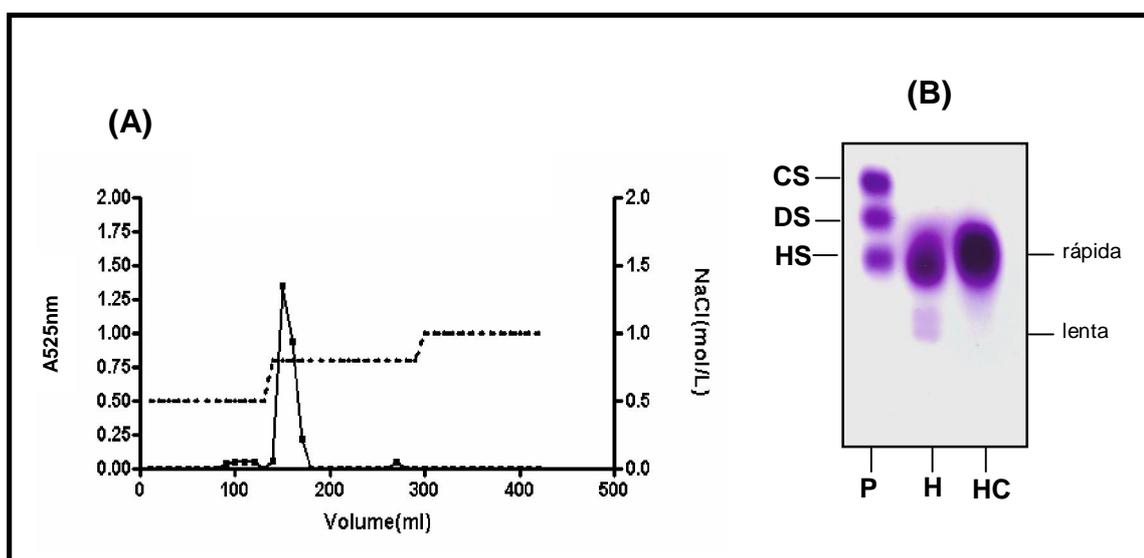


**Figura 12:** Comportamento eletroforético nos sistemas PDA (A) e Ba/PDA (B) da fração F-0,5, obtida após tratamento com acetona. P - padrão contendo 5 $\mu$ g de condroitim 4/6 sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparim sulfato (HS); H – heparina de mamíferos.

Sinais de baixa intensidade, correspondentes ao C-2 (~54 ppm) e C-6 (~63 ppm) dos resíduos de galactosamina N-acetilada foram observados no espectro das frações F-0,5, F-0,7 e F-1,0 (Dados não mostrados), indicando a presença de pequenas quantidades de galactosaminoglicanos, como CS ou DS. No entanto, na fração F-0,5 esses sinais são menos intensos, demonstrando uma menor contaminação por aqueles tipos de GAGs. Desse modo, esta fração foi submetida a etapas subseqüentes de purificação.

#### 4.2. Purificação do heparinóide de *Litopenaeus vannamei*

Para isolar o heparinóide dos galactosaminoglicanos contaminantes, a fração F-0,5 foi purificada por cromatografia de troca-iônica em DEAE-sephacel e eluída com NaCl nas molaridades de 0,5, 0,8 e 1,0 M (Figura 13A). Através da dosagem de ácido urônico, foi observado que as frações eluídas com NaCl 0,8 M representam 91,5% do conteúdo total de urônico. Essas frações foram reunidas e, após liofilização, submetidas à cromatografia de gel filtração em Sephadex G-25 para remoção do sal. A eletroforese no sistema Ba/PDA do heparinóide obtido mostrou que o mesmo é constituído principalmente pelo componente de migração rápida (Figura 13B).

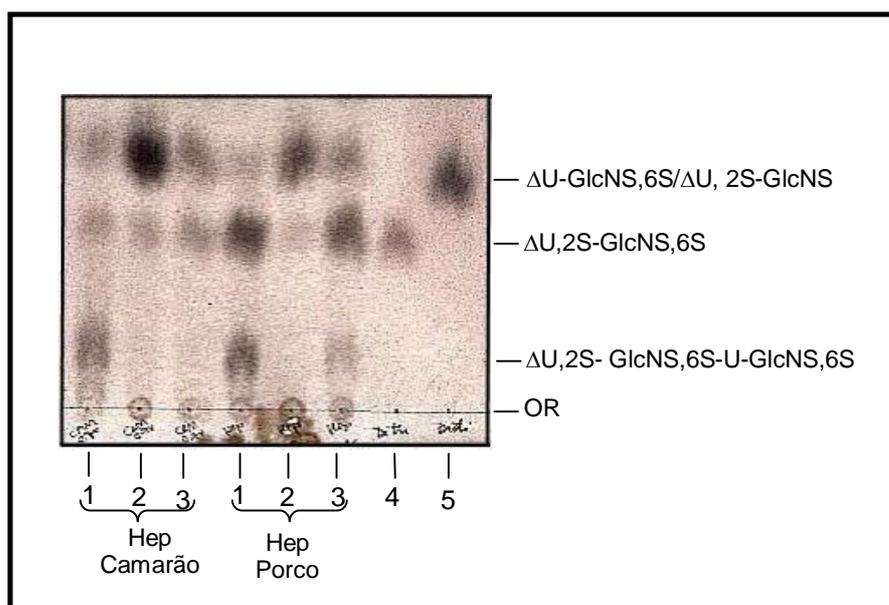


**Figura 13:** (A) Purificação do heparinóide de camarão por cromatografia de troca-iônica em DEAE-sephacel. A linha pontilhada indica o gradiente de NaCl utilizado. Todas as frações foram monitoradas a 525 nm pela dosagem de urônico. (B) Eletroforese em gel de agarose no sistema Ba/PDA do heparinóide do camarão após cromatografia de troca-iônica. P - padrão contendo 5µg de condroitim 4/6 sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS); H – heparina de mamíferos; HC – heparinóide de camarão.

#### 4.3. Degradação enzimática do heparinóide de *L. vannamei*

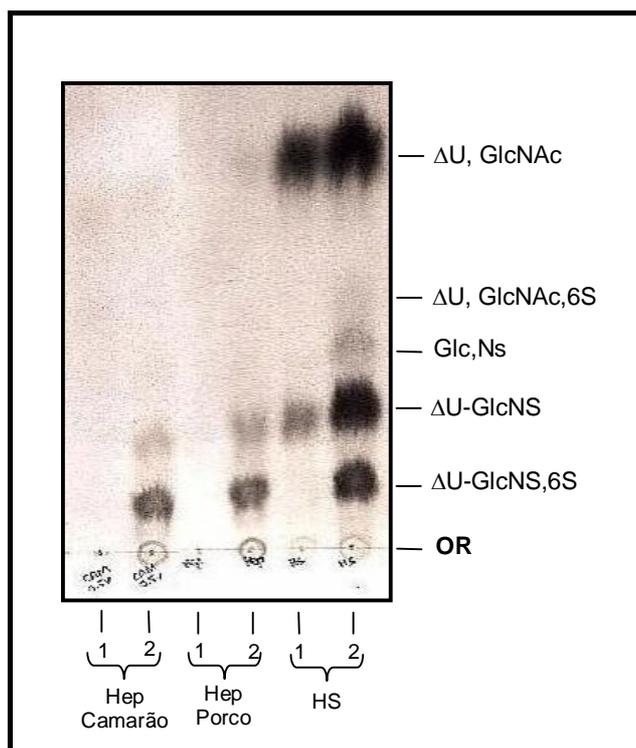
As principais unidades dissacarídicas constituintes do heparinóide isolado do camarão cinza foram identificadas por fragmentação com heparinase e heparitinasas I e II provenientes de *Flavobacterium heparinum*. Os produtos gerados por ação dessas enzimas foram evidenciados por cromatografia em papel.

Os produtos de degradação do heparinóide são mostrados nas Figuras 14 e 15. Observa-se que a heparinase agiu sobre o composto liberando tetrassacarídeos ( $\Delta U, 2S\text{-GlcNS, 6S-U-GlcNS, 6S}$ ), dissacarídeos trissulfatados ( $\Delta U, 2S\text{-GlcNS, 6S}$ ) e dissacarídeos dissulfatados ( $\Delta U, 2S\text{-GlcNS}$ ). Esses produtos também foram observados quando a heparina foi submetida à ação da mesma enzima, indicando que a heparina de mamíferos e o heparinóide apresentam o mesmo perfil de degradação, embora apresentem proporções distintas dos dissacarídeos formados. Sob ação da heparitinase II o composto isolado do camarão liberou como principal produto o dissacarídeo dissulfatado ( $\Delta U, 2S\text{-GlcNS/ } \Delta U\text{-GlcNS, 6S}$ ) e pequenas quantidades do dissacarídeo trissulfatado ( $\Delta U, 2S\text{-GlcNS, 6S}$ ). A ação conjunta de heparinase e heparitinase II também liberou produtos que migram como dissacarídeos dissulfatados e trissulfatados (Figura 14).



**Figura 14:** Cromatografia em papel dos produtos obtidos após ação da heparinase e da heparitinase II. Cerca de 100  $\mu\text{g}$  do heparinóide de camarão ou da heparina suína foram incubados com heparinase ou heparitinase II por 18hs a 30° C. Os produtos formados foram submetidos à cromatografia em papel Whatman nº1, no solvente isobutírico:amônia 1,25N (5:3 v/v) por 24hs (heparitinase II) ou no mesmo solvente (5:3,6 v/v) por 48hs (heparinase). Em seguida, os produtos foram revelados com nitrato de prata em meio alcalino. OR-Origem; (1) produtos gerados por ação da heparinase; (2) produtos gerados por ação da heparitinase II; (3) produtos gerados por ação combinada das duas enzimas; (4) dissacarídeo trissulfatado ( $\Delta U, 2S\text{-GlcNS, 6S}$ ); (5) dissacarídeo dissulfatado ( $\Delta U\text{-GlcNS, 6S/} \Delta U, 2S\text{-GlcNS}$ );  $\Delta U, 2S\text{-GlcNS, 6S-U-GlcNS, 6S}$ : tetrassacarídeo pentassulfatado.

Como pode ser observado na figura 16, não foi identificada a formação de produtos após ação da heparitinase I sobre o heparinóide. Quando submetido à ação das heparitinases I e II, o heparinóide de camarão libera principalmente dissacarídeo dissulfatado ( $\Delta$ U-GlcNS,6S) e monossulfatado ( $\Delta$ U-GlcNs), além de pequenas proporções de dissacarídeo N-acetilado ( $\Delta$ U-GlcNAc) (Figura 15).

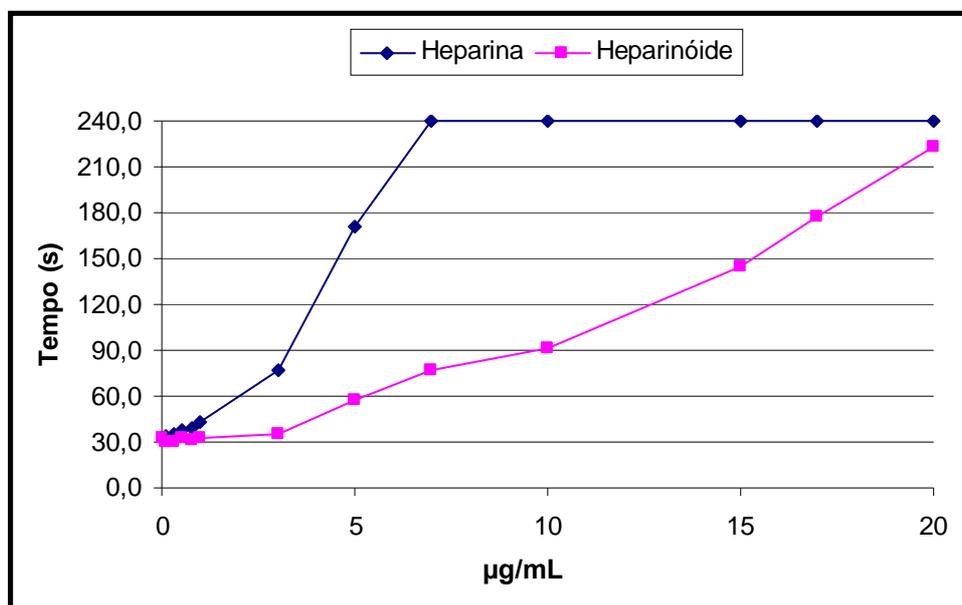


**Figura 15:** Cromatografia em papel dos produtos obtidos após ação da heparitinase I e da heparitinase II. Cerca de 100  $\mu$ g do heparinóide de camarão, de heparam sulfato ou da heparina suína foram incubados com heparitinase I e II por 18hs a 30° C. Os produtos formados foram submetidos à cromatografia em papel Whatman nº1 no solvente isobutírico:amônia 1,25N (5:3 v/v) e após 24 horas foram revelados com nitrato de prata em meio alcalino. OR-Origem; (1) produtos gerados por ação da heparitinase I; (2) produtos gerados por ação combinada das heparitinases I e II.  $\Delta$ U-GlcNS,6S, dissacarídeo N,6-dissulfatado;  $\Delta$ U-GlcNS, dissacarídeo N-sulfatado; Glc,Ns, glucosamina N-sulfatada;  $\Delta$ U, GlcNAc,6S, dissacarídeo N-acetilado, 6-sulfatado;  $\Delta$ U, GlcNAc, dissacarídeo N-acetilado.

#### 4.4. Atividade anticoagulante *in vitro* do heparinóide isolado do camarão

A atividade anticoagulante do heparinóide foi avaliada pelo ensaio de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), que reflete a via intrínseca da cascata de coagulação. Na figura 16 podemos observar que o efeito do heparinóide sobre o tempo de coagulação difere daquele observado para a heparina e que o mesmo foi dependente da concentração. A atividade anticoagulante desse composto, expressa

em Unidades Internacionais (UI), corresponde a ~40 UI/mg, evidenciando sua reduzida atividade, quando comparado à heparina padrão (190 UI/mg).

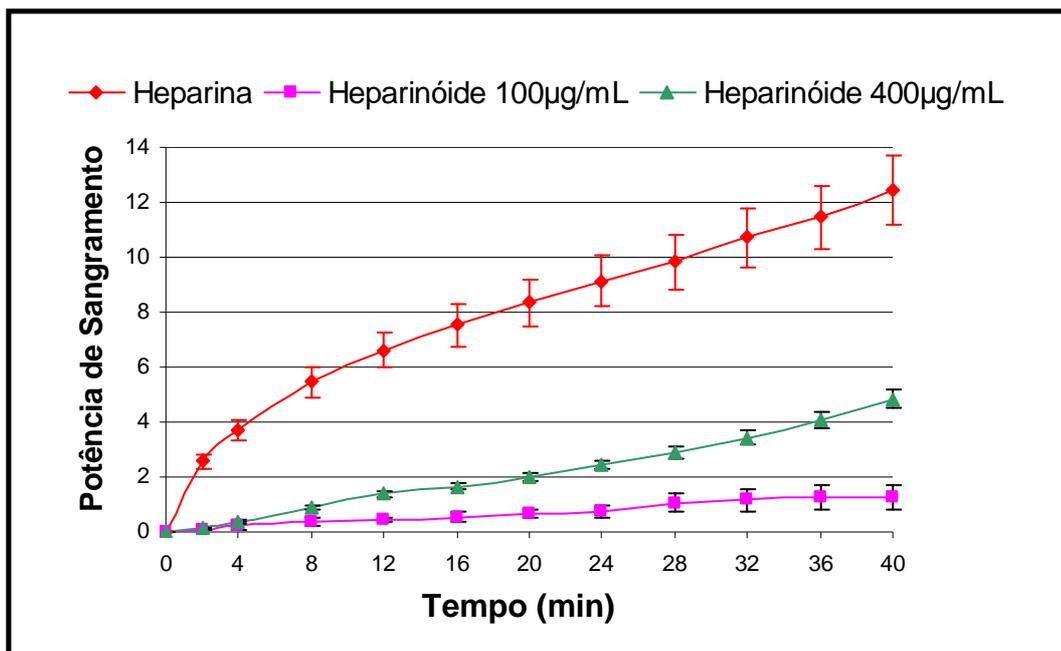


**Figura 16:** Atividade anticoagulante *in vitro* do heparinóide de camarão pelo ensaio de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT).

#### 4.5. Avaliação do efeito hemorrágico residual do heparinóide de *L. vannamei*

A utilização clínica de heparina é acompanhada por alguns efeitos indesejáveis, como complicações hemorrágicas decorrentes de sua capacidade de interferir no equilíbrio hemostático. Dessa forma, é de grande importância a avaliação do efeito do heparinóide sobre a hemostasia. Para isso foi utilizado o modelo de escarificação em cauda de ratos, onde a aplicação tópica de heparina na lesão provoca um intenso sangramento, mesmo após a cauda ser intensamente lavada com solução salina. Esse efeito apresentado pela heparina, que é independente de sua atividade anticoagulante (NADER et al., 2001), é chamado de efeito hemorrágico residual.

Como pode ser observado na figura 17, 100 µg/mL de heparina são suficientes para desencadear um potente efeito hemorrágico, enquanto o heparinóide, na mesma concentração, possui um efeito negligenciável sobre a hemostasia. É interessante observar que, mesmo em uma concentração quatro vezes maior (400 µg/mL) que a heparina, o heparinóide apresenta um potencial de sangramento cerca de três vezes menor.



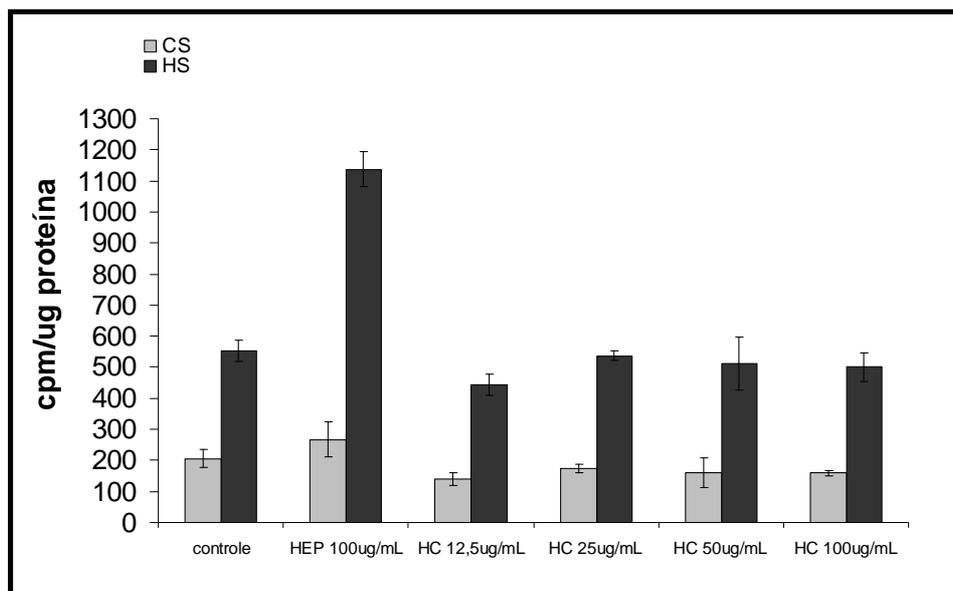
**Figura 17:** Ensaio da atividade hemorrágica da heparina e heparinóide do camarão. Após contato com heparina de mamíferos Liqueimine<sup>®</sup> (100 µg/mL) ou heparinóide (100 ou 400 µg/mL), a cauda escarificada foi intensamente lavada com solução salina e introduzida em meio contendo apenas solução salina por 40 minutos. A proteína total liberada da lesão foi expressa em potência de sangramento conforme descrito em métodos.

#### 4.6. Efeito do heparinóide de camarão sobre a síntese de HS pelas células endoteliais.

Quando as células endoteliais da aorta de coelho e células da veia umbilical são expostas à heparina e outros agentes antitrombóticos, pode-se observar um aumento da síntese de cadeias de HS antitrombótico (NADER et al., 1989; 1991).

Para verificar se o heparinóide possui efeito semelhante à heparina sobre a síntese desse HS peculiar, células endoteliais da aorta de coelho foram expostas, ou não, a diversas concentrações do heparinóide (12,5; 25; 50 e 100 µg/mL) ou 100 µg/mL de heparina e 150 µCi/mL de [<sup>35</sup>S] – sulfato de sódio. Após 20 horas de incubação os glicosaminoglicanos foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

Como observado na figura 18, o composto isolado do camarão não estimula a síntese de HS antitrombótico em nenhuma das concentrações testadas.



**Figura 18:** Quantificação dos GAGs secretados para o meio de cultura. Células endoteliais da aorta de coelho foram incubadas em meio F-12 contendo [ $^{35}\text{S}$ ]-sulfato de sódio ( $150\mu\text{Ci/mL}$ ), por 24hs, na presença ou ausência de heparina ou heparinóide (HC). Os GAGs sintetizados e secretados para o meio foram quantificados como descrito em métodos.

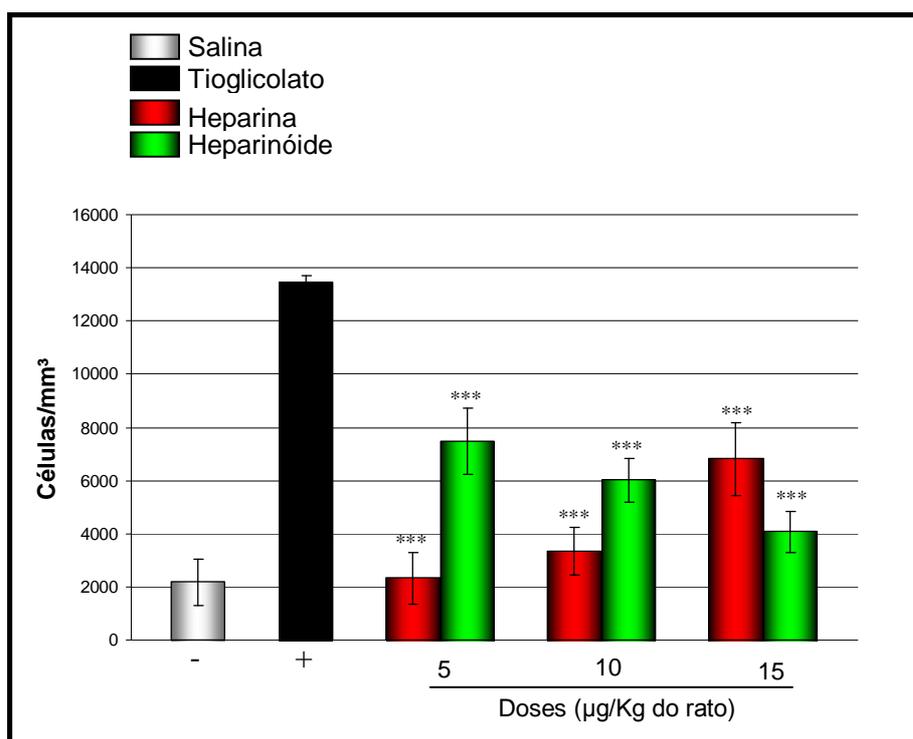
#### 4.7. Efeito do heparinóide sobre o influxo de células à cavidade peritoneal

Com o objetivo de comparar as atividades antiinflamatórias entre heparina e heparinóide, foi utilizado um modelo de inflamação aguda induzida por tioglicolato de sódio, que provoca o influxo de neutrófilos à cavidade peritoneal (FRENETTE et al., 1996; MULLIGAN et al., 1993; NELSON et al., 1993). Os animais do grupo controle positivo (+) receberam uma injeção intraperitoneal de tioglicolato, enquanto o grupo controle negativo (-) foi tratado apenas com solução salina. Quando os animais são tratados com heparina ou heparinóide, antes da indução da inflamação, observa-se uma redução significativa do recrutamento de neutrófilos ao sítio de injúria em todas as concentrações testadas (Figura 19).

Pode-se observar também que a menor dose de heparina testada ( $5\mu\text{g/Kg}$  do animal) foi capaz de reduzir mais de 80% da infiltração celular, enquanto a maior dose do heparinóide ( $15\mu\text{g/Kg}$  do animal) promoveu uma redução de cerca de 60%. Apesar de ser necessária uma maior dose do heparinóide para obter uma resposta mais acentuada sobre a migração dos leucócitos, vale ressaltar que a heparina possui um elevado potencial hemorrágico. Enquanto isso, o composto isolado do camarão consegue reduzir mais da metade da infiltração celular e ainda possui a

vantagem de apresentar pequeno efeito hemorrágico residual, mesmo em uma concentração 4 vezes maior que a concentração de heparina (Figura 17).

Uma vez que a migração de neutrófilos aos sítios de injúria é máxima por volta de 8 horas após o estímulo inflamatório (HARTT et al., 1999; LAGASSE; WEISSMAN, 1996), foi realizado um experimento para verificar se o heparinóide na dose de 15 µg/Kg do animal também era capaz de reduzir a migração celular em um período maior de inflamação. Após 8 horas da aplicação de tioglicolato, a contagem do número de células que migraram para a cavidade peritoneal revelou que o composto isolado do camarão ainda foi capaz de reduzir 52,5% do influxo celular (dados não mostrados). Para descartar a possibilidade de que o mesmo pudesse exercer algum efeito citotóxico sobre as células, a viabilidade celular após tratamento com heparinóide foi avaliada por exclusão por Tripán Blue, sendo observado 96% de células viáveis.

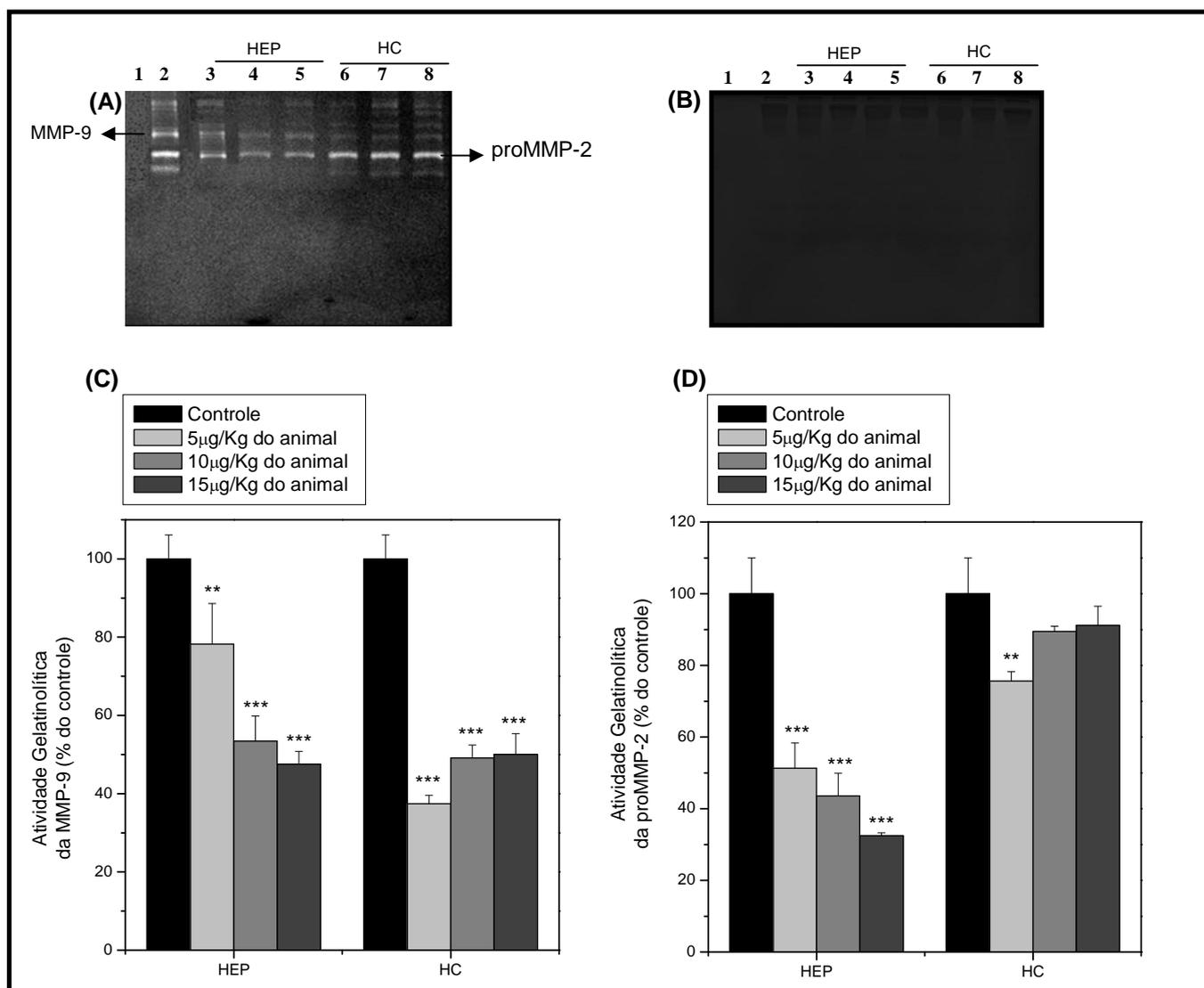


**Figura 19:** Efeito do heparinóide de camarão sobre a migração leucocitária. Foi utilizado o modelo de peritonite aguda, como descrito em "Material e Métodos". (-) – Controle negativo; (+) – controle positivo. Cada coluna representa os valores médios  $\pm$  DP; n=5 (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

#### **4.8. Efeito do Heparinóide sobre a Atividade das MMPs no Líquido Peritoneal**

Para avaliar o efeito do heparinóide sobre a atividade das MMPs na resposta inflamatória aguda, amostras do líquido peritoneal foram submetidas à zimografia em géis contendo gelatina para avaliação das atividades das gelatinases MMP-9 e MMP-2 que degradam colágeno tipo IV e V.

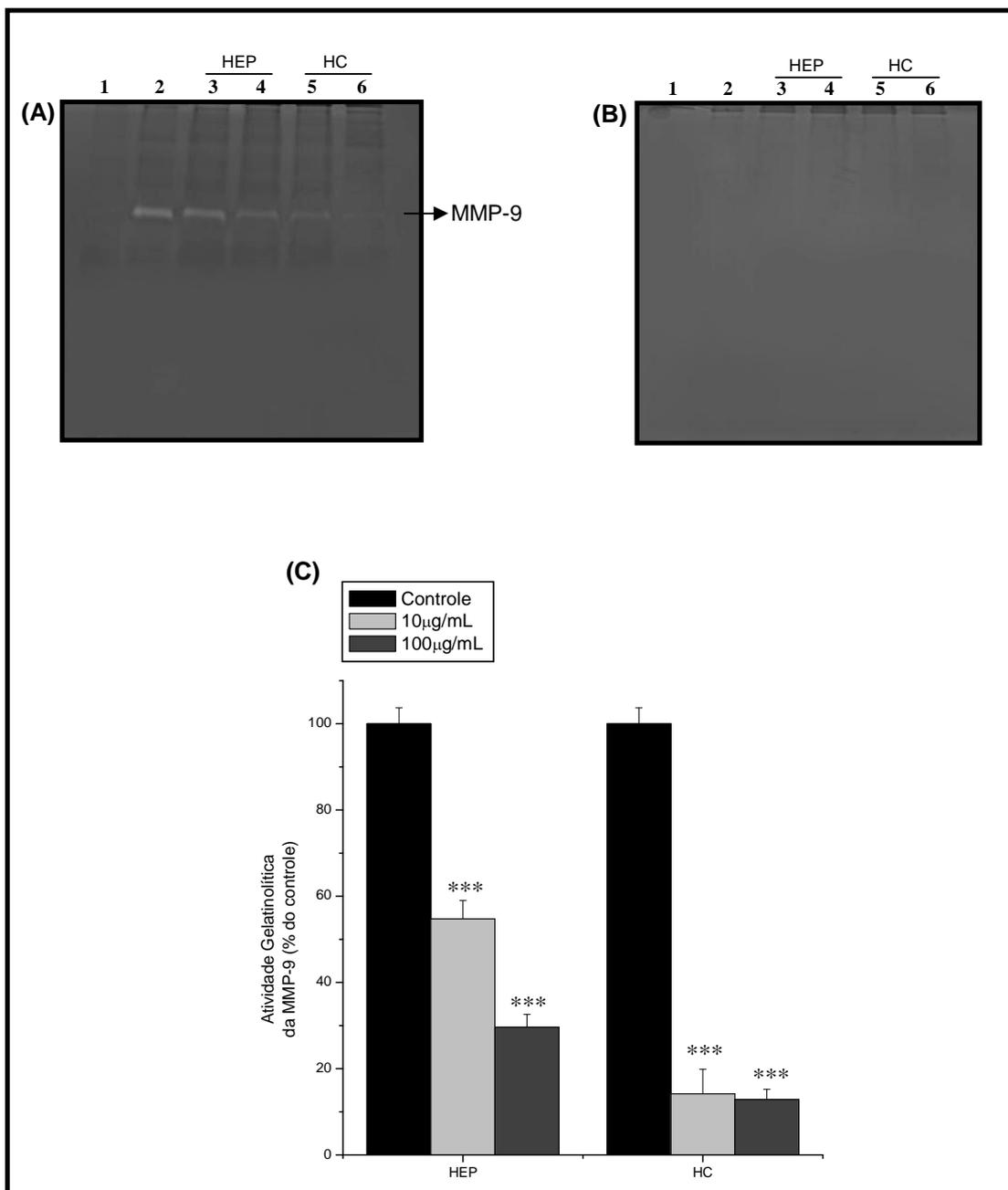
Foi possível visualizar a presença de bandas com atividade apenas na ausência de EDTA, o qual é importante para a atividade dessas enzimas por ser quelante de cálcio. No líquido peritoneal dos animais tratados apenas com tioglicolato, observa-se a atividade aumentada de MMP-9 e proMMP-2, quando comparado com aqueles animais que receberam apenas solução salina (Figura 20A). O tratamento com heparinóide reduziu significativamente ( $p < 0.001$ ) mais de 50% da atividade dessa enzima em todas as doses testadas. Com uma dose menor (5  $\mu\text{g/Kg}$ ), a heparina promoveu apenas uma modesta redução (~20%) na atividade da MMP-9, apresentando maior efeito sobre a atividade dessa enzima com as doses de 10 e 15  $\mu\text{g/Kg}$  do animal (Figura 20C). Por outro lado, o efeito da heparina foi muito maior sobre a proMMP-2, chegando a reduzir 68% de sua atividade com a dose de 15  $\mu\text{g/Kg}$ , enquanto o heparinóide reduziu significativamente a atividade dessa enzima apenas com a dose de 5  $\mu\text{g/Kg}$  (Figura 20D). Para as doses maiores o tratamento com heparinóide não teve efeito significativo sobre a atividade de proMMP-2.



**Figura 20:** Zimografia para determinação da atividade gelatinolítica das MMP-9 e proMMP-2 presente no líquido peritoneal dos animais tratados com heparina (HEP) ou heparinóide (HC). **(A)** Atividade gelatinolítica de proMMP-2 e MMP-9 foi detectada por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gelatina. **(B)** Zimografia das mesmas amostras incubadas com tampão contendo EDTA. A área e a intensidade das bandas digeridas pela MMP-9 **(C)** e proMMP-2 **(D)** foi quantificada por densitometria e expressa como porcentagem do controle positivo. 1 e 2: atividade gelatinolítica das MMPs no fluido peritoneal dos animais tratados apenas com salina ou tioglicolato, respectivamente; 3, 4 e 5: atividade gelatinolítica das MMPs no fluido dos animais tratados com HEP nas doses 5, 10 e 15µg/Kg do rato, respectivamente; 6, 7 e 8: atividade gelatinolítica das MMPs no fluido dos animais tratados com HC nas doses 5, 10 e 15µg/Kg do rato, respectivamente. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs controle com tioglicolato.

#### **4.9. Efeito do heparinóide de camarão sobre a atividade da MMP-9 de leucócitos humanos**

Uma vez que algumas doenças inflamatórias estão relacionadas com níveis elevados de MMPs, é importante avaliar a capacidade do heparinóide de camarão de interferir nessas enzimas produzidas por células humanas. Portanto, foi avaliado o efeito do heparinóide sobre a atividade da MMP-9 produzida por leucócitos humanos ativados. Como mostrado na figura 21A e C, heparina e heparinóide foram capazes de reduzir a atividade da MMP-9 tanto em uma baixa como em uma alta concentração, onde o heparinóide apresentou um efeito inibitório mais pronunciado sobre a atividade dessa enzima, chegando a promover uma redução de quase 90% . A capacidade de reduzir a atividade de MMPs é extremamente importante, uma vez que a atividade gelatinolítica exagerada pode ser prejudicial para a integridade do sistema vascular e está relacionada com muitas doenças inflamatórias.



**Figura 21:** Zimografia para determinação das atividades de MMP-9 liberada por leucócitos humanos ativadas com fitohemaglutinina (PHA). **(A)** Atividade gelatinolítica MMP-9 foi detectada por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 10% de gelatina. **(B)** As mesmas amostras foram incubadas com tampão contendo EDTA. **(C)** A área e a intensidade das bandas digeridas pela MMP9 foi quantificada por densitometria e expressa como porcentagem do controle positivo. 1: leucócitos não ativados; 2: Controle positivo (atividade de MMP-9 de leucócitos ativados com PHA); 3 e 4: atividade de MMP-9 de leucócitos ativados pré-tratados com HEP nas concentrações de 10 e 100 µg/mL, respectivamente; 5 e 6: atividade de MMP-9 de leucócitos ativados tratados com HC nas concentrações 10 e 100 µg/mL, respectivamente. \*\*\*p<0.001 vs controle positivo.

## **5. DISCUSSÃO**

## Discussão

---

A resposta inflamatória exagerada e descontrolada pode contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e agudas, onde se faz necessária a intervenção na resposta imune com a utilização de moléculas que possam modular o processo inflamatório. É inegável o grande potencial da heparina em interferir na resposta imune, no entanto sua forte atividade anticoagulante tem se mostrado como um grande obstáculo ao aproveitamento de suas outras propriedades. Por essa razão, várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de encontrar ou desenvolver moléculas de heparina com reduzida atividade anticoagulante, mas que preservem suas propriedades antiinflamatórias.

A pesquisa por compostos semelhantes à heparina, heparinóides, obtidos a partir de fontes naturais tem crescido bastante, e os organismos marinhos vêm se destacando cada vez mais como fontes promissoras. A presença de heparinóides já foi verificada, por exemplo, em diversos grupos de invertebrados marinhos (MEDEIROS et al., 2000; ANDRADE, 2006; CASSARO; DIETRICH, 1977; DIETRICH et al., 1999; DIETRICH et al., 1985; NADER et al., 1984.; SANTOS et al., 2002; PEJLER et al., 1987; CHAVANTE et al., 2000), no entanto a maior parte da pesquisa com esses compostos tem almejado a descoberta de um agente antitrombótico ideal, que possa substituir a heparina no tratamento e prevenção de eventos trombóticos. A possível propriedade antiinflamatória desses compostos ainda é pouco explorada. Recentemente foi demonstrado que um heparinóide do camarão *Penaeus schimitt* foi capaz de reduzir a migração de leucócitos em um modelo de inflamação aguda (SANTOS, 2006). No presente trabalho, foram investigadas as propriedades antiinflamatórias de um heparinóide isolado do cefalotórax da principal espécie de camarão da carcinicultura brasileira, o *Litopenaeus vannamei*. Para isso, foi necessário estudar alguns aspectos relevantes de sua estrutura e seu efeito sobre a hemostasia e sobre a síntese de HS antitrombótico.

Inicialmente, a presença do heparinóide foi identificada por análises eletroforéticas no sistema PDA, que discrimina os GAGs pela capacidade de interação com a diamina. A diferença de migração observada entre o composto do camarão e a heparina/HS sugere diferenças de sulfatação entre esses compostos, levando a uma interação com a diamina distinta daquela observada para heparina/HS de vertebrados. Perfil semelhante ao do heparinóide de *L.vannamei*

também foi observado para os heparinóides do caranguejo *Goniopsis cruentata* (ANDRADE, 2006). No sistema Ba/PDA, no qual a heparina de mamíferos é fracionada em seus componentes de migração rápida e lenta, observa-se a predominância de uma banda metacromática com perfil de migração semelhante ao componente de migração rápida da heparina, revelando que o composto isolado do camarão pode ser constituído principalmente por dissacarídeos dissulfatados (VOLPI, 1993). Esse perfil de migração eletroforética também foi observado em heparinóides de outras espécies de crustáceos, como no camarões *Litopenaeus brasiliensis* (DIETRICH et al., 1999) e *Penaeus Schimit* (SANTOS, 2006), na lagosta *Panulirus laevicauda* (SILVA, 2003) e no microcrustáceo *Artemia franciscana* (CHAVANTE et al., 2000).

A predominância dos dissacarídeos dissulfatados no heparinóide do camarão cinza foi confirmada pela despolimerização enzimática com heparinase e heparitinases I e II. Semelhante ao heparinóide do camarão *Penaeus brasiliensis* (DIETRICH et al., 1999) e aos heparinóides de outras espécies de invertebrados (DIETRICH et al., 1985,1989; MEDEIROS et al., 2000), o heparinóide de *L. vannamei* foi mais suscetível à heparitinase II, liberando principalmente dissacarídeos dissulfatados. Baseado ainda na especificidade dessa enzima, os resultados indicam que o heparinóide do crustáceo possui um maior conteúdo de resíduos de ácido glucurônico. Essas diferenças também têm sido observadas em heparinóides de moluscos e de outros crustáceos, que também possuem maior quantidade de resíduos de ácido glucurônico em sua estrutura (MEDEIROS et al., 2000; DIETRICH et al., 1985; DIETRICH et al., 1999). A liberação de dissacarídeos dissulfatados ( $\Delta$ U, 2S-GlcNS) após ação da heparinase sugere que os resíduos de glucosamina N-sulfatada também podem estar ligados a resíduos de idurônico 2-sulfato.

Uma vez que o heparinóide não foi suscetível à heparitinase I, a qual age sobre a ligação entre a D-glucosamina (N-acetilada ou N-sulfatada) e ácido D-glucurônico, pode-se concluir que o composto isolado do camarão apresenta uma menor proporção desse tipo de unidade dissacarídica. Além disso, é provável que os resíduos de ácido glucurônico estejam ligados à glucosamina N-sulfatada, 6-O-sulfatada, já que a sulfatação em C-6 da glucosamina impede a ação dessa enzima.

Alguns aspectos estruturais observados para o heparinóide de camarão, como a predominância de resíduos de ácido glucurônico e de dissacarídeos

dissulfatados, podem estar relacionados com a sua reduzida atividade anticoagulante (40 UI/mg) observada pelo ensaio de aPTT. Por outro lado, o heparinóide isolado do molusco *Anomalocardia brasiliiana* também é rico em resíduos de ácido glucurônico, no entanto possui elevada atividade anticoagulante (320 UI/mg) (PEJLER, 1987; ENERBÄCK et al., 1985; DIETRICH et al., 1989). Na verdade, as propriedades farmacológicas de cada heparinóide variam de acordo com sua origem, e isso deve estar relacionado com algumas peculiaridades estruturais, como o padrão de sulfatação dos resíduos de glucosamina, que influenciam a conformação assumida pelos resíduos de ácido urônico, refletindo, por exemplo, na sua capacidade de se ligar à AT.

Uma vez que a AT não é o único alvo de compostos antitrombóticos (BOUÇAS, 2006), a reduzida atividade anticoagulante *in vitro* do heparinóide não exclui a possibilidade de que o mesmo possua algum efeito antitrombótico *in vivo*. Uma fucana sulfatada da alga marrom *Spatoglossum schroederi*, por exemplo, possui atividade antitrombótica *in vivo*, porém, com nenhuma atividade anticoagulante *in vitro* (ROCHA et al., 2005). O mesmo é verificado para o acaran sulfato, um glicosaminoglicano isolado dos tecidos do molusco *Achatina fulica* e cuja estrutura é caracterizada pela presença de resíduos de  $\alpha$ -D-N-acetilglucosamina e ácido  $\alpha$ -L-idurônico 2-O-sulfato (KIM et al., 1996).

Na verdade, acredita-se que a atividade antitrombótica *in vivo* da heparina e de outros agentes antitrombóticos seja devida, pelo menos em parte, à capacidade desses compostos de estimular a síntese de cadeias de heparam sulfato antitrombótico pelas células endoteliais (NADER et al., 2001). Compostos sulfatados que apresentam atividade antitrombótica *in vivo*, como dextram sulfato, condroitim sulfato e outros agentes antitrombóticos (PINHAL et al., 1994, 1995; NADER et al., 2001) estimulam a síntese desse GAG peculiar.

Estudos anteriores mostraram que a heparina possui sítios de ligação na matriz extracelular, através dos quais ela se liga e estimula a síntese do HS antitrombótico. Heparinóides do crustáceo *G. cruentata* (ANDRADE, 2006) e fucanas A e B da alga *Spatoglossum schroederi* (ROCHA, 2005), que têm efeito estimulatório sobre as células endoteliais, são capazes de reconhecer os mesmos sítios de ligação na matriz reconhecidos pela heparina. Logo, é possível que as peculiaridades estruturais do heparinóide em estudo dificultem sua ligação a esses

sítios na matriz extracelular. Contudo, estudos posteriores devem ser realizados para que se possa testar essa hipótese.

Um outro aspecto interessante a respeito das propriedades farmacológicas do heparinóide de camarão foi a observação de que este composto apresenta um reduzido potencial de sangramento, quando comparado à heparina de mamíferos, o que possibilitou sua utilização como um modelo para estudar seus possíveis efeitos sobre a resposta inflamatória. Um parâmetro utilizado para investigar as propriedades antiinflamatórias do heparinóide de camarão foi a avaliação de sua capacidade de interferir na migração leucocitária aos sítios de injúria em um modelo de peritonite aguda induzida por tioglicolato de sódio. O tráfico excessivo de leucócitos para regiões extravasculares pode contribuir para a ocorrência de doenças inflamatórias agudas e crônicas. Por essa razão, muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de encontrar moléculas que funcionem como inibidores desse fluxo anormal de células.

Nesse estudo, foi demonstrado que a administração do heparinóide de camarão reduziu significativamente a migração de leucócitos à cavidade peritoneal em todas as doses testadas. Uma vez que a resposta inflamatória é um processo complexo, envolvendo a participação de uma grande variedade de proteínas, tanto heparina quanto heparinóide podem estar interferindo em diversos pontos da inflamação. Sabe-se, por exemplo, que heparina é capaz de ligar-se a quimiocinas e inibir a interação dessas moléculas com os GAGs da superfície das células endoteliais. A inibição dessa interação acaba prejudicando a formação do gradiente de quimiocinas, promovendo, conseqüentemente, a diminuição do recrutamento de leucócitos aos sítios de injúria (CRIPPS et al., 2005).

Utilizando um modelo de inflamação aguda, outros pesquisadores mostraram que os efeitos antimigratórios da heparina e seus derivados também podem estar relacionados com a inibição das interações mediadas por P- e L-selectinas, e que esse efeito é dependente de sulfatação (WANG et al., 2002; GAO et al., 2005).

Considerando esses mecanismos de ação da heparina sobre infiltração de leucócitos, é possível que o heparinóide do camarão possa atuar inibindo os eventos iniciais de adesão mediados pelas selectinas ou competindo com os GAGs da superfície das células pela interação com as quimiocinas. Seu menor grau de sulfatação justificaria a necessidade de uma dose maior do heparinóide para a obtenção de um efeito inibitório mais pronunciado sobre o influxo das células

inflamatórias. No entanto, outros experimentos são necessários para comprovar essas hipóteses.

O efeito inibitório sobre a atividade de metaloproteinases de matriz amplia mais ainda a possibilidade de alvos moleculares envolvidos no efeito do heparinóide sobre a resposta inflamatória. Os neutrófilos apresentam diversas proteinases em seus grânulos, entre as quais se destaca a MMP-9. Sua capacidade de degradar componentes da matriz extracelular sugere sua participação na migração dessas células aos sítios de injúria. Embora existam evidências de que a MMP-9 é secretada por neutrófilos durante a migração celular (DELCLAUX et al., 1996), Betsuyaku et al. (1999) demonstraram que a migração dessas células a alguns sítios, inclusive à cavidade peritoneal, parece não ser dependente da atividade dessa enzima, uma vez que camundongos com peritonite induzida por tioglicolato de sódio, deficientes em MMP-9, apresentam infiltração de neutrófilos semelhante a camundongos normais. MMP-2 também parece não estar relacionada com a infiltração dos neutrófilos. Por isso não podemos relacionar a redução da infiltração celular nos ratos pré-tratados com heparina ou heparinóide com a redução da atividade dessas MMPs.

Apesar disso, a secreção dessas enzimas durante a resposta inflamatória sugere a sua ação sobre outros substratos, além das proteínas da matriz. MMP-2 e MMP-9, por exemplo, são importantes efetores em outros pontos da resposta inflamatória, ativando proteínas como IL-1 $\beta$  e TNF (SCHONBECK; MACH; LIBBY, 1998; MOHAN et al., 2002). Logo, a capacidade do heparinóide de reduzir a atividade dessas gelatinases, incluindo a MMP-9 secretada por leucócitos humanos ativados, é extremamente interessante, uma vez que o acúmulo dessas células em tecidos contribui para a imunopatogênese de muitas doenças inflamatórias crônicas.

O mecanismo pelo qual a heparina reduz a atividade das MMPs não é completamente esclarecido. Sabe-se que ela é capaz de inibir a expressão gênica de algumas dessas enzimas, incluindo a MMP-9, e que esse mecanismo parece envolver a via da proteína quinase C e o fator de transcrição AP-1 (Activator Protein-1), um importante fator de transcrição de MMPs (KENAGY et al., 1994). Em um estudo envolvendo fibroblastos gengivais humanos também foi demonstrado que a heparina é capaz de reduzir a expressão gênica de algumas MMPs nessas células (GOGLY et al., 1998). Se a heparina age fora ou dentro da célula ainda é uma

incógnita, embora já tenha sido demonstrado que algumas células são capazes de se ligar e internalizar a heparina (CASTELLOT et al., 1985).

Muitas desordens inflamatórias estão relacionadas com o excesso de atividade gelatinolítica e muitos inibidores de metaloproteinases de matriz são usados como drogas antiinflamatórias (LEE et al., 2004). Por essa razão, a capacidade de interferir na atividade de MMPs representa um importante mecanismo de intervenção na resposta imune mediada pelo heparinóide de *L. vannamei*.

Embora heparina e outros polissacarídeos sulfatados já tenham sido identificados como inibidores do processo de inflamação, nenhum estudo envolvendo a participação de heparinóides sobre a atividade de metaloproteinases de matriz em modelos de inflamação foi realizado. Por isso, esse trabalho pode ampliar os conhecimentos a respeito dos possíveis alvos da heparina envolvidos em sua ação antiinflamatória. Por possuir um efeito hemorrágico reduzido, o heparinóide pode ainda servir como um modelo para estudar os requerimentos estruturais necessários para interferir na resposta inflamatória.

## **6. CONCLUSÕES**

## Conclusões

---

Com base na análise dos dados obtidos, podemos concluir que:

- O heparinóide isolado do cefalotórax do camarão cinza compartilha algumas características estruturais observadas nos heparinóides de outros invertebrados marinhos, como a maior proporção de resíduos de ácido glucurônico e de dissacarídeos dissulfatados, indicando que essas características devem ser importantes para o papel biológico dos heparinóides nesses organismos.
- Sua reduzida atividade anticoagulante, bem como ausência de efeito sobre a síntese de HS antitrombótico pelas células endoteliais nas concentrações testadas, podem ser resultado de peculiaridades estruturais desse composto, que possivelmente interferem em sua interação com alvos moleculares específicos.
- A capacidade de inibir a migração dos leucócitos à cavidade peritoneal, bem como a inibição da atividade de MMPs envolvidas tanto na resposta inflamatória como aquelas secretadas por leucócitos humanos, demonstram o potencial terapêutico do heparinóide de camarão.
- Por ser um composto com efeito hemorrágico reduzido, o heparinóide de camarão pode servir como um modelo estrutural interessante para o estudo dos requerimentos estruturais necessários para desencadear certas atividades relacionadas com a resposta inflamatória, tais como inibição do rolamento de leucócitos e da atividade de MMPs, podendo contribuir para o desenvolvimento de agentes antiinflamatórios mais específicos.

## **7. REFERÊNCIAS**

## Referências

---

AHMED, T.; CAMPO, C.; ABRAHAM, M.K.; MOLINARI, J.F.; ABRAHAM, W.M.; ASHKIN, D.; SYRISTE, T.; ANDERSSON, L.O.; SVAHN, C.M. Inhibition of antigen-induced acute bronchoconstriction, airway hyperresponsiveness, and mast cell degranulation by a nonanticoagulant heparin — comparison with a low molecular weight heparin. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**155: 1848–1855, 1997.

AHMED, T.; SYRISTE, T.; MENDELSSOHN, R.; SORACE, D.; MANSOUR, E.; LANSING, M.; ABRAHAM, W.M.; ROBINSON, M.J. Heparin prevents antigen-induced airway hyperresponsiveness: interference with IP3-mediated mast cell degranulation? **J. Appl. Physiol.** 76: 893–901, 1994.

ANDRADE, G.P.V. Heparinóides do crustáceo *Goniopsis cruentata*: estrutura, atividades farmacológicas e interação com células endoteliais. Natal-RN, 2006 [Tese – Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Dpto. de Bioquímica.

BARROSO, E.M.; COSTA, L.S.; MEDEIROS, V.P.; CORDEIRO, S.L.; COSTA, M.S.; FRANCO, C.R.; NADER, H.B.; LEITE, E.L.; ROCHA, H.A. A Non-Anticoagulant Heterofucan has Antithrombotic Activity in vivo. **Planta Med.** 2008.

BENAUD, C.; DICKISON, R.B.; THOMPSON, E.W. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 50: 97-116, 1998.

BETSUYAKU, T.; SHIPLEY, J.M.; LIU, Z.; SENIOR, R.M. Neutrophil Emigration in the Lungs, Peritoneum, and Skin Does Not Require Gelatinase B. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 20: 1303–1309, 1999.

BIANCHINI, P.; OSIMA, B.; PARMA, B.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Pharmacological activities of heparins obtained from different tissues: enrichment of heparin fractions with high lipoprotein lipase, antihemolytic and anticoagulant activities by molecular sieving and antithrombin II affinity chromatography. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 220:406-10, 1982.

BOUÇAS, R.L.; SAMPAIO, L.O.; ANDRADE, G.P.V.; LOPES, C.C.; NASCIMENTO, F.D.; TERSARIOL, I.L.S.; ROCHA, H.A.O.; NADER, H. B. Heparin and heparin derivatives and their effect on hemostasis. **Insights into Carbohydrate Structure and Biological Function**, 2006: 145 159.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1976.

BRITO, A.S. Aproveitamento do cefalotórax do camarão *Litopenaeus vannamei* para obtenção de heparina. Monografia (Bacharelado em Bioquímica do Curso de Ciências Biológicas da UFRN). Natal, 2005.

CAPILA, I.; LINHARDT, R.J. Heparin-protein interactions. **Angew. Chem. Int. Ed.** 41: 390-412, 2002.

CASSARO, C.M.F.; DIETRICH, C.P. The distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **J. Biol. Chem.** 242: 2254-2261, 1977.

CASTELLOT, J.J.; WONG, K.; HERMAN, B.; HOOVER, R.L.; ALBERTINI, D.F.; WRIGHT, T.C.; CALEB, B.L.; KARNOVSKY, M.J. Binding and internalization of heparin by vascular smooth muscle cells. **J Cell Physiol.** 124(1):13–20, 1985.

CASU, B. Structure and Active Domains of Heparin. In: Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate. H.G. Garg, R.J. Linhardt and C.A. Hales (Editors) Elsevier Ltd., 2005.

CAVALCANTE, M.C.M.; ALLODI, S.; VALENTE, A.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K.; MOURÃO, P.A.S.; PAVÃO, M.S.G. Occurrence of heparin in the invertebrate *Styela plicata* (Tunicata) is restricted to cell layers facing the outside environment. **J. Biol. Chem.** 46: 36189-36196, 2000.

CHAVANTE, S.F.; SANTOS, E.A.; OLIVEIRA, F.W.; GUERRINI, M.; TORRI, G.; CASU, B.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. 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(1):49-57, 2000.

CHOAY, J.; PETITOU, M. The Chemistry of heparin: a way to understand its mode of action. **Med. J. Aust.** 144: 7-10, 1986.

CORRY, D. B. Decreased allergic lung inflammatory cell egression and increased susceptibility to asphyxiation in MMP2-deficiency. **Nature Immunol.** 3, 347–353, 2002.

CRIPPS, J.G.; CRESPO, F.A.; ROMAVOSKIS, P.; SPATOLA, A.F.; BOTRÁN, R.F. Modulation of acute inflammation by targeting glycosaminoglycan-Cytokine interactions. *International Immunopharmacology*. 5, 1622-1632, 2005.

CRUZ, W.O.; DIETRICH, C.P. Antihemostatic effect of heparin counteracted by adenosine triphosphate. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.** 126: 420, 1967.

DELCAUX, C.; DELACOURT, C.; d'ORTHO, M.P.; BOYER, V.; LAFUNA, C.; HARF, A. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 14:288, 1996.

DIAMOND, M. S.; ALON, R.; PARKOS, C. A.; QUINN, M. T.; SPRINGER, T. A. Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin MAC-1 (CD11b/CD18). **J. Cell Biol.** 130: 1473–1482 ,1995.

DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; PAIVA, J.F.; TERSARIOL, I.L.S.; SANTOS, E.A.; HOLME, K.R.; PERLIN, A.S. Heparin in mollusks: chemical, enzymatic degradation and <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H spectroscopical evidence for the maintenance of the structure through evolution. **Int. J. Biol. Macromol.** 11: 361-366, 1989.

DIETRICH, C.P. Novel heparin degradation products. Isolation and characterization of novel disaccharides and oligosaccharides produced from heparin by bacterial degradation. *Biochim. J.* 108: 647-54, 1968.

DIETRICH, C.P.; PAIVA, J.F.; CASTRO, R.A.B.; CHAVANTE, S.F.; JESKE, W.; FAREED, J.; GORIN, P.A. J.; MENDES, A.; NADER, H.B. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1428: 273-283, 1999.

DIETRICH, C.P.; PAIVA, J.F.; MORAES, C.T.; TAKAHASHI, H.K.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B. Isolation and Characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliensis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 843: 1-7, 1985.

DISCHE, Z.A. A new specific colorreaction of hexuronic acid. *J. Biol. Chem.* 167: 189-193, 1947.

ENERBÄCK, L.; KOLSET, S.O.; KUSCHE, M.; HJERPE, A.; LINDAHL, U. Glycosaminoglycans in rat mucosal mast-cells. *Biochem J* 227: 661-8.

ENGELBERG, H. Heparin, heparin fractions, and the atherosclerotic process. *Semin. Thromb. Hemost.* 11: 48-55, 1985.

ENGLISH, W.R.; PUENTE, X.S.; FREIJE, J.M.; KNAUPER, V.; AMOUR, A.; MERRYWEATHER, A.; LOPEZ-OTIN, C.; MURPHY, G. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. *J. Biol. Chem.* 275, 14046-14055, 2000.

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 algae *botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *J. Biol. Chem.* 275: 29299-29307, 2000.

FEGHALI, C.A.; WRIGHT, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci.* 2: 12-26, 1997.

FRANSON, L.A.; COSTER, L.; MAL STROM, A.; SJOBERG, I. The copolymeric structure of pig skin dermatam sulfate. Characterization of D-glucuronic acid-containing oligosaccharides isolated after controlled degradation of oxydermatam sulfate. *Biochemi. J.* 143:369-378, 1974.

FRANSON, L.A.; HAVSMARK, B. Structure of dermatam sulfate. VII. Copolymeric structure of dermatam sulfate. *J. Biol. Chem.* 245: 4770-4783, 1970.

FRENETTE, P. S.; MAYADAS, T. N.; RAYBURN, H.; HYNES, R. O.; WAGNER, D. D. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 84, 563-574, 1996.

GAO, Y.; LI, N.; FEI, R.; CHEN, Z.; ZHENG, S.; ZENG, X. P-Selectin-mediated Acute Inflammation Can Be Blocked by Chemically Modified Heparin, RO-Heparin. **Mol. Cells**, 19: 350-355, 2005.

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry** 36: 809-812, 2001.

GOGLEY, B.; HORNEBECK, W.; GROULT, N.; GODEAU, G.; PELLAT, B. Influence of Heparin(s) on the Interleukin-1- $\beta$  Induced Expression of Collagenase, Stromelysin-1, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Human Gingival Fibroblasts. **Biochemical Pharmacology** 56: 1447-1454, 1998.

GÖTTE, M. Syndecans in inflammation. **The FASEB Journal** 17: 575-591, 2003.

GUERRINI, M.; BISIO, A.; TORRI, G. Combined quantitative (1)H and (13)C nuclear magnetic resonance spectroscopy for characterization of heparin preparations. **Semin. Thromb. Hemost.** 27(5):473-82, 2001.

HARTT, J. K.; BARISH, G.; MURPHY, P.M.; GAO, J.L. N-formylpeptides induce two distinct concentration optima for mouse neutrophil chemotaxis by differential interaction with two N-formylpeptide receptor (FPR) subtypes. Molecular characterization of FPR2, a second mouse neutrophil. **FPR. J. Exp. Med.** 190:741-747, 1999.

HELTING, T.; LINDAHL, U. Occurrence and biosynthesis of  $\beta$ -glucuronic linkages in heparin. **J. Biol. Chem.** 256: 5442, 1971.

HERSHKOVIZ, R.; BRUCK, R.; AEED, H.; SHIRIN, H.; HALPREN, Z. Treatment of concanavalin A-induced hepatitis in mice with LMWH. **J. Hepatology** 31: 834-840, 1999.

JACKSON, R.L.; BUSCH, S.J.; CARDIN, A.D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiol. Rev.** 2: 481-539, 1991.

KENAGY, R.D.; NIKKARI, S.T.; WELGUS, H.G.; CLOWES, A.W. Heparin inhibits the induction of three matrix metalloproteinases (stromelysin, 92-kD gelatinase, and collagenase) in primate arterial smooth muscle cells. **J Clin Invest.** 93(5):1987-93, 1994.

KIM, Y.S.; JO, Y.Y.; CHANG, M.; TOIDA, T.; PARK, Y.; LINHARDT, B. A new glycosaminoglycan from the giant African snail *Achatina fulica*. **J. Biol. Chem.** 271: 11750-55, 1996.

KJELLÉN, L; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annu. Rev. Biochem.** 60: 443-75, 1991.

KOENIG, A.; NORGDARD-SUMNICHT, K.; LINHARDT, R.; VARKI, A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. **J. Clin. Invest.** 101, 877-889 1998.

KUMAR, V.; ABBAS, AK.; FAUSTO, N.; ROBBINS, SL.; COTRAM, RS. *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I.L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **J. Immunol. Methods** 197:139–150, 1996.

LEE, H. M.; CIANCIO, S.G.; TÜTER, G.; RYAN, M.E.; KOMAROFF, E.; GOLUB, L.M. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. **J. Periodontol.** 75, 453–463, 2004.

LEPPANEN, A.; WHITE, S.P.; HELIN, J.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Binding of glycosulfopeptides to P-selectin requires stereospecific contributions of individual tyrosine sulfate and sugar residues. **J. Biol. Chem.** 275:39569–39578, 2000.

LEPPERT, D.; WAUBANT, E.; GALARDY, R.; BUNNETT, N.W.; HAUSER, S.L. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration *in vitro*. **J. Immunol.** 154: 4379, 1995.

LEVER, R.; HOULT, J. R. S.; PAGE, C. P. The effects of heparin and related molecules upon the adhesion of human polymorphonuclear leukocytes to vascular endothelium *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.** 129: 533–540, 2000.

LEVER, R.; PAGE, C.P. Novel drug development opportunities for heparin. **Nature** 1: 140-148, 2002.

LIDER, O.; BAHAROAV, E.; MEKORI, Y.A.; MILLER, T.; NAPARSTEK, Y.; VLODAVSKY, I.; COHEN, I.R. Suppression of experimental autoimmune diseases and prolongation of allograft survival by treatment of animals with low doses of LMWH. **J. Clin. Invest.** 83: 752-756, 1989.

LOWE, J. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. **Current Opinion in Cell Biology**15: 31-538, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. **J. Biol. Chem.** 193: 265. 1951.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. An anticoagulant proteoglycan from the marine green alga, *Codium pugniformis*. **Journal of Applied Phycology** 12:1573-5176, 2000.

MATUTINO, G.; OLIVER, N.; CHANEZ, P.; BOUSQUET, J.; CAPONY, F. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**, 17: 583, 1997.

MAYER, A.M.; RODRÍGUEZ, A.D.; BERLINCK, R.G.; HAMANN, M.T. Marine pharmacology in 2003-4: marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and

nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 145(4):553-81, 2007.

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. **Biochim. Biophys. Acta** 1475: 287-294, 2000.

MILLIGAN, K.E.; MARQUEZ, B.L.; WILLIAMSON, R.T.; GERWICK, W.H. Lyngbyabellin B, a toxic and antifungal secondary metabolite from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **J Nat Prod.** 63(10):1440-3, 2000.

MOHAN, M.J.; SEATON, T.; MITCHELL, J.; HOWE, A.; BLACKBURN, K.; BURKHART, W.; MOYER, M.; PATEL, I.; WAITT, G.M.; BECHERER, J.D.; MOSS, M.L.; MILLA, M.E. The tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. **Biochemistry** 41, 9462–9469, 2002.

MOURA, R.M.; QUEIROZ, A.F.; FOOK, J.M.; DIAS, A.S.; MONTEIRO, N.K.; RIBEIRO, J.K.; MOURA, G.E.; MACEDO, L.L.; SANTOS, E.A.; SALES, M.P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr. Physiol.** 145(4):517-23, 2006.

MULLIGAN, M. S.; PAULSON, J. C.; DE FREES, S.; ZHENG, Z. L.; LOWE, J. B. Protective effects of oligosaccharides in P-selectin-dependent lung injury. **Nature** 364, 149–151, 1993.

MUNRO, M.H.; BLUNT, J.W.; DUMDEI, E.J.; HICKFORD, S.J.; LILL, R.E.; LI, S.; BATTERSHILL, C.N.; DUCKWORTH, A. R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. **J Biotechnol.** 70(1-3):15-25, 1999.

MURPHY, G. and DOCHERTY, A.J.P. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 7:120, 1992.

NADER, H.B; PORCIONATTO, M.A; TERSARIOL, I.L.S; PINHAL, M.A.S; OLIVEIRA, F.W.; MORAES, C.T; DIETRICH, C.P. Purification and substrate specificity of heparitinase I and heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*, **J. Biol. Chem.** 265: 16807-16813, 1990.

NADER, H. B.; TOMA, L.; PINHAL, M. A.; BUONASSISI, V.; COLBURN, P.; DIETRICH, C. P. Effect of heparin and dextran sulfate on the synthesis and structure of heparan sulfate from cultured endothelial cells. **Semin. Thromb. Hemost.** 17: 147-56, 1991.

NADER, H.B.; CHAVANTE, S.F.; DOS SANTOS, E.A.; OLIVEIRA, T.W.; DE PAIVA, J.F.; JERÔNIMO, S.M.B.; MEDEIROS, G.F.; DE ABREU, L.R.D.; LEITE, E.L.; DE SOUSA FILHO, J.F.; CASTRO, R.A.B.; TOMA, L.; TERSARIOL, I.L.S.; PORCIONATTO, M.A.; DIETRICH, C.P. heparan sulfates and heparins: similar

compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? **Braz. J. Méd. Biol. Res.** 32:529-38, 1999.

NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Natural occurrence and possible biological role of heparin. In: Heparin: chemical and biological properties, Eds. DA. Lane and U. Lindahl, Edward Arnold Ltd., Londo, pp. 81-96, 1989.

NADER, H.B.; FERREIRA, T.M.P.; PAIVA, J.F.; MEDEIROS, M.G.L.; JERÔNIMO, S.M.B.; PAIVA, V.M.P. DIETRICH, C.P. Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three species of moluscs. **J. Biol. Chem.** 259: 1431-5, 1984.

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. **Braz J Med Biol Res.** 34(6) 699-709, 2001.

NADER, H.B.; STRAUS, A.H; TAKAHASHI, H.K.;DIETRICH, C.P. Selective appearance of heparin in mammalian tissues during development. **Biochem. Biophys. Acta** 714:292-7, 1982.

NADER, H.B.; TAKAHASHI, H.K.; STRAUS, A.H.; DIETRICH, C.P. Selective distribution of heparin in mammals. Conspicuous presence of heparin in lymphoid tissues. **Biochem. Biophys. Acta** 627:40-48, 1980.

NADER, H.B.; TERSARIOL, I.L.S.; DIETRICH, C.P. Antihemostatic activity of heparin disaccharides and oligosaccharides obtained by chemical and enzymatic fragmentation: reversal of the hemorrhagic activity by ATP and myosin. **Thromb. Res.** 54: 207-214, 1989.

NADER, H.B.; LOPES, C.C.; ROCHA, H.A.O.; SANTOS, E.A.; DIETRICH, C.P. Heparins and Heparinoids: Occurrence, Structure and Mechanism of Antithrombotic and Hemorrhagic Activities. **Current Pharmaceutical Design** 10: 951-966, 2004.

NAGASE, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biol. Chem.** 378: 151, 1997.

NELSON, R. M.; CECCONI, O.; ROBERTS, W. G.; ARUFFO, A.; LINHARDT, R. J. Heparin oligosaccharides bind L- and Pselectin and inhibit acute inflammation. **Blood** 82: 3253–3258, 1993.

NOTI, C.; SEEBERGER, P.H. Chemical Approaches to define the structure-activity relationship of heparin-like glycosaminoglycans. **Chemistry & Biology.** 12: 731-756, 2005.

OKADA, S.; KITA, H.; GEORGE, T.J.; GLEICH, T.J.; LEIFERMAN, K.M. Migration of eosinophil through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 17:519, 1997.

PARKS, W.C.; WILSON, C.L.; BOADO-LÓPEZ, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Immunology* 4:617, 2004.

PEJLER, G.; DANIELSSON, A.; BJÖRK, I.; LINDAHL, U.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Structure and antithrombin-binding properties of heparin isolated from the clams *Anomalocardia brasiliensis* and *Tivela mactroides*. *J. Biol. Chem.* 268: 11413-11421, 1987.

PERLIN, A.S.; MACKIE, D.M.; DIETRICH, C.P. Evidence for alfa (1,4)-linked 4-O-(alfa-L-idopyranosyl-uronic acid 2-sulfate)-(2-deoxy-2-sulfamido-D-glucopyranosyl 6-sulfate) sequence in heparin. Long range H-H coupling in 4-deoxy-hex-4-enopyranosydes. *Carbohydr. Res.* 18: 185-194, 1971.

PINHAL, M.A.S.; SANTOS, I.A.; SILVA, I.F.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. 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, 1995.

PINHAL, M.A.S.; SILVA, I.F.; LEE, T.C.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. 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, 1994.

PREUSS, J. M. H.; PAGE, C. P. Effect of heparin on antigeninduced airway responses and pulmonary leukocyte accumulation in neonatally immunized rabbits. *Br. J. Pharmacol.* 129: 1585–1596, 2000.

QUAGLIA, L. J. C. Estudo da qualidade da água do canal de Taperoá (Valença-BA): implicações na carcinicultura marinha. Tese de Mestrado (Curso de Mestrado em Produção Aquática do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia). p.118, 1993.

RAMAN, R.; SASISEKHARAN, V.; SASISEKHARAN, R. Structural Insights into Biological Roles of Protein-Glycosaminoglycan Interactions. *Chemistry & Biology* 12: 267-277, 2005.

ROCHA, H.A.; MORAES, F.A.; TRINDADE, E.S.; FRANCO, C.R.; TORQUATO, R.J.; VEIGA, S.S.; VALENTE, A.P.; MOURÃO, P.A.; LEITE, E.L.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? *J Biol Chem.* 16: 280(50):41278-88, 2005.

ROSEN, S.D.; BERTOZZI, C.R. The selectins and their ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:663–673, 1994.

ROSENBERG, R.D.; BAUER, K.A. The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In: Colman, R.w.; Hirsh, J.; Marder, V.J., et al, eds. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: J.B. Lippincott 837-860, 1992.

ROSENBERG, R.D.; DAMUS, P.S. The Purification and Mechanism of Action of Human Antithrombin-Heparin Cofactor. **J. Biol. Chem.** 248: 6490-6505, 1973.

SANTOS, E.A.; ROCHA, L.R.M.; PEREIRA, N.M.L.; ANDRADE, G.P.V.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Mast cells are present in epithelial layers of different tissues of the mollusc *Anomalocardia brasiliensis*. In situ characterization of heparin and a correlation of heparin and histamine concentration. **The Histochemical Journal.** 34: 553-558, 2002.

SANTOS, V.O. Polissacarídeos sulfatados de interesse farmacológico no camarão marinho *Litopenaeus schmitti*. Natal-RN, 2006 [Dissertação – mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Dpto. de Bioquímica].

SCHONBECK, U.; MACH, F.; LIBBY, P. Generation of biologically active IL-1 $\beta$  by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 $\beta$  processing. **J. Immunol.** 161, 3340–3346, 1998.

SILVA, L.P. Heparina e dermatam sulfato da lagosta *Panulirus laevicauda*. Natal-RN, 2003 [Dissertação – mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Depto. De Bioquímica].

SILVA, M.E.; DIETRICH, C.P. The structure of heparin. Characterization of the products formed from heparin by the action of a heparinase from *Flavobacterium heparinum*. **J. Biol. Chem.** 250: 6841-6846, 1975.

SILVESTRO, L.; VIANO, I.; MACARIO, M.; COLANGELO, D.; MONTRUCCHIO, G.; PANICO, S.; FANTOZZI, R. Effects of heparin and its desulfated derivatives on leukocyte–endothelial adhesion. **Semin. Thromb. Hemost.** 20: 254–258, 1994.

SKINNER, M. P.; LUCAS, C. M.; BURNS, G. F.; CHESTERMAN, C. N.; BERNDT, M. C. GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. **J. Biol. Chem.** 266, 5371–5374, 1991.

SMAILBEGOVIC, A.; LEVER, R.; PAGE, C. P. The effects of heparin on the adhesion of human peripheral blood mononuclear cells to human stimulated umbilical vein endothelial cells. **Br. J. Pharmacol.** 134: 827–836, 2001.

SPECTOR, T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantification. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 $\mu$ g of protein. **Anal. Biochem.** 86: 142-6, 1978.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell** 76, 301–314, 1994.

STAHLE-BACKDAHL, M.; INOUE, M.; GUIDICE, G.J.; PARKS, W.C. 92-kDa type IV collagenase mRNA by eosinophils associated with basal cell carcinoma. **J. Invest. Dermatol.** 99: 497, 1994.

SUDO, M.; SATO, K.; CHAIDEDGUMJORN, A.; TOYODA, H.; TOIDA, T.; IMANARI, T. (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis for determination of

glucuronic and iduronic acids in dermatan sulfate, heparin, and heparan sulfate. **Anal Biochem.** 1: 297(1):42-51, 2001.

TAKAHASHI, H.K.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. A method for rapid quantification and preparation of antithrombin III-high-affinity heparin fractions. **Anal. Biochem.** 116: 456-61, 1981.

TAKEMOTO, D.; TAKEKAWA, Y.; SOEST, R.W.; FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S. Poecillastrin D: a new cytotoxin of the chondropsin class from marine sponge *Jaspis serpentina*. **Biosci Biotechnol Biochem.** 71(11):2697-700, 2007.

TANAKA, Y.; ADAMS, D.H.; HUBSCHER, S.; HIRANO, H.; SIEBENLIST, U.; SHAW, S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1b. **Nature** 361: 79–82, 1993.

TEIXEIRA, M.M.; ROSSI, A.G.; HELLEWELL, P.G. Adhesion mechanisms involved in C5a-induced eosinophil homotypic aggregation. **J. Leukocyte Biol.** 59: 89–96, 1996.

THOURANI, V.H.; BRAR, S.S.; KENNEDY, T.P.; THORNTON, L.R.; WATTS, J.A.; RONSON, R.S.; ZHAO, Z.Q.; STURROCK, A.L.; HOIDAL, J.R.; VINTEN-JOHANSEN, J. Nonanticoagulant heparin inhibits NF-kappaB activation and attenuates myocardial reperfusion injury. **Am J Physiol.** 278: H2084–93, 2000.

TOLEDO, O.M.; DIETRICH, C.P. Tissue specific distribution of sulfated mucopolysaccharides in mammals. **Biochem. Biophys. Acta** 498: 114-22, 1977.

TYRREL, D. J.; HORNE, A.P.; HOLME, K.R.; PREUSS, J.M.; PAGE, C.P. Heparin in inflammation: potential therapeutic applications beyond anticoagulation. **Adv. Pharmacol.** 46: 151–208, 1999.

VARKI, A. Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:7390–7397, 1994.

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

VOLPI, N.; MACCARI, F. Electrophoretic approaches to the analysis of complex polysaccharides. **Journal of Chromatography B** 834: 1-13, 2006.

WALLUM, E.; STRENBORG, K.; JENSSEN, D. **Understanding cell toxicology: Principles and practice**, New York: Ellis Howood, 1990.

WANG, L.; BROWN, J.R.; VARKI, A.; ESKO, D. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosaminine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. **J. Clin. Invest.** 110:127–136, 2002.

WEBB, L.M.C.; EHRENGRUBER, M.U.; CLARK-LEWIS, I.; BAGGIOLINI, M.; ROT, A. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin-8. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 7158–60, 1993.

WEILER, J.M.; EDENS, R.E.; LINHARDT, R.J.; KAPELANSKI, D.P. Heparin and modified heparin inhibit complement activation *in vivo*. **J. Immunol.** 148: 3210–5, 1992.

XIE, X.; THORLACIUS, H.; RAUD, J.; HEDQVIST, P.; LINDBOM, L. Inhibitory effect of locally administered heparin on leukocyte rolling and chemoattractant-induced firm adhesion in rat mesenteric venules *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.** 122: 906–910, 1997.

YAO, P.M.B.; DELACOURT, M.C.; BUHLER, J.M.; HARF, A.; LAFUNA, C. Divergent regulation of 92-kDA gelatinase and TIMP-1 by HBECs in response to IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Am. J. Physiol.** 237:L866, 1997.

ZHANG, X.; EDWARDS, J.P.; MOSSER, D.M. Dynamic and Transient Remodeling of the Macrophage IL-10 Promoter during Transcription. **The Journal of Immunology** 177: 1282–1288, 2006.

## **8. APÊNDICES**

## Apêndices

### Comunicações em Congressos

CHAVANTE, Suely Ferreira.; **BRITO, Adriana da Silva.**; SOUZA, Lucilla Rodrigues.; ARIMATÉIA, Dayse Santos.; LIMA, Marcelo Andrade.; OLIVEIRA, Fernanda Wanderlei.; LEITE, Edda Lisboa.; BISIO, Antonela.; NADER, Helen Boncciani. Heparin-like compounds from the *L. vannamei* and its antiinflammatory effect in an experimental model of peritonitis. 5<sup>th</sup> International Conference on Proteoglycans, 2007, Rio de Janeiro – RJ.

**BRITO, Adriana da Silva**; Arimatéia, DS; SOUZA, Lucilla Rodrigues; CRUZ, Ana Katarina; OLIVEIRA, Fernanda Wanderlei; GUERRINI, Marco; TORRI, Giangiacomo; BISIO, Antonella; SANTOS, Elizeu Antunes dos; CHAVANTE, Suely Ferreira. High Content of 3-O-sulfated Glucosamine Residues in a Heparin from Shrimp *Litopenaeus vannamei*. In: VIII Reunião Regional da SBBq e 3<sup>rd</sup> International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2006, Natal – RN.

LIMA, Marcelo Andrade de.; SANTOS, Vanessa Olinto dos.; **BRITO, Adriana da Silva.**; ARIMATEIA, Dayse Santos.; SOUZA, Lucilla.; ANDRADE, Julianna Paiva Viana de.; EVANGELISTA, Ismail.; LEITE, Edda Lisboa.; TORRI, Giangiacomo.; CHAVANTE, Suely Ferreira. A novel chondroitin sulfate isoform from the shrimp *Litopenaeus schimitti*. In: VIII Reunião Regional da SBBq e 3<sup>o</sup> International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2006, Natal - RN.

ANDRADE, Julianna Paiva Viana de.; SANTOS, Elizeu Antunes dos.; Medeiros, Daniele Souto de.; MORAES, Fábio Augusto.; **BRITO, Adriana da Silva.**; CHAVANTE, Suely Ferreira.; OLIVEIRA, Fernanda Wanderley de.; ROCHA, Hugo Alexandre Oliveira.; DIETRICH, Carl Peter Von.; NADER, Helena Boncciani. Crab heparinoids contain high degree of 2-o-sulfated glucuronic acid and antithrombotic activity. In: VIII Reunião Regional da SBBq e 3<sup>o</sup> International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2006, Natal - RN.

CRUZ, Ana Katarina; ALBUQUERQUE, Elizabeth Maria Maia de.; EVANGELISTA, Ismail; **BRITO, Adriana da Silva**; ANDRADE, Julianna Paiva Viana de.; TORRI, Giangiacomo.; SALES, Maurício Pereira.; OLIVEIRA, Fernanda Wanderlei. In: VIII Reunião Regional da SBBq e 3<sup>o</sup> International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, 2006, Natal - RN.

ANDRADE, Giuliana Paiva Vianna; SANTOS, Elizeu Antunes; GUIMARÃES, Luciana; BOUÇAS, R.I.; TRINDADE, E.S.; **BRITO, Adriana da Silva**; DIETRICH, Carl Peter Von; NADER, Helena Boncciani. Crab Heparinoids Stimulate the Synthesis of the Antithrombotic Heparan Sulfate Through the Interaction with the Extracellular Matrix Endothelial Cells. In: XXXVI Reunião Anual da SBBq, 2007, Salvador – Ba.

CHAVANTE, Suely Ferreira; ANDRADE, Giuliana Paiva Vianna; **BRITO, Adriana da Silva**; LIMA; Marcelo Andrade; SOUZA, Lucilla Rodrigues; ARIMATEIA, Dayse Santos; OLIVEIRA, Fernanda Wanderlei; SANTOS, Elizeu Antunes; CRUZ, Ana

Katarina; TORRI, Giangiacomo; NADER, Helena Bonciani. Structural Analysis of Unusual Heparinoids from Crustaceans. In: XXXVI Reunião Anual da SBBq, 2007, Salvador – Ba.

SANTOS, Vanessa Olinto dos ; **BRITO, Adriana da Silva** ; ANDRADE, Giuliana Paiva Vianna ; SOUZA, Lucilla Rodrigues de; LIMA, Marcelo; EVANGELISTA, Ismail; ALBUQUERQUE, Elizabeth Maia Maria de; CRUZ, Ana Katarina; LEITE, Edda Lisboa; OLIVEIRA, Fernanda Wanderlei; TORRI, Giangiacomo; CHAVANTE, Suely Ferreira . A novel Dermatan Sulfate-like from Tissues of the Shrimp *Litopenaeus schmitti*. In: XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006, Águas de Lindóia - SP.

**BRITO, Adriana da Silva** ; SANTOS, Elizeu Antunes dos; ANDRADE, Giuliana Paiva Vianna de; SANTOS, Vanessa Olinto dos; SOUZA, Lucilla Rodrigues; LIMA, Marcelo; OLIVEIRA, Fernanda Wanderlei; GUERRINI, Marco; TORRI, Giangiacomo; BISIO, Antonela; CHAVANTE, Suely Ferreira . An Unusual Heparin from Shrimp *Litopenaeus vannamei* Enriched with 3-O Sulfated Glucosamine Residues. In: XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006, Águas de Lindóia-SP.

ALBUQUERQUE, Elizabeth Maria Maia de; CRUZ, Ana Katarina; EVANGELISTA, Ismail; SANTOS, Vanessa Olinto dos; **BRITO, Adriana da Silva**; SOUZA, Lucilla Rodrigues de; SANTOS, Elizeu Antunes dos; CHAVANTE, Suely Ferreira; VIVACQUA, C A; MENDES, A; NADER, Helena B; ALBUQUERQUE, Pedro; OLIVEIRA, Fernanda Wanderlei. Glycosaminoglycans Analysis in Pleural Effusions - Diagnostic Separation of Pleural Tuberculosis and Lung Cancer. In: XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006, Águas de Lindóia – SP.

CRUZ, Ana Katarina; ALBUQUERQUE, Elizabeth Maria Maia de; EVANGELISTA, Ismail; SANTOS, Vanessa Olinto dos; **BRITO, Adriana da Silva**; VASCONCELOS, C L; TORRI, Giangiacomo; CHAVANTE, Suely Ferreira; SALES, Mauricio Pereira; OLIVEIRA, Fernanda Wanderlei. Structure Studies of Acidic Galactan from Pomacea sp. In: XXXV Reunião Anual da SBBq, 2006, Águas de Lindóia - SP.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)