



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

PROJETO DE PESQUISA

**Caracterização de Hialuronidase produzida por
Microrganismos isolados de aranhas Caranguejeiras**

ORIENTANDA: Maria Eduarda Grisolia
Acadêmica do Curso de Biotecnologia

ORIENTADOR: Prof. Doutor Takeshi Matsuura

JULHO / 2014

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	OBJETIVOS	5
2.1	Geral	5
2.2	Específicos	5
3	MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1	Microrganismos	5
3.2	Teste de ocorrência de Hialuronidase	5
3.3	Produção de hialuronidase em meio líquido	5
3.4	Separação da hialuronidase	5
3.5	Atividade enzimática da hialuronidase	5
4	RESULTADOS	7
4.1	Microrganismos	7
4.2	Teste de ocorrência de Hialuronidase	7
4.3	Produção de hialuronidase em meio líquido	7
4.4	Atividade enzimática da hialuronidase	8
5	DISCUSSÃO	10
6	CONCLUSÃO	11
7	CRONOGRAMA	12
8	REFERÊNCIAS	13

Caracterização de Hialuronidase por Microrganismos isolados de aranhas Caranguejeiras

RESUMO

A hialuronidase é uma enzima que catalisa a quebra do ácido hialurônico, participando de diversos processos biológicos, como fagocitose, mitose, desenvolvimento e implantação de embriões, adesão, migração, proliferação, e diferenciação celular, e por estar envolvida em inúmeros processos relativos à manutenção e integridade da matriz extracelular, possui aplicabilidade em especialidades médicas. Estas enzimas são produzidas por diversos seres vivos, entre eles bactérias e fungos. Além de ser um fator de dispersão de toxinas, as hialuronidases atuam também como alérgenos, como é o caso da hialuronidase presente na peçonha de himenópteros, sendo encontrado como o principal fator de reações alérgicas presente em peçonha de abelhas e vespas. O objetivo deste estudo é caracterizar microrganismos produtores da enzima hialuronidase, isolados das aranhas caranguejeiras *Avicularia avicularia* e *Maraca horrida*, mesmo o veneno destes animais serem inócuos contra mamíferos, apresentam um grau de proteólise tecidual e são as fontes dos microrganismos testados, nunca testados para a produção de hialuronidase, tornando este estudo de grande importância na ecologia de microrganismos.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias; Hialuronidase; Enzimas, Aranhas caranguejeiras.

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico é um polissacarídeo de alto peso molecular constituído por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina, que se localiza no interstício celular, possuindo a propriedade de manter a adesão celular, pois é um composto de alta viscosidade que atua como excelente protetor e lubrificante (PINTO et al., 2009).

As hialuronidases pertencem ao grupo enzimático descoberto por Duran Reynals, em 1928, através da observação de que extratos de testículos e outros tecidos continham um “fator de espalhamento”, o qual facilitava a difusão de corantes e vacinas antivirais aplicadas subcutaneamente.

Esse grupo enzimático é constituído por enzimas que catalisam a quebra do ácido hialurônico, participando de diversos processos biológicos, como fagocitose, mitose, desenvolvimento e implantação de embriões, adesão, migração, proliferação, e diferenciação celular, e por estarem envolvidas em inúmeros processos relativos à manutenção e integridade da matriz extracelular encontraram aplicabilidade em especialidades médicas (MENZEL & FARR, 1998; KNUDSON & TOOLE, 1987; HAKANSSON & VENGE, 1985).

Estas enzimas são produzidas por diversos seres vivos, entre eles bactérias e fungos, e estão presentes em nematóides e sanguessugas, secreções de bacteriófagos e outros vírus, tumores malignos, parasitos, crustáceos, lisossomas, esperma de mamíferos, venenos e peçonhas de animais pertencentes a diferentes famílias. No corpo humano as hialuronidases são encontradas tanto em órgãos, como, por exemplo, no baço, fígado, olhos, pele, rim e útero, como em fluidos corporais, tais como lágrimas, sangue e esperma (STERN & CSÓKA, 2000; KUDO & TU, 2001). Além disso, é necessário ressaltar que a hialuronidase pode ser encontrada em veneno de animais.

As hialuronidases são ubíquas de peçonha de cobras, que por ação destas enzimas, o ácido hialurônico é transformado em pequenos fragmentos, diminuindo significativamente sua viscosidade e facilitando a difusão dos componentes de veneno de cobra para o interior das células. Além de ser um fator de dispersão de toxinas, as hialuronidases atuam também como alérgeno, como é o caso da hialuronidase presente na peçonha de himenópteros sendo encontrada como principal fator de reações alérgicas presente em peçonha de abelhas e de vespas. (KOLARICH et al., 2005; GIRISH et al., 2004; LU et al., 1995).

Kaiser (1953) foi o primeiro a relatar a atividade hialuronidásica na peçonha das aranhas brasileiras e atualmente, esta atividade é conhecida na peçonha de diversas outras aranhas, em 1973, Schanbacher e colaboradores, purificaram e caracterizaram a hialuronidase da caranguejeira *Dugesiella hentzi* e a identificaram como o principal constituinte da peçonha desta espécie. A hialuronidase também tem sido isolada e caracterizada na peçonha de escorpiões (FENG et al., 2008; MOREY et al., 2006; PESSINI et al., 2001).

Embora existam poucos relatos de casos em que as caranguejeiras sejam causadoras de acidentes em humanos, é possível que as peçonhas destas aranhas representem rica fonte de moléculas bioativas com potencial aplicação na pesquisa básica e na terapêutica. Segundo Rocha-e-Silva (2009), a peçonha de *Vitalius dubius* possui uma composição bioquímica e farmacológica complexa, com a presença de diversas atividades biológicas.

No presente estudo, foi investigado a caracterização de hialuronidase em isolados microbianos das aranhas caranguejeiras *Avicularia avicularia* e *Maraca*

horrida, com a finalidade de determinar se existe estes microrganismos produzem alguma enzima do grupo das hialuronidasas e determinar seu potencial biotecnológico.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar a produção da enzima hialuronidase em isolados microbianos de aranhas caranguejeiras.

2.2 ESPECÍFICOS

- Testar, *in vitro*, dentre os microrganismos isolados das aranhas caranguejeiras, as que sejam produtoras da enzima hialuronidase;
- Isolar a enzima hialuronidase produzida pelo microrganismo;
- Determinar a atividade enzimática da hialuronidase extraída dos microrganismos da aranha.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram testadas as bactérias isoladas de aranhas caranguejeiras, que estão depositadas na Coleção de Culturas Bacterianas da Amazônia (CCBAm), no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Amazonas.

3.2 Teste de ocorrência de Hialuronidase

Os microrganismos foram semeados em meio de cultura Mínimo-M9 suplementado com Ácido Hialurônico à 0,2% e posteriormente incubados por 24h em temperatura de 37° C. O mesmo foi corado com Azul de Alcian por 30 minutos, a ocorrência de hialuronidase foi verificada através dos halos de degradação do substrato.

3.3 Produção de hialuronidase em meio líquido

Foram utilizados 50 microrganismos isolados de aranhas caranguejeiras de duas espécies, *Avicularia avicularia* e *Maraca horrida*. Os microrganismos foram inoculados em caldo Mínimo-M9 suplementado com Ácido Hialurônico à 0,2%, posteriormente incubados à 37°C, sob agitação por 48h.

3.4 Separação da hialuronidase

Foi retirado 2 mL do líquido metabólico e o mesmo centrifugado à 14000 rpm por 10 min à 4°C.

3.5 Atividade enzimática da hialuronidase

A atividade hialuronidásica foi determinada pelo método turbidimétrico de Di Ferrante (1956).

O ensaio foi proporcionado pela solução constituída de 20µL de tampão (acetato de sódio 0,2M, pH 4,9, contendo NaCl 0,15M), 20µL de substrato (ácido hialurônico, 1mg/mL em tampão acetato) e 10 µL de enzima, com um volume final de 50µL, com

incubação por 15 minutos à 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 200µL de brometo de cetil-trimetilamônio, CTAB 2,5% em NaOH, e foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. A turbidez resultante foi lida em 400nm no leitor de microplaca.

4 RESULTADOS

4.1 Microrganismos

Foi estabelecido que o número de amostral seria de 50 microrganismos isolados de aranhas caranguejeiras *Avicularia avicularia* e *Maraca horrida*, dos quais 47% são pertencentes ao grupo morfo-tintorial Bacilo Gram-positivo, 25% Bacilos Gram-negativos e 28% Cocos Gram-positivo (Figura 1).

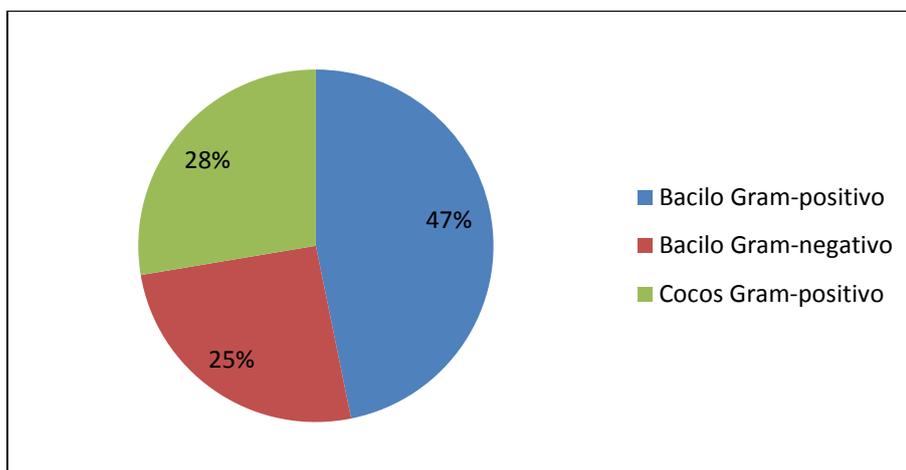


Figura 1. Proporção em porcentagem dos grupos morfo-tintoriais encontrados das bactérias isoladas das espécies de aranha caranguejeiras utilizadas.

Os 50 microrganismos foram determinados de acordo com os grupos morfo-tintoriais, testes de protease, amilase e catalase realizados. Os microrganismos foram isolados de quatro indivíduos de *Avicularia avicularia* e nove indivíduos de *Maraca horrida*.

4.2 Teste de ocorrência de Hialuronidase

Foram utilizados 50 microrganismos para a semeadura em meio de cultura Mínimo-M9 suplementado com Ácido Hialurônico à 0,2%, após a adição do corante Azul de Alcian, na concentração de 0,125% em solução de lavagem, não houve apresentação de halo de degradação em nenhuma das colônias apresentadas. O que pode indicar que este método não é preciso na verificação da ocorrência de produção enzimática por microrganismos, mas também pode indicar que estes microrganismos não produzem a enzima nas condições estudadas.

4.3 Produção de hialuronidase em meio líquido

Os microrganismos, já citados, foram inoculados em caldo Mínimo-M9 suplementado com Ácido Hialurônico à 0,2% apresentando turvação em 24h de incubação, indicando crescimento microbiano. O crescimento microbiano em caldo indica a utilização do Ácido Hialurônico como fonte de carbono pelos microrganismos, sendo necessária a produção de enzima do grupo hialuronidase, para que a clivagem do glicosaminoglicano ocorra.

4.4 Atividade enzimática da hialuronidase

Foi retirado 2 mL do líquido metabólico e o mesmo centrifugado à 14000 rpm por 10 min à 4°C, o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade hialuronidásica, método turbidimétrico de Di Ferrante (1956).

O ensaio proporcionou os resultados que podem ser verificados na Tabela 1, relacionando microrganismo e a quantificação da enzima, em U/mL, obtida através da fórmula que por sua vez relaciona variação da absorbância (Δabs), volume total (V_T) variação de tempo (ΔT), o coeficiente de extinção molar (ϵ) e volume de amostra (V): **A(atividade) = ($\Delta\text{abs} \times V_T$) / ($\Delta T \times \epsilon \times V$).**

Tabela 1. Resultados de média de absorbância verificada nas linhagens que apresentaram a hialuronidase.

Código do Microrganismo	Média de Abs	U/mL
Av7E2bEMB	0,012	1
Av3a3TCBS	0	0
Av7a10 ⁻¹ 2EMB	0,001	0,083333333
At6E1	0,008	0,666666667
Av5E1bEMB	0,0035	0,291666667
Av5Ve2ISP2A	0,01925	1,604166667
Av7E1TCBS	0	0
Av2o10 ⁻¹⁵ aEMB	0	0
At2o1	0,03975	3,3125
Av7o10 ⁻² 2EMB	0,00175	0,145833333
At1Vo2	0,0075	0,625
At8E2C2	0,02925	2,4375
Av7E5MS	0,01525	1,270833333
Av5Ve6aISP2A	0	0
Av2a1aTCBS	0,01025	0,854166667
At2o2	0,015	1,25
Av7E4MS	0,02925	2,4375
At1E1	0,033	2,75
At7a2b	0	0
Av5E1MS	0,016	1,333333333
Av7E5bEMB	0,04	3,333333333
Av3E2MS	0,0055	0,458333333
At9E3	0,01275	1,0625
Av7E2aEMB	0,132	11
Av5o10 ⁻³ 2bMS	0,001	0,083333333
Av2a1bTCBS	0,00675	0,5625
At3o4	0	0
At11I10-41	0,00025	0,020833333
Av5o10-46aEMB	0,004	0,333333333
Av5o10-43EMB	0,013	1,083333333
At10A1	0,031	2,583333333
At8E4	0,01275	1,0625
At3o3	0,0525	4,375
Av3E1a1EMB	0,02	1,666666667
Av7o10 ⁻² 1EMB ?	0,0095	0,791666667
Av3I5MS	0,0655	5,458333333

Av2E2bMS	0,02425	2,020833333
At3E	0,0065	0,541666667
At3o1	0,00675	0,5625
At10Ve1	0,00125	0,104166667
At3A1	0,014	1,166666667
At9A1	0,01125	0,9375
Av3o3MS	0,01275	1,0625
Av7o10-15bEMB	0,01375	1,145833333
At1o1	0,112	9,333333333
Av7o10-14bEMB	0,00475	0,395833333
Controle +	0,01925	1,604166667

Para o controle positivo da atividade foi utilizado lisozima, proteína descoberta pelo médico escocês Alexander Fleming em 1922, com ação de hidrólise das ligações glicosídicas (Ruas, 2010; Lehninger, 2006).

Foi possível fazer o estudos de isolados por região das aranhas (Figura 2), pode-se observar que as regiões externa e interna da espécie *Avicularia avicularia* e as regiões bucal e anal da espécie *Maraca horrida* são as regiões com maior número de isolados microbianos produtores de hialuronidase.

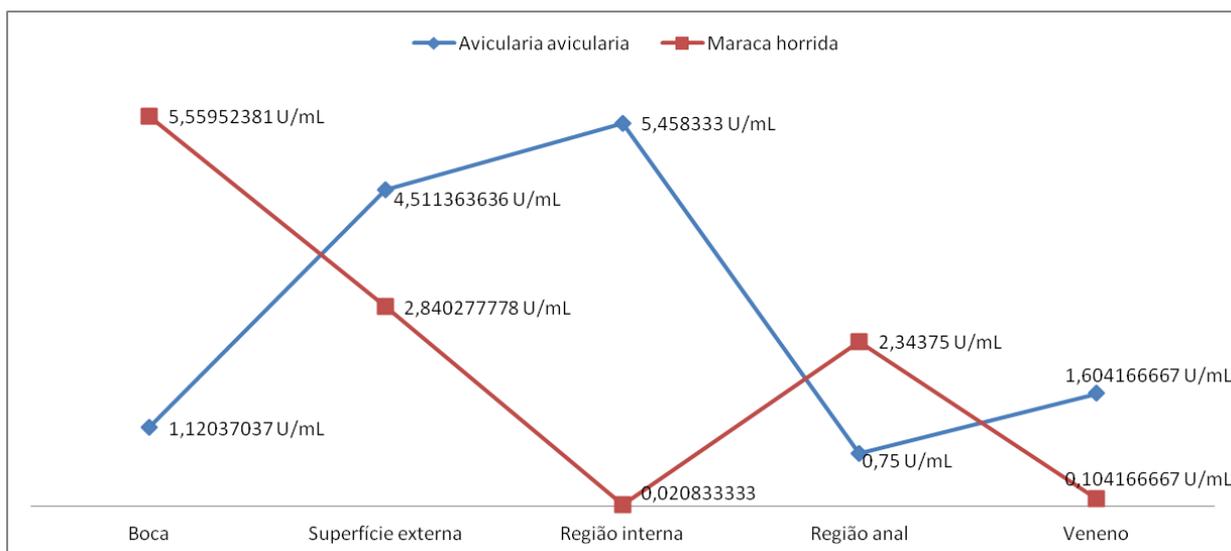


Figura 2. Atividade das enzimas do grupo das hialuronidasas encontradas em linhagens de bactérias isoladas de diferentes regiões do corpo das aranhas caranguejeiras.

5 DISCUSSÃO

Hialuronidasas têm sido descritas em microrganismos, tumores malignos e em peçonhas de animais. Nas peçonhas, a enzima é considerada um fator de dispersão devido à capacidade de catalisar a hidrólise de glicosaminoglicanos no tecido conectivo, facilitando assim a difusão de toxinas do sítio de inoculação (Sutti, 2011). Em microrganismos patogênicos a hialuronidase tem seu papel como fator principal no primeiro estágio de infecções, pois a consistência viscosa do ácido hialurônico, e outros glicosaminoglicanos componentes da matriz extracelular, fornece resistência à penetração de agentes infecciosos e seus produtos extracelulares, dessa maneira aqueles que são adaptados à produção de hialuronidase conseguem se estabelecer no tecido conjuntivo. Os produtos finais de degradação de ácido hialurônico pelas hialuronidasas são dissacarídeos, que podem ser transportados e metabolizados intracelularmente para suprimento de nutrientes necessários para um patógeno. O papel de proporcionar nutrientes para a célula pode ser a função principal de hialuronidase em microrganismos (Hynes & Walton, 2000).

Os microrganismos isolados de aranhas caranguejeiras demonstraram, através da atividade enzimática, produzir hialuronidase, havendo predominância da produção por microrganismos isolados da região bucal de *Maraca horrida* e regiões externa e interna de *Avicularia avicularia*. Estudos que relacionam os isolados microbianos de animais com a produção de hialuronidasas são escassos, não ocorrendo uma clara relação dos isolados microbianos com tal produção. No entanto, é possível que a maior produção dessa enzima em bactérias dessas regiões possa representar um exemplo de coevolução entre as espécies de aranhas em questão e essas bactérias. Também poderíamos supor que a presença das enzimas do grupo hialuronidase possa ser corroborado pelas bactérias neste local.

Esse grupo de enzimas é normalmente encontrado em peçonhas de animais venenosos, o que facilita a ação das toxinas presentes no veneno. É possível que as bactérias que habitam as regiões externas dessas espécies de aranhas produzam tal enzima para potencializar a ação do veneno em casos em que é necessário se defender de predadores. É necessário destacar, também, que espécies de caranguejeiras são usualmente utilizadas como animais de estimação. Isso pode representar um risco para saúde de seres humanos em casos de ataques acidentais ou contato desses animais com alimentos.

No presente estudo verificamos que ocorre a produção de hialuronidase em bactérias isoladas de aranhas caranguejeiras. Porém, é necessária a realização de análises mais específicas para determinar a potencialidade da utilização das enzimas isoladas das linhagens bacterianas utilizadas.

6 CONCLUSÕES

- Aparentemente a boca de aranhas caranguejeiras da espécie *Maraca horrida* apresenta uma quantidade significativa de bactérias produtoras de enzimas hialuronidásicas;
- Por outro lado, na espécie *Avicularia avicularia* o trato digestório parece ser o local que concentra a maior quantidade de bactérias produtoras de enzimas do grupo das hialuronidasas;
- Podemos inferir, de modo geral, que aranhas caranguejeiras das espécies *Avicularia avicularia* e *Maraca horrida* albergam bactérias produtoras de enzimas pertencentes ao grupo das Hialuronidasas;
- É possível que as enzimas encontradas possuam potencialidade para futuras aplicações em setores da biotecnologia, mas são necessários maiores estudos.

7 CRONOGRAMA

ATIVIDADES	2013					2014						
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7
<>Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<>Reativação das Bactérias	x	x	x	x								
<> Teste de ocorrência de hialuronidase	x	x	x	x	x							
<>Produção de hialuronidase em meio líquido		x	x	x	x	x	x					
<>Separação da hialuronidase		x	x	x	x	x	x	x				
<>Atividade Enzimática da hialuronidase		x	x	x	x	x	x	x	x	x		
<>Elaboração e apresentação do Relatório Parcial						x						
<>Elaboração e apresentação do Relatório Final											x	
<>Elaboração do artigo científico												x
<>Apresentação do trabalho em Congresso ou similar											x	

8 REFERÊNCIAS

1. FENG L.; GAO R.; GOPALAKRISHNAKONE P. 2008. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 148, 250–257.
2. Girish K.S., Shashidharamurthy R., Nagaraju S., Gowda T.V., Kemparaju K. 2004. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. Biochimie 86, 193–202.
3. Glycoforum, 2000. Mammalian Hyaluronidases. (<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hapdf/HA15.pdf>). Acesso em: 07.abril.2013.
4. HAKANSSON, L.; VENGE, P. 1985. The combined action of hyaluronic acid and fibronectin simulates neutrophil migration. Journal of Immunology, 135(4):2735-9.
5. HYNES, W.L., WALTON, S.L. 2000. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria (MiniReview). FEMS Microbiology Letters 183, 201-207
6. KNUDSON, C.B.; TOOLE, B.P. 1987. Hyaluronate cell interactions during differentiation of chick-embryo limb mesoderm. Developmental Biology, 124: 82-90.
7. KOLARICH, D.; LEONARD, R.; HEMMER, W.; ALTMANN, F. 2005. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. FEBS J.;272(20):5182-90.
8. KUDO, K.; TU, A. T. 2001. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* (southern copperhead) venom. Arch Biochem Biophys, 386(2):154-62.
9. LU, G.; KOCHOUMIAN, L.; KING, T.P. 1995. Sequence identify and antigenic cross-reactivity of White face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. J Biol Chem, 270(9):4457-65.
10. MENZEL, E. J.; FARR, C. 1998. Hyaluronidase and its substrate hyaluran: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. Cancer Letters 131 3–11.

11. MOREY, S.S.; KIRAN, K.M.; GADAG, J.R. 2006. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon* 47, 188-195.
12. Nelson, D.L; Cox, M.M; Lehninger: Princípios de bioquímica, Ed. Savier, 2006, p 220 – 223.
13. PESSINI , A.C.; TAKAO, T.T.; CAVALHEIRO, E.C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E.C. 2001. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39(10): 1495-504.
14. PINTO, J.R.A.S., PALMA, M.S., SANTOS, L.D., DIAS, N.B., SANTOS, K.S. 2009. Caracterização molecular do alérgeno hialuronidase do veneno da vespa social *Polybia paulista* (hymenoptera, vespidae). Departamento de Biologia/CEIS, Unesp. São Paulo.
15. ROSA, C. S.; HOELZEL, S. C.; VIERA, V. B.; BARRETO, P. M.; BEIRÃO, L. H. 2008. Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango. *Ciência Rural*, v.38, p2593-2598.
16. RUAS, G.W. 2010. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica da lisozima. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 80p.
17. SUTTI, R. 2011. Purificação e caracterização de hialuronidase da peçonha da caranguejeira *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Campinas. Campinas, São Paulo. 87p.