

EXTRAÇÃO DE MUCOPOLISSACARÍDEOS DA PELE DE CARPA-COMUM: FERRAMENTA AUXILIAR DE PARÂMETRO IMUNOLÓGICO?*

José Ariévilto Gurgel RODRIGUES, Norma Maria Barros BENEVIDES

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará - UFC

e-mails: arieviloengpesca@yahoo.com.br; nmbb@ufc.br

Recebido em: 7 de março de 2008

Resumo - Exposições a fatores químicos, biológicos e/ou físicos (estresse) na aquicultura intensiva tendem a diminuir a resistência dos peixes às doenças. Objetivou-se relacionar o isolamento de mucopolissacarídeos (conhecidos como proteoglicanos - PG) extraídos da pele da carpa comum *Cyprinus carpio* como uma ferramenta indicativa de estado nutricional e barreira física de resistência dos animais. Inicialmente, os PG foram extraídos com papaína bruta em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, seguido por cromatografia de troca iônica do extrato total em coluna de DEAE-celulose utilizando um gradiente de NaCl. Em seguida, as frações obtidas foram analisadas quanto em composição química (proteína solúvel total e açúcar total) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,5%. A técnica foi eficiente na extração dos PG e o perfil cromatográfico indicou a separação de cinco diferentes frações de glicosaminoglicanos (GAGs) (F I; F II; F III; F IV e F V), eluídas nas concentrações de 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 e 1,50 M de NaCl, respectivamente, revelando, por eletroforese, bandas diferentes entre si em densidades em cargas negativas. Desta forma, a técnica utilizada foi útil para isolar GAGs da pele de *C. carpio* sugerindo uma possível ferramenta de parâmetro imunológico.

Palavras-chave: piscicultura, *Cyprinus carpio*, digestão proleolítica, glicosaminoglicanos, sistema de defesa.

EXTRACTION OF MUCOPOLYSACCHARIDES FROM THE SKIN OF THE COMMON CARP: AN AUXILIARY TOOL FOR IMMUNOLOGICAL PARAMETER?

Abstract - Exposures to chemical, physical and/or biological factors (stress) in intensive aquaculture trend to decrease the resistance of fishes to diseases. It was objected to relate the isolation of mucopolysaccharides (known as proteoglycans - PG) extracted from the skin of the common carp *Cyprinus carpio* as an indicated tool of nutritional and resistance physical obstacle status of animals. Initially, PG were extracted with crude papain in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, followed by ion exchange chromatography on a DEAE-cellulose column using a NaCl gradient. Then, the obtained fractions were analyzed as in chemical composition (total soluble protein and total sugar), and submitted to 0.5% agarose gel electrophoresis. The technique was efficient on PG extraction, and the chromatographic profile showed five different fractions separation of glycosaminoglycans (GAGs) (F I, F II, F III, F IV and F V) eluted at concentrations of 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 and 1.50 M of NaCl, respectively, revealing, by electrophoresis, mobility of distinct bands by charge density. Thus, the technique used was useful to isolate GAGs from the skin of *C. carpio* as a possible immunological parameter tool.

Key-words: fish culture, *Cyprinus carpio*, proteolytic digestion, glycosaminoglycans, defense mechanism.

*Pesquisa desenvolvida com apoio financeiro da RENORBIO/CNPq/FUNCAP.

INTRODUÇÃO

A China é o maior produtor mundial de pescado, seguido de Peru, Estados Unidos, Japão e Indonésia, segundo estatísticas da Fao (2003) em 2001. A aquicultura no Brasil, por sua vez, desponta com crescimentos de 30% ao ano (Fao, 1999), sendo a carpa comum (*Cyprinus carpio*) uma das espécies de peixes cultivadas no País (Moreira *et al.*, 2001).

Sistemas de manejo intensivo no cultivo de organismos aquáticos, por outro lado, favorecem o aparecimento de doenças quando expostos a elevados níveis de estresse de natureza química, física e/ou biológica. Elevadas densidades de estocagem, a presença de grandes quantidades de alimento e dejetos dos animais elevam os níveis de matéria orgânica e bactérias, prejudicando a qualidade de água e causando doenças (Vadstein, 1997), bem como trazendo prejuízos para o crescimento, reprodução, saúde, sobrevivência e qualidade dos peixes (Kubitza, 2003). Também a utilização de equipamentos contaminados (tanques de transporte, redes, puçás, baldes, roupas de trabalho etc), favorece a transmissão de patógenos e parasitas aos animais, tais como por via oral (alimento e água ingerida), pele e brânquias, vetores, narinas e ânus (Kubitza & Kubitza, 1999), comprometendo as estratégias de tratamento. Desta forma, a conjunção desses fatores leva a diminuição da imunidade dos peixes, quando expostos, também a tratamentos profiláticos com o uso indiscriminado de antibióticos, induzindo, não apenas a seleção de linhagens de bactérias resistentes e riscos ambientais, mas também a transferência dessa resistência para bactérias associadas à população humana, comumente chamada de resistência cruzada (Figueiredo *et al.*, 2008a). A introdução e dispersão de espécies exóticas de peixes ameaçam os ecossistemas aquáticos e as populações de espécies nativas, gerando impactos ambientais, econômicos, sociais ou culturais (Ostrensky, 2010).

A imunidade dos organismos aquáticos é ainda pouco entendida, envolvendo um conjunto de barreiras e mecanismos físicos, químicos ou celulares de um ser vivo capaz que prevenir ou combater agressões de origem física, química ou biológica provenientes do ambiente que os cercam (Figueiredo *et al.*, 2008b). Em contribuição, diversos compostos imunoestimulantes derivados de plantas, algas marinhas etc, (Dügenci *et al.*, 2003; Farias *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2009a) e as vacinas (Figueiredo *et al.*, 2009), têm sido empregados na prevenção do estresse e enfermidades em peixes, respectivamente, de maneira manter o estado de equilíbrio homeostático (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Os peixes dispõem de mecanismos de defesa diversos, sendo assim conhecidos como não específicos (inatos do próprio animal ou espécie) e específicos (ligados à imunidade dos peixes e

adquiridas ao longo de sua vida e exposições a patógenos e parasitas). Considerado uma das principais barreiras de defesa contra organismos patogênicos, o muco também possui a propriedade de reduzir o atrito do corpo do peixe com a água, facilitando, não apenas sua natação, mas também contribuindo na função osmorregulatória do animal (Kubitza & Kubitza, 1999).

O muco de superfície contém diversos compostos como lectinas, lactoferrinas, lisozimas, componentes do sistema complemento, peptídeos antibacterianos, imunoglobulina M e pentraxinas que inibem ou dificultam a infecção e disseminação de patógenos (Figueiredo *et al.*, 2008b), enquanto aquele conhecido como mucopolissacarídeo se faz presente na pele, o qual encontra-se, na sua grande maioria, na forma de agregados complexos denominados de proteoglicanos. Nos vertebrados, essas macromoléculas estão representadas por açúcares sulfatados chamados de glicosaminoglicanos (GAGs), dos quais os galactosaminoglicanos, condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS), e os glucosaminoglicanos, heparina (HEP) e ácido hialurônico (este último não-sulfatado), são os mais conhecidos (Kjellén & Lindahl, 1991). Esses polissacarídeos também são conhecidos por apresentarem atividades anticoagulante e antitrombótica (Souza *et al.*, 2007), despertando assim grande interesse nas ciências médicas.

De forma a contribuir com os estudos sobre os mecanismos de defesa envolvidos em peixes, a proposta deste trabalho foi extrair GAGs da pele da carpa comum, *C. carpio*, e relacioná-los como possíveis parâmetros de avaliação para o diagnóstico aparente da condição de estado nutricional e defesa física desses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

REMOÇÃO DA PELE DO MÚSCULO

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

EXTRAÇÃO DOS GAGs

Os GAGs totais foram obtidos através da combinação de duas metodologias (Farias *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2007), como mostradas na figura 1. Inicialmente, a pele desidratada ao sol foi hidratada

com 80 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (AcNa) (Vetec Química) (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM (Sigma Chemical) e EDTA 5 Mm (QEEL). Em seguida, foram adicionados 30% de papaína bruta (Vetec Química), sendo a mistura incubada em banho-maria (MARCONI, modelo MA 159) a 60 °C por 48 horas. Após incubação, o material foi filtrado, centrifugado (8.000 × g; 4 °C; 30 min.) e, ao sobrenadante, adicionados 3,5 mL de uma solução de cloreto cetilpiridínio (CCP) (Sigma Chemical) a 10% para precipitação dos GAGs (25 °C; 72 h). O precipitado foi lavado com 200 mL de CCP 0,05%, dissolvido em 100 mL de NaCl 2 M: etanol absoluto (100: 15; v/v) e submetido a uma nova precipitação através da adição de 80 mL de etanol absoluto (4 °C; 24 h). Logo após a precipitação, o material assim obtido foi centrifugado, submetido a duas lavagens com 100 mL de etanol 80% e uma outra lavagem com etanol absoluto (100 mL), e finalmente seco em estufa (MARCONI, modelo MA 035) à 40 °C por 48 h.

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

O extrato total foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (Sigma Chemical) percolada como mesmo tampão de extração (AcNa) até a completa remoção dos polissacarídeos não retidos, seguido do fracionamento dos GAGs por eluição com o mesmo tampão de equilíbrio contendo concentrações diferentes de NaCl (0,50; 0,75; 1,00; 1,25 e 1,50 M). As frações obtidas foram monitoradas através da propriedade metacromática usando o azul 1,9-dimetilmetileno (ADM) (Sigma-Aldrich) segundo Farndale *et al.* (1986) em espectrofotômetro a 525 nm (AMERSHAM BIOSCIENCES ULTROSPEC 1100). Em seguida, as frações de GAGs foram concentradas por liofilização e as soluções preparadas mantidas sob refrigeração a 4°C.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As frações metacromáticas de GAGs (15 µg) obtidas do fracionamento em DEAE-celulose foram aplicadas no gel preparado em tampão 1,3-acetato diaminopropano 0,05 M (Aldrich) (pH 5,0). A corrida foi realizada utilizando-se voltagem constante (110 V) durante 60°C. Após a corrida, os GAG presentes no gel foram fixados com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio a 0,1% (Vetec Química) por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina a 0,1% (Vetec Química) e descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v/v/v), segundo Dietrich & Dietrich (1976).

ANÁLISES QUÍMICAS

O conteúdo de carboidrato total (CT) das frações foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico por Dubois *et al.* (1956), utilizando a galactose para a obtenção da curva padrão. O conteúdo de proteínas totais solúveis (PTS) foi estimado pelo método descrito por Bradford (1976) usando albumina sérica bovina como padrão.

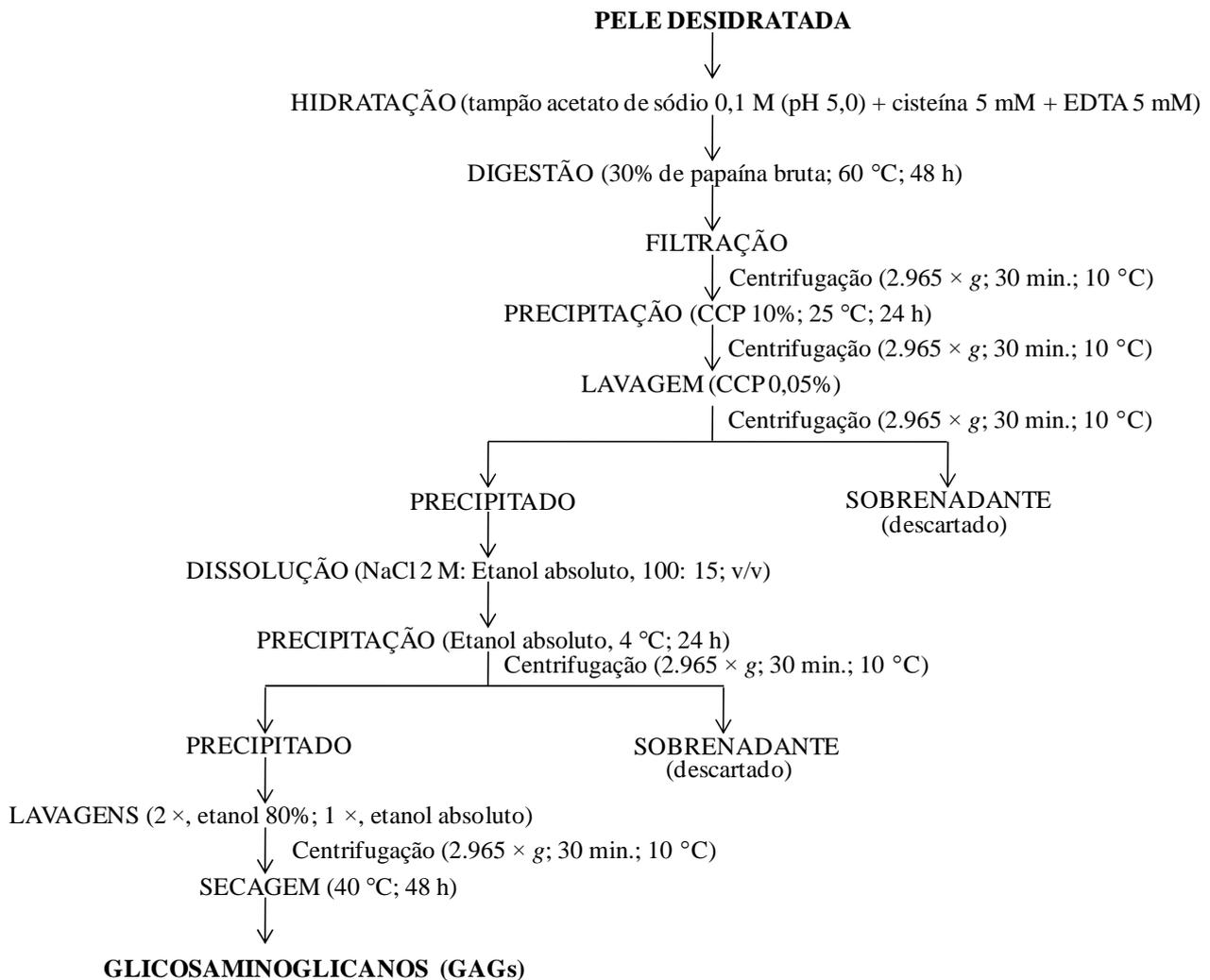


Figura - 1. Fluxograma de obtenção dos GAGs presentes na pele da carpa-comum, *Cyprinus carpio*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aquicultura comercial é atualmente responsável pela maior fonte de proteína de origem animal, atendendo aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo. A competitividade no mercado interno e

externo vem se comportando proporcional ao crescimento da atividade. O controle sanitário da produção também tem sido amplamente recomendado como forma legal e obrigatória por órgãos governamentais de fiscalização. Tal certificação tem como objetivo monitorar, controlar e informar a ocorrência de doenças em aquicultura (Figueiredo & Leal, 2008).

O manejo inadequado geralmente propicia aos peixes a uma série de problemas nutricionais, bem como susceptibilidade a diferentes enfermidades de origem infecciosa e parasitária (Martins, 1998). A busca de novas ferramentas que auxiliem na melhor compreensão da imunidade inata em peixes (muco, escamas, pele, mecanismos fisiológicos e hormonais), bem como estratégias de avaliação desses parâmetros imunológicos, principalmente quando os organismos aquáticos são expostos a condições adversas de cultivo (má nutrição, variações na qualidade de água, inadequada condição sanitária, infestações por parasitas e patógenos, alta densidades nos cultivos etc), são extremamente importantes com o crescimento da aquicultura no mundo.

EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS GAGs EM COLUNA DE TROCA IÔNICA DEAE-CELULOSE

A utilização da digestão enzimática de proteínas por enzimas proteolíticas (papaína) na extração e/ou assim como de CCP na concentração por precipitação de polissacarídeos sulfatados (PS) vem sendo bastante utilizada em organismos aquáticos, tais como peixes e algas marinhas. Por exemplo, o glicosaminoglicano CS e outros compostos contendo glucosaminas semelhantes a grupos HEP ou HS foram obtidos e fracionados por precipitação com CPC de guelras da carpa-comum *C. carpio* (Wasserman *et al.*, 1972); precipitações de DS, CS e ácido hialurônico foram obtidas da carpa indiana *Labeo rohita* (Sikder & Das, 1979); DS e CS foram extraídos das peles das espécies de raias marinhas, *Dasyatis americana*, *D. guttata*, e *Aetobatus narinari*, e da espécie de raia de água doce *Potamotrygon motoro* (Dellias *et al.*, 2004); DS, CS e HS do tecido muscular do bacalhau *Gadus morhua* e peixe lobo *Anarhichas minor* (Tingho *et al.*, 2005) e DS da pele da enguia elétrica *Electrophorus electricus* nativa do Rio Amazonas (Souza *et al.*, 2007).

Na extração de PS presentes em algas marinhas, também se empregando a enzima papaína, bem como o CCP para a concentração por precipitação desses compostos, podemos citar a obtenção de galactanas sulfatadas das espécies de algas vermelhas *Botryocladia occidentalis* (Farias *et al.*, 2000), *Gelidium crinale* (Pereira *et al.*, 2005) e *Halymenia pseudofloresia* (Rodrigues *et al.*, 2009b), e fucanas sulfatadas da alga marinha *L. variegata* (Rodrigues *et al.*, 2009a).

Neste trabalho, o emprego da enzima papaína durante a extração e CCP na precipitação dos GAGs presentes na pele de *C. carpio* demonstrou-se eficiente. A purificação dos polissacarídeos por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose resultou na separação de cinco diferentes frações de GAGs (F I; F II; F III; F IV e F V) eluídas nas concentrações de 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 e 1,50 M de NaCl, respectivamente (Figura 2). A maior metacromasia foi observada na fração F II, eluída com 0,75 M de NaCl, seguida das frações F III e F IV (1,00 e 1,25 M), respectivamente. Desta forma, a resina de troca iônica mostrou-se eficiente no fracionamento dessas macromoléculas, o que denota que a espécie estudada é rica em GAGs na pele.

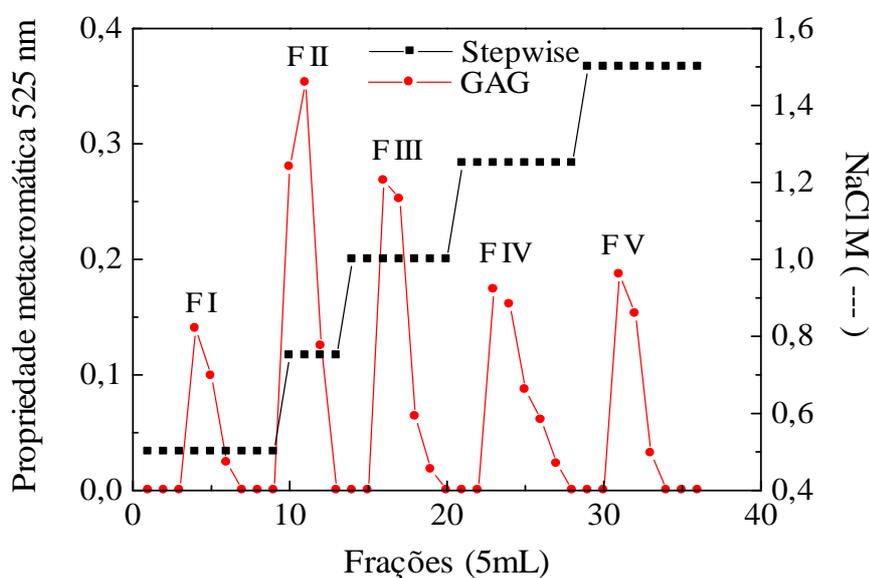


Figura - 2. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose do extrato total de GAGs da pele da carpa-comum, *Cyprinus carpio*. A coluna foi equilibrada com tampão AcNa. Os GAGs adsorvidos no gel foram eluídos com o tampão AcNa contendo NaCl em concentrações diferentes (0,50; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,50 M). (■—■) propriedade metacromática (GAG); (■—■) gradiente salino (stepwise).

Embora as vacinas e os imunostimulantes, produtos que agem no sistema imune contra diversas enfermidades, sejam, de uma maneira geral, eficientes, somente as defesas inespecíficas do organismo não são capazes de evitar a grande variedade de infecções. Tal fato é justificado devido à capacidade que os patógenos têm de driblar a imunidade inata e, assim, causar doenças ao hospedeiro. Para melhor alcançar melhores repostas nos tratamentos contra as doenças, sem causar seleção microbiana e esiduabilidade nos animais com o uso de antibióticos, por exemplo, deve-se, sobretudo, conhecer as defesas naturais dos organismos aquáticos (Figueiredo *et al.*, 2009).

Os mucopolissacarídeos (proteoglicanos) são encontrados nas cartilagens, na pele e no líquido sinovial (Menezes, 1991). As funções dos GAGs estão relacionadas com a resistência à infecções (Warren & Granham, 1950), controle de água e eletrólitos, cicatrização (Dorfman, 1958), atividade anticoagulante (Colburn & Buonassi, 1982), divisão e crescimento celular (Dietrich, 1984), dentre outras. Nos peixes, o muco promove defesa contra organismos patogênicos devido a sua ação neutralizante, bactericida e fungicida, sendo sua produção regulada por mecanismos hormonais, a qual vem a aumentar durante a infestação por parasitas ou exposição dos peixes a águas com pH ácido (< 5,5) ou alcalino (> 10). Desta forma, uma nutrição balanceada é requisito básico para a produção normal de muco nos animais durante eventos que promovam estresse (despescas, transporte, reprodução etc), enquanto o inadequado manejo terapêutico com produtos químicos (antibióticos e formalina) e aqueles de ações oxidativa (permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio e cloro), podem resultar na destruição da camada protetora de muco, favorecendo a ação de parasitas e patógenos (Kubitza & Kubitza, 1999).

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As frações F II, F III e F IV, ao serem submetidas ao procedimento eletroforético, mostraram um perfil migratório bastante similar entre si (Figura 3). No entanto, a F II revelou a presença de componentes distintos durante sua mobilidade eletroforética, quando comparada as frações F III e F IV. A mistura de GAGs encontrada na F II sugere diferenças marcantes na densidade de cargas negativas dessas moléculas. A banda metacromática que apresentou menor mobilidade no gel foi mais carregada quando comparada as duas outras obtidas na F II. As frações F III e F IV, por sua vez, indicaram um alto grau de resolução, quando bandas homogêneas e bastante carregadas foram obtidas no gel.

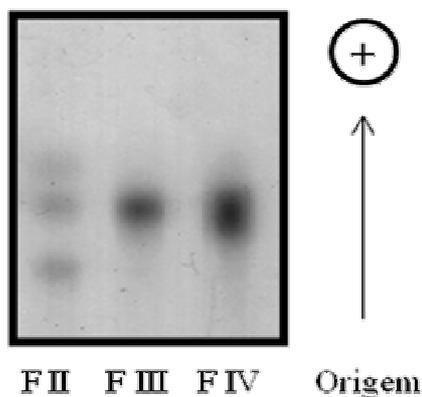


Figura - 3. Revelação das frações (F II; F III e F IV) de GAGs por eletroforese em gel de agarose da carpa-comum, *Cyprinus carpio*. As frações foram coradas com azul de toluidina a 0,1%.

Normalmente, o DS é o GAG predominante na pele de vertebrados marinhos (Baú, 1998; Baú, 2003; Dellias *et al.*, 2004; Nandini *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2007), enquanto o CS e HS ocorrem em baixas concentrações em outras espécies de peixes (BAÚ, 1998). Sikder e Das (1979) isolaram uma mistura de GAG (DS, CS e ácido hialurônico) da espécie de carpa indiana *L. rohita*. Baú (1998) isolou por proteólise seguida de precipitação por etanol e fracionamento por acetona o glicosaminoglicano HEP das peles das espécies de peixes marinhos *Tuna thynnus*, *Gadus morhua* e *Epinephalus* sp. Baú (2003) relatou a presença de DS na pele do atum *Katsuwonus pelamis* e do CS em cartilagens de nadadeira e coluna vertebral em dez espécies de tubarões. HSs identificados em duas espécies de peixes de regiões temperadas mostraram diferentes proporções no conteúdo de sulfato entre o bacalhau do Atlântico *Gadus morhua* comparado ao peixe lobo *Anarhichas minor* (Tingbor *et al.*, 2005).

Neste trabalho, a análise por eletroforese revelou uma mistura de GAGs na fração F II e a ubiquidade de frações de GAGs (F III e F IV) isoladas da pele de *C. carpio* (Figura 3). Este fato também vem a reforçar a elevada metacromasia encontrada na fração F II do perfil cromatográfico em DEAE-celulose (Figura 2). Desta forma, a identificação do (s) GAG (s) presente (s) na pele de *C. carpio* sugere estudos posteriores.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química das frações de GAGs isoladas da pele de *C. carpio* está mostrada na tabela 1. O AT foi maior na F III, eluída com 1,00 M de sal, quando comparada às demais, enquanto que o conteúdo de PTS não foi mensurado na maioria das frações de GAGs (Tabela 1). O conteúdo traço de PTS obtido na F II foi justificado pela presença das três diferentes bandas observadas durante a migração eletroforética (Figura 3).

Tabela - 1. Açúcares totais (AT) e proteína total solúvel (PTS) das frações de GAGs obtidas por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) da carpa-comum, *Cyprinus carpio*

Frações	NaCl (M)	AT (%)	PTS (%)
F I	0,50	nd	nd
F II	0,75	21,30	traços
F III	1,00	40,69	-
F IV	1,25	29,45	-
F V	1,50	nd	nd

nd: não determinado e -: não detectado.

Os GAGs são heteropolissacarídeos constituídos por unidades de açúcares formadas por uma glicosamina ou galactosamina, um ácido D-glucurônico ou L-idurônico ou ainda galactose (Dietrich *et al.*, 1976; Medeiros *et al.*, 1999; Dellias *et al.*, 2004).

Em suma, a caracterização química do (s) GAG (s) sugere posteriores investigações, principalmente em estudos de atividades biológicas, como esses compostos são também conhecidos (Dellias *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2007). Embora que seja provocativa, a detecção dessas moléculas por emprego da técnica (extração e fracionamento) poderia vir a ser utilizada como uma ferramenta adicional de fator de parâmetro de resposta de defesa imunológica para peixes cultivados comercialmente, haja vista o pouco conhecimento da imunidade desses animais. Para tanto, bioensaios utilizando diferentes espécies de peixes, com exposição dos animais a diferentes situações de estresse, seriam indicados, de forma a melhor compreender o papel biológico dos GAGs presentes nesse grupo de vertebrados aquáticos.

CONCLUSÃO

A extração de glicosaminoglicanos da pele da carpa-comum (*C. carpio*), seguido por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, revela, por eletroforese, moléculas distintas entre si em densidade de cargas negativas, sugerindo assim estudos complementares de caracterização química. A utilização desses polissacarídeos em diferentes modelos de atividades biológicas também seria fortemente recomendada. Acredita-se que a técnica em questão poderia vir a ser vantajosa em estudos sobre a imunidade inata de peixes de interesse comercial.

REFERÊNCIAS

- Bau, E.C. (2003). *Isolamento, purificação, caracterização e atividades farmacológicas de glicosaminoglicanos sulfatados de diferentes espécies marinhas*. [Tese de Doutorado]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo.
- Bau, E.C. (1998). *Glicosaminoglicanos de pele de peixes de diferentes salinidades: estrutura e atividades farmacológicas do dermatam sulfato de *Katsuwonus pelamis**. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Colburn, P. & Buonassi, V. (1982). Anti-clotting activity of endothelial cell-cultures and heparin sulfate proteoglycans. *Biochemica at Biophysica Research Communication*, 104: 220-227.

Dellias, J.M.M.; Onofre, G.R.; Werneck, C.C.; Landeira-Fernandez, A.M.; Melo, F.R.; Farias, W.R.L.; Silva, L.C.F. (2004). Structural composition and differential anticoagulant activities of dermatan sulfates from the skin of four species of rays, *Dasyatis Americana*, *Dasyatis guttata*, *Aetobatus narinari* and *Potamotrygon motoro*. *Biochimie*, 86(9-10): 677-683.

Dietrich, C.P. (1984). A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycan. *Brazilian of Journal Medical Biology Research*, 17: 5-15.

Dietrich, C.P. & Dietrich, S.M.C. (1976). Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Analytical Biochemistry*, 70(2): 645-647.

Dorfman, A. (1958). Studies on the biochemistry of connective tissue. *Pediatre*, 22: 576-591.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350-356.

Düğenci, S.K., Arda, N. & Candan, A. (2003). Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethopharmacology*, 88(1): 99-106.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Overview of fish production, utilization, consumption and trade*. (2003). Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/overview/2001/commodity/2001fisheryoverview.pdf>. Acesso: 15 de set. 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *The state of world fisheries and aquaculture 1998*. Information Division. Roma, 1999. 112 p.

Farias, W.R.L.; Rebouças, H.J.; Torres, V.M.; Rodrigues, J.A.G.; Pontes, G.C.; Silva, F.H.O.; Sampaio, A.H. (2004). Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. *Revista Ciência Agronômica*, 35(número especial): 189-195.

Farias, W.R.L.; Valente, A.P.; Pereira, M.S.; Mourão, P.A.S. (2000). Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38): 29299-29307.

Figueiredo, H.C.P.; Castro, G.A.C.; Leal, C.A.G.; Netto, L.N. (2009). Uso de vacinas na piscicultura: verdades, mitos e perspectivas. *Panorama da Aqüicultura*, 19(115): 22-31.

Figueiredo, H.C.P.; Godoy, D.T. & Gomes, C.A. (2008a). Sanidade aquícola: antibióticos na aquíicultura. *Panorama da Aquíicultura*, 16(105): 42-49.

Figueiredo, H.C.P.; Lopes, C.O.; Leal, C.A.G. (2008b). Sanidade aquícola: imunidade de animais aquícolas. *Panorama da Aquíicultura*, 18(106): 14-19.

Figueiredo, H.C.P. & Leal, C.A.G. (2008). Sanidade aquícola: certificação sanitária na aquíicultura. *Panorama da Aquíicultura*, 18(107): 14-20.

Farndale, R.W.; Buttle, D.J. & Barrett, A.J. (1986). Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimistry et Biophysica Acta*, 883(2): 173-177.

Kjellén, L. & Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: structure and interactions. *Annual Review of Biochemistry*, 60: 443-475.

Kubitza, F. (2003). A evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercados. *Panorama da Aquíicultura*, 13(76): 25-35.

Kubitza, F. & Kubitza, L.M.M. (1999). *Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados*. 3^a ed. Jundiaí: F. Kubitza. 95 p.

Martins, M. L. (1998). *Doenças infecciosas e parasitárias de peixes*. Jaboticabal: Funep.

Medeiros, G.F. (1999). Distribuição de glicosaminoglicanos sulfatados em invertebrados, presença de heparina nos filos crustaceae e echinodermata. [Tese de Doutorado]. São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo.

Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochemical et Biophysica Acta*, 1475: 285-294.

Menezes, D.B. (1991). *Biologia Celular e Molecular*. Fortaleza: Stylus comunicações, 390 p.

Moreira, H.L.M.; Vargas, L.; Ribeiro, R.P.; Zimmermann, S. (2001). *Fundamentos da moderna aquíicultura*. Canoas: Ed. ULBRA, 200 p.

Nandini, C.D., Itoh, N. & Sugahara, K. (2005). Novel 70-kDa chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains with a unique heterogeneous sulfation pattern from shark skin, which exhibit neuritogenic activity and binding activities for growth factors and neurotrophic factors. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 4058-4069.

Ostrensky, A. (2010). Aqüicultura e biodiversidade: precaução ou exagero?. *Panorama da Aqüicultura*, 19(116): 30-37.

Pereira, M.G.; Benevides, N.M.B.; Melo, M.R.S.; Valente, A.P.; Melo, F.R.; Mourão, P.A.S. (2005). Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?. *Carbohydrate Research*, 340(12): 2015-2023.

Rodrigues, J.A.G.; Alencar, D.B.; Pires, K.M.S.; Saboya, J.P.S.; Araújo, G.S.; Torres, V.M.; Farias, W.R.L. (2009a). Efeitos dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata* em alevinos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidos à diferentes salinidades. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 4(2): 20-33.

Rodrigues, J.A.G.; Torres, V.M.; Alencar, D.B.; Sampaio, A.H.; Farias, W.R.L. (2009b). Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. *Revista Ciência Agronômica*, 40(2): 224-231.

Sikder, S.K. & Das, A. (1979). Isolation and characterization of glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) from the skin of the fish *Labeo rohita*. *Carbohydrate Research*, 71(1): 273-285.

Souza, M.L.S.; Dellias, J.M.M.; Melo, F.R.; Silva, L.C.F. (2007). Structural composition and anticoagulant activity of dermatan sulfate from the skin of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 147(3): 387-394.

Tavares-Dias, M. & Moraes, F.R. (2004). *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 144 p.

Tingho, M.G.; Kolset, S.O.; Ofstad, R.; Enersen, G.; Hannesson, K.O. (2005). Sulfated glycosaminoglycans in the extracellular matrix of muscle tissue in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Spotted wolffish (*Anarhichas minor*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140(3): 349-357.

Vadstein, O. (1997). The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*, 155(1-4): 405-421.

Warren, J.R. & Granham, F. (1950). The effect of heparin on the growth of bacteria and yeasts. *Journal of Bacteriology*, 60: 171-178.

Wasserman, L., Ber, A. & Allalouf, D. (1972). Acidic glycosaminoglycan composition of the gills of *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 42(4): 669-677.