

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GLICOSIDASES ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS NO *CRUSTACEA CHACEON FENNERI*

NADJA FERREIRA RABELO DE MELO
JOÃO FELIPE DE SOUSA FILHO*

Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte,
Fone/Fax: (84) 211.9208 - Natal - RN. E-mail: jfelipe@cb.ufrn.br

INTRODUÇÃO

O estudo da degradação de glicosaminoglicanos em nosso laboratório (Nader, H. B.; Sousa F^o et al, 1993) é investigado em moluscos (*Anomalocardia brasiliensis*, *Tegulus gibbus*, *Pomacea* sp), não havendo relato sobre a degradação destes no *Chaceon fenneri*. O tecido muscular do crustáceo foi homogeneizado a 4°C com tampão acetato de sódio, posteriormente centrifugado a 40.000g e o sobrenadante submetido a um fracionamento por diferentes concentrações de sulfato de amônio. As atividades enzimáticas foram medidas nas frações correspondentes a 0-50% (F₁) e 50-80% (F₂) de saturação. A comprovação da ação enzimática foi feita após eletroforese em gel de agarose pelo desaparecimento dos glicosaminoglicanos e formação de produtos de baixo peso molecular detectados na cromatografia. Os resultados mostraram a presença de α - e β -endoglicosidases visualizadas pela degradação do heparam e condroitim sulfatos respectivamente, sugerindo um mecanismo de degradação de GAG em *Chaceon fenneri* semelhante aquele descrito para mamíferos.

Figura 01 - *Chaceon fenneri*



Glicosaminoglicanos sulfatados (GAGS) são compostos químicos de origem animal formados por unidades dissacarídicas alternadas constituídas por uma hexosamina e por um açúcar não nitrogenado unidas entre si, através de ligações covalentes glicosídicas (JACKSON *et al.*, 1991 e MELO, *et al.*, 2000). Em função do tipo de hexosamina encontrada, pode-se distinguir os diversos GAGS, como: condroitim 4- e 6-sulfatos e dermatam sulfato que contém galactosamina.

Heparam sulfato, heparina, queratam sulfato e ácido hialurônico cuja variação reside na estrutura da hexosamina que pode ser: N-acetilada, N-sulfatada, N-acetilada-6-sulfatada e N,6-dissulfatada (DIETRICH *et al.*, 1998). Podemos ainda diferenciá-los pela presença, quantidade e posição dos grupos sulfatos (NADER *et al.*, 1999).

Na degradação dos glicosaminoglicanos sulfatados existem glicosidases que atuam, de maneiras diferentes. Algumas agem sobre o polissacarídeo, transformando-o em oligos, são chamadas de exoglicosidases e outro grupo, que atua sobre os oligos, a partir da extremidade não redutora, de maneira sequencial e de acordo com a sua especificidade (Hers and Van Hoof, 1973; Hopwood, 1989).

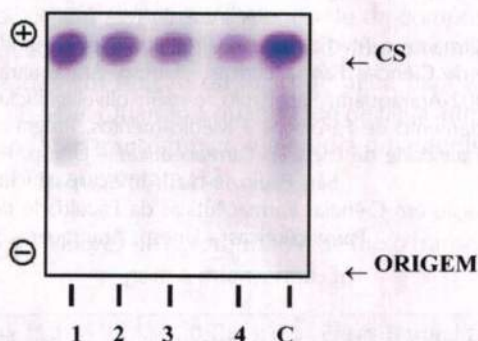
São poucas as referências na literatura sobre glicosidases em invertebrados e as que existem, mostram a atividade dessas enzimas sobre substratos sintéticos (Ceccarini *et al.*, 1983; Sousa *et al.*, 1985; Nakagawa *et al.*, 1987). Dados obtidos pelo nosso grupo mostram que no extrato do *Chaceon fenneri*, obtido por saturação de 50 – 80% com sulfato de amônio, as enzimas a- e b- endoglicosidases estão presentes devido à degradação do condroitim sulfato e heparam sulfato respectivamente, sugerindo que o mecanismo de degradação desses Glicosaminoglicanos é semelhante àquele descrito para mamíferos (Kresse & Glössl, 1987; Dietrich, 1991).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de glicosaminoglicanos no crustáceo *Chaceon fenneri*, a princípio, foi investigada nas frações F₁ e F₂ adquiridas por fracionamento do extrato bruto com concentrações crescentes de sulfato de amônio. A ação enzimática de F₂ sobre o condroitim 4-sulfato foi evidenciada por eletroforese em gel agarose pela perda da atividade metacromática como podemos visualizar na Figura 02. É crescente, à medida em que aumentou-se a sua concentração, ocorrendo uma parcial degradação, quando comparamos com o controle.

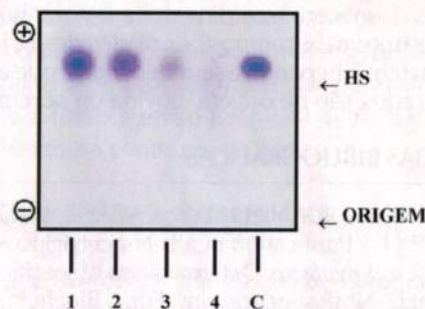
Figura 02 - Ação do extrato enzimático (F₂) do crustáceo *Chaceon fenneri* sobre o condroitim sulfato.

As fendas 1, 2, 3 e 4 correspondem a incubações feitas a 37°C durante 18h com 10, 20, 40 e 80 mg do extrato F₂. C - Controle; CS - condroitim 4-sulfato.



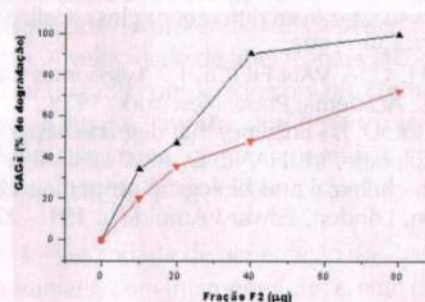
Na Figura 3, podemos notar um aumento na degradação do heparam sulfato proporcional ao aumento na concentração de F₂. Houve um desaparecimento do heparam sulfato, quando comparado com o controle. Podemos observar que para uma concentração de 80mg houve uma degradação total deste composto.

Figura 03 - Ação do extrato enzimático (F₂) de *Chaceon fenneri* sobre o heparam sulfato. As fendas 1, 2, 3 e 4 correspondem a incubações feitas a 37°C durante 18h com 10, 20, 40 e 80mg do extrato F₂. C - Controle; HS - heparam sulfato



A Figura 04 mostra que a degradação do condroitim 4-sulfato e do heparam sulfato é crescente, de acordo com o aumento da concentração das enzimas no meio de incubação. Com aproximadamente 80mg de F₂ ocorreu uma degradação de aproximadamente 70% para o condroitim 4-sulfato e aproximadamente 100% para heparam sulfato, Figuras 02 e 03, respectivamente. Os resultados foram obtidos através dos perfis densitométricos a uma DO = 525nm.

Figura 04 - Degradação do condroitim sulfato e heparam sulfato pelo aumento da concentração do extrato enzimático F₂ do *Chaceon fenneri*



O experimento foi realizado nas mesmas condições descritas nas Figuras 01 e 12, variando-se a concentração da fração F₂ (50 – 80%), como indicado, e o tempo de incubação foi de 18 horas. (5) Condroitim Sulfato e (5) Heparam Sulfato.

CONCLUSÕES

Numa análise global das eletroforeses, é possível destacar uma alta susceptibilidade do extrato enzimático do *Chaceon fenneri* sobre o Heparam sulfato. Baseado na especificidade da ação enzimática, bem como nas análises químicas dos produtos formados destes substratos em passos cromatográficos e migração eletroforética obtidos do condroitim sulfato e heparam sulfato de origem animal, podemos concluir que o crustáceo *Chaceon fenneri* possui as atividades de a- e b- endoglicosidases, que ficaram evidenciadas no extrato F₂, quando usamos como substratos o condroitim sulfato (Figura 02) e o heparam sulfato (Figura 03), respectivamente, visualizadas pelo desaparecimento desses glicosaminoglicanos em eletroforese de gel de agarose. Ou seja, a ação das enzimas sobre os compostos foi observada pelo desaparecimento das bandas metacromáticas no gel de agarose em tampão PDA.

Esta maior susceptibilidade do extrato F₂ foi ratificada graficamente (Figura 04) que essa degradação é proporcional à concentração do extrato F₂, e que aproximadamente 80mg ocorre uma degradação de praticamente 100% para os dois substratos; onde podemos concluir que a ação do extrato F₂

(50 - 80% de saturação com sulfato de amônio) difere da ação determinada por Sousa, et al., 1990, para outro invertebrado (*Anomalocardia brasiliensis*), que para o Heparan sulfato é no máximo 70%, mas é muito semelhante quando comparados com alguns vertebrados; estes estudos enzimáticos sobre a degradação desses polissacarídeos complexos poderá nos fornecer subsídios para um melhor entendimento da estrutura de compostos isolados desses invertebrados semelhantes à heparina e seus derivados, que atualmente comercializados são de origem bovina ou porcina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CECCARINI, C. DANIELLO, A.; CACAGE, M. G. & ATKINSON, P. H. - Purification of a b-N-acetylglucosaminidase from *Octopus vulgaris*. Determination of specificity by using 360-MHZ-NMR spectroscopy. Eur. J. Biochem. 132: 469-476, 1983.
2. CIFONELLI, J.A. & KING, J. - Structural studies on heparins with unusually high N-acetylglucosamine contents. Biochim. Biophys. Acta. 320-331, 1973.
3. DIETRICH, C. P. - The mode of action of sulfatases in the metabolism of glycosaminoglycans. TIGC 3: 352-354, 1991.
4. DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M.C. - Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. Anal. Biochem. 70: 645, 1976.
5. DIETRICH, C.P.; TERSARIOL, I.L.S., TOMA, L., MORAES, C.T., PORCIONATTO, M.A., OLIVEIRA, F.W. & NADER, H.B. "Sequencing of heparan sulfate. Identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight heparan sulfates from different origins. Cell. Mole. Biol. 44: 417-429, 1998.
6. HERS, H. G. & VAN HOOFF, F. - Lysosomes and storage diseases. Academic Press, New York, 1973.
7. HOPWOOD, J. - Enzymes that degrade heparin and heparan sulphate. In: HANE, D. A. & LINDAHL, U. (Eds) Heparin-chemical and biological properties, clinical application. London, Edward Arnold, p. 191 - 227, 1989.
8. JACKSON, R.L., BUSCH, S.J. & CARDIN, A.D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. Physiol. Rev. 2: 481-539, 1991.
9. KRESSE, H. & GLÖSSL, J. - Glycosaminoglycan degradation. Adv. Enzymol. 60: 217 - 311, 1987.
10. MELO, Nadja Ferreira Rabelo. Extração e caracterização de exo- e endoglicosidases do crustáceo *Chaceon fenneri*. Natal, 2000, 101p. [Tese (Mestre) - UFRN / Departamento de Bioquímica].
11. NADER, H. B.; MEDEIROS, M. G. L.; SOUSA Fº, J. F.; FERREIRA, T. M. P. C. & DIETRICH, C. P. - The mode of action of sulfated glycosaminoglycans degrading enzymes in bacteria, invertebrates and vertebrates. Ciênc. Cult. 45: 62 - 65, 1993.
12. NADER, H.B., CHAVANTE, S.F., SANTOS, E.A., OLIVEIRA, F.W., PAIVA, J.F., JERÔNIMO, S.M.B., MEDEIROS, G.F., ABREU, L.R.D., LEITE, SOUSA Fº, J.F., CASTRO, R.A.B., TOMA, L., TERSARIOL, I.L.S., PORCIONATTO, M.A. & DIETRICH, C.P. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Rio de Janeiro/RJ, v.32, p.529-538, 1999.
13. NAKAGAWA, H.; ENOMOTO, N. & ASAKAWA, M. - Glycosidase activities in the livers of various fishers and molluscs. Nippon Suisan Gakkaishi 53: 1033-1039, 1987.
14. SOUSA Fº, J. F.; MEDEIROS, M. G. L.; PAIVA, V. M. P.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. - Enzymatic degradation of glycosaminoglycans in molluscs: formation of glucuronic acid and N-acetyl hexosamines from heparan sulfate and chondroitin sulfate by enzymes from three species of molluscs of the class gastropoda and pelecypoda. Comp. Biochem. Physiol. 82B:223, 1985.
15. SOUSA Fº, J. F.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. - Sequential degradation of chondroitin sulfate in molluscs: desulfation of chondroitin sulfate without prior depolymerization by a novel sulfatase from *Anomalocardia brasiliensis*. J. Biol. Chem. 255: 150-155, 1990.