

# PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA $\beta$ -N ACETILHEXOSAMINIDASE EXTRAÍDA DO MOLUSCO MARINHO ANADARA NOTABILIS

BARTOLOMEU ALVES DE LIRA FILHO<sup>1</sup>; CYNTHIA ANDRADE DOS SANTOS FARIAS<sup>2</sup>;  
ALDA MARIA KRELLING DE SOUSA<sup>3</sup>; JOÃO FELIPE DE SOUSA FILHO<sup>4</sup>

1. Farmacêutico, Mestrando em Bioquímica do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, CB, UFRN.
2. Bolsista PIBIC/CNPq, Base de Pesquisa ligada ao PPg/DBq, CB, UFRN.
3. Bióloga, Técnica de Laboratório nível superior.
4. Professor adjunto, Departamento de Bioquímica, CB, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPg/DBq), UFRN.

Autor responsável E-mail: [jfelipe@cb.ufrn.br](mailto:jfelipe@cb.ufrn.br)

## Introdução

Glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) são açúcares complexos, formados por uma hexosamina [D-glicosamina (GlcN) ou D-galactosamina (GalN) e um ácido idurônico [ácido D-glicurônico (GlcA) ou ácido L-idurônico (IdoA)] ou galactose (queratam sulfato), que são arranjados alternadamente, em seqüência não ramificada, e carregam substituintes sulfato em várias posições (17). Suas funções biológicas são altamente diversificadas e vão desde simples função de suporte mecânico às mais complexas, como adesão, motilidade, proliferação, diferenciação e morfogênese celulares.

Certas funções, como anticoagulante e atividade antiproliferativa do Heparan sulfato e Heparina, são expressos pela cadeia de GAG livre. Os principais glicosaminoglicanos são: Ácido hialurônico (AH) único não sulfatado, Condroitim 4 e 6 sulfatos (CS), Heparan sulfato (HS), Heparina (Hep), Dermatam sulfato (DS) e Queratam sulfato (KS) (7;9;8)

A demonstração da degradação seqüencial do Queratam sulfato (KS) com enzimas bacterianas derivadas do *Pseudomonas* e *Actinobacillus*, crescendo simbioticamente em um meio contendo KS (1%) como única fonte de C, demonstra a presença em extratos de bactérias de endoglicosidases, sulfatases, exo- $\beta$ -D- galactosidases e exo-N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase, onde seus efeitos combinados levaram à liberação do 2-acetoamido-2-deoxy-D-glicose, D-galactose e sulfato inorgânico (25).

Os avanços no estudo das estruturas química de glicoconjugados devem-se, em grande parte, à aplicação de glicosidases para investigação dos polissacarídeos constituintes de glicoproteínas. Uma das principais enzimas aplicadas nesses estudos tem sido a N-Acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase -  $\beta$ -NAG(3). A  $\beta$ -NAG é uma enzima lisossomal, amplamente distribuída em vários tecidos (12). Atividade  $\beta$ -NAG tem sido detectada em uma grande variedade de materiais biológicos, sendo inicialmente notada em epidídimo de porco (10), em microorganismos (2;36), vários tecidos de animais (6;28;33), grandes plantas (16;1;18) e em outros animais (22). Entretanto, na literatura são poucas as referências sobre glicosidases em moluscos (32;19), e as que têm, mostram a atividade dessas enzimas sobre substratos sintéticos (15;21;5;25).

A descoberta de desordens metabólicas envolvendo a deficiência de enzimas específicas de glicosaminoglicanos tem chamado a atenção, nas duas últimas décadas, pela sua importância no metabolismo humano (23). Ademais, em mamíferos, as  $\beta$ -NAG são liberadas das células pelo rompimento destas ou por exocitose. Por este motivo, estão sendo utilizadas como avaliadoras do desenvolvimento de determinadas patologias humanas (35;26;27;29;14;12).

O avanço na química de glicoconjugados deve-se, em parte, à aplicação de glicosidases para investigação de açúcares constituintes de glicoproteínas, onde uma das enzimas inicialmente aplicadas nestes estudos foi a  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (3).

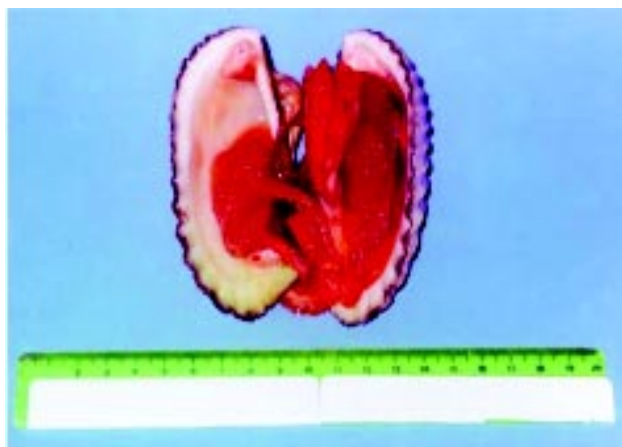


Figura 1 - Anadara notabilis

Glicosidasas estão envolvidas no catabolismo de glicoproteínas, glicolipídios, glicosaminoglicanos e oligossacarídeos, onde estas substâncias acumulam-se em excesso em erros inatos do metabolismo de humanos recém-nascidos, designados de glicoproteinoses, esfingolipidoses, mucopolissacaridoses ou oligossacaridoses (4). Em mamíferos, o estudo com pacientes portadores de doença aterosclerótica crônica, incluindo doença coronariana e cerebrovascular, mostrou um aumento em 30% da atividade  $\beta$ -N-acetilhexosaminidásica ( $\beta$ -NAHex) em relação a pacientes controle, além disso, enzimas citosólicas como aspartato amino-transferase e lactato desidrogenase, apresentavam-se com seus valores dentro da normalidade, mostrando que a atividade  $\beta$ -NAHex não estava elevada por ruptura de células e sim, por secreção lisossomal extracelular (37).

Por causa do seu alto peso molecular,  $\beta$ -NAHex não é filtrada através da membrana glomerular renal, assim, na presença de uma lesão glomerular ou dano tubular renal, o aumento da atividade  $\beta$ -NAHex tem importante aplicação como diagnóstico laboratorial das doenças renais. Por outro lado, o significado clínico da atividade  $\beta$ -NAHex no soro e plasma ainda não está estabelecido (12).

Por estes motivos, atividade  $\beta$ -NAHex está sendo utilizada como avaliadora do desenvolvimento de determinadas patologias humanas apresentando-se elevada na hipertensão, diabetes mellitus e doenças renais (35;27;29;12;14); na pesquisa com glicoproteínas, onde pode ser usada para a recuperação de oligossacarídeos N-ligados e de proteínas parcialmente deglicosiladas sem danificá-los; para examinar aspectos do tipo da proteína, e compartimentalização de glicoproteínas secretadas nas células (34;30).

Além destas aplicações, existe uma necessidade premente de se descobrir novos agentes antifúngicos para utilização na terapêutica médica, não somente para se ter um número de drogas satisfatório para o combate da infecção fúngica em humanos, mas também devido à ineficiência dos antimicóticos atuais, visto que, anfotericina B, um dos medicamentos mais usados nessas patologias, é muito tóxica e a aplicação clínica de derivados do ergosterol durante as duas últimas décadas tem resultado no aparecimento de cepas resistentes a esses medicamentos, além disso, as terapias alternativas que buscam o aumento da defesa dos hospedeiros contra fungos não tem demonstrado bons resultados, esses problemas são semelhantes na medicina veterinária. Assim, a  $\beta$ -NAHex, por sua atividade quitinolítica ao nível de célula fúngica, pode ser uma opção na utilização como agente antimicótico de largo espectro (11).

Razões para o interesse econômico na produção industrial da  $\beta$ -NAHex residem na justificativa da sua utilização na medicina como fungicida de largo espectro, na agricultura, como potente agente biocontrolador de fungos fitopatogênicos (11), um potente agente controlador de insetos onde fungos entomopatogênicos secretam enzimas quitinolíticas que facilitam sua penetração na cutícula destes invertebrados e podem ser utilizados como um meio natural de controle biológico de pragas em substituição a pesticidas químicos (38;13), na análise de cadeias glicosiladas com-

plexas de glicoproteínas e glicolipídios e, na química orgânica, para a preparação de estruturas de oligossacarídeos sintéticos (30). Podendo também ser usada como potente larvicida no combate a mosquitos transmissores de doenças, onde o extrato enzimático do fungo saprófita, *M. verrucaria*, produtor de um complexo enzimático que degrada cutícula de insetos, mostrou-se eficaz contra larvas do mosquito *A. aegypti* no primeiro e quarto estágio larval, matando estas em 48 hs (20), neste caso, o mecanismo de ação desta enzima é primariamente exercido na membrana peritrópica do intestino médio larval, que é composta por uma rede de quitina envolvida em uma matriz rica em proteoglicanos (31).

## Resultados e discussão:

Análises iniciais das eletroforeses não deixam dúvidas quanto à atividade catalítica mostrada pelos extratos enzimáticos extraídos do molusco, frente aos glicosaminoglicanos naturais (Figuras 2). Os precipitados  $F_1$  e  $F_2$ , adquiridos por concentrações crescentes de sulfato de amônia, após serem testados, mostraram uma forte atividade apresentada por ambas as frações, provavelmente devido à presença de um grupo de glicosidasas que incluem exo e endoglicosidasas e também sulfatases.

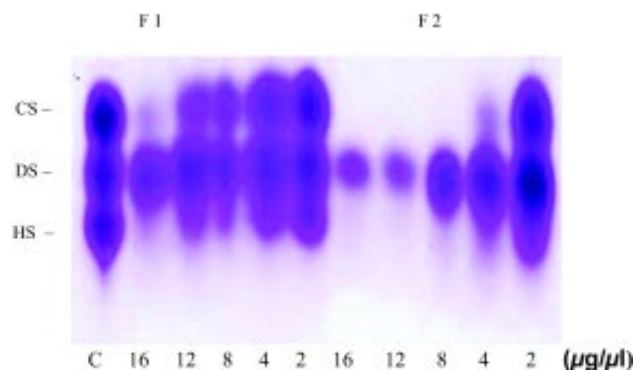


Figura 2 - Ação dos extratos enzimáticos ( $F_1$  e  $F_2$ ) do molusco *Anadara notabilis* sobre os glicosaminoglicanos sulfatados. Cerca de 10 $\mu$ g de uma mistura de Condroitim 4 - e 6-sulfatos, Dermatom sulfato e Heparom sulfato (C = Controle de HS, DS e CS) foram incubados com concentrações crescentes (2; 4; 8; 12 e 16 $\mu$ g/100 $\mu$ l de Proteína) das Frações  $F_1$   $F_2$  em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0, por 16hr a 37°C em um volume final de 100 $\mu$ l. Aliquotas de 5 $\mu$ l foram aplicadas em eletroforese em gel de agarose, tampão PDA.

A fração  $F_2$  por ter sido comprovadamente a mais ativa, mostrada pela perda da atividade metacromática e/ou desaparecimento dos glicosaminoglicanos em baixas concentrações, após a coloração com azul de toluidina, foi a fração escolhida para os experimentos seguintes que buscam o isolamento e a caracterização de enzimas envolvidas neste processo.

A fração  $F_2$  foi cromatografada em coluna de gel-filtração Bio Gel A 1,5m, as alíquotas colhidas foram anali-

sadas com relação a vários p-nitrofenil derivados, para avaliação de suas atividades enzimáticas ( $\beta$ -N-Acetilglicosaminidase, Sulfatase e  $\alpha$ -Galactosaminidase), onde nota-se uma separação da atividade  $\beta$ -N-hexosaminidásica ( $\beta$ -NAHex) das demais glicosidasas envolvidas na degradação dos glicosaminoglicanos sulfatados (Figura 3). Nota-se a presença da atividade  $\beta$ -N-hexosaminidásica ( $\beta$ -NAHex) eluída logo nas primeiras frações coletadas (9 à 12) mostrando que a enzima tem uma elevada massa molecular, essas frações foram agrupadas e denominadas de “Fração 3” (F<sub>3</sub>). A atividade coincide com o início do primeiro pico protéico, sugerindo um resultado satisfatório quanto ao grau de purificação.

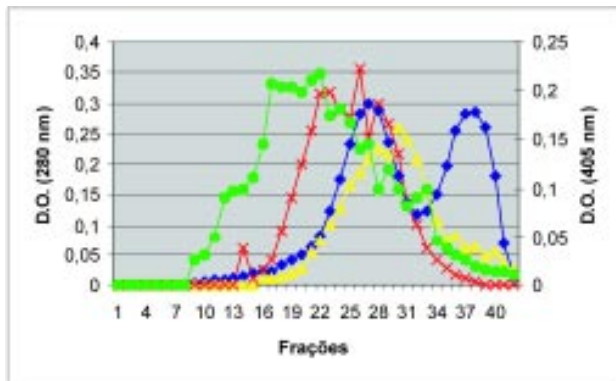


Figura 3 - Perfil de eluição de proteínas e de três atividades enzimáticas existentes na fração

F<sub>2</sub>. Proteína (■),  $\beta$ -N-hexosaminidase (●), Sulfatase (▲) e  $\alpha$ -Galactosaminidase (X).

A fração 3 (frações 9 a 12), quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, mostrou uma única banda protéica cujo peso molecular foi de 105 kDa, Figura 4. O grau de pureza da atividade enzimática existente na Fração 3, foi de 483 vezes e quando o submetemos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) aumentou para 579 vezes, que foi ratificado pela presença de um único pico eluído em 28% de acetonitrila, Figura 5.

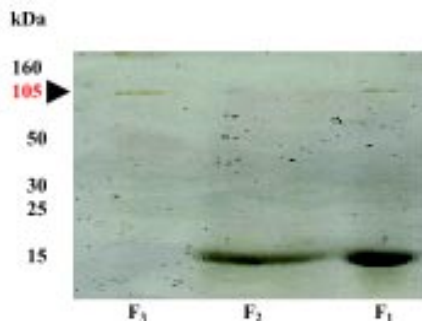


Figura 4 - Eletroforese em Gel de poliacrilamida das Frações F1, F2 e F1 na presença de SDS. A eletroforese processou-se sob corrente constante de 30 mA por aproximadamente 2 horas. As proteínas utilizadas como padrão foram proteínas recombinantes que apresentavam as seguintes massas moleculares: M = 160 kDa, M = 50 kDa, M = 30 kDa, M = 25 kDa, M = 15 kDa (Armarsham Pharmacia)

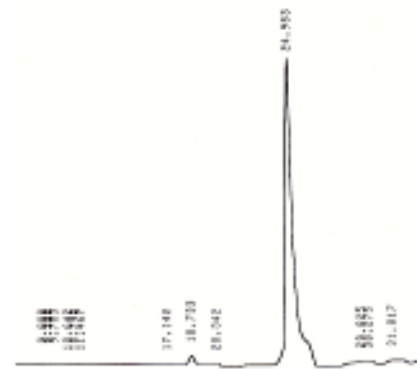


Figura 5 - Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa da Fração 3. Uma amostra de 250  $\mu$ l da fração F3 foi aplicada o material eluído com um gradiente linear de acetonitrila (0-100%), em tfa aquoso 0,1 M. a velocidade do fluxo foi de 7 ml / min. as linhas sólidas indicam a absorção em 216 nm e a linha tracejada mostra o percentual de 28% de acetonitrila no momento de saída (25 min) do pico protéico

## Conclusões

A alta atividade do extrato enzimático mostrado com a degradação do heparim e condroitim sulfato, muito embora não tenha havido ação enzimática sobre a heparina (dados não mostrados), sugere a existência de um mecanismo de degradação para esses glicosaminoglicanos em *Anadara notabilis*. Nota-se a presença da atividade de  $\beta$ -N-hexosaminidase ( $\beta$ -NAHex) quando F<sub>2</sub> foi eluída em Bio Gel A 1,5 M, e quando submetida à eletroforese em SDS-PAGE, mostrou a presença de uma única banda protéica e de um único pico protéico, quando a amostra foi aplicada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, sugerindo um excelente resultado quanto ao grau de purificação (579 vezes).

Os resultados encontrados indicam uma grande perspectiva na utilização desta enzima ( $\beta$ -NAHex) extraída do molusco *Anadara notabilis* em variados modos de aplicação. Por exemplo, no estudo das estruturas químicas e funções de alguns glicosaminoglicanos originados de muitos sistemas biológicos; na agricultura; em pesquisas para o desenvolvimento de pesticidas naturais; na biomedicina no combate a mosquitos, vetores de diversas patologias ou, até mesmo, como um fungicida natural de largo espectro.

## Referências Bibliográficas

1. BAHL, O. P.; AGRAWAL, K. M. L. Glycosidases of *Phaseolus vulgaris* I. isolation and characterization of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase. **J. Biol. Chem.**, v. 243, p. 98-102, 1968.
2. BAHL, O. P.; AGRAWAL, K. M. L. Glycosidases of *Aspergillus niger* I. Purification and characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidasas and  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase. **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 2970-2978, 1969.
3. BANNISTER, J.V. ; PHIZACKERLEY, P.J.R. Purification of an N-acetylglucosaminidase from the limpet *Patella vulgata* (L.). **Febs letters.**, v. 29, p. 313-317, 1973.
4. CABEZAS, J.A.; REGLERO, A.; DE PEDRO, M.A. Hydro-

- lysis of natural and synthetic substrates by  $\alpha$ -L-Fucosidase,  $\beta$ -D-Glucuronidase and  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase purified from molluscs. **Int. J. Biochem.**, v. 13, p. 389-393, 1981.
5. CALVO, P.; REGLERO, A.; CABEZAS, J.A. Purification and properties of beta-N-acetylhexosaminidase from the mollusc *Helicella ericetorum* Müller. **Biochem. J.**, v. 175, p. 743-50, 1978.
  6. CAYGILL, J.C.; ROSTON, C.P.J.; JEVONS, F.R. Purification of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase and  $\beta$ -galactosidase from ram testis. **Biochem. J.**, v. 98, p. 405-409, 1966.
  7. DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; STRAUS, A.H. Structural differences of heparan sulfates according to tissue and species of origin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 111, p. 865, 1983.
  8. DIETRICH, C.P. *et al.* Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1428, p.273-83. 1999.
  9. DIETRICH, C.P. *et al.* Sequencing of heparan sulfate: Identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight in heparan sulfates from different origins. **Cell. Mole. Biol.**, v. 44, p. 417-429, 1998.
  10. FINDLEY, J.; LEVVY, G.A. Purification of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from the pig epididymis. **Biochem. J.**, v. 77, p. 170-175, 1960.
  11. HORSCH, M. *et al.*  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase: A target for the design of antifungal agents. **Pharmacol. Ther.** v. 76, p. 187-218, 1997.
  12. INOUE, T. *et al.* Serum N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity increases in association with insulin resistance in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 149, p. 117-122, 2000.
  13. KANG, S.C.; PARK, S.; LEE, D.G. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiol Lett.**, v.165, p. 267-271, 1998.
  14. KAVUKCU, S.; SOYLU, A.; TURKMEN, M. The clinical value of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase levels in childhood age group. **Acta Med. Okayama.**, v. 56, p. 7-11, 2002.
  15. KAWAY, Y.S.; ANNO, K. Mucopolysaccharide degrading enzymes from the liver of the squid, *Ommastrephes sloni pacificus*. I. Hyaluronidase. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 242, p. 428-436, 1971.
  16. LEVVY, G.A.; McALLAN, A. A. Some plant glycosidases. **Nature Lond.**, v. 195, p. 387, 1962.
  17. KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: Structures and Interactions. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 60, p. 443-475, 1991.
  18. LI, Y.T.; LI, S.C. Glycosidases in jack bean meal-II. Separation of various glycosidases by isoelectric focusing. **J. Biol. Chem.**, v. 243, p. 3994-96, 1968.
  19. MELO, N.F.R.; SOUSA FILHO, J.F. Extração e Caracterização de Glicosidases Envolvidas na Degradação de glicosaminoglicanos sulfatados no Crustácea *Chaceon fenneri*. **Pharmacia Brasileira**, n. 33, p. 74-76, 2002.
  20. MENDONSA, E.S. *et al.* An enzyme from *Myrothecium verrucaria* that degrades insect cuticles for biocontrol of *Aedes aegypti* mosquito. **Biotechnol Lett.**, v. 18, p. 373-76, 1996.
  21. MOLODTSOV, N.V.; VAFINA, M.G. The distribution of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase in marine invertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 41B, p. 113-120, 1972.
  22. MURAMATSU, T. N-acetylhexosaminidase from a gastropod *Turbo cornutus*. **J. Biochem. (Tokyo).**, v. 64, p. 521-531, 1968.
  23. NADER, H.B. *et al.* The mode of action of sulfated glycosaminoglycans degrading enzymes in bacteria, invertebrates and vertebrates. **Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science)**, v. 45, p. 62-65, 1993.
  24. NAKAGAWA, H.; ENOMOTO, N.; ASAKAWA, M. Glycosidases activities in the livers of various fishers and molluscs. **Nippon Suisan Gakkaishi.**, v. 53, p. 1033-39, 1987.
  25. NAKAZAWA, K.; SUZUKI, S. Purification of keratan sulfate-endogalactosidase and its action of keratan sulfates of different origin. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 912, 1975.
  26. PEREZ-BLANCO, F.J. *et al.* Urinary excretion of N-acetyl-beta-glucosaminidase in slight arterial hypertension during pregnancy. **Clin Investig.**, v. 72, p. 799, 1994.
  27. PEREZ-BLANCO, F.J. *et al.* Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase in the prediction of preeclampsia. **Clin. Nephrol.**, v. 50, p. 169-171, 1998.
  28. ROBINSON D.; STIRING J.L. N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase in human spleen. **Biochem. J.**, v. 107, p. 321-327, 1968.
  29. ROGERS, M.S. *et al.* Diurnal variation in excretion of N-acetyl-beta-glucosaminidase during pregnancy: Implications for the prediction of pre-eclampsia. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 47, p. 9-12, 1999.
  30. SCIGELOVA, M.; CROUT, D.H.G. Microbial  $\beta$ -N-acetylhexosaminidases and their biotechnological applications. **Enzyme and Microbial Technology.**, v. 25, p. 3-14, 1999.
  31. SMIRNOFF, W. A. The symptoms of infection by *Bacillus thuringiensis* + Chitinase formulation in larvae of *Choristoneura fumiferana*. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 23, p. 397-9, 1974.
  32. SOUSA FILHO, J.F.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Sequential degradation of chondroitin sulfate in molluscs. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 20150-155, 1990.
  33. SUZUKI, J.; KUSHIDA, H.; SHITA, H. Mammalian glycosidases-I. N-acetyl- $\alpha$ -hexosaminidase and N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase. **Seikagaku (J. Japan. Biochem. Soc.)**, v. 40, p. 838-850, 1968.
  34. TAKEGAWA, K. *et al.* Cloning, sequencing, and expression of *Arthrobacter protophormiae* endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase in *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics.**, v. 338, p. 22-28, 1997.
  35. TOMINAGA, M.; IKEDA, T.; MASHIBA, H. Changes in urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase during oral glucose tolerance testing in patients with glucose intolerance. **Clin. Chim. Acta.**, v. 161, p. 355-356, 1986.
  36. WADSTRÖM, T.; HISATSUNE, K. Bacteriolytic enzymes from *Staphylococcus aureus* -I. Purification of an endo-N-acetylglucosaminidase-II. Specificity of action of endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase-III. Properties of the endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase. **Biochem. J.**, v. 120, p. 725-754, 1970.
  37. WELMAN, E. *et al.* Plasma lysosomal enzyme activity in acute myocardial infarction. **Cardiovasc. Res.**, v. 12, p. 99-105 1978.
  38. ZEN, K.C. *et al.* Cloning, expression, and hormonal regulation of an insect  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase gene. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 26, p. 435-444, 1996.