

GLICOSIDASES E SULFATASES NO MOLUSCO MARINHO *APLYSIA CERVINA*

L.D.M. da Matta & L.R.D. de Abreu*

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Av. Senador Salgado Filho, S/N, Lagoa Nova, CEP: 59072-970, Natal, RN, Brasil. E-mail: lucianamatta@cb.ufrn.br.

RESUMO

Glicosaminoglicanos (GAGs) são carboidratos presentes em todos os organismos que apresentam organização tissular. Glicosidases e sulfatases são as enzimas envolvidas na degradação destes compostos em vertebrados e invertebrados. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença destas enzimas em diferentes tecidos do molusco *Aplysia cervina*. O molusco foi dissecado em esôfago, fígado, moela e músculo e homogeneizados separadamente. Após centrifugação os sobrenadantes (extratos brutos) foram fracionados com sulfato de amônio nas concentrações de 0-30% (F-I), 30-50% (F-II) e 50-80% (F-III). Foi identificada a presença de sulfatase, β -glucuronidase, β -D-N-acetilgalactosaminidase e α -glucosaminidase nos extratos brutos de todos os tecidos investigados. A enzima α -fucosidase não foi detectada em esôfago, nos extratos brutos e F-I de moela, mas sim nas frações de fígado e músculo. A sulfatase apresentou-se mais ativa na F-III de fígado e moela com atividades específicas de 3,0 e 4,8, respectivamente. A α -glucosaminidase foi mais ativa nas frações F-III de esôfago e músculo apresentando atividades específicas de 3,9 e 2,0, respectivamente. Estes resultados indicam a existência de atividade catabólica sobre os GAGs neste invertebrado marinho.

PALAVRAS-CHAVE: Glicosaminoglicanos, glicosidases, sulfatases, metabolismo, invertebrados, *Aplysia cervina*.

ABSTRACT

GLYCOSIDASES AND SULFATASES FROM THE MARINE MOLLUSC *APLYSIA CERVINA*. Glycosaminoglycans (GAGs) are carbohydrates present in all organisms with tissue organization. Glycosidases and sulfatases are the enzymes involved in their degradation in vertebrates and invertebrates. The objective of this work was to identify the presence of these enzymes in different tissues of the mollusc *Aplysia cervina*. The mollusc was dissected, separating out the esophagus, liver, gizzard and muscle, which were homogenized separately. After centrifugation the supernatants (crude extracts) were fractionated with ammonium sulfate in the concentrations of 0-30% (F-I), 30-50% (F-II) and 50-80% (F-III). The presence of the sulfatase, β -glucuronidase, β -D-N-acetilgalactosaminidase and α -glucosaminidase was identified in the crude extracts of all studied tissues. α -fucosidase was not found in the esophagus or in the crude extracts and F-I from gizzard, but was detected in the fractions from liver and muscle. Sulfatase was more active in F-III from liver and gizzard, demonstrating specific activity of the 3.0 and 4.8, respectively. α -glucosaminidase was more active in the F-III fraction from esophagus and muscle presenting 3.9 and 2.0 specific activities, respectively. These results indicate the existence of catabolic activity on GAGs in these marine invertebrate.

KEY WORDS: Glycosaminoglycans, glycosidases, sulfatases, metabolism, invertebrates, *Aplysia cervina*.

INTRODUÇÃO

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são heteropolissacarídeos constituídos por unidades dissacarídicas formadas por uma glicosamina ou galactosamina, um ácido D-glucurônico ou L-idurônico ou ainda galactose. Estes açúcares geralmente

a apresentam grupamentos sulfato em diferentes posições de suas estruturas. Os principais tipos de glicosaminoglicanos são: ácido hialurônico, condroitim 4- e 6-sulfatos, dermatansulfato, heparansulfato, queratansulfato e heparina. O estudo da distribuição destes compostos mostrou que eles estão presentes em todos os filos do reino animal que

*Apoio Financeiro: CNPq-PIBIC.

apresentam organização tissular (DIETRICH *et al.*, 1976; MEDEIROS *et al.*, 2000).

As funções dos GAGs estão relacionadas com a resistência à infecção (WARREN & GRANHAM, 1950), controle de água e eletrólitos, cicatrização (DORFMAN, 1958), atividade anticoagulante (COLBURN & BUONASSI, 1982), divisão e crescimento celular (DIETRICH, 1984; PORCIONATO *et al.*, 1999), adesão celular (STALLCUP *et al.*, 1990), reconhecimento intercelular (LÓPEZ-CASTILHAS *et al.*, 1991) e manutenção da transparência da córnea (KRESSE *et al.*, 1993), dentre outras.

O estudo do metabolismo do heparam sulfato e heparina em mamíferos e outros vertebrados, revelou que estes compostos são inicialmente degradados a fragmentos de baixo peso molecular por endoglicosidases. Estes fragmentos são então completamente degradados por ação seqüencial e alternada de exoglicosidases e sulfatases específicas (GLASER & CONRAD, 1979). A deficiência de algumas enzimas envolvidas no catabolismo destes GAGs leva ao acúmulo de intermediários destes compostos nos tecidos e aumento da sua excreção urinária, podendo levar a sérias complicações tais como: retardo mental, problemas visuais, deformações físicas e óbito (SUZUKI *et al.*, 1997).

Alguns trabalhos já foram realizados em que se identificou a presença de glicosidases e sulfatases que degradam polissacarídeos ácidos em vários invertebrados marinhos pertencentes aos filos mollusca (SOUZA FILHO *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1994; MEDEIROS *et al.*, 1998), equinodermata (KUSAYKIN *et al.*, 2003), artropoda (KUSAYKIN *et al.*, 2003), dentre outros.

O estudo da degradação do Heparam sulfato no molusco *Tagelus gibbus* realizado por MEDEIROS *et al.* (1998) evidenciou que as glicosidases e sulfatases agem a fim de degradar o heparam sulfato liberando sulfato inorgânico, glucosamina *N*-sulfato, *N*-acetilglucosamina-6-sulfato e outros oligossacarídeos como produtos. Estes resultados, quando comparados à degradação do heparam sulfato em vertebrados, indicaram a existência de uma rota diferente de degradação destas moléculas neste invertebrado.

Com o propósito de estudar o metabolismo dos GAGs em outras espécies de invertebrados, este artigo relata a identificação de glicosidases e sulfatases em diferentes tecidos do molusco *Aplysia cervina*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes Utilizados

Os substratos utilizados para a realização deste estudo foram os p-nitrofenil derivados de açúcar (p-nitrofenil sulfato, p-nitrofenil- β -D-glucuronídeo, p-nitrofenil- β -D-*N*-acetilgalactopiranosídeo,

p-nitrofenil- α -glucopiranosídeo, p-nitrofenil- α -L-fucopiranosídeo) adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Obtenção dos extratos brutos

Os moluscos, da espécie *Aplysia cervina*, foram gentilmente coletados e cedidos pela administradora de uma fazenda de cultivo de camarão (Marisa Sonehara) situada no litoral sul do Rio Grande do Norte e então armazenados a -20°C até sua utilização.

Os moluscos foram descongelados, mantidos a 4°C e dissecados com o auxílio de uma tesoura de dissecação. A porção ventral foi seccionada e os órgãos internos expostos. Após a identificação, o esôfago, o fígado, a moela e os músculos foram isolados e transferidos separadamente para um homogenizador de tecidos contendo tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. As porções foram, separadamente, homogeneizadas e em seguida centrifugadas a 15.000 RPM por 15min a 4°C. O precipitado foi descartado e a fração solúvel (denominada de extrato bruto) foi submetida ao fracionamento com sulfato de amônio.

Fracionamento com sulfato de amônio

Os extratos brutos foram individualmente precipitados em três etapas de saturação com sulfato de amônio: 0-30%, 30-50% e 50-80%. A solução de cada passo de saturação foi centrifugada após 16h e os precipitados resultantes foram ressuspensos em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 e em seguida dialisados contra o mesmo tampão realizando-se quatro trocas. Essas frações foram denominadas F-I, F-II e F-III, referindo-se aos percentuais de saturação 0-30%, 30-50% e 50-80%, respectivamente.

Determinação das Atividades Enzimáticas

A determinação das atividades enzimáticas presentes nos extratos do molusco *Aplysia cervina* foram realizadas utilizando-se como substratos específicos os p-nitrofenil derivados de açúcar: p-nitrofenil- β -D-glucuronídeo, p-nitrofenil- β -D-*N*-acetilgalactopiranosídeo, p-nitrofenil- α -glucopiranosídeo, p-nitrofenil- α -L-fucopiranosídeo e o p-nitrofenil-sulfato. Estes testes foram realizados utilizando-se 10 mM de cada substrato sintético juntamente com os extratos brutos e as frações obtidas da precipitação com sulfato de amônio (F-I, F-II e F-III). Os experimentos foram realizados a 37°C durante 60min. As reações foram interrompidas pela adição de 1 mL de hidróxido de sódio 0,25 M e o p-nitrofenolato liberado, quantificado em espectrofotômetro a 405 nm. Em todos os experimentos foram feitos controles negativos dos substratos (experimentos contendo 10 mM de cada substrato acrescido de

tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0) e das frações enzimáticas (experimentos contendo somente as frações-extratos brutos, F-I, F-II e F-III e tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0) sendo estes submetidos às mesmas condições de ensaio. A atividade específica foi determinada levando-se em consideração a quantidade de p-nitrofenol liberado e a massa em μg de proteína contida no volume de cada fração ensaiada, por um período de uma hora. A determinação das proteínas foi feita pelo método de BRADFORD (1976) utilizando albumina bovina como padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados iniciais mostraram que, nos extratos brutos de esôfago e moela, foram identificadas as atividades sulfatásica, β -glucuronidásica, β -N-acetilglucosaminidásica e α -glucosaminidásica, esta última apresentando-se mais elevada que as demais com atividade específica (AE) de 3,9 e 1,4, respectivamente. Nestes extratos não foi identificada a atividade de α -fucosidásica (Figs. 1 e 3). Nos extratos brutos de fígado e músculo, foi possível identificar todas as enzimas pesquisadas: sulfatase, β -glucuronidase, β -N-acetilglucosaminidase, α -glucosaminidase e α -fucosidase (Figs. 2 e 4), e, como no esôfago e moela, a enzima α -glucosaminidase apresentou maior atividade com AE de 1,9 e 1,1, respectivamente.

A presença das enzimas sulfatase, β -glucuronidase, β -D-N-acetilgalactosaminidase e α -glucosaminidase no molusco pode indicar atividade metabólica sobre glicosaminoglicanos, por se tratarem de enzimas típicas do catabolismo destes compostos (CAPILA & LINHARDT, 2002; HANSON, *et al.*, 2004).

A identificação da α -fucosidase indica atividade metabólica em relação às fucanas, polissacarídeos ácidos constituídos por fucose, encontrados em invertebrados marinhos, como em *Strongylocentrotus franciscanus* (PEREIRA *et al.*, 2002) e em algas marinhas.

Nos experimentos realizados, com frações derivadas do fracionamento com sulfato de amônio de esôfago (Fig. 1), verificou-se que a enzima α -glucosaminidase foi precipitada em F-III apresentando AE de 3,9, atividade esta, maior que todas as outras determinadas para este tecido. Não foram encontradas as enzimas β -D-N-acetilgalactosaminidase, α -glucosaminidase e α -fucosidase na F-I. As enzimas sulfatase e β -glucuronidase foram precipitadas na F-III, com AE de 2,0 e 0,5, respectivamente, enquanto a β -D-N-acetilgalactosaminidase nas frações F-II e F-III, com 0,9 de AE. A α -fucosidase não foi identificada em nenhuma das frações. Estes resultados são semelhantes aos encontrados na literatura em que foram

determinadas atividades de glicosidases e sulfatases nos extratos enzimáticos dos moluscos *Anomalocardia brasiliensis* (SOUZA FILHO *et al.*, 1990), *Pomacea* sp. (OLIVEIRA *et al.*, 1994), *Tagelus gibbus* (MEDEIROS *et al.*, 1998) e *Littorina kurila* (KUSAYKIN *et al.*, 2003).

Nas frações obtidas de fígado (Fig. 2), detectou-se elevada atividade sulfatásica em todas as frações, porém maior na F-III com 3,0 de atividade específica, sendo esta a mais ativa neste tecido. Estes resultados podem ser relacionados com os obtidos no mexilhão marinho *Mytilus edulis*, onde foi determinada a presença de uma sulfatase em seus ovócitos, que atua sobre o p-nitrocatecol sulfato um substrato sintético semelhante ao p-nitrofenil-sulfato (PIPE & MOORE, 1985). Foi possível ainda, identificar atividade α -glucosaminidase nas frações F-II e F-III com semelhantes intensidades com AE de 1,7 e 1,8, respectivamente. A enzima α -fucosidase, apesar de ter sido encontrada em todas as frações, apresentou maior atividade específica (1,1) na F-II, enquanto a β -D-N-acetilgalactosaminidase foi igualmente precipitada nas frações F-II e F-III apresentando atividades específicas de 0,4. A β -glucuronidase não foi identificada na F-I, mas apresentou maior atividade na F-II, com 0,3 de AE.

Nas frações de moela (Fig. 3), é possível verificar intensa ação sulfatásica na F-III, na qual a enzima apresentou AE de 4,8 e, como no fígado, a atividade desta enzima é maior do que as outras. A enzima α -glucosaminidase foi precipitada nas frações F-I, F-II e F-III, embora na F-II ela tenha apresentado maior atividade com AE de 2,7. A enzima β -D-N-acetilgalactosaminidase foi encontrada em todas as frações, mas apresentou-se maior em F-II com AE de 1,5. As demais atividades apresentaram-se mais baixas. A realização deste fracionamento possibilitou a identificação da α -fucosidase que não foi encontrada no extrato bruto. A não detecção desta atividade enzimática nos extratos brutos deste tecido pode ser devido à presença de moléculas, que possam ter interferido na atividade da enzima, inibindo-a. O fracionamento destas enzimas com sulfato de amônio pode ter excluído este tipo de interferência e as atividades enzimáticas foram ressaltadas nas frações onde os inibidores não foram co-precipitados com as enzimas. A presença de uma fucosidase com ação degradativa sobre fucanas da alga marinha *Ascophyllum nodosum* foi identificada em glândulas digestivas do molusco *Pecten maximus* (DANIEL *et al.*, 1999), como ainda, foi identificada em várias espécies de invertebrados marinhos (coelenterados, anelídeos, equinodermos, nemertíneos e artropoda) a presença de enzimas denominadas fucoidan hidrolases (degradam fucoidan, um outro tipo de polissacarídeo encontrado em algas marinhas) e diversas glicosidases (KUSAYKIN *et al.*, 2003).

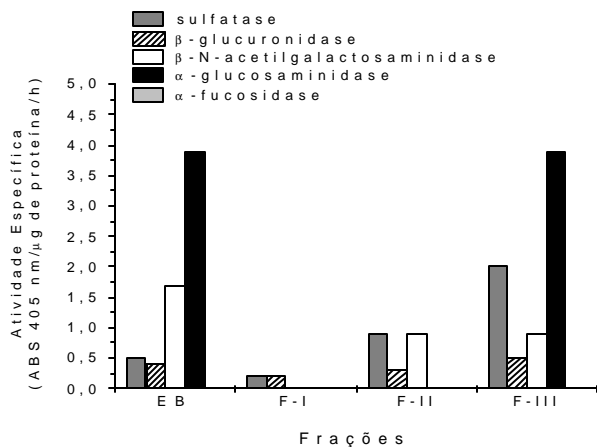


Fig. 1 - Enzimas presentes nos extratos brutos e frações de esôfago do molusco *Aplysia cervina*. Os ensaios foram realizados com os substratos: p-nitrofenil-sulfato, p-nitrofenil-β-D-glucuronídeo, p-nitrofenil-β-D-N-acetilgalactopiranosídeo, p-nitrofenil-α-glucopiranosídeo e p-nitrofenil-α-L-fucopiranosídeo. Onde EB, F-I, F-II e F-III indicam o extrato bruto e as frações precipitadas com 0-30%, 30-50% e 50-80% de sulfato de amônio, respectivamente.

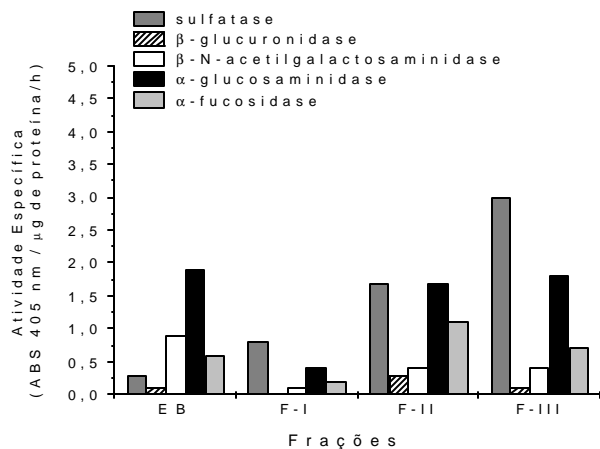


Fig. 2 - Enzimas presentes nos extratos brutos e frações de fígado do molusco *Aplysia cervina*. Os ensaios foram realizados com os substratos: p-nitrofenil-sulfato, p-nitrofenil-β-D-glucuronídeo, p-nitrofenil-β-D-N-acetilgalactopiranosídeo, p-nitrofenil-α-glucopiranosídeo e p-nitrofenil-α-L-fucopiranosídeo. Onde EB, F-I, F-II e F-III indicam o extrato bruto e as frações precipitadas com 0-30%, 30-50% e 50-80% de sulfato de amônio, respectivamente.

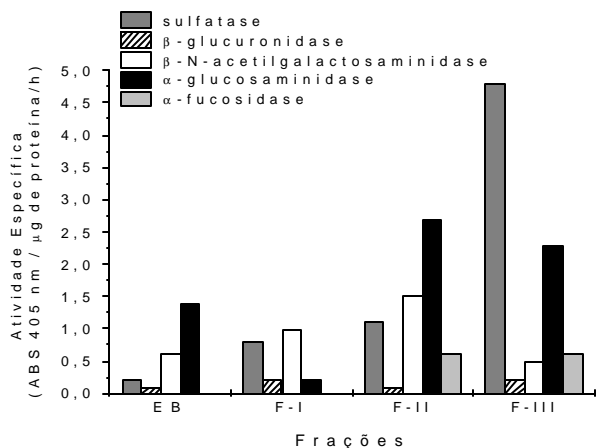


Fig. 3 - Enzimas presentes nos extratos brutos e frações de moela do molusco *Aplysia cervina*. Os ensaios foram realizados com os substratos: p-nitrofenil-sulfato, p-nitrofenil-β-D-glucuronídeo, p-nitrofenil-β-D-N-acetilgalactopiranosídeo, p-nitrofenil-α-glucopiranosídeo e p-nitrofenil-α-L-fucopiranosídeo. Onde EB, F-I, F-II e F-III indicam o extrato bruto e as frações precipitadas com 0-30%, 30-50% e 50-80% de sulfato de amônio, respectivamente.

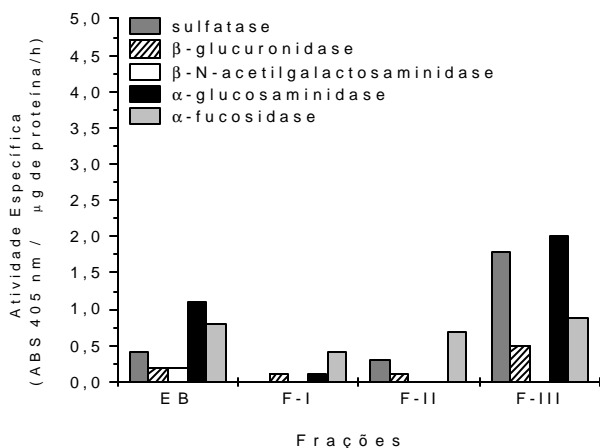


Fig. 4 - Enzimas presentes nos extratos brutos e frações de músculo do molusco *Aplysia cervina*. Os ensaios foram realizados com os substratos: p-nitrofenil-sulfato, p-nitrofenil-β-D-glucuronídeo, p-nitrofenil-β-D-N-acetilgalactopiranosídeo, p-nitrofenil-α-glucopiranosídeo e p-nitrofenil-α-L-fucopiranosídeo. Onde EB, F-I, F-II e F-III indicam o extrato bruto e as frações precipitadas com 0-30%, 30-50% e 50-80% de sulfato de amônio, respectivamente.

Com relação às frações obtidas de músculo (Fig. 4) identificou-se maior atividade α-glucosaminidásica e sulfatásica na F-III, com atividades específicas de 2,0 e 1,8, respectivamente. Estas enzimas apresentaram-se mais ativas do que todas as outras neste tecido. A enzima α-fucosidase, apesar de ter sido encontrada em todas as frações, apresentou maior atividade em F-

III, com atividade específica de 0,9. Observou-se ainda nesta fração, a atividade β-glucuronidásica, que apresentou atividade específica de 0,5. Não foi identificada atividade da enzima β-D-N-acetilgalactosaminidase em nenhuma destas frações.

Na maioria destes experimentos, após o fracionamento com sulfato de amônio, observou-se

um predomínio e acentuação das atividades enzimáticas nas frações F-II e F-III em todos os tecidos. Assulfatases foram sempre potencializadas em relação às suas atividades nos extratos brutos e, em todos os tecidos, apresentou maior atividade específica na F-III, indicando que o fracionamento realizado foi eficaz para a atividade desta enzima. A presença da sulfatase nestes extratos sugere a existência de um sistema catabólico sobre todos glicosaminoglicanos sulfatados, já que eles possuem grupos sulfato em diferentes posições de suas hexosaminas: posições 2, 3, 4 e 6 (CAPILA & LINHARDT, 2002). Experimentos mais aprofundados poderão indicar quais as posições de sulfatação são reconhecidas por esta enzima.

A presença de β -N-acetilgalactosaminidase indica atuação catabólica sobre o condroitim sulfato e dermatam sulfato, visto estes polissacarídeos contêm em suas estruturas β -N-acetilgalactosamina. A atividade desta enzima decresceu em quase todos os fracionamentos, indicando que mudanças nas condições destes e/ou dos ensaios enzimáticos podem ser necessários para determinar melhor a atividade desta enzima.

A identificação das enzimas α -glucosaminidase e α -fucosidase indica atividade catabólica sobre heparam sulfato, heparina e fucanas, por tratarem-se de polissacarídeos que contêm em suas estruturas os açúcares glucosamina, no caso dos GAGs e fucose, nas fucanas. A existência da β -glucuronidase, nas frações dos tecidos estudados, indica atividade metabólica sobre todos o GAGs que apresentam ácido glucurônico em suas estruturas e incluem: o ácido hialurônico, o condroitim sulfato, o dermatam sulfato, o heparam sulfato e a heparina.

A não detecção de algumas atividades enzimáticas, ou mesmo, a redução de algumas destas ao longo do fracionamento pode ter sido causado por alguns fatores que interferiram na precipitação destas proteínas, ou na identificação de suas atividades, como as condições do fracionamento realizado, ou seja, as faixas de saturação de sulfato de amônio utilizadas (0-30%, 30-50% e 50-80%) talvez não tenham sido ideais para a precipitação destas proteínas. Outro tipo de problema pode ter ocorrido durante o processo de fracionamento, em que determinados íons (Ca^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , dentre outros), por exemplo, que influenciam a atividade de certas enzimas, como descrito para uma sulfatase e β -N-acetilhexosaminidase bovinas (FAROOQUI & SRIVASTAVA, 1981) podem ter sido ao longo do fracionamento precipitados em algumas frações enzimáticas, causando a diminuição, ou mesmo a perda de suas atividades catalíticas. Novas precipitações podem ser realizadas, utilizando diferentes faixas de saturação salina, a fim de estabelecer condições de fracionamentos mais eficazes para estas enzimas. E ainda, sabendo que as enzimas necessitam de

condições ótimas para agir, tais como: tempo, pH, temperatura e concentração de substrato, é possível que as condições utilizadas nos ensaios enzimáticos (60 min, pH 5,0, 37° C e 10 mM de substrato) não tenham sido ideais para a atividade de determinadas enzimas e, estas se apresentaram baixas em relação às demais. Novos experimentos podem ser realizados, em diferentes condições, para determinação dos parâmetros ideais (ótimos) de atividade para algumas enzimas aqui identificadas.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que nos extratos brutos e nas frações precipitadas com sulfato de amônio de esôfago, fígado, moela e músculo do molusco *Aplysia cervina* foram identificadas as presenças das enzimas sulfatase, β -glucuronidase, β -D-N-acetilgalactosaminidase, α -glucosaminidase e α -fucosidase. A enzima α -fucosidase não foi encontrada nos extratos brutos e nas frações precipitadas com sulfato de amônio de esôfago, como também no extrato bruto e F-I de moela. A sulfatase apresentou-se mais ativa na F-III do fígado e moela, enquanto a α -glucosaminidase foi mais ativa nas frações F-III de esôfago e músculo. Isto indica que, nos tecidos pesquisados existe atividade catabólica sobre os GAGs e polissacarídeo algal o que encoraja a realização de experimentos mais aprofundados, como a purificação destas enzimas, estudo de suas especificidades e características cinéticas, a fim de caracterizar melhor suas atividades e assim propor, futuramente, um mecanismo de degradação destas moléculas nestes animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Ann. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976.
- CAPILA, I. & LINHARDT, R.J. Heparin-Protein Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v.41, p.390-412, 2002.
- COLBURN, P. & BUONASSI, V. Anti-clotting activity of endothelial cell-cultures and heparan sulfate proteoglycans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.104, p.220-227, 1982.
- DANIEL, R.; BETEAU, O.; JOZEFONVICZ, J.; GOAUSDOUE, N. Degradation of algal *Ascophylum nodosum* by an enzymatic activity contained in digestive glands of the marine mollusk *Pecten maximus*. *Carbohydr. Res.*, v.322, p.291-297, 1999.
- DIETRICH, C.P.; SAMPAIO, L.O.; TOLEDO, O.M.S. Characteristic distribution of sulfated mucopolysaccharides in different tissues and in their respective mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.71, p.34-43, 1976.

- DIETRICH, C.P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycan. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.17, p.5-15, 1984.
- DORFMAN, A. Studies on the biochemistry of connective tissue. *Pediatre*, v.22, p.576-591, 1958.
- FAROOQUI, A.A. & SRIVASTAVA, P.N. Changes in the kinetic properties of β -N-acetylhexosaminidase and arylsulfatase A upon immobilization on concanavalin A. *Int. J. Biochem.*, v.13, p-893-897, 1981.
- GLASER, J.H. & CONRAD, H.E. Chick embryo liver β -glucuronidase: comparison of activity on natural and artificial substrates. *J. Biol. Chem.*, v.254, p.2316-22, 1979.
- HANSON, S.R.; BEST, M.D.; WONG, CHI-HUEY. Sulfatases: Structure, Mechanism, Biological Activity, Inhibition, and Synthetic Utility. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v.43, p.2-19, 2004.
- KRESSE, H.; HAUSSER, H.; SCHONHERR, E. Small Proteoglycans. *Experientia*, v.49, p.403-416, 1993.
- KUSAYKIN, M.I.; BURTSOVA, Y.V.; SVETASHEVA, T.G.; SOVA, V.V.; ZVYAGINTSEVA, T.N. Distribution of O-glycosylhydrolases in marine invertebrates. Enzymes of the marine mollusk *Littorina kurila* that catalyze fucoidan transformation. *Biochemistry (Moscow)*, v.68, n.3, p.384-392, 2003.
- LÓPEZ-CASTILHAS, F. CHEIFTZ, S.; DOODY, J.; ANDRES, J.L.; LANE, W.S.; MASSAGUÉ, J. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell*, v.67, p.785-795, 1991.
- MEDEIROS, M.G.L.; FERREIRA, T.M.P.C.; LEITE, E.L.; TOMA, L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. New pathway of heparan sulfate degradation iduronate sulfatase and N-sulfoglucosamine 6-sulfatase act on the polymer chain prior to depolymerisation by a N-sulfoglucosaminidase and glycuronidases in the molluscs *Tagelus gibbus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.*, v.119, p.539-547, 1998.
- MEDEIROS, G.F.; MENDES, A. CASTRO, R.A.B.; BAÚ, E.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1475, p.285-294, 2000.
- OLIVEIRA, F.W.; CHAVANTE, S.F.; SANTOS, E.A.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Isolation and characterization of a galactanase, galactosidases, heparan sulfate and chondroitin sulfate degrading enzymes synthesized during embryonic development of the mollusc *Pomacea sp.* *Biochim. Biophys. Acta*, v.1200, p.240-246, 1994.
- PEREIRA, M.S.; VILELA-SILVA, A.C.E.S.; VALENTE, A.P.; MOURÃO, P.A.S. A 2-Sulfated, 3-linked α -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. *Carbohydr. Res.*, v.337, p.2231-2238, 2002.
- PIPE, R.K. & MOORE, M.N. The ultrastructural localization of lysosomal acid hydrolases in developing oocytes of the common marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem J.*, v.17, n.8, p. 939-949, 1985.
- PORCIONATO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Heparan sulfate and cell division. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.32, p.539-544, 1999.
- SOUZA FILHO, J.F.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Sequential degradation of chondroitin sulfate in molluscs. *J. Biol. Chem.*, v.265, p.20150-20155, 1990.
- STALLCUP, W.B.; DAHLIN, K.; HEALY, P. Interaction of the NG2 chondroitin sulphate proteoglycan with type VI collagen. *J. Cell. Biol.*, v.111, p.3177-3188, 1990.
- SUZUKI, S.; SANGO, K.; PROIA, R.L.; LANGAMAN, C. Mice deficient in all forms of lysosomal β -hexosaminidase show mucopolysaccharidosis-like pathology. *J. Neurol. Exper. Neurol.*, v.56, p.693-703, 1997.
- WARREN, J.R. & GRANHAM, F. The effect of heparin on the growth of bacteria and yeasts. *J. Bacteriol.*, v.60, p.171-178, 1950.

Recebido em 29/3/05

Aceito em 20/6/05