



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

*CAMPUS MACAÉ*

CURSO DE FARMÁCIA

EXPRESSÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS NA ASCÍDIA MICROCOSMUS  
EXASPERATUS

AUTORA: RAYSSA RODRIGUES DIAS

MACAÉ

JULHO DE 2013

Ficha Catalográfica

Dias, Rayssa Rodrigues.

Expressão de glicosaminoglicanos na ascídia *Microcosmus exasperatus*

Monografia do Curso de Farmácia

- 1- Glicosaminoglicanos
- 2- Ascídia
- 3- Anticoagulante
- 4- Heparina
- 5- Dermatan sulfato

- I- Universidade Federal do Rio de Janeiro, campus Macaé
- II- Expressão de glicosaminoglicanos na ascídia *Microcosmus exasperatus*

Rayssa Rodrigues Dias

Título: Expressão de  
glicosaminoglicanos na  
ascídia *Microcosmus exasperatus*

Monografia Apresentada ao Curso  
de Farmácia da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro como um  
dos requisitos para obtenção do  
título de farmacêutico

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli

Macaé

Julho de 2013

## **Agradecimentos**

**Deus:** Sem Ele eu não teria chegado aonde cheguei.

**Mãe:** Agradeço à minha linda mãe pela força que me deu não só durante toda a trajetória da faculdade, mas por toda a vida, pelas palavras confortantes nos momentos difíceis, por sempre ter acreditado que eu conseguiria. Hoje posso dizer que consegui, aliás, conseguimos vencer, estou praticamente formada. Mais que uma mãe, sempre foi minha companheira, minha amiga, confidente, sempre foi meu porto seguro! Obrigada por tudo!

**Avô:** Agradeço ao meu avô, que mais que um avô sempre foi um pai para mim, me ajudando com palavras e também no financeiro, sem o senhor vô eu não teria chegado até aqui. Agradeço a Deus por ter colocado em minha vida esse avô tão maravilhoso que tenho.

**Germano:** Meu irmão que brincando comigo sempre perguntava para quê eu estudava tanto.

**Raphael:** Ao meu lindo, que sempre me deu muita força durante todo esse tempo, que teve que ficar longe de mim em alguns finais de semana para que eu estudasse para as provas, que às vezes mesmo estando junto comigo tinha que permanecer distante. Que me ajudou em muitas coisas, como na limpeza da casa, para que eu tivesse mais tempo para estudar, e lógico, ficar com ele.

**Leonardo Paes Cinelli:** Meu orientador, professor, amigo e companheiro de trabalho. É a pessoa a que venho mais agradecer. Sem sua ajuda eu estaria neste momento longe da pesquisa, escrevendo uma revisão bibliográfica ao invés de meus próprios resultados como faço no presente momento. Obrigada por todo conhecimento passado, pela paciência e amizade, por acreditar em mim, por ter me dado uma chance em seu laboratório quando eu já havia desistido de fazer iniciação científica. Hoje me enxergo seguindo na vida acadêmica e isso se deve muito à sua persistência e seriedade.

**Meninas do laboratório:** Agradeço à Bianca Costa, Regina Celestino, Thamiris Brandão e Thamyris Almeida por, de vez em quando, fazerem alguns favores para mim, como por exemplo, trocar minha água da diálise.

**Laboratório de Morfologia (NUPEM):** Agradeço à Professora Cintia Monteiro de Barros e à aluna Juliana do Nascimento por fornecer seus resultados histológicos e pela ajuda para interpretá-los. Estes muito contribuíram para que pudéssemos chegar mais próximo da descoberta do (s) composto (s) presentes na espécie de ascídia estudada.

**Laboratório de Bioquímica e Biologia Celular de Glicoconjugados:**

Agradeço ao Professor Mauro Sérgio G. Pavão por permitir minha participação no Programa de Ciência, Tecnologia e Inovação para Biodiversidade (BIOTA).

**Laboratório de Tecido Conjuntivo:** Agradeço ao Professor Paulo A. S. Mourão e toda sua equipe por me receber tão bem em seu laboratório localizado no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), para que pudesse realizar um experimento.

**Laboratório de Ciências do Mar (LABOMAR):** Agradeço ao Professor Tito Lotufo da Universidade Federal do Ceará pela realização da coleta de minha ascídia.

**FAPERJ:** Quero agradecer também à FAPERJ pela minha bolsa de iniciação científica e o apoio financeiro.

**PESAGRO-RIO (Estação Experimental Macaé):** Nossos mais sinceros agradecimentos aos responsáveis pela PESAGRO-RIO localizada na cidade de Macaé. Pelo espaço fornecido ao Professor Leonardo Paes Cinelli para que lá pudéssemos instalar nosso laboratório realizando nossas descobertas diárias.

**Banca examinadora do TCC:** Agradeço aos professores, titulares e suplentes, que se dispuseram a participar de minha banca de defesa do TCC.

## Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição de óbitos no mundo de acordo com a OMS

Figura 2: Tríade de Virchow

Figura 3: Estrutura de um proteoglicano

Figura 4: Unidades dissacarídicas que constituem os GAGs

Figura 5: Distribuição dos GAGs no reino animal

Figura 6: Sequência majoritária da Heparina

Figura 7: Estrutura de uma heparina de 12.000 kDa

Figura 8: Dermatan sulfato é semelhante à condroitim 4-sulfato e heparina

Figura 9: Unidades dissacarídicas de DS de mamíferos e ascídias

Figura 10: Esquema representativo do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares

Figura 11: Anatomia e imagem da *M. exasperatus*

Figura 12: Esquema da metodologia

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos totais

Figura 14: Rendimento das frações – Dosagem com DMB

Figura 15: Cromatografia de troca-iônica – F50

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos purificados-F50

Figura 17: Cromatografia de troca-iônica – F300

Figura 18: Microscopias dos tecidos da ascídia *M. exasperatus* corados com Alcian Blue

## **Lista de Abreviações**

Ácido desoxirribonucléico (DNA)

Ácido glucurônico (GlcA)

Ácido hialurônico (HA)

Ácido idurônico (IdoA)

Ácido urônico (UA)

Antitrombina (AT)

Azul de dimetilmetileno (DMB)

Cofator 2 da heparina (HCII do inglês *heparin co-factor II*)

Condroitim liase ABC (Chase ABC)

Condroitim liase AC (Chase AC)

Condroitim sulfato (CS)

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC do inglês *high performance liquid chromatography*)

Dermatam sulfato (DS)

Fator de von Willebrand (FvW)

Fator IV ativado (FIVa)

Fator IX ativado (FIXa)

Fator tecidual (FT)

Fator V ativado (FVa)

Fator VII ativado (FVIIa)

Fator VIII ativado (FVIIIa)

Fator X (FX)

Fração da precipitação em 100% de etanol (F100)

Fração da precipitação em 300% de etanol (F300)

Fração da precipitação em 50% de etanol (F50)

Fração da precipitação em 70% de etanol (F70)

Glicosaminoglicano (GAG)

Glucosamina N-sulfatada (GlcNS)

Heparam sulfato (HS)

Heparina (Hep)  
Inibidor da via do fator tecidual (TFPI)  
N-acetilgalactosamina (GalNAc)  
Organização Mundial da Saúde (OMS)  
Peso molecular (PM)  
Polissacarídeos sulfatados (PS)  
Proteína C (PC)  
Proteína C ativada (APC)  
Proteína S (PS)  
Proteína transmembrânica trombomodulina (TM)  
Proteoglicano (PG)  
Protrombina (Fator II)  
Queratam sulfato (QS)  
Ressonância Magnética Nuclear (RMN)  
Tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)  
Galactose (Gal)  
Fucose (Fuc)



## Sumário

Lista de Figuras e Tabelas

Lista de Abreviações

Resumo

<b>1.0. Introdução</b>	<b>12</b>
1.1. Doenças cardiovasculares-Trombose	12
1.2. Polissacarídeos sulfatados	14
1.3. Glicosaminoglicanos	14
1.4. Proteoglicanos	16
1.5. Heparina	17
1.6. Dermatan sulfato- estrutura e origem	19
1.7. Ascídias	21
1.8. Organização das ascídias	21
1.9. Anatomia e filtração da água	22
1.10. Ascídia <i>Microcosmus exasperatus</i>	23
1.11. Cascata da coagulação	24
1.12. Novo modelo da cascata de coagulação baseado em superfícies celulares	25
1.12.1. Fase de iniciação	26
1.12.2. Fase de amplificação	27
1.12.3. Fase de propagação	28
1.12.4. Fase de finalização	28
1.13. Dermatan sulfato em ascídias	30
<b>2.0. Justificativa</b>	<b>31</b>
<b>3.0. Objetivos</b>	<b>32</b>
3.1. Objetivos gerais	32
3.2. Objetivos específicos	32
<b>4.0. Materiais e Métodos</b>	<b>32</b>
<b>5.0. Resultados e Discussão</b>	<b>36</b>

<b>5.1.</b>	Eletroforese em gel de agarose.....	36
<b>5.2.</b>	Rendimento das frações.....	37
<b>5.3.</b>	Cromatografia de troca-iônica (Fração 50) .....	38
<b>5.4.</b>	Eletroforese em gel de agarose.....	39
<b>5.5.</b>	Cromatografia de troca-iônica (Fração 300) .....	40
<b>5.6.</b>	Histoquímica da ascídia.....	41
<b>6.0.</b>	Conclusão.....	43
<b>7.0.</b>	Referências Bibliográficas.....	44

## Resumo

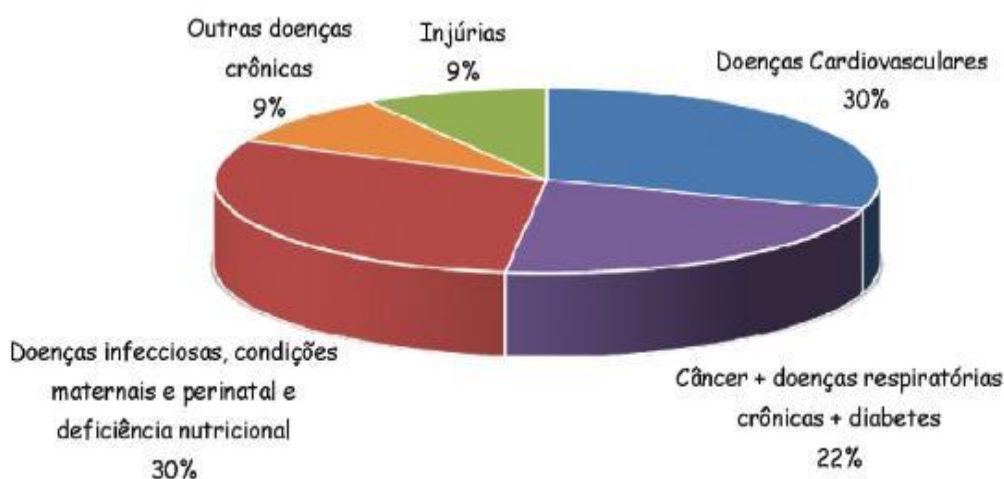
Ascídias são invertebrados marinhos cobertos por manto ligado a túnica que circunda o corpo. Esta contém  $\alpha$ -L-galactana sulfatada enquanto que no corpo de algumas espécies reporta-se a presença de glicosaminoglicanos (GAG), denominados dermatam sulfato (DS) e heparina. Os DS de ascídias contém mesmo padrão estrutural que de mamífero. Todavia, possuem alto teor de ácido idurônico 2-sulfatado e diferem no padrão de sulfatação da N-acetilgalactosamina. Enquanto em mamíferos o padrão é  $\alpha$ -UA-1 $\rightarrow$ 3-GalNAc(4SO<sub>4</sub>), nas ascídias *Styela plicata* e *Halocynthia piriiformis* é  $\alpha$ -UA(2SO<sub>4</sub>)-1 $\rightarrow$ 3-GalNAc(4SO<sub>4</sub>) e *Phallusia nigra* é  $\alpha$ -UA(2SO<sub>4</sub>)-1 $\rightarrow$ 3-GalNAc(6SO<sub>4</sub>). Estas diferenças estruturais produzem efeitos sobre as atividades anticoagulante e antitrombótica provocada por estes polímeros. Sendo assim, a utilização dessa classe de compostos, na condição de moléculas-modelo se faz importante para a melhor compreensão do mecanismo molecular em que estão envolvidos. O presente estudo visou a identificação e localização de GAGs presentes na ascídia *Microcosmus exasperatus*. Inicialmente, o corpo foi separado da túnica, e os GAGs foram extraídos por digestão proteolítica e precipitados em concentrações crescentes de etanol para posterior análise em eletroforese em gel de agarose e cromatografia. As precipitações iniciais demonstraram a presença de DNA e dois polissacarídeos sulfatados que precipitam em concentrações mais elevadas de etanol migraram como DS e heparina. A fim de localizar estes polissacarídeos sulfatados tecidos da ascídia foram corados com alcian blue e os resultados sugerem fortemente a presença destes polímeros. A elucidação desses compostos será importante para identificar requisitos estruturais essenciais para as atividades biológicas.

Palavras-chave: ascídia, dermatam sulfato, heparina, anticoagulante, glicosaminoglicanos

## 1.0 Introdução

### 1.1. Doenças Cardiovasculares – Trombose

A alimentação desequilibrada, a redução da atividade física diária, o uso do tabaco, dentre outros fatores vêm contribuindo para o aparecimento de diversas patologias nos seres humanos, principalmente as doenças cardiovasculares. Estas são caracterizadas por uma alteração que ocorre no sistema sanguíneo e inclui: trombose, doenças coronarianas, doenças cerebrovasculares, hipertensão, doença arterial periférica e doença reumática do coração (CHAVES, 2010).



**Figura 1:** A distribuição de óbitos no mundo de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). As doenças cardiovasculares representam 30% em todo o mundo. Retirado de CHAVES, 2010.

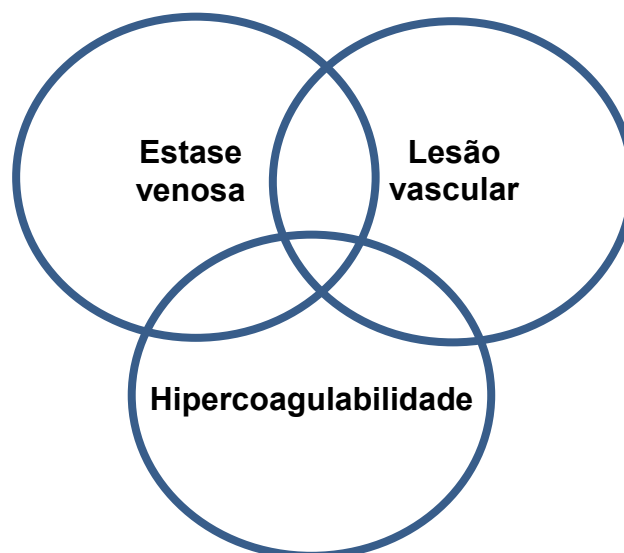
A trombose é definida como a formação patológica de um tampão hemostático no interior do vaso sanguíneo na ausência de sangramento. Esta patologia comumente gera consequências graves, tais como, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e embolia pulmonar. Os fármacos que são utilizados tanto na prevenção como tratamento da trombose venosa são os anticoagulantes orais e injetáveis. Já aqueles que se destinam ao tratamento da trombose arterial consistem nos antiplaquetários (CHAVES, 2010)

O processo hemostático quando ativado de forma inespecífica é capaz de resultar na oclusão de vasos sanguíneos levando à doença trombótica, além

de poder causar problemas hemorrágicos. As causas que predisõem a trombose venosa profunda foram descritas em 1856 por Virchow. Esse pesquisador criou a Tríade de Virchow, que relaciona três eventos fisiopatológicos que seriam estase sanguínea, injúria vascular e a hipercoagulabilidade. Os fatores de risco genéticos e também aqueles que podem ser adquiridos pelo indivíduo, atuam no mínimo em um dos três componentes dessa Tríade e o reconhecimento deste fator é de grande relevância para a escolha do diagnóstico e método de profilaxia da doença tromboembólica (CHAVES, 2010).

Muitas condições clínicas podem estar associadas com o alto risco de trombose arterial, trombose venosa e tromboembolia. A aterosclerose, o fumo, a hipertensão e a *diabetes mellitus* são alguns fatores relacionados com a trombose arterial. Já a trombose venosa está relacionada à cirurgia geral, a cirurgia ortopédica, o trauma e o câncer (CHAVES, 2010).

Tanto para o tratamento quanto para a prevenção da trombose são utilizados anticoagulantes orais e injetáveis, sendo o principal deles a heparina, que é um polissacarídeo sulfatado.



**Figura 2:** Tríade de Virchow. Adaptado de < <http://endovasc.med.br/wp/wp-content/uploads/2011/03/palestratev.pdf>>, acesso em 10/07/2013.

## **1.2. Polissacarídeos sulfatados**

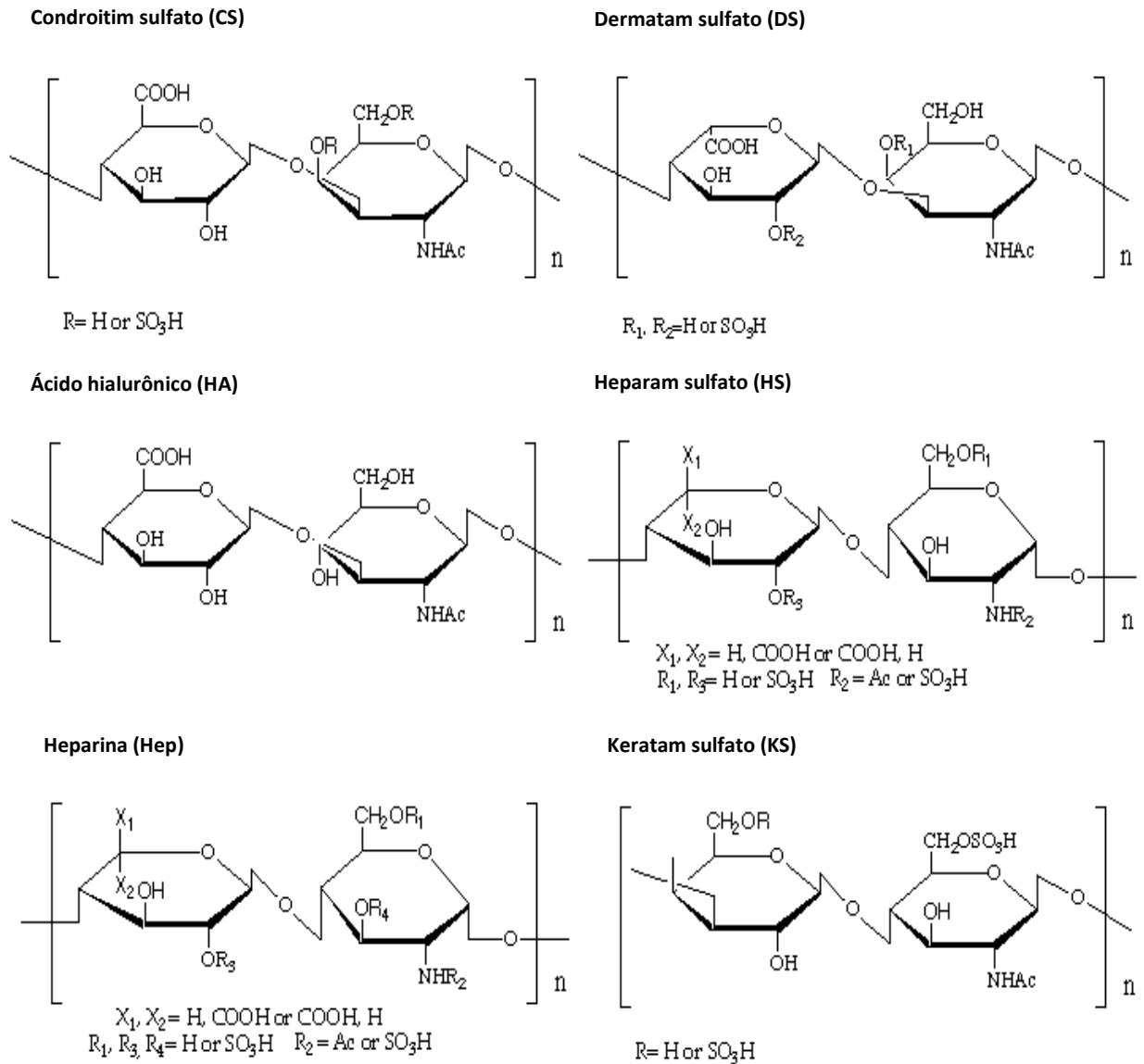
Os polissacarídeos sulfatados (PS) consistem em polímeros de açúcares que apresentam carga negativa devido à presença principalmente de grupamentos sulfato. Possuem grande variedade estrutural e diversas funções nos tecidos que se originam. Além disso, podem ser encontrados tanto no espaço extracelular (matriz extracelular ou lâmina basal), quanto na célula (superfície celular ou em grânulos intracitoplasmáticos como no caso da heparina, por exemplo) (AQUINO et al, 2005).

São amplamente encontrados em tecidos animais (vertebrados e invertebrados) e em algas marinhas. A classe dos PS pode ser subdividida em três famílias de carboidratos: as fucanas sulfatadas, galactanas sulfatadas e GAGs. Os dois primeiros são compostos exclusivamente por fucose e galactose, respectivamente. Já os GAGs são formados por unidades dissacarídicas repetitivas, que serão descritas detalhadamente a seguir.

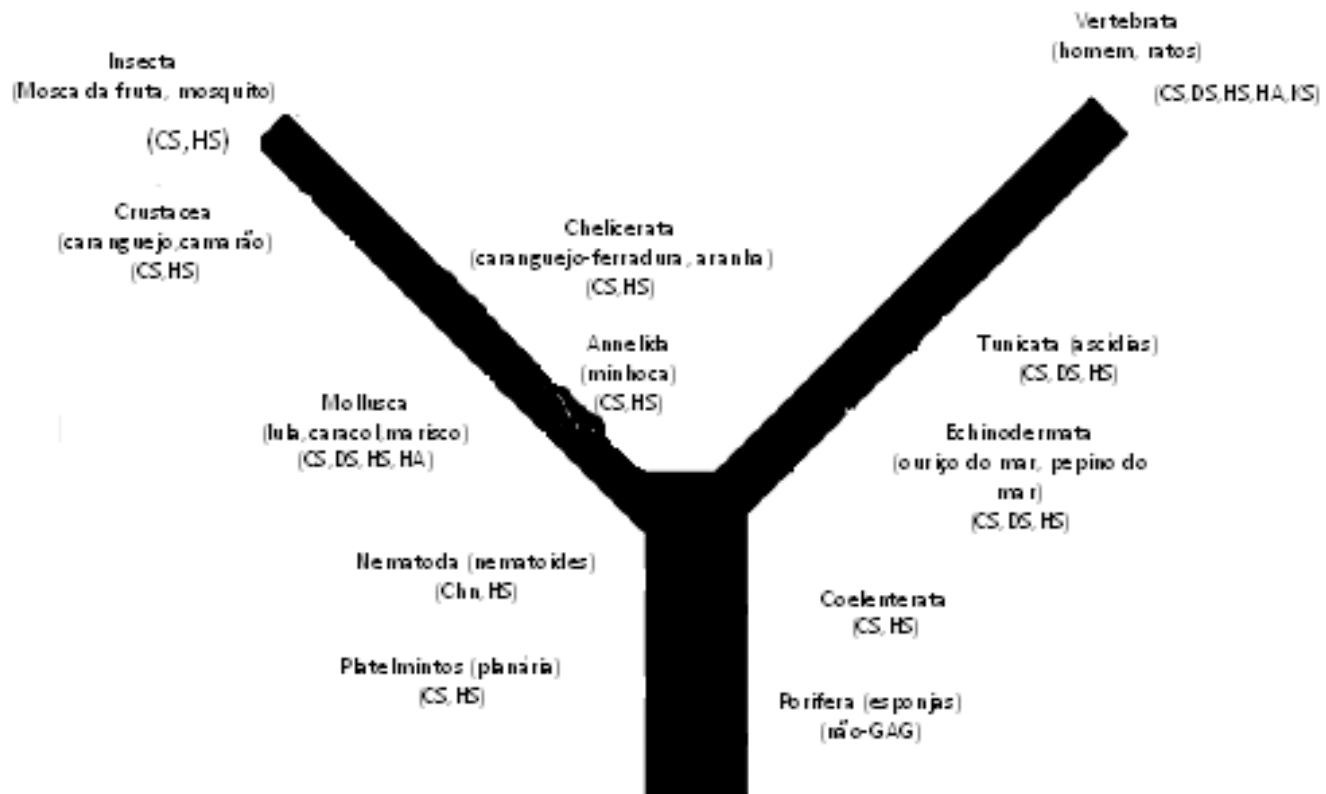
## **1.3. Glicosaminoglicanos**

Os polissacarídeos sulfatados do tipo glicosaminoglicanos (GAG) são açúcares com cadeias lineares não ramificadas compostos por unidades dissacarídicas repetitivas que apresentam papéis importantes no crescimento celular, diferenciação, morfogênese, migração celular e nas infecções tanto bacterianas como virais. São compostos por unidades alternadas de um açúcar aminado, N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) ou N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) e um ácido hexurônico (HexA), que pode ser ácido glucurônico (GlcA) ou ácido idurônico (IdoA) (Figura 4) (YAMADA, 2011) Estão presentes virtualmente em todos os tecidos do reino animal e ainda não foram descritos no reino vegetal (Figura 5). Diversificam-se pelo peso molecular e também pelo grau e posição de sulfatação na estrutura química. Podem participar de diversos processos biológicos, tais como a proliferação celular, diferenciação celular, metástase do câncer, infecções virais, a regeneração do nervo, dentre outros. Por isso, possui grande importância na investigação de mecanismos moleculares de interações entre os GAGs e proteínas específicas em condições tanto fisiológicas como patológicas (TAKADA et al, 2013).

Os principais GAGs provenientes de vertebrados incluem heparina (Hep), heparam sulfato (HS), condroitim sulfato (CS), queratam sulfato (QS), dermatam sulfato (DS) e o ácido hialurônico (HA) (YAMADA, 2011).



**Figura 3:** Unidades dissacarídicas que constituem os glicosaminoglicanos: condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), ácido hialurônico (HA), heparam sulfato (HS), heparina (Hep) e queratam sulfato (QS). Adaptado de < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

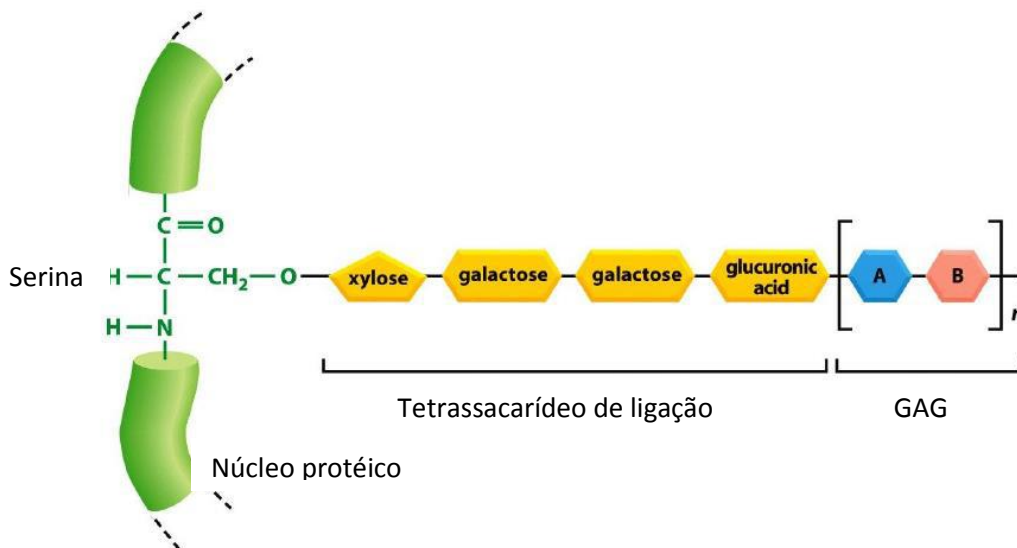


**Figura 4:** Distribuição dos GAGs no reino animal. Adaptado de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104567/pdf/cib0402\\_0150.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104567/pdf/cib0402_0150.pdf), acesso em 01/07/2013.

#### 1.4. Proteoglicanos

Os proteoglicanos (PG) são compostos formados por um núcleo proteico ligado covalentemente a uma ou várias cadeias de glicosaminoglicanos (GAG). A síntese da região de ligação do GAG se dá através de sua ligação de forma covalente ao grupo hidroxila ou amina da cadeia lateral de aminoácidos que compõem o núcleo proteico. A esta ligação soma-se, antes do GAG propriamente dito, um tetrassacarídeo de ligação, que posteriormente serve como iniciador da síntese da cadeia de um GAG específico, podendo ser: condroitim sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato, heparina e heparam sulfato. A biossíntese da cadeia de glicano estende-se desde o terminal de redução durante a adição gradual de monossacarídeos com a ajuda de glicosiltransferases correspondentes (TAMURA, 2001).





**Figura 5:** Estrutura de um proteoglicano. O tetrassacarídeo de ligação composto por xilose, galactose e ácido glucurônico une a cadeia peptídica à cadeia de GAG. Adaptado de <<http://dc204.4shared.com/doc/LKBzRLmz/preview.html>>, acesso em 16/07/13.

### 1.5. Heparina

Os fármacos com atividade anticoagulante que temos atualmente para o uso clínico são classificados em dois grandes grupos, heparina e seus derivados de baixo peso molecular com administração subcutânea e parenteral, e outro grupo compreendendo os anticoagulantes orais ou indiretos derivados da cumarina (CHAVES, 2010).

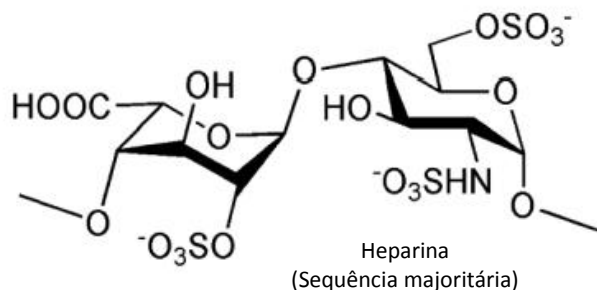
A heparina é um GAG utilizado na clínica como anticoagulante há 70 anos, é o segundo fármaco mais utilizado na prática médica. Seu uso principal é para o tratamento de trombose ou como profilaxia para pacientes com grandes chances de desenvolver eventos tromboembólicos. Pode ser extraída de mamíferos, onde a parte utilizada seria tanto pulmão bovino como mucosa intestinal de suínos, o que já acontece atualmente, como também de determinados organismos marinhos, que ainda não se aplica a utilização e/ou comercialização. É um GAG composto por unidades repetidas de ácido hexurônico ligado a D-glucosamina que possuem alto grau de heterogeneidade

devido à variações que podem ocorrer na D-glucosamina em relação à sulfatação e nas unidades de ácido urônico (PAVÃO, 2002).

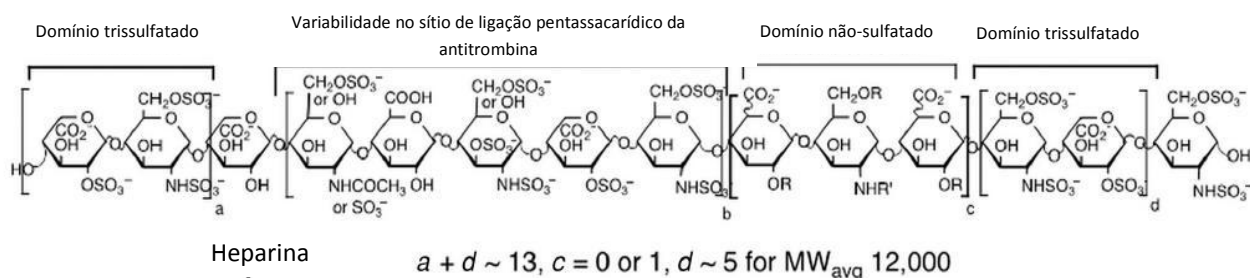
O fato da heparina possuir uma sequência pentassacarídica específica para ligação à antitrombina, faz com que seja detentora de uma potente atividade anticoagulante. A presença deste GAG aumenta a inibição da formação de trombina pelo fator X e fator IX via antitrombina (ATIII) devido a um aumento na afinidade que ocorre entre heparina e antitrombina. A sequência pentassacarídica da heparina que interage com a antitrombina foi identificada como sendo  $\text{GlcNAc}(6\text{SO}_4)\text{-GlcA-GlcNS}(3\text{-SO}_4)\text{-IdoA}(2\text{SO}_4)\text{-GlcNS}(6\text{-SO}_4)$ . Existe um grupo O-sulfatado no carbono 3 do resíduo de glucosamina que é importante para que ocorra a interação entre a antitrombina e a sequência específica da heparina. A aceleração na inativação do fator Xa parece estar relacionada a uma mudança conformacional que ocorre na estrutura da antitrombina. Já a velocidade de inibição da trombina pela antitrombina se relaciona à interação da heparina tanto com a trombina quanto desta com a antitrombina (PAVÃO, 2002).

O uso da heparina é um pouco limitado pelo fato desta poder causar efeitos colaterais como trombocitopenia, complicações hemorrágicas, alterações no metabolismo lipídico, osteoporose, dentre outros. Devido à ocorrência desses efeitos indesejados a heparina vem sendo substituída por derivados de baixo peso molecular que podem ser obtidos por fragmentação parcial ou pelo fracionamento da própria heparina nativa. Oligossacarídeos, com 16 a 20 unidades, mesmo que contenha a sequência pentassacarídica específica para ligação a antitrombina, não é suficientemente longa para interagir com a trombina e inibe apenas o fator X ativado. Essa informação inicialmente levantou a possibilidade de se poder dissociar a propriedade antitrombótica da anticoagulante evitando com isso a indução do efeito hemorrágico citado anteriormente como um dos efeitos colaterais da heparina não-fracionada. Em experimentos recentes foi visto que a atividade anti-Xa seria um pré-requisito para se ter um efeito de prevenção da trombose. As moléculas de heparina devem ser grandes o suficiente para manter algum bloqueio da ação da trombina. Devido a isso, busca-se novas fontes de moléculas que possuam atividade anticoagulante, mas que tenha menos

efeitos indesejados, além também de poderem ser protótipos para o desenho de novos fármacos, correlacionando a estrutura *versus* atividade anticoagulante do composto (PAVÃO, 2002).



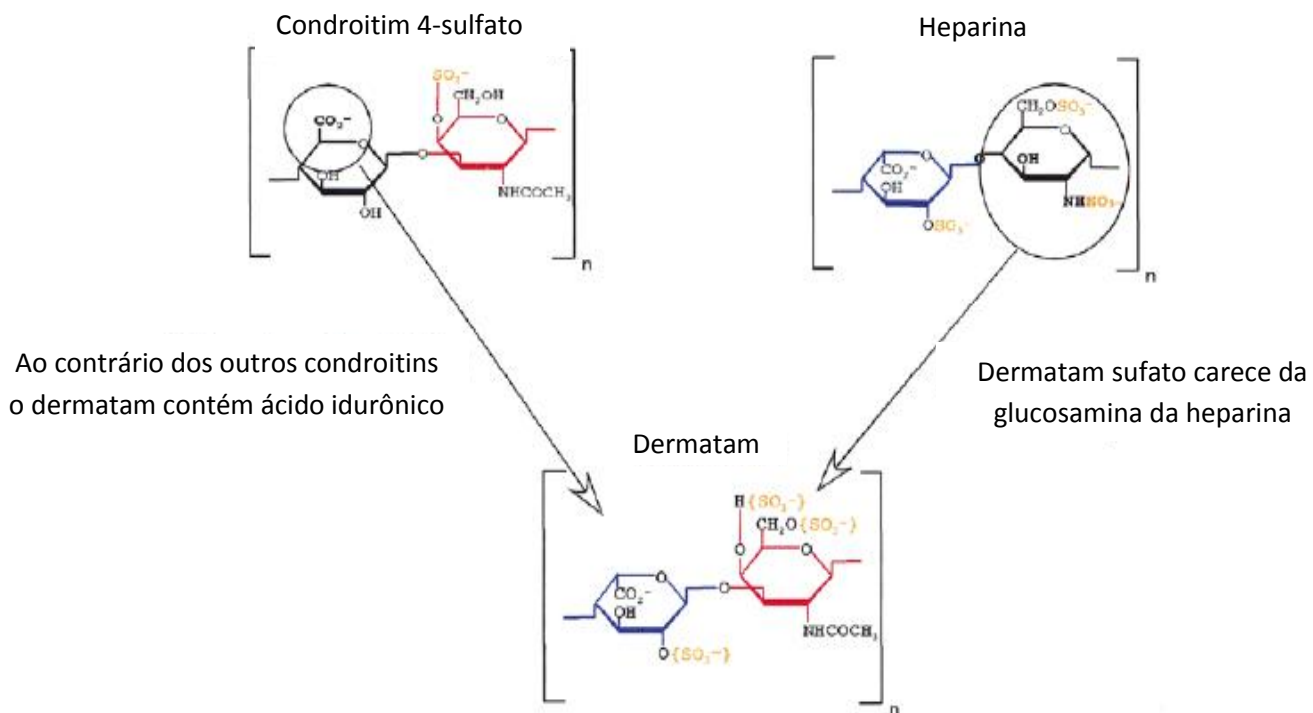
**Figura 6:** Sequência majoritária da Heparina. Retirado de <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.



**Figura 7:** Estrutura de uma cadeia de heparina representativa de peso molecular de aproximadamente 12.000KDa e a variabilidade observada no sítio de ligação deste GAG. Adaptado de FU et al, 2013.

### 1.6. Dermatom sulfato- Estrutura e origem:

A estrutura do DS já foi amplamente descrita. Ele é conhecido/definido como condroitim sulfato B (CS-B) por possuir em sua estrutura a N-acetil galactosamina, se diferenciando dos outros dois tipos de condroitim sulfato (condroitim sulfato A (CS-A) 4-O- sulfatado e condroitim sulfato C (CS-C) 6-O-sulfatado) pela presença de ácido idurônico (IdoA) e pela presença deste grupamento pode ser comparado a heparina e heparam sulfato que também apresentam esta unidade (TROWBRIDGE, 2002).



**Figura 8:** Dermatam sulfato é semelhante à condroitim 4-sulfato e heparina. Adaptado de TROWBRIDGE, 2002.

O DS é composto por polissacarídeos lineares agrupados na forma de dissacarídeos, a N-acetilgalactosamina (GalNAc) com ligações do tipo  $\beta$ 1,4 e ácido glucurônico (GlcA) com ligações do tipo  $\beta$ 1,3. A estrutura deste GAG pode ser alterada pela sulfatação na hexosamina, podendo existir no carbono 4 ou 6 (TROWBRIDGE, 2002).

A complexidade do DS ou do proteoglicano composto por DS pode ser vista pela variabilidade do comprimento total da cadeia polissacarídica, localização do IdoA, variabilidade da sulfatação e das proteínas do núcleo do proteoglicano (TROWBRIDGE, 2002).

Fortes evidências indicam que o comprimento da cadeia do DS, composição dissacarídica e sulfatação podem determinar tanto a afinidade de ligação quanto o controle das interações funcionais com determinadas proteínas (TROWBRIDGE, 2002).

Existe um controle tanto das reações de sulfatação quanto das de epimerização responsáveis pela conversão de GlcA em IdoA, e não trata-se de um processo aleatório mas sim um sistema enzimático controlado. A sequência

informacional deste GAG é composta por alterações passíveis de ocorrer no ácido urônico (GlcA ou IdoA ou IdoA 2-O-sulfatado) ou na hexosamina (GalNAc sem sulfatação ou 4-O-sulfatado ou 6-O-sulfatado ou 4,6-O-dissulfatado) (TROWBRIDGE, 2002).

### **1.7. Ascídias**

As ascídias são invertebrados marinhos sésseis que podem ser encontrados por todo o mundo. Podem ser do tipo colonial ou solitária. Normalmente são encontradas em águas rasas, estando fixadas em cascos de navio, rochas, conchas, sendo conhecidas como incrustadoras. Das quase 3.000 espécies que já foram encontradas apenas 100 destas foram coletadas acima de 200 metros de profundidade. Em relação à coloração das ascídias, podem ser de várias cores, podendo ser opacas ou fortemente coloridas. As ascídias do tipo solitárias podem ser laranja, cereja, ou pêssego e as coloniais podem ser vermelho-sangue, verdes, ou mistura de cores (Ruppert e Barnes,1996).

### **1.8. Organização em Ascídias Solitárias e Coloniais**

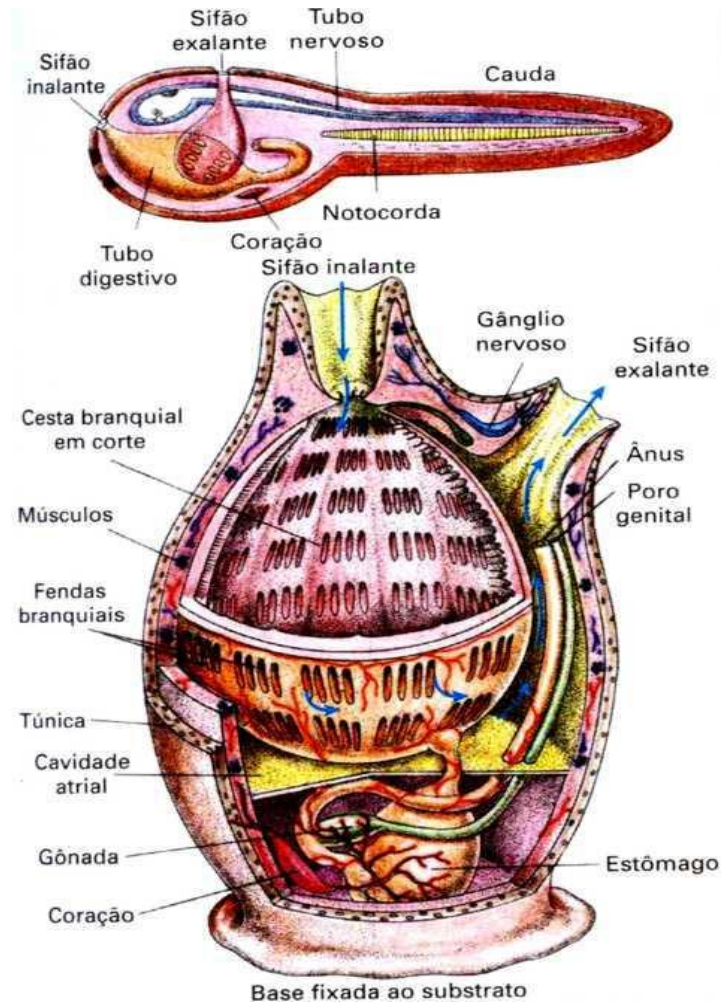
As ascídias solitárias podem apresentar-se sob as formas de batata, uva, pêssego enquanto outras não possuem formato regular. Uma parte da superfície da ascídia fica presa a substratos, que já foram citados anteriormente; sendo essa informação válida apenas para aquelas que são encontradas em águas rasas. Enquanto que a outra parte é composta por duas aberturas que formam duas estruturas denominadas de sifão inalante e sifão exalante, que serão importantes para realização da filtração da água a qual estão submersas. O sifão inalante como o próprio nome diz, realiza a inalação da água promovendo a sua entrada ao interior do animal enquanto que o exalante promoverá a saída da água que foi filtrada anteriormente. As ascídias que são encontradas em águas profundas ancoram-se em fundos pouco consolidados, projetando-se na coluna de água (Ruppert e Barnes,1996).

As ascídias coloniais são formadas por um número elevado de zoóides que fazem com que a colônia atinja um tamanho considerável, formando tapetes que podem ser irregulares e grossos em cima de cascos de navio, rochas, estacarias. As ascídias conhecidas como compostas possuem seus zoóides embebidos em uma única túnica comum. Podem ser pequenas ou amplas, incrustantes e delgadas ou grossas e maciças (Ruppert e Barnes, 1996).

### **1.9. Anatomia e Filtração da água pelas ascídias**

As ascídias coloniais possuem uma túnica comum que envolve várias ascídias já as ascídias do tipo solitárias são capazes de sintetizar uma túnica que envolve o corpo de um único indivíduo (Corbo, 2001).

No estágio larval, nadam livremente e exibem tubo neural, notocorda e cauda pós-anal. A larva nada por algum tempo até se fixar a um substrato, quando perde sua cauda e também sua mobilidade. Após a fixação, a túnica é secretada e a notocorda e tubo neural são absorvidos. A faringe é a única característica dos cordados que permanece na ascídia adulta. O corpo da ascídia adulta é simples, consistindo de uma estrutura com dois sífões por onde a água do mar, contendo plâncton em suspensão, entra e sai. Logo após entrar pelo sífão bucal, a água é filtrada nos sacos faríngeos e as partículas orgânicas são encaminhadas a um muco, na base da faringe. Os movimentos ciliares faríngeos dirigem o muco alimentar para o estômago, onde a digestão é iniciada. A água filtrada, por sua vez, passa da faringe para o átrio, de onde sai através do sífão atrial. Um manto delimita a cavidade corporal e auxilia na respiração. As ascídias são animais hermafroditas, possuindo os órgãos sexuais masculino e feminino (Corbo, 2001).

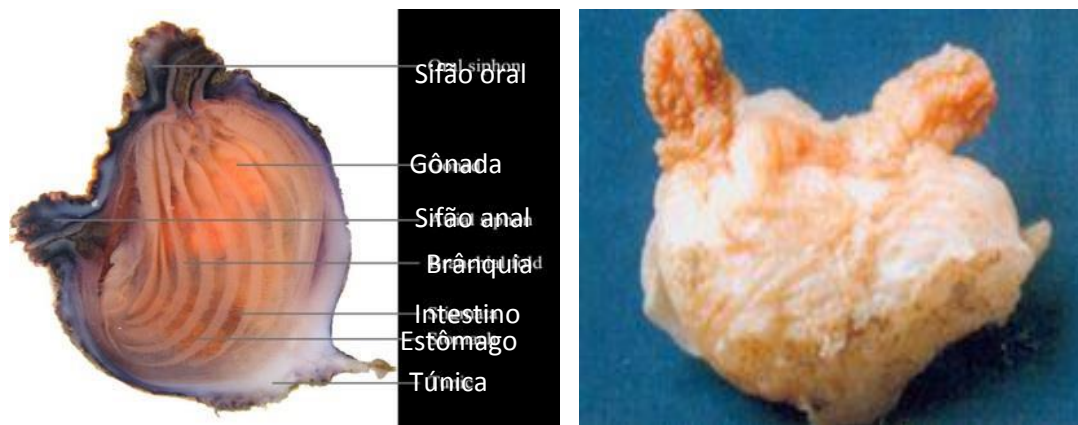


**Figura 9:** Anatomia das ascídias no estágio larval e adulto. Retirado de < <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/filo-cordata/imagens/anatomia-de-um-cordado.jpg>>, acesso em 22/08/2013.

### 1.10. Ascídia *Microcosmus exasperatus*

A distribuição desta espécie é ampla em mares tropicais e subtropicais. Seu corpo é globoso, com sifões os quais o comprimento pode variar. A túnica é espessa, rugosa, coriácea, a coloração varia entre vermelha ou roxa e geralmente estão associadas a incrustações de areia, hidrozoários, algas dentre outros organismos marinhos. Seu interior consiste em manto semitransparente que apresenta faixas musculares circulares nos sifões e oblíquas que irradiam dos sifões em direção à região central do corpo. Possui cerca de 10 tentáculos orais grandes e vários outros menores. A cesta

branquial tem de 8 a 10 pregas de cada lado. O estômago é estreito com 2 grandes conjuntos de túbulos hepáticos. Existe uma gônada de cada lado do corpo, formadas por 3 a 5 conjuntos, constituídos por 1 ovário central que é cercado por folículos testiculares que se dispõem ao redor dos gonodutos. Já a gônada esquerda apresenta um de seus conjuntos no interior da alça intestinal primária (RODRIGUES et al., 1998).



**Figura 10:** Anatomia e imagem da *Microcosmus exasperatus*. Adaptado de <<http://www.ascidians.com/>><<http://www.biosearch.in/publicOrganismPage.php?id=131228>>.

### 1.11. Cascata de Coagulação

A clássica cascata da coagulação foi proposta no ano de 1964 pelos pesquisadores Macfarlane, Davie e Ratnoff e até hoje é citada em artigos e compêndios. Foi proposto para explicar a parte fisiológica da coagulação sanguínea, iniciada pela ativação proteolítica de pró-enzimas pelas proteases do plasma de forma sequencial, que resultará na formação de trombina que promove a quebra da molécula de fibrinogênio em monômeros de fibrina. Neste modelo a coagulação é segregada em duas vias, a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca envolve tanto elementos do sangue como aqueles que normalmente não são encontrados no espaço intravascular. Já a via intrínseca é iniciada pelos componentes encontrados no espaço intravascular, se diferenciando por isso da via anteriormente citada. Essas vias convergem-se para uma via comum quando ocorre a ativação do fator X (FX). Na via extrínseca, o fator VII é ativado quando seu cofator, o fator tecidual (FT), se faz



presente, e ocorre a formação de um complexo fator VII ativado/FT (FVIIa/FT) que será o responsável pela ativação do FX. Na via intrínseca ocorre de forma diferenciada, a ativação do fator XII se dá quando o sangue entra em contato com uma determinada superfície que contém cargas negativas, além disso para que este fenômeno ocorra é necessária a presença de outros componentes do plasma, como: pré-caliceína, que é uma serinoprotease e do cininogênio de alto peso molecular, que é um cofator não enzimático. Quando o fator XII está ativado promove a ativação do fator XI que vai ativar o fator IX, este ativado e na presença de íons cálcio (complexo tenase) vai ativar o fator X, resultando na formação de trombina com consequente formação de fibrina como já citado anteriormente (FERREIRA, 2010).

Mais recentemente, observações experimentais e clínicas demonstraram que a hipótese da cascata da coagulação não seria capaz de refletir os eventos da hemostasia *in vivo*, possuindo falhas em relação ao modelo fisiológico da coagulação e que as vias intrínseca e extrínseca podem não funcionar de forma independente como foi tratado durante muitos anos. Diante destes fatos, surgiu a necessidade em aprimorar as informações referentes a esse modelo clássico. Como alternativa desenvolveu-se um modelo para hemostasia baseado em superfícies celulares, que procura enfatizar a interação que ocorre entre fatores da coagulação e superfícies celulares específicas (FERREIRA, 2010).

É um modelo que possui algumas limitações pelo fato de não conseguir explicar de forma satisfatória como se dão todos os fenômenos que estão ligados à hemostasia *in vivo* (FERREIRA, 2010).

#### **1.12. Novo modelo da Cascata de Coagulação baseado nas superfícies celulares**

Ao longo dos últimos 15 anos grandes avanços no campo da hemostasia foram obtidos. Percebeu-se que, a coagulação sanguínea é iniciada por células que expressam FT em sua superfície. A partir deste ponto, foi criado o novo modelo da cascata de coagulação baseado em superfícies celulares, que relata a necessidade da presença localizada de substâncias procoagulantes ativadas

no sítio da lesão que resultará na formação do tampão plaquetário e fibrina no local, obtendo-se assim a condição fisiológica de hemostasia. O processo coagulativo inicia-se pela exposição do FT na corrente sanguínea devido a alguma lesão endotelial e de células vizinhas ou mesmo pela ativação de células endoteliais ou monócitos (FERREIRA, 2010).

Atualmente o entendimento sobre o processo hemostático se dá pela interrelação entre processos físicos, celulares e também bioquímicos que irão atuar em uma série de estágios ou fases, e não apenas em duas vias (extrínseca e intrínseca) como era considerado no modelo clássico. Quatro (4) fases denominadas de iniciação, amplificação, propagação e finalização, compreendem a atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares (FERREIRA, 2010).

#### **1.12.1. Fase de Iniciação**

No processo da coagulação por este modelo atual, a fase de iniciação se dá quando células que expressam o FT superficialmente são expostas aos componentes do sangue no local da lesão. Este quando ligado ao FVII que está presente no sangue é capaz de rapidamente ativá-lo formando o complexo FVIIa/FT que será responsável por ativar pequenas quantidades de FIX e FX. O FXa quando associado a seu cofator, o FVa, forma o complexo protrombinase na superfície da célula que expressa o FT. O FV pode ser ativado tanto por FXa como por proteases não coagulantes, resultando em FVa em quantidades suficientes para compor o complexo protrombinase. Esse complexo promove a conversão de protrombina em trombina, que não serão suficientes para completar a etapa de formação do coágulo de fibrina porém contribui para a fase de amplificação da coagulação (FERREIRA, 2010).

Já foi observado que as reações da fase de iniciação podem ocorrer fora do espaço vascular em indivíduos saudáveis. Fatores da coagulação como FVII, FX e protrombina são capazes de deixar o espaço vascular percorrendo entre os tecidos. Foi proposto que esta fase permanece ativa continuamente gerando pequenas quantidades de fatores ativados quando se encontra em estado basal. A trombina, mesmo que em pequenas proporções, seria

produzida fora do espaço vascular, independentemente da ocorrência de lesão vascular. Admite-se então que essa fase mesmo com baixa atividade esteja ocorrendo a todo o tempo no espaço extravascular (FERREIRA, 2010).

O processo de coagulação passará para a próxima fase, de amplificação, apenas se ocorrer algum dano vascular, onde será permitido o contato entre plaquetas e FVIII (ligado ao fator de von Willebrand) com o tecido extravascular local este que as células que expressam FT costumam se aderir (FERREIRA, 2010).

### **1.12.2. Fase de Amplificação**

A fase posterior à fase de iniciação é a fase de amplificação. Nesta etapa do processo da coagulação teremos a formação de um tampão estável. As plaquetas e o FVIII ligado ao fator de von Willebrand (FvW) só conseguem passar para o espaço extravascular caso ocorra uma lesão vascular, isso se deve ao grande tamanho que possuem. Quando a lesão ocorre no vaso, as plaquetas migram para o sítio da lesão se ligando ao colágeno e alguns componentes da matriz extracelular, são ativadas, tendo como resultado a formação de um tampão hemostático. Podemos denominar esse evento de hemostasia primária. É neste momento que as pequenas quantidades de trombina que foram produzidas durante a fase de iniciação vão interagir tanto com as plaquetas que migraram para o local como com o complexo formado entre FVIII e FvW. Inicia-se o processo hemostático dando origem a formação de fibrina estável, culminando em tampão plaquetário inicial. Este segundo evento denomina-se hemostasia secundária (FERREIRA, 2010).

A pequena quantidade de trombina que é produzida pelas células que expressam o FT possui diversas funções, sendo a principal delas a ativação máxima de plaquetas com o intuito destas exporem receptores e sítios de ligação para os fatores da coagulação que estejam ativados. Com isso elas alteram a permeabilidade de suas membranas promovendo a entrada de íons cálcio e a saída de substâncias com propriedades quimiotáticas que irão atrair fatores da coagulação para sua superfície, podendo também liberarem FV parcialmente ativados (FERREIRA, 2010).

A trombina também pode ativar cofatores FV e FVIII na superfície das plaquetas que foram ativadas. O complexo formado entre FVIII e FvW dissocia-se e o FvW passa a mediar a adesão e a agregação plaquetárias no local lesionado (FERREIRA, 2010).

Outra função da trombina ainda na fase de iniciação seria ativar o FXI na superfície da plaqueta, o que explica o porquê do FXII não ser necessário para que se obtenha a hemostasia normal. Os fatores mencionados são atraídos para a superfície das plaquetas através de mecanismos quimiotáticos, dando início à fase de propagação (FERREIRA, 2010).

### **1.12.3. Fase de Propagação**

A terceira fase desse novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares é denominada propagação. Nesta ocorre recrutamento de um elevado número de plaquetas para o sítio onde se deu a lesão. Outro ponto que caracteriza esta fase seria a formação dos complexos tenase e protrombinase. O FIX que foi ativado ainda na fase de iniciação neste momento pode ligar-se a FVIIIa originando o complexo tenase, este evento se dá na superfície das plaquetas. O FXa não é capaz de se mover das células que expressam o FT até à plaqueta ativada, com isso é necessário que o complexo FIXa/FVIIIa produza uma maior proporção de FXa diretamente na superfície da plaqueta. Ocorre a associação entre FXa e FVa ligado à plaqueta na fase de amplificação e tem-se a formação do complexo protrombinase. Este complexo promove a conversão de protrombina em trombina, e esta cliva o fibrinogênio em monômeros de fibrina, que irão se polimerizar para que seja consolidado o tampão plaquetário inicial (FERREIRA, 2010).

### **1.12.4. Fase de Finalização**

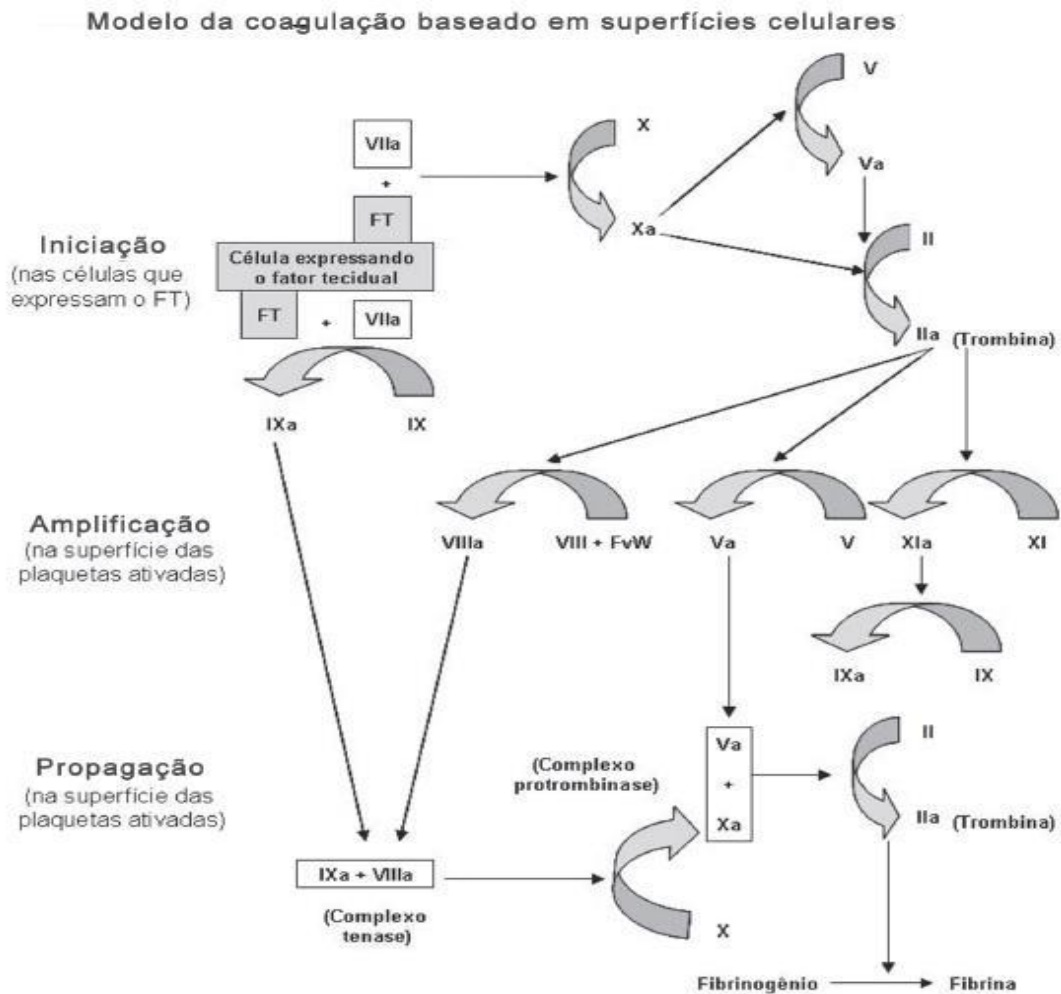
A última fase do processo de coagulação é a finalização. O processo deve limitar-se ao local onde ocorreu a lesão para não permitir que ocorra a oclusão trombótica do vaso. Existem anticoagulantes naturais com a capacidade de controlar a disseminação da ativação da coagulação, estes são

a antitrombina (AT), a proteína C (PC), a proteína S (PS) e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI) (FERREIRA, 2010).

A AT é a responsável por inibir a trombina além de outras serinoproteases. Uma ampla variedade de glicosaminoglicanos funcionam como sítios de ligação para a AT promovendo uma rápida inativação da trombina, eles são produzidos por células endoteliais (FERREIRA, 2010).

O TFPI é uma proteína secretada pelo endotélio que consegue limitar a coagulação através da formação de um complexo quaternário entre FT, FVIIa, FXa e TFPI que inativa os fatores da coagulação que anteriormente haviam sido ativados (FERREIRA, 2010).

Os outros dois anticoagulantes anteriormente citados, a proteína C e a proteína S, conseguem inativar os cofatores anticoagulantes FVa e FVIIIa. A proteína C quando tem sua síntese ativada é capaz de causar a proteólise dos cofatores Va e VIIIa. É ativada pela trombina que está ligada à proteína transmembrânica trombomodulina (TM) na parte superficial de células endoteliais que estão intactas. A atividade desta pode ser aumentada pela presença da proteína S (PS), que é um cofator inibidor. A PS circulante no plasma humano está sob a forma livre, e consiste na parte que funciona como cofator da PC ativada (FERREIRA, 2010).



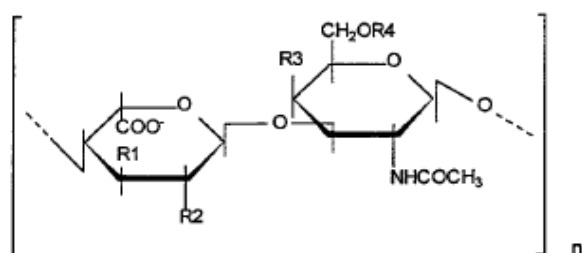
**Figura 11:** Esquema representativo do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares compreendendo as fases de iniciação, amplificação e propagação. Fator tecidual (FT), ativado (a). Retirado de FERREIRA, 2010.

### 1.13. Dermatan sulfato em ascídias

O DS de ascídias é bem semelhante ao DS de mamíferos, [IdoA(2SO<sub>4</sub>)-GalNac(4SO<sub>4</sub>)], diferindo-se no grau e posição dos grupamentos sulfato em sua estrutura. Já foi relatada sua presença em tecidos de ascídias como *Styela plicata*, *Phallusia nigra* e outras (PAVÃO, 2002).

A *Phallusia nigra* apresenta a sequência [4-α-L-IdoA(2SO<sub>4</sub>)-1→3-β-D-GalNac(6SO<sub>4</sub>)-1]<sub>n</sub> que não é tão eficiente em potencializar a atividade do HCII e tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)-ensaio que avalia o tempo de formação do coágulo de fibrina. Já a ascídia *Styela plicata* possui [4-α-L-

IdoA(2SO<sub>4</sub>)-1→3-β-D-GalNAc(4SO<sub>4</sub>)-1]<sub>n</sub>, que contribui na potencialização do HCII, apresentando também aPTT maior que DS de mamífero como visto em diversos artigos científicos. Como a sulfatação na posição 2 do ácido idurônico ambas espécies de ascídias apresentam, podemos supor que a sulfatação na posição 4 da N-acetilgalactosamina seja importante para se ter a atividade anticoagulante (PAVÃO, 2002).



		% de sulfatação			
		R1	R2	R3	R4
Mamífero	nativo	<5	7	95	13
	supersulfatado	20	25	100	100
Ascídia	<i>S. plicata</i>	<5	66	94	6
	<i>H. piriformis</i>	<5	70	99	1
	<i>A. nigra</i>	<5	80	<5	100

**Figura 12:** Unidades dissacarídicas de DS de mamíferos e ascídias. Adaptado de PAVÃO, 1998.

## 2.0. Justificativa

As ascídias são organismos marinhos que possuem um elevado potencial biotecnológico, pois produzem uma grande quantidade de metabólitos secundários que podem ser utilizados no tratamento do câncer e também como anticoagulantes, antiinflamatórios e antimetastáticos. Por estarem próximas filogeneticamente dos humanos e por já ter sido descrito na literatura que apresentam moléculas com diversas atividades farmacológicas tornam-se um bom modelo de estudo para inúmeras patologias.

A descoberta de uma molécula que tenha atividade anticoagulante semelhante à heparina pode fazer com que seja utilizada como protótipo para o desenho de fármacos no modelo de estrutura versus atividade anticoagulante. Outra importância do presente projeto seria pelo fato da heparinoterapia causar efeitos colaterais como hemorragias, trombocitopenia, osteoporose, alteração no metabolismo lipídico, dentre outros existindo por isso a necessidade em se buscar substitutos que causem um menor número de consequências para o paciente que os causados pela heparina. O uso da heparina também pode levar à contaminação por xenobióticos situação esta que seria minimizada caso a extração do glicosaminoglicano fosse de organismos marinhos. Este fato motiva diversos pesquisadores à resolução destas problemáticas e com isso buscam em invertebrados marinhos a descoberta de moléculas que possam substituir o uso da heparina. O desenvolvimento de um medicamento com ação anticoagulante que possa ser administrado por via oral seria também um grande marco já que atualmente a maioria é de administração subcutânea e intravenosa.

### **3.0. Objetivos**

3.1. Objetivo Geral: Estudar a estrutura e localização dos GAGs presentes nas vísceras da ascídia da espécie *M. exasperatus*.

3.2. Objetivos Específicos: Extração, purificação, localização e avaliação da atividade anticoagulante dos GAGs presente nas vísceras da ascídia *M. exasperatus*.

### **4.0. Materiais e Métodos**

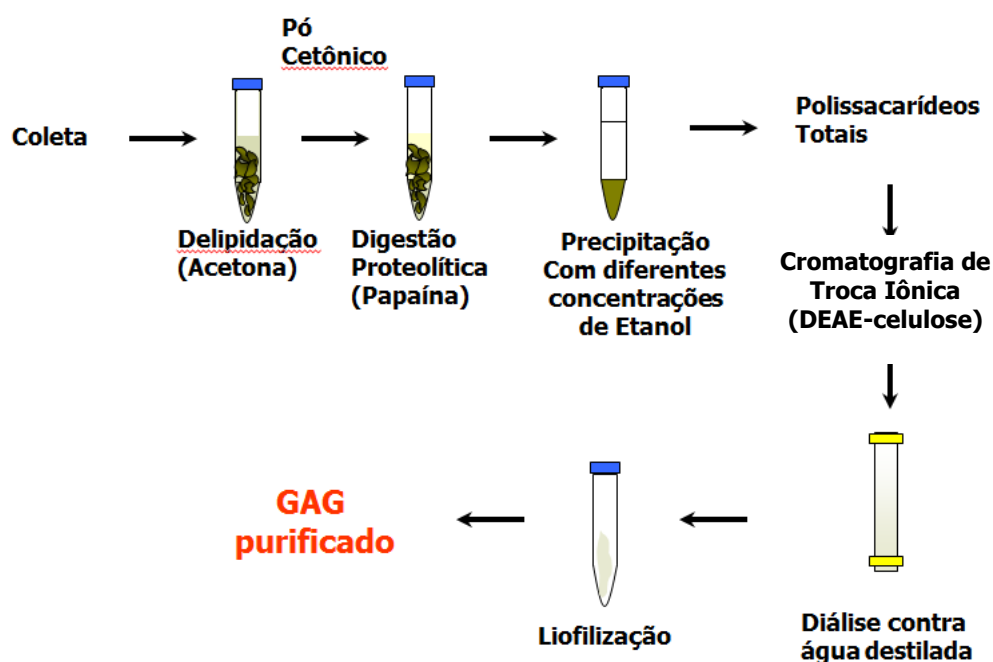
Coleta: As ascídias da espécie *Microcosmus exasperatus* foram coletadas na praia da Urca, na Baía de Guanabara, cidade do Rio de Janeiro. No laboratório suas vísceras foram separadas da túnica através de um corte transversal feito no corpo de cada animal e submetidas ao processo de extração (PAVÃO, 1995).



Extração e Purificação: Primeiramente, as vísceras foram imersas em acetona a 4°C, para a retirada dos lipídeos presentes nos tecidos, processo este denominado de delipidação e, então, secadas em estufa a 60°C, obtendo-se dessa forma o pó cetônico (PAVÃO, 1995). O pó cetônico foi solubilizado em tampão de digestão (0,1 M de acetato de sódio (pH 5,5), contendo 5 mM de EDTA e 5 mM de cisteína) na presença de 10% de papaína (p/p; peso seco das vísceras / peso da papaína), por 24 horas a 60°C. O produto desta incubação foi centrifugado e o precipitado contendo restos teciduais (*debris* celular), foi submetido a uma nova digestão sob as mesmas condições descritas anteriormente. Esse processo de digestão proteolítica foi repetido até que no sobrenadante não possuísse mais quantidade detectáveis de polissacarídeos sulfatados (VIEIRA, 1991). Visando uma pré-purificação dos polissacarídeos sulfatados, foram adicionados aos sobrenadantes volumes crescentes de etanol (50%, 70%, 100% e 300%) e mantidos a 4°C *overnight* para precipitação dos polissacarídeos. Os polissacarídeos precipitados foram reunidos e liofilizados.

Identificação e Caracterização: Os polissacarídeos obtidos em cada uma das extrações proteolíticas e precipitações em etanol foram analisados por eletroforese em gel de agarose, método desenvolvido por Dietrich e Dietrich (1976). Alíquotas dos GAGs sulfatados foram aplicadas ao gel de agarose 0,5% p/v em tampão 0,05M 1,3 diaminopropano:acetato (pH 9,0) e submetidos a uma corrida eletroforética por 1 h a 120 V. Usou-se como padrões a heparina bovina e o condroitim 4-sulfato. Depois da corrida, os polissacarídeos foram fixados no gel com uma solução de 0,1% de N-cetil-N,N,N-trimetil amônio brometo (cetavlon) por 12h e, em seguida, o gel foi secado e corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético/etanol/água (0.1:5:5, v/v). Após corado, o gel foi lavado por cerca de 15 minutos em ácido acético/etanol/água (0.1:5:5, v/v). A fim de quantificar os GAGs presentes nas frações de polissacarídeos totais realizou-se uma curva-padrão utilizando-se o corante azul de dimetilmetileno (DMB) e como padrão o condroitim sulfato 4-S. A

mistura do corante em concentrações crescentes de DMB foram quantificados em espectrofotômetro ( $A_{525}$ ). Os polissacarídeos totais foram aplicados a uma coluna de troca iônica DEAE-celulose equilibrada com solução tampão (20mM Tris-HCl e 10 mM EDTA (pH 7,4)). Os glicanos foram eluídos em degraus (*step-wise*) de NaCl nas concentrações de 0,3M; 0,5M; 0,7M; 1,0M; 1,5M; 2,0M e 4,0M e a troca da salinidade do tampão era alterada somente quando obtivemos absorção semelhante à linha de base. Terminada a purificação realizou-se diálise exaustiva contra água destilada (PAVÃO, 1995).



**Figura 13:** Esquema da metodologia: Realizou-se a coleta da ascídia, a delipidação em acetona, secou-se o material, fez-se a digestão proteolítica com papaína, precipitou em concentrações crescentes de etanol obtendo-se os polissacarídeos totais. A segunda etapa consistiu na purificação através da cromatografia de troca-iônica em DEAE-celulose, diálise contra água destilada e liofilização das frações.

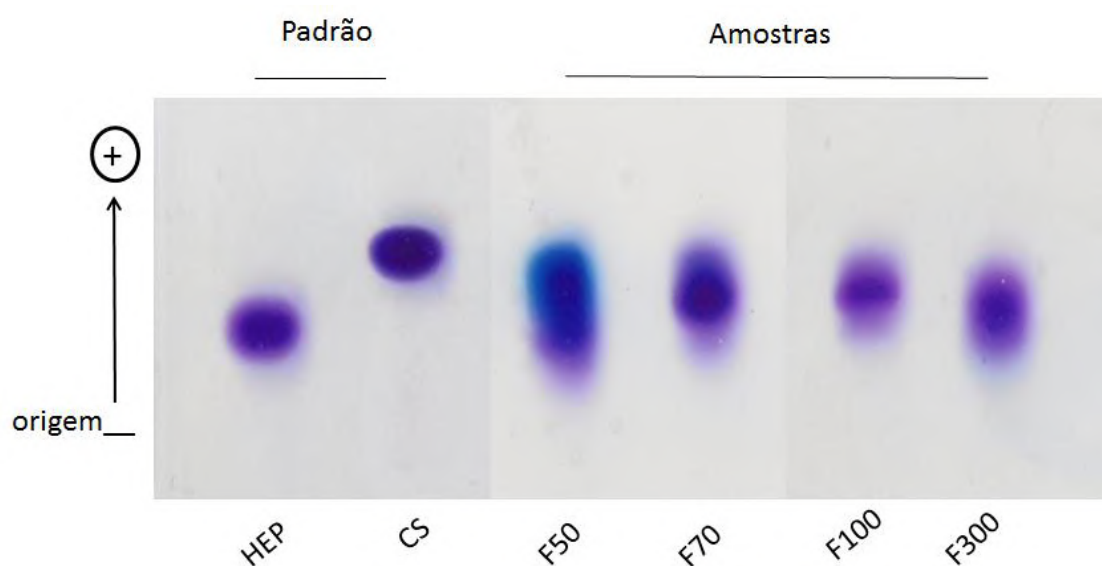
Histoquímica - processamento e coloração dos tecidos das ascídias: Segundo GOMES et al (2010), os animais foram anestesiados com triclaína por cerca de 30 minutos de acordo com as Normas do Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e, em seguida, foram mergulhados e deixados *overnight* na solução fixadora de formaldeído 4% em

água do mar. Posteriormente, os tecidos passaram pelo processamento histológico. Inicialmente, os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol até a concentração de 100%. Feito isso foram clarificados em xilol (xileno) e emblocados em paraplast. Os tecidos em paraplast foram fatiados, com espessura de 5µm, no micrótomo. Com auxílio de uma pinça, os cortes foram transferidos para o banho-maria e, em seguida, aderidos em lâmina histológica previamente lavada com água e sabão. Após secagem das lâminas a temperatura ambiente, as mesmas foram deixadas em estufa a 60°C e, posteriormente, seguiram para a bateria de coloração. Nesta, as lâminas foram, inicial e sequencialmente, mergulhadas em xilol por 3 minutos, depois em concentrações decrescentes de etanol até atingir apenas água por também 3 minutos em cada diluição. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em corantes utilizados rotineiramente, Hematoxilina e Eosina. Primeiramente mergulhou em Hematoxilina e, em seguida, no corante Eosina por 7 minutos em cada um deles. Ao término desse período, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol por 1 minuto em cada concentração e mergulhadas em xilol pelo mesmo tempo. Para finalizar o processo de coloração, cada lâmina recebeu uma gota do meio de montagem Entellan-Merck e uma lamínula que dispersou o líquido recobrando todo o tecido. Para coloração com azul de alciano (alcian blue) pH 1.0 contra corado com ácido periódico shiff (PAS) seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima, deixando as lâminas mergulhadas neste corante por 45 minutos. O azul de alciano é capaz de corar moléculas sulfatadas e carboxiladas dependendo do pH em que é utilizado. Em pH 1.0 cora sulfatadas, já e pH 2.5 cora as carboxiladas. Por 24 horas as lâminas foram deixadas a temperatura ambiente para completa secagem do meio de montagem. Posteriormente, as lâminas foram levadas ao microscópio óptico para que, com auxílio de uma câmera, realizássemos a aquisição de imagens de diferentes campos e aumentos dos tecidos (GOMES et al, 2010).

## 5.0. Resultados e Discussão

### 5.1. Eletroforese em Gel de Agarose (Polissacarídeos Totais)

Após a extração e precipitação em concentrações crescentes de etanol dos GAGs presentes nas vísceras de *M. exasperatus* as frações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Nesta metodologia, foram utilizados como padrões a heparina e CS. Foram aplicadas as frações F50, F70, F100 e F300, obtidas por precipitação seletiva com etanol, para avaliar sua mobilidade eletroforética das bandas, que pode ser visualizada devido à coloração com azul de toluidina. A F50 apresentou uma banda azulada, típica da presença do DNA e uma banda metacromática mais fraca que co-migra com o padrão de heparina. Já as frações F70 e F100 apresentaram uma única banda densa e estreita com migração entre CS e heparina, que acredita-se se tratar de um GAG puro, sugere-se fortemente se tratar de DS. Já a fração F300 possui duas subpopulações, uma delas co-migra com heparina e a segunda como DS.

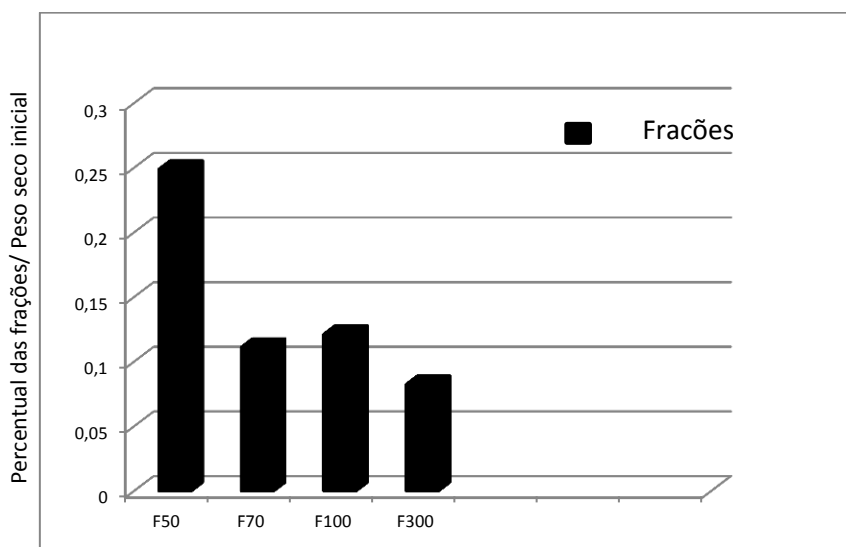


**Figura 14:** Eletroforese em gel de agarose das frações referentes às precipitações em EtOH comparado aos padrões de glicosaminoglicanos (heparina e condroitim sulfato). As frações foram aplicadas ao gel de agarose 0,5% e correu por 1 hora a 110 volts em 1,3-diaminopropano/benzina (pH 9.0). Os GAGs foram fixados com solução brometo de cetil trimetil amônio 0.1%.

Após 12h, o gel foi lavado e corado utilizando-se azul de toluidina 0.1% e posteriormente foi lavado com solução ácido acético/etanol/H<sub>2</sub>O (0.1:5:5,v/v).

## 5.2. Rendimento das Frações

Logo após a realização da eletroforese em gel de agarose foi feita uma curva-padrão com azul de dimetilmetileno (DMB), utilizando CS como padrão, e a partir desta foi realizada a dosagem das frações F50, F70, F100 e F300 (Fig. 13). Como pode-se observar a fração F50 apresentou a maior proporção de polissacarídeos sulfatados se compararmos às outras frações. Isso se deve à presença do contaminante DNA nesta fração, que claramente foi quantificado junto aos possíveis GAGs presentes nesta, como foi visto na eletroforese em gel de agarose (Fig. 14). As frações F70 e F100 apresentaram quantidades muito semelhantes e a F300 apresentou a menor quantidade de polissacarídeos sulfatados.

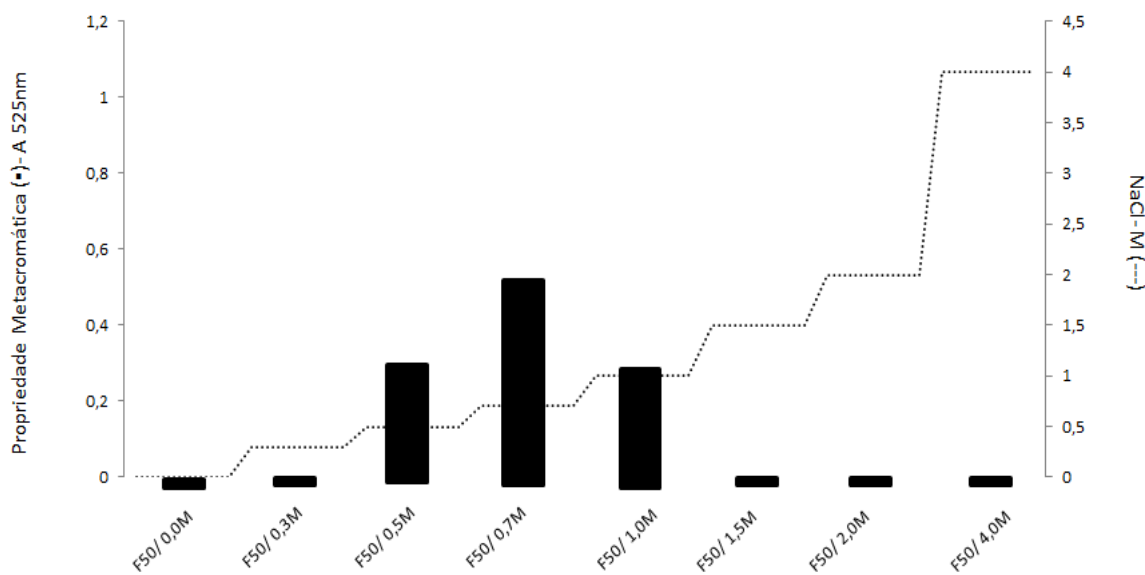


**Figura 15:** Dosagem qualitativa dos polissacarídeos sulfatados contidos nas frações F50, F70, F100 e F300 extraídos da ascídia *M. exasperatus*. Os PS foram quantificados utilizando-se como padrão o condroitim sulfato 1µg/µl através de curva-padrão. Foi verificada a metacromasia em azul de dimetilmetileno (DMB) em espectrofotômetro ( $A_{525nm}$ ).

### 5.3. Cromatografia de Troca Iônica (F50)

A fim de prosseguir com a purificação dos compostos, submetemos as frações F50 e F300 à cromatografia de troca iônica. Estas duas frações foram priorizadas devido à contaminação com DNA presente em F50 e a forte sugestão de que em ambas as frações havia mais de um composto (Fig. 14).

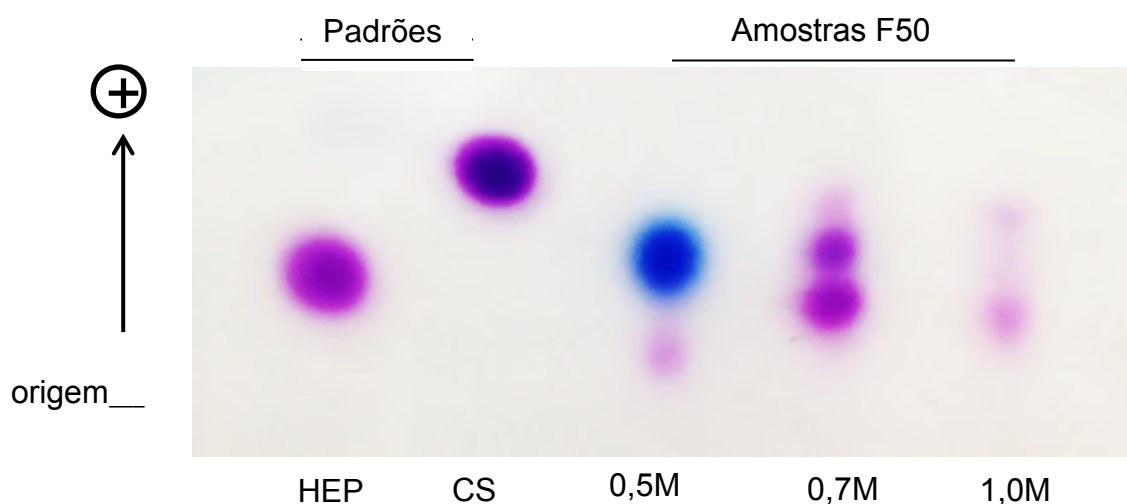
Inicialmente, as amostras foram dissolvidas no tampão de equilíbrio (Tris-HCl) e submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose equilibrada e eluída, também com mesmo tampão, na presença de concentrações crescentes de NaCl até a completa remoção dos polissacarídeos não retidos. Os GAGs retidos na coluna foram eluídos nas concentrações de NaCl 0; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 M. No cromatograma as barras em preto representam a propriedade metacromática  $A_{525\text{ nm}}$  e a linha tracejada (- - -) indica as concentrações de NaCl que foram utilizadas para eluição do material. Nas molaridades de 0,5 M, 0,7 M e 1,0 M pôde ser observada a eluição de material. As frações obtidas foram monitoradas através da reação metacromática usando o DMB. Posteriormente foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e concentradas por liofilização para utilização em ensaios posteriores.



**Figura 16:** Purificação dos GAGs da fração F50 de *M. exasperatus* por cromatografia de troca-iônica DEAE-celulose. Os polissacarídeos totais extraídos da ascídia foram aplicados à coluna da cromatografia. As frações foram ensaiadas por metacromasia (▪) e concentrações de NaCl (---). As frações indicadas por barras verticais foram dializadas contra água destilada e posteriormente liofilizadas e indicam a eluição dos GAGs em diferentes concentrações de NaCl.

#### 5.4. Eletroforese em Gel de Agarose (Polissacarídeos Purificados)

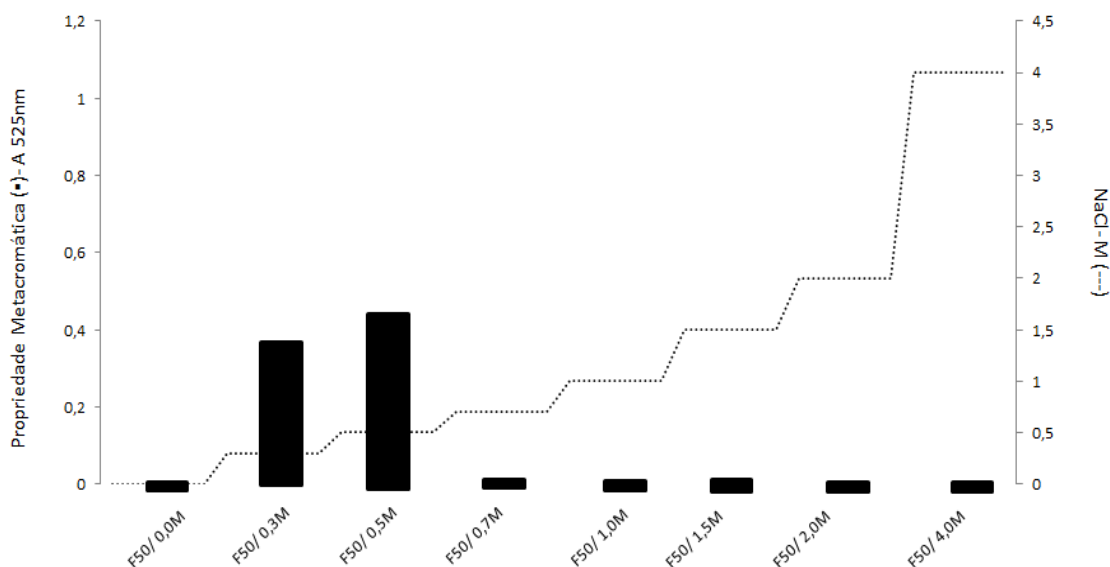
Após a purificação, realizamos uma eletroforese em gel de agarose com o material eluído da cromatografia de troca-iônica. O material eluído em 0,5 M de NaCl apresentou uma banda de coloração azulada, típica de DNA, demonstrando que a realização deste método de purificação foi eficiente para separar este contaminante da molécula de interesse. Abaixo da banda do DNA observamos uma banda que migrou um pouco abaixo do padrão de heparina, sugerindo a presença de algum heparinóide. O material eluído à 0,7 M e 1,0 M de NaCl apresentou três bandas, uma que co-migra com heparina e a outra com CS. A terceira banda apresentou migração eletroforética entre os dois padrões utilizados, o que sugere fortemente a presença de DS.



**Figura 17:** Eletroforese em gel de agarose das frações da cromatografia de troca-iônica comparado aos padrões de glicosaminoglicanos: As frações purificadas na cromatografia foram aplicadas ao gel de agarose 0,5% e correu durante 1 hora a 110 volts em 1,3-diaminopropano/benzina (pH 9.0). Os GAGs foram fixados com solução brometo de cetil trimetil amônio 0.1%. Após 12 horas, o gel foi lavado e corado utilizando-se azul de toluidina 0.1% e posteriormente foi lavado com solução ácido acético/etanol/H<sub>2</sub>O (0.1:5:5,v/v).

### 5.5. Cromatografia de Troca Iônica (F300)

O procedimento experimental executado para purificação da F300 foi realizado conforme citado no item anterior “cromatografia de troca iônica (F50)” e pode-se observar a eluição de polissacarídeos sulfatados em duas molaridades de NaCl 0,3 M e 0,5 M.

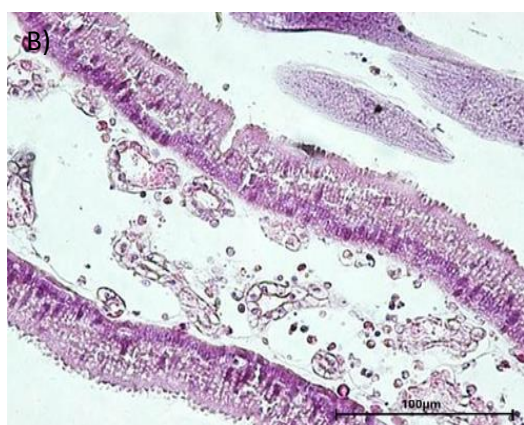
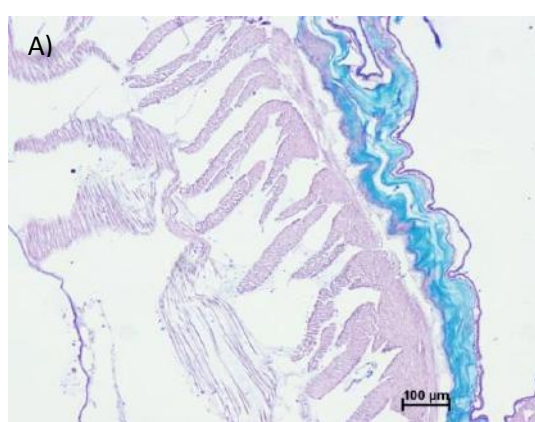
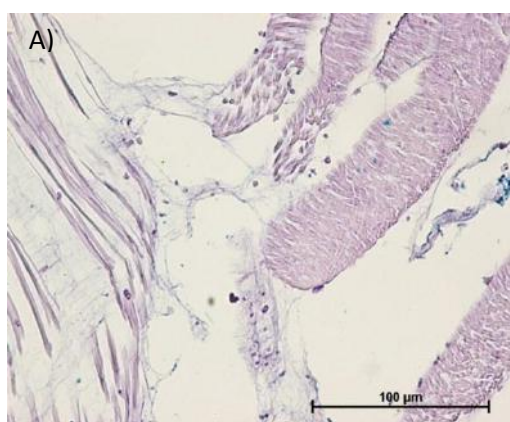


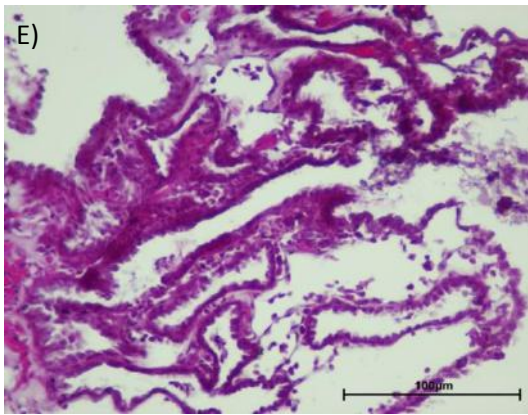
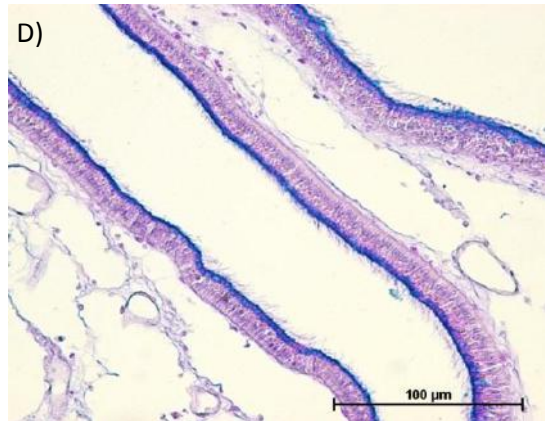
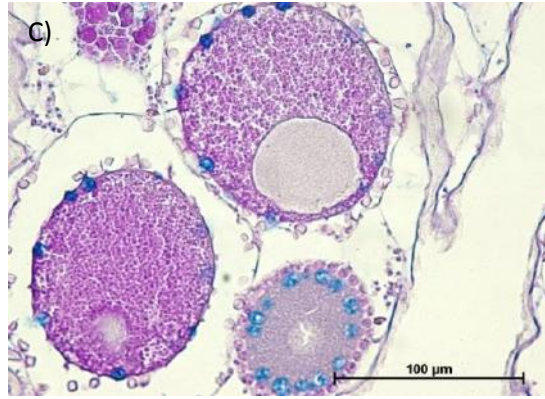
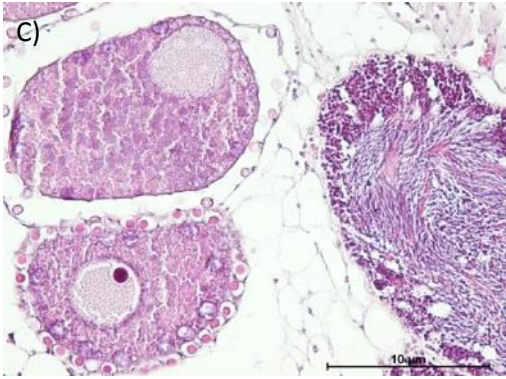
**Figura 18:** Purificação dos GAGs da fração F300 de *M. exasperatus* por cromatografia de troca-iônica DEAE-celulose. Os polissacarídeos totais extraídos da ascídia foram aplicados à coluna. As frações foram ensaiadas por metacromasia (•) e concentrações de NaCl (---). As frações indicadas por barras verticais foram dializadas contra água destilada e posteriormente liofilizadas e indicam a eluição dos GAGs em diferentes concentrações de NaCl.



## 5.6. Histoquímica da *M. exasperatus*

Para observarmos a localização dos GAGs, inicialmente realizou-se técnica de processamento dos tecidos da ascídia. Para a coloração utilizou-se hematoxilina e eosina e o azul de alciano. Pelas imagens abaixo podemos observar que a coloração com azul de alciano ocorreu preferencialmente nas células-teste da gônada, no tecido conjuntivo do manto, nas células da superfície apical do epitélio intestinal, na superfície basal do epitélio estomacal e no muco e algumas células da brânquia (Fig. 19).





**Figura 19:** Tecidos da ascídia *M. exasperatus* foram corados com Hematoxilina e Eosina e com Alcian Blue contra corado com Ácido Periódico Schiff. A presença e a localização dos PS foram confirmados pela presença do alcian blue no manto (a), estômago (b), gônada feminina (c), intestino (d) e brânquia (e). A coloração se deu preferencialmente nas células-teste da gônada, tecido conjuntivo do manto, nas células da superfície apical do epitélio intestinal, na superfície basal do epitélio estomacal e no muco e células da brânquia dos tecidos respectivamente.

## 6.0. Conclusão

A precipitação em etanol é uma abordagem metodológica comum no estudo de purificação de polissacarídeos sulfatados, e na maioria das vezes, é realizada em uma única e alta concentração (300%). A precipitação foi realizada em várias concentrações e esse simples procedimento minimiza processos futuros mais trabalhosos como é o caso da cromatografia de troca iônica já que a precipitação também atuaria promovendo uma “pré-purificação” das frações, haja visto o que ocorre com as frações F70 e F100 quando as submetemos a eletroforese em gel de agarose (Fig. 12).

As etapas de cromatografia de troca iônica foram satisfatórias já que foi obtida a separação dos compostos, bem como do contaminante, como observado no próprio cromatograma e na eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos purificados da F50. Embora não possamos confirmar a presença de GAG nas vísceras da ascídia da espécie *Microcosmus exasperatus*, sugerimos fortemente a presença de DS, CS e heparinóide, devido à migração na eletroforese em gel de agarose, pela eluição na cromatografia de troca iônica e pelo fato dos resultados obtidos nesse trabalho conferirem com dados descritos na literatura em relação à presença de GAGs em ascídias. Todavia, são necessários outros estudos para a confirmação destas informações. A realização de eletroforese em gel de agarose após a incubação das frações com enzimas específicas como a condroitim sulfato

liase AC (Chase AC), condroitim sulfato liase ABC (Chase ABC), além do tratamento químico com ácido nitroso seria crucial para a identificação e/ou confirmação da presença de GAG. Isto também poderia ser feito nos tecidos que coraram-se com alcian blue para a localização específica desses GAGs no tecido.

## 7.0. Referências Bibliográficas

CASTAÑON, M.M. (2008) Glicosaminoglicanos en hemostasia: Acción del dermatán sulfato sobre el sistema fibrinolítico\* Glycosaminoglycans on hemostasis: Dermatan sulfate action on the fibrinolytic system. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 42 (4): 509-28.

CORBO, J. C.; Di Greogorio, A.; Levine, M. (2001) The ascidian as a model organism in developmental and evolutionary biology. *Cell*. 106(5): 535-8.

COSTA et al. (2010) Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 64, 21–28.

CHAVES, D.S.A. e Costa,S.S. (2010) Metabólitos secundários de origem vegetal: Uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. *Química Nova*, Vol. 33, No. 1, 172-180.

DIETRICH, C.P., Dietrich S.M. (1976) Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem* 70: 645-647.

FERREIRA, C.N.,et al.(2010) A cell-based model of coagulation and its implication. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*; 32(5): 416-421.

FU et al. (2013) Structural Characterization of Pharmaceutical Heparins Prepared from Different Animal Tissues. *Journal of pharmaceutical sciences*, vol.102, no.5.

GOMES A.M., et al. (2010) Unique Extracellular Matrix Heparan Sulfate from the Bivalve *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) Safely Inhibits Arterial Thrombosis after Photochemically Induced Endothelial Lesion. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 285, no. 10, pp. 7312–7323.

GÓMEZ, F.P., Bover, R. (2007) The New Coagulation Cascade and Its Possible Influence on the Delicate Balance Between Thrombosis and Hemorrhage. *Revista Española de Cardiología*.

AQUINO, R.S., et al. (2005) Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycobiology* vol. 15 no. 1 pp. 11–20, 2005.

PAVÃO, M.S.G., et al. (1998) Highly Sulfated Dermatan Sulfates from Ascidiaceae: Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. *The journal of biological chemistry*. Vol. 273, No. 43, Issue of October 23, pp. 27848–27857.

PAVÃO, M.S.G., Mourão, P.A.S. (1995) A Unique Dermatan Sulfate-like Glycosaminoglycan from Ascidian -Its structure and effect unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 270, no. 52, Issue of December 29, pp. 31027–31036.

PAVÃO, M. S. G. (2002) Structure and anticoagulant properties of sulfated glycosaminoglycans from primitive chordates. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 74(1): 105-112.

Projeto de pesquisa levantamento taxonômico e potencial biotecnológico de Tunicados da enseada da urca, Rio de Janeiro (BIOTA).

RODRIGUES et al. (2009) Purificação e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele da carpa comum, *Cyprinus carpio*. *Rev. Ciênc. Agron., Fortaleza*, v. 40, n. 3, p. 381-387.



RODRIGUES, J.A.G., Farias, W.R.I. (2009) Avaliação comparativa dos polissacarídeos sulfatados extraídos de Rodofíceas *Halymenia* spp: Ferramenta taxonômica para algas? Rev. Bras. Enga. Pesca 4(1).

RODRIGUES, S.A. (1998) Guia Ilustrado para Identificação das Ascídias do Estado de São Paulo. Ed. FAPESP. São Paulo, p.134.

RUPPERT, E.E., Barnes, R.D. (1996). Zoologia dos invertebrados. Capítulo 29. Pág. 1095-1098.

TAKADA et al. (2013) A sulfated glycosaminoglycan array for molecular interactions between glycosaminoglycans and growth factors or anti-glycosaminoglycan antibodies. Analytical Biochemistry 435, 123–130.

TAMURA, Jun ichi. (2001) Recent Advances in the Synthetic Studies of Glycosaminoglycans Trends in Glycoscience and Glycotechnology, Vol. 13 No. 69 pp. 65-8.

TROWBRIDGE, J. M., Gallo, R.L. (2002) Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. Glycobiology vol. 12 no.9 pp. 117R-125R.

VIEIRA, R.P., Mulloy, B.; Mourão, P.A.S. (1991) Structure of a Fucose-branched Chondroitin Sulfate from Sea Cucumber. Evidence for the presence of 3-O-Sulfo- $\beta$ -D-Gucuronosil residues. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 266, No. 21, Issue of July 25, pp. 13530-13536.

YAMADA, S., Sugahara, k., Ozbek S. (2011) Evolution of glycosaminoglycans- Comparative biochemical study. Communicative & Integrative Biology 4:2, 150-158; Landes Bioscience.

ZHANG et al (2013) Structural Studies of the Interaction of Crataeva tapia Bark Protein with Heparin and Other Glycosaminoglycans. dx.doi.org/10.1021/bi400077b | Biochemistry, 52, 2148–2156.

<http://www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar35a.htm>

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104567/pdf/cib0402\\_0150.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104567/pdf/cib0402_0150.pdf)

<http://endovasc.med.br/wp/wp-content/uploads/2011/03/palestratev.pdf>