



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

ESTUDO QUIMILUMINESCENTE DE GRANULOMA HEPÁTICO DE
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA UTILIZANDO LECTINAS CONJUGADAS A
ÉSTER DE ACRIDINA

Aluna: Gabriela Ayres Fragoso Nascimento
Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Co-orientadora: Maria Elizabeth Cavalcante Chaves

RECIFE

2013

GABRIELA AYRES FRAGOSO NASCIMENTO

**ESTUDO QUIMILUMINESCENTE DE GRANULOMA HEPÁTICO DE
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA UTILIZANDO LECTINAS CONJUGADAS A
ÉSTER DE ACRIDINA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

Co-orientadora:

Prof. Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves

Departamento de Bioquímica, CCB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

RECIFE

2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Nascimento, Gabriela Ayres Fragoso

Estudo quimiluminescente de granuloma hepático de esquistossomose mansônica utilizando lectinas conjugadas a éster de acridina / Gabriela Ayres Fragoso Nascimento. – Recife: O Autor, 2013.

66 f.: il., fig.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Coorientadora: Maria Elizabeth Cavalcante Chaves

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2013.

Inclui bibliografia

1. Esquistossomose 2. Lectinas 3. Histoquímica I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orient.) II. Chaves, Maria Elizabeth Cavalcante (coorient.) III. Título.

616.963

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-344

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

Parecer da comissão examinadora da defesa da dissertação de mestrado de

GABRIELA AYRES FRAGOSO NASCIMENTO

ESTUDO QUIMILUMINESCENTE DE GRANULOMA HEPÁTICO DE
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA UTILIZANDO LECTINAS CONJUGADAS A
ÉSTER DE ACRIDINA

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **GABRIELA AYRES FRAGOSO NASCIMENTO** como:

APROVADA

Recife, 10 de outubro de 2013.

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.
Orientador – Membro interno

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior
Membro interno

Prof. Dra Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Membro externo

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela vida e força dada para superar todas as dificuldades, e coragem para traçar esse caminho.

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicional de sempre, apoiando-me quando eu precisei e me ajudando em cada luta. Obrigada por toda a educação dada e por sempre batalhar junto comigo.

À minha irmã Gisela, pelo amor, companheirismo e apoio sempre prestados, pela força que sempre me deu e pela amizade verdadeira e incondicional.

Ao Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, pela confiança depositada em mim, ensinamentos e dedicação dispensados durante a realização deste trabalho.

À Prof.^a Maria Elizabeth Cavalcante Chaves, pelo apoio, ensinamentos, confiança e companheirismo em todos os momentos desde a época da graduação.

A Luiza Rayanna, que além de ser uma grande amiga de infância, se tornou uma pessoa fundamental na realização desse trabalho, por toda a atenção prestada a mim, todos os esclarecimentos, todo o apoio e ajuda que foram primordiais.

Às minhas amigas Adriana Andrade e Mariana Cabrera, que me acompanham desde a iniciação científica, pelo apoio, companhia e dedicação na realização deste trabalho.

Aos meus amigos IMOBIO Raquel Varela, Thiago Vêras, Matheus Filgueira, Lucia Patricia, Sinara Almeida e Camila Galvão, que me fizeram sentir parte do grupo e me acolheram com carinho.

Às minhas amigas de infância Raquel, Maria Christina e Andréa pela grande amizade que dedicaram a mim.

Aos amigos de faculdade Divar, Camila e Rafael pela amizade, apoio, estímulo e ajuda presentes desde o início.

À amiga Eliete Rodrigues, secretária do PPGBAS, pelo apoio e serviço sempre eficiente, que sempre esteve a postos e ajudou no decorrer das questões burocráticas do desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Patologia do LIKA Arthur Clark, Carmelita Cavalcanti e Marina Cartaxo, pela oportunidade de trabalhar com pessoas especiais.

Aos amigos que fazem o LIKA, Rafael Padilha, Vera, Edson, Felipe, Maria Helena, Sr Otaviano, Ilma e Conceição pela amizade e auxílio concedido sempre que solicitado.

A CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

A inflamação granulomatosa na esquistossomose mansônica acontece quando o ovo fica retido no tecido vivo e não consegue amadurecer ou ser expulso, promovendo alterações patológicas severas no indivíduo infectado. O objetivo deste trabalho foi avaliar quantitativamente as lesões granulomatosas de tecido hepático de camundongos infectados com esquistossomose mansônica, através do uso de lectinas conjugadas a um composto quimiluminescente, o éster de acridina (EA). As lectinas Concanavalina A (Con A), Wheat Germ Agglutinin (WGA) e Sambucus Nigra Agglutinin (SNA) foram conjugadas ao éster de acridina e incubadas no tecido hepático de camundongos esquistossomóticos. A quimiluminescência foi expressa em Unidades Relativas de Luz (RLU). Fragmentos do tecido hepático infectado e de tecido normal foram incubados com ConA-EA, WGA-EA e SNA-EA e ficou evidenciado que houve um aumento da expressão de α -D-glicose/manose e N-acetilglicosamina nos tecidos infectados em relação ao tecido normal, enquanto que não houve significativa diferença entre os valores de α -NeuNAc-[2→6]-Gal/GalNAc dos fígados infectados e não infectados. Assim, a histoquímica quimiluminescente mostrou-se uma ferramenta eficaz na avaliação de mudanças patológicas causadas por esquistossomose mansônica.

Palavras-chaves: esquistossomose mansônica; granuloma; histoquímica; lectinas; quimiluminescência

ABSTRACT

Granulomatous inflammation in schistosomiasis mansoni occurs when eggs are retained in living tissue and cannot mature or be expelled, promoting severe pathological changes in the infected individual. The aim of this work was to evaluate quantitatively the granulomatous lesions of hepatic tissue in mice infected by schistosomiasis mansoni, through the use of lectins conjugated to Acridinium Ester (AE), a chemiluminescent compound. Lectins Concanavaline A (Con A), Wheat Germ Agglutinin (WGA) and Sambucus Nigra Agglutinin (SNA) were conjugated to Acridinium Ester and incubated in hepatic tissue infected by schistosomiasis. Chemiluminescence was expressed in Relative Light Units (RLU). Infected and not infected tissue were incubated with ConA-AE, WGA-AE e SNA-AE and was notice that there was higher expression of α -D-glucose/mannose and N-acetyl-D-glucosamine in infected tissues when compared to normal tissue, whereas there was no significant difference between the values of α -NeuNAc-[2 $\rightarrow$ 6]-Gal/GalNAc in infected and not-infected livers. Thus, chemiluminescent histochemistry proved an effective tool to evaluation of pathological changes caused by Schistosomiasis mansoni.

Key words: schistosomiasis mansoni; granuloma; histochemistry; lectins; chemiluminescence.

LISTA DE FIGURAS (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

Figura		Pág
Figura 1	Áreas Endêmicas da esquistossomose mansônica.	15
Figura 2	Distribuição espacial de prevalência (A) e intensidade de infecção(B) por <i>S. mansoni</i> na Zona da Mata, Pernambuco.	17
Figura 3	Ciclo de vida das espécies de Schistosoma.	18
Figura 4	Dematite causada pela penetração das cercárias.	19
Figura 5	Hepatoesplenomegalia em criança em idade escolar no Quênia (A); imagem de ultrassom de fibrose periportal (B); fibrose periportal em indivíduo de 48 anos de idade (C).	20
Figura 6	Granuloma com macrófago multinucleado englobando ovo de <i>S. mansoni</i> (A); mucosa de intestino grosso sem alterações. Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> na sub-mucosa(B).	22
Figura 7	Esquema representativo das estruturas de glicanos em <i>Schistosoma mansoni</i> e <i>Haemonchus contortus</i> . Os antígenos estão indicados pelas estruturas em parenteses. (LDN) LacdiNAc; (Le ^x) Lewis ^x ; (CAA) antígeno anódico circulante; (F-) fucosilado; (DF-) difucosilado.	24
Figura 8	Representação esquemática dos quatro tipos de lectinas de plantas.	27
Figura 9	Representação da estrutura tridimensional da Con A (A), WGA (B) e SNA-II (C).	29

Figura 10 Detecção de resíduos de n-acetilglicosamina (A) e galactose (B) 32
respectivamente pelas lectinas WGA e PNA (Peanut aglutin).

Figura 11 Mecanismo de quimiluminescência do éster de acridina: equilíbrio com uma 34
base neutra e acréscimo de Peróxido de Hidrogênio.

LISTA DE FIGURAS (ARTIGO)

Fig		Pág
Fig 1	Con A-AE, WGA-AE and SNA-AE purification profile from a Sephadex G-25 column (10 x 1 cm). Elution was carried out with PBS. Fractions (1 mL) were collected and protein (280 nm) and chemiluminescence of Con A-AE (A), WGA-AE (B) and SNA-AE (C) were assayed.	55
Fig 2	Comparison between chemiluminescence of normal tissue (n = 10) and infected tissue (n = 10) for three lectin conjugates, respectively, Con A-AE, WGA-AE and SNA-AE	56
Fig 3	Lectin inhibition: comparison between infected tissue and incubated with lectins (Con A-AE and WGA -AE) and the same tissue when incubated previously by specific carbohydrate (A); competitive inhibition of Con A and WGA when incubated without AE conjugated followed by incubation with Con A-AE and WGA-AE (B).	57
Fig 4	Relation between chemiluminescence and the area of infected tissue. Photon emission, expressed in relative light units, was detected from four different area values: 0.09 cm ² , 0.15 cm ² , 0.21 cm ² and 0.30 cm ² .	58

LISTA DE ABREVIACÕES/ SIGLAS

Con A – Concanavalina A

EA – Éster de Acridina

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

GBP – Glican Binding Protein (Proteína ligadora de glicano)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL – Interleucina

Le^x – Antígenos Lewis X

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PNA – Peanut agglutinin

PSA – *Pisum sativum* agglutinin

QL – Quimiluminescência

SANAR – Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas

TGR – Tiorredoxina glutathione reductase

TH-1 – Células T helper 1

TH-2 – Células T helper 2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral - α

SNA – *Sambucus nigra* agglutinin

UEA – *Ulex europaeus* agglutinin

WGA – Wheat germ agglutinin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Histórico	14
2.2 Epidemiologia	15
2.3 Ciclo Biológico	17
2.4 Manifestações Clínicas	19
2.5 Glicobiologia do <i>Schistosoma mansoni</i>	23
2.6 Biomarcadores na Esquistossomose	25
2.7 Lectinas.....	26
2.7.1 Con A.....	28
2.7.2 WGA.....	28
2.7.3 SNA.....	29
2.7.4 Aplicações das lectinas.....	30
2.8 Quimiluminescência	33
3. REFERÊNCIAS	36
4. OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo geral	48
4.2 Objetivos específicos	48
5. ARTIGO: CHEMILUMINESCENT DETECTION OF GLYCOPHENOTYPE IN HEPATIC GRANULOMATOUS LESIONS OF EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASIS.	49
6. CONCLUSÕES	66

1. INTRODUÇÃO

Responsável por afetar cerca de 230 milhões de pessoas ao redor do mundo, a esquistossomose é uma importante helmintíase que constitui sério problema de saúde pública, sendo caracterizada como doença tropical negligenciada. Esta parasitose ocorre em locais cuja situação de saúde é precária, regiões de baixas condições socioeconômicas nas quais há longo histórico de ausência à assistência sanitária (LEAL NETO et al., 2012; PEREIRA et al., 2013).

Dentre as diversas espécies existentes, a que acomete o Brasil é o *Schistosoma mansoni*. Este é um parasita digenético intravascular que vive nos vasos porta-mesentéricos, onde a fêmea realiza a postura de cerca de 300 ovos diariamente. Estes ovos podem ficar retidos nos tecidos do hospedeiro ou atingir coleções hídricas, como lagos, lagoas e açudes, através das fezes. Quando isto acontece, os ovos podem romper-se e liberar o miracídio, que, uma vez encontrando o hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria*, podem vir a se tornar larvas infectantes, as cercárias. Novamente atingindo o meio aquático, essas cercárias estão hábeis a infectar novos indivíduos e recomençar o ciclo (COELHO et al., 2008; BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013).

Caso os ovos não atinjam o meio externo, podem ficar retidos na submucosa coloretal, onde são depositados, ou retornam ao fígado pelo fluxo do sangue nos vasos porta-mesentéricos. A doença causa um severo grau de morbidade e mudanças patológicas, que quando não diagnosticadas e tratadas, podem resultar em incapacidade física ou mesmo na morte do paciente (MANNIVANAN et al., 2010).

Nos tecidos hepáticos, os ovos promovem as alterações mais importantes da esquistossomose, como as lesões inflamatórias granulomatosas. O granuloma periovular ocorre quando os ovos vivos ficam retidos no tecido, onde não conseguem amadurecer ou ser expulsos. Essas lesões são seguidas de excesso de deposição de colágeno e outros componentes de matriz extracelular, que causarão fibrose periportal e oclusão progressiva das veias portais. Isto resulta na hepatomegalia característica da doença (BURKE et al., 2009; ANDRADE, 2009).

A patogenia da esquistossomose está bastante ligada aos antígenos secretados pelo *Schistosoma mansoni* e, particularmente, por seus ovos. Estes antígenos são responsáveis por produzir grandes quantidades de glicoproteínas, glicolipídios e ligantes de membrana circulatórios contendo antígenos fucosilados. Uma vez secretadas pelos

ovos, essas moléculas são altamente imunogênicas, podendo acelerar a resposta inflamatória. Permitem, ainda, interações entre o parasita e o hospedeiro e têm o papel de facilitar a passagem dos ovos através dos tecidos, principalmente no intestino, o que pode iniciar a formação do granuloma (CUMMINGS; NYAME, 1999; VAN DIE et al., 2005; JANG-LEE et al., 2007).

Pesquisas recentes têm mostrado a caracterização do perfil de carboidratos do processo inflamatório da esquistossomose (GUIMARÃES et al., 2008). Esses estudos são feitos por instrumentos que permitam o reconhecimento de carboidratos no sistema ovo-granuloma do tecido hepático. Na histoquímica analítica, essa avaliação vem sendo usualmente feita com o emprego de lectinas (MELO-JUNIOR et al., 2008). Estas são glicoproteínas que possuem ao menos um domínio não catalítico e são capazes de reconhecer e se ligar reversivelmente a monossacarídeos específicos ou oligossacarídeos (LAM; NG, 2011).

As lectinas podem ser utilizadas como sondas bioquímicas quando associadas a compostos reveladores, os quais permitam a visualização da ligação lectina-carboidrato. Estes compostos podem ser a peroxidase, substâncias fluorescentes e quimiluminescentes (CAMPOS et al., 2006; ARAUJO et al., 2011).

Definida como a produção de luz gerada através de uma reação química, a quimiluminescência é uma emissão de radiação eletromagnética geralmente próxima do visível acompanhada pela liberação de energia. É uma reação que ocorre por meio da mistura de reagentes líquidos sem necessidade de ativação externa. Sua utilização como instrumento analítico depende do acoplamento biomolecular da substância de interesse a um dos participantes da reação ou ao produto no estado excitado, e a emissão de luz é proporcional à concentração de amostra conhecida (BROWN et al., 2009).

O éster de acridina é um composto quimiluminescente com baixos níveis de detecção, que emite luz cerca durante um período de 5 segundos (DODEIGNE; THUNUS; LEJEUNE, 2000). Vem sendo empregado em ensaios com ácidos nucleicos (KRICKA, 2003), como marcador de antígenos para *Schistosoma mansoni* e *Trypanossoma cruzi* (COELHO et al., 2002) e, recentemente, na avaliação do perfil glicídico em neoplasias (BRUSTEIN et al., 2012; LIMA et al., 2013). Desta forma, o presente estudo teve como finalidade estudar o padrão de glicosilação dos tecidos hepáticos de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* utilizando como ferramenta lectinas conjugadas a éster de acridina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

O primeiro relato da esquistossomose foi feita por Theodor Bilharz, em 1852, quando, em uma expedição no Egito, realizou dissecações em camponeses e observou alterações no trato urinário e intestinal permitindo a descrição do gênero *Schistosoma*. Na ocasião foram observados ovos com espículo terminal, correspondentes ao *Schistosoma haematobium* (KATZ, 2008). A espécie *Schistosoma mansoni*, por sua vez, foi descrita primeiramente em Londres por Sambon em 1907, baseada na morfologia de um verme macho e um ovo com espículo lateral (KATZ; ALMEIDA, 2003).

No Brasil, a publicação inicial sobre a esquistossomose mansônica foi feita por Manuel Pirajá da Silva, quando em 1908, publicou um trabalho no qual observou a presença de ovos em autópsias de casos humanos e exames coprológicos. Seguiram-se três trabalhos publicados entre 1908-1909, nos quais havia relatos de pacientes que eliminavam ovos com espículo lateral nas fezes, mas nenhum ovo na urina (KATZ, 2008).

A espécie *Schistosoma mansoni* foi introduzida no Brasil vinda da África com o tráfico de escravos e, graças às condições climáticas e a presença do molusco transmissor, conseguiu se estabelecer. Sua consequente propagação ocorreu devido aos movimentos migratórios promovidos pela estrutura econômica canavieira, sendo a única, dentre as espécies de *Schistosoma*, a desenvolver a doença no país (KLOSS et al., 2008).

A preocupação com esta parasitose começou após 1960, quando pesquisas sobre esquistossomose surgiram em revistas, teses de Livre Docência e de Cátedra, sendo então propostos alguns métodos de combate à doença (ANDRADE, 2002). Em 1975 foi introduzido o Programa Nacional de Controle à Esquistossomose, no qual foram implementadas medidas de educação e engenharia sanitárias, tais como: fossas sépticas, canalização e criação de tanques de água, além do controle do caramujo vetor (KLOSS et al., 2008).

2.2 Epidemiologia

Endêmica em áreas tropicais, a esquistossomose mansônica é uma enfermidade provocada por helmintos da classe Trematoda, a qual engloba parasitos que possuem ventosas de fixação aos vasos dos hospedeiros (PEREIRA et al., 2011). A espécie responsável pela doença, o *Schistosoma mansoni*, é encontrado em grande parte da África, com destaque para Egito e Sudão, e da América do Sul, estando regiões do Caribe, Venezuela e Brasil os lugares de maior risco (CLERINX; GOMPEL, 2011).

O Brasil é considerado o país com maior área endêmica da esquistossomose mansônica. Segundo dados da Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde, a parasitose é encontrada em 19 unidades federativas, principalmente, no Nordeste e Sudeste, devido à presença de moluscos do gênero *Biomphalaria* (BRASIL, 2011). Destacam-se, entre os estados atingidos, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco, devido aos aspectos históricos da economia canavieira (**Figura 1**).

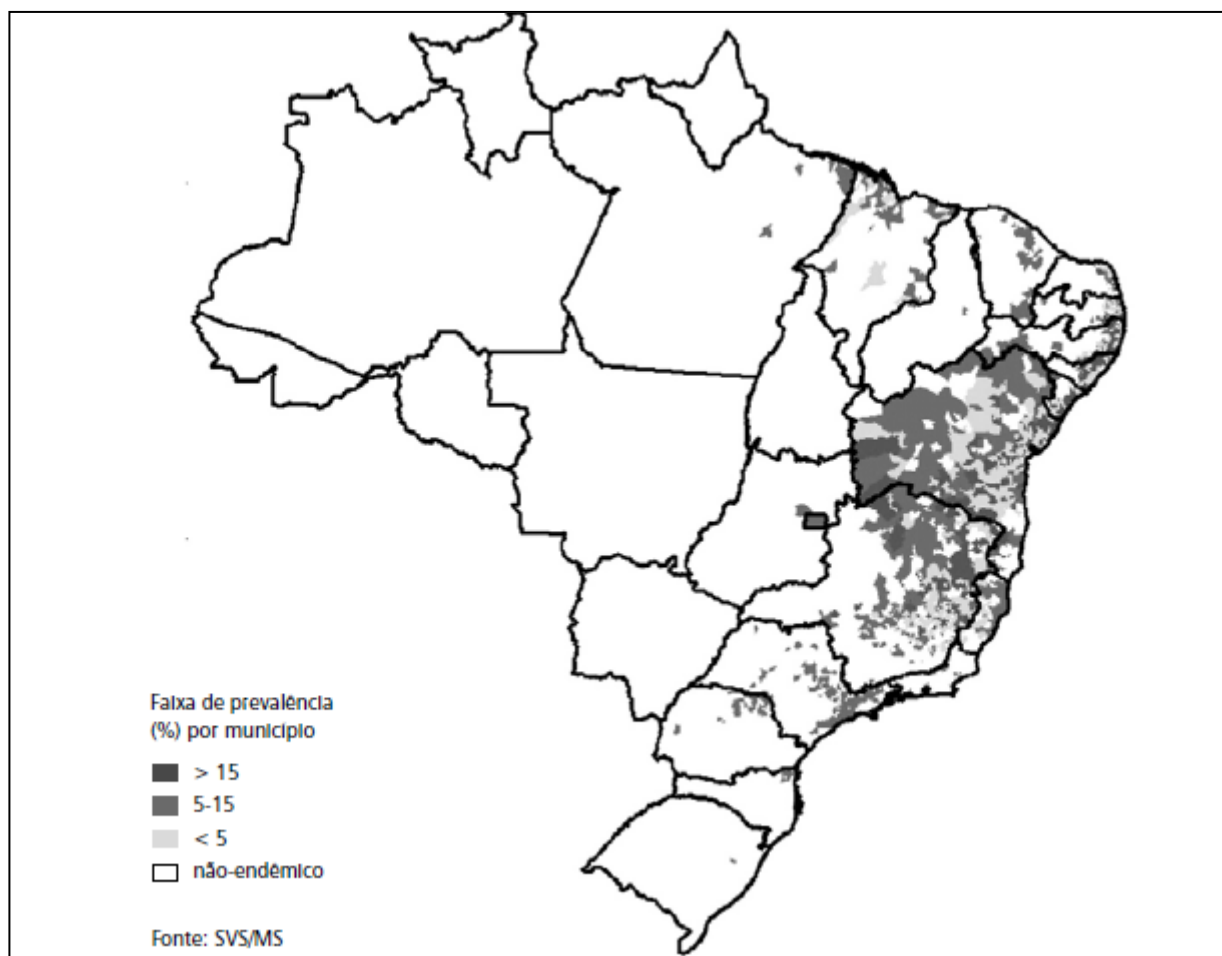


Figura 1: Áreas Endêmicas da esquistossomose mansônica.

Fonte: BRASIL, 2011.

O que se observa, no entanto, é que a esquistossomose está passando por um processo de transição epidemiológica, devido a migrações populacionais, perdendo seu caráter tipicamente rural para urbano (PORDEUS et al., 2008). Os movimentos migratórios estão entre os mais relacionados na introdução da doença para outras áreas do país. O aumento da população e as necessidades correspondentes de energia e água, muitas vezes resultam em regimes de desenvolvimento e modificações ambientais que também levam a um aumento da transmissão (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013).

Os primeiros focos da doença surgiram no Nordeste brasileiro, na zona litorânea canavieira, desde o Rio Grande do Norte, passando por regiões quentes e úmidas dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (CARVALHO et al., 2008). Entre os anos de 1995 e 2011 foram contabilizados cerca de 2 milhões e 300 mil casos registrados da doença no Brasil, sendo aproximadamente 50% deles nos estados do Nordeste. Neste levantamento, Pernambuco ocupou o quarto lugar entre os estados nordestinos com o maior índice de esquistossomose, respondendo por 175 mil casos (BRASIL, 2013).

No estado de Pernambuco, a primeira ação de controle da esquistossomose mansônica data de 1977 (BARBOSA et al., 2012) e recebeu atenção especial quando foi classificada em 2011, como doença negligenciada, pelo Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas, o SANAR (PERNAMBUCO, 2013). Dados do Ministério da Saúde apontaram o estado como o primeiro em óbitos pela doença, entre 1990 e 2011, dentre todos os estados brasileiros, respondendo por quase um terço dos óbitos totais da esquistossomose (BRASIL, 2013).

Esta parasitose é endêmica em 102 dos 185 municípios, sendo a zona da mata a área mais atingida, podendo apresentar em certas localidades 80% de indivíduos parasitados. As maiores prevalências são encontradas em localidades dos municípios das bacias do Capibaribe, Una, Sirinhaém, Ipojuca, Jaboatão e Goiana (**Figura 2**). (QUININO; BARBOSA; SAMICO, 2010). Acredita-se que os valores da infecção são subestimados, pela dificuldade de informação, não condizendo com a realidade (BARBOSA et al., 2012).

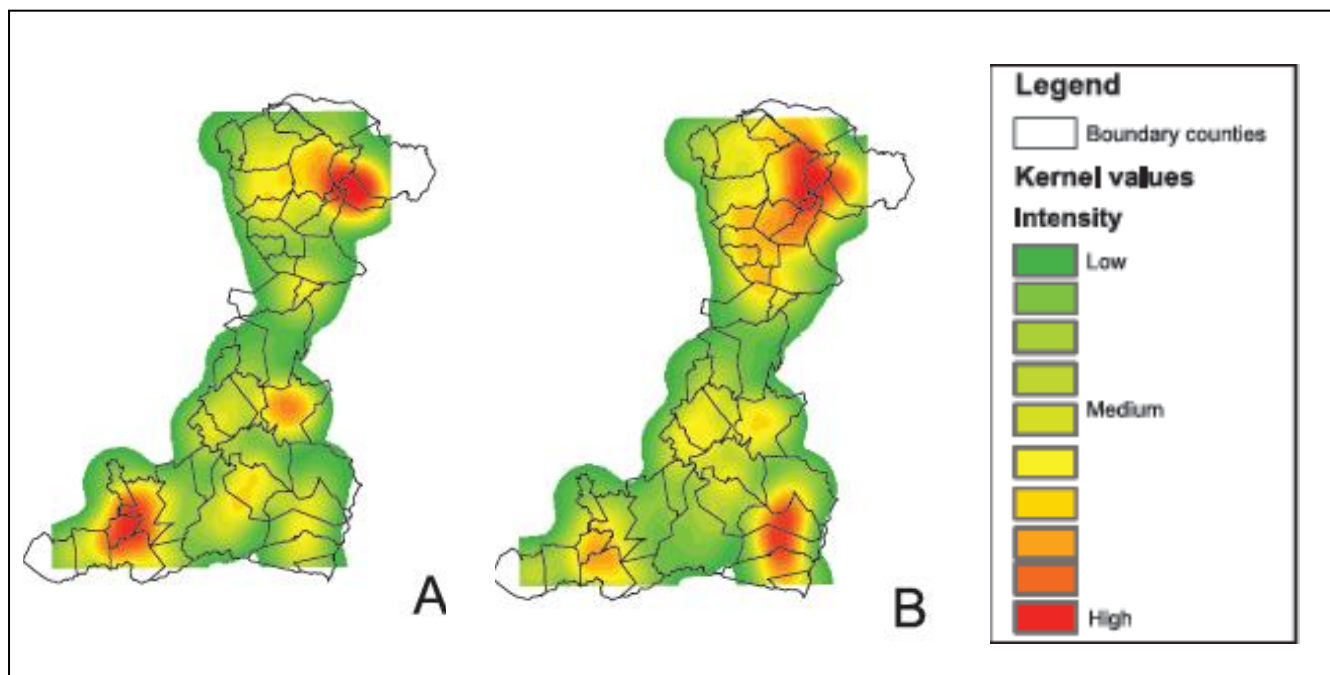


Figura 2: Distribuição espacial de prevalência (A) e intensidade de infecção(B) por *S. mansoni* na Zona da Mata, Pernambuco.

Fonte: Barbosa, et al., 2012.

2.3 Ciclo Biológico

O ovo do *S. mansoni* quando eliminado através das fezes do hospedeiro definitivo deve atingir coleções hídricas, tais como lagos, lagoas e açudes, onde o miracídio, sob temperatura e luz intensas, rompe a membrana do ovo. Ao cair em meio aquático, o miracídio necessita encontrar hospedeiro intermediário do *S. mansoni*, um caramujo do gênero *Biomphalaria*, para continuar seu desenvolvimento larval. No interior do molusco, passará por estágios intermediários de esporocisto primário e secundário, até que atingir a forma de cercária. As cercárias são liberadas pelo molusco sob estímulos de luz intensa e temperaturas elevadas e encontram, em um prazo de até 48 horas, seu hospedeiro definitivo, preferencialmente o homem. Nadam ativamente na água, graças a sua cauda bifurcada, e, quando encontram o hospedeiro, iniciam o processo de penetração pela pele e mucosas. Essas larvas fixam-se ao hospedeiro por meio de ventosas e por ação lítica e mecânica, promovem a penetração do corpo cercariano. Nesse momento, a cercária perde sua cauda e passa, então, a ser chamada esquistossômulo. Migram pelo tecido subcutâneo até caírem em algum vaso, sendo

levadas passivamente, pela circulação, até os pulmões, e de lá para o sistema porta (COELHO et al., 2008).

Uma vez no sistema porta-hepático, os esquistossômulos se estabelecem para sua vida adulta, estando prontos para acasalamento cerca de 25 a 28 dias após a penetração. Esse processo ocorre graças ao dimorfismo sexual: o macho possui o canal ginecóforo, o qual alberga a fêmea no momento do acasalamento. Ambos, macho e fêmea, migram acasalados para a veia mesentérica inferior e iniciam a postura de ovos. Por volta do 35º dia após a penetração, os ovos são depositados nos vasos da submucosa intestinal. Esses ovos podem ou permanecer no tecido e provocar inflamação do sistema gastrintestinal, ou ser eliminados junto às fezes. Neste caso, se as fezes, sem os devidos cuidados sanitários, forem lançadas em ambientes propícios, tais como lagos e açudes, o ciclo recomeça (**Figura 3**) (LENZI et al., 2008).

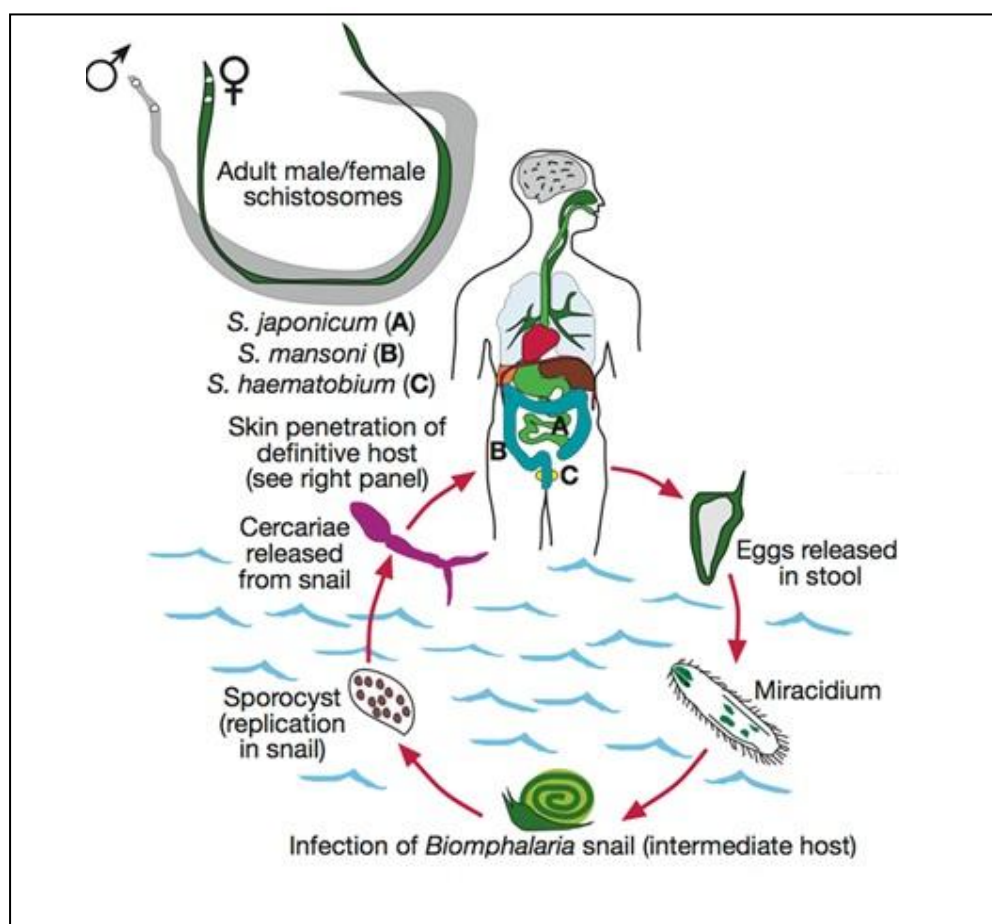


Figura 3: Ciclo de vida das espécies de Schistosoma

Fonte: Cummings; Turco, 2009.

2.4 Manifestações Clínicas

A esquistossomose mansônica é uma doença multifatorial, que inclui fatores ambientais e comportamentais do parasita e dos hospedeiros, sendo uma importante doença em relação a causas de morbidade e mortalidade (ELBAZ; ESMAT, 2012). Por ser um parasito intravascular do sistema porta-mesentérico, fêmea e macho adultos de *S. mansoni* se alojam nesses vasos do hospedeiro definitivo, onde a fêmea realizará a postura de cerca de 300 ovos diariamente (ANDRADE, 2009).

As manifestações agudas da doença coincidem com os estágios de invasão e migração do ciclo de vida do parasito. A entrada da cercária no individuo promove a dermatite cercariana (**Figura 4**), uma reação de hipersensibilidade caracterizada por um prurido transitório, acompanhado de eritema (MAHDAVI et al., 2013). Segue-se uma hiper-reatividade brônquica, que cursa com mal estar, febre, artralgia e erupções cutâneas, acompanhadas de eosinofilia, com aumento de IgM sérico (CHEEVER et al., 2002).



Figura 4: Dermatite causada pela penetração das cercárias

Fonte: Mahdavi et al, 2013

As formas adultas do verme migram acasaladas do fígado para o intestino, para a deposição dos ovos na região submucosa coloretal. Isto leva à formação de granulomas, congestão, edema, formação de pólipos, além de ulceração. Isto pode conduzir a dores abdominais, diarreia e disenteria, quando acompanhada de sangue (BARSOUM; ESMAT; EL-BAZ, 2013).

A fase crônica da doença é variável e pode começar a se estabelecer em torno de 10 a 20 semanas da infecção. A esquistossomose hepatoesplênica tem início com a deposição de ovos nos sinusóides hepáticos, promovendo o desenvolvimento do granuloma e hepatomegalia (CALDAS et al., 2008). A infecção crônica e a inflamação granulomatosa levam ao excesso de deposição de colágeno e outros componentes de matriz extracelular, causando fibrose periportal e oclusão das veias porta. Isto levará ao desenvolvimento de hipertensão portal, esplenomegalia, ascite, varizes e hemorragia gastrointestinal (**Figura 5**) (BURKE et al., 2009).

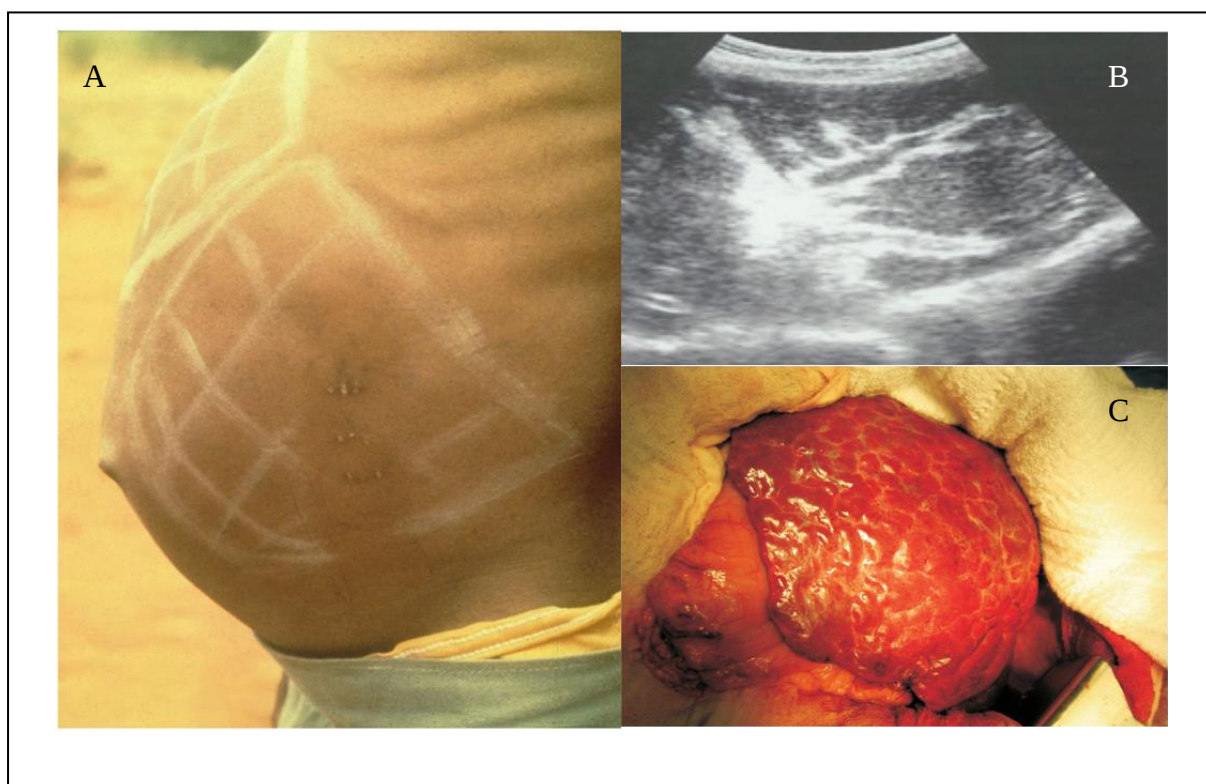


Figura 5: Hepatoesplenomegalia em criança em idade escolar no Quênia (A); imagem de ultrassom de fibrose periportal (B); fibrose periportal em indivíduo de 48 anos de idade (C)

Fonte: Wilson, et al, 2011; Lambertucci, et al, 2009

O quadro sintomático da esquistossomose depende do número de ovos e do órgão onde estão localizados. A esquistossomose hepática é a forma mais comum da doença na fase crônica e geralmente, resulta de uma resposta imune mediada por célula por causa dos antígenos dos ovos do verme, com fibrose progressiva e irreversível e severa hipertensão portal (ELBAZ; ESMAT, 2012). Embora a carga parasitária seja de primordial importância na patogênese da doença, fatores como condições de infecção e reinfecção, genética do hospedeiro e linhagem do parasita também desempenham papel significativo (VENNERVALD; DUNNE, 2004).

No fígado os ovos maduros, por serem bastante antigênicos, ativam a resposta imune TH1 com produção de citocinas do tipo TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e concomitante ativação de macrófagos, o que resulta na formação de granulomas e febre, caracterizando a infecção aguda. Com a cronificação da doença, a resposta imunológica predominante passa a ser do tipo TH2, com produção de IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, recrutamento de eosinófilos, formação do granuloma e fibrogênese do fígado, associados também a um quadro afebril. (GRYSCHK; CHIEFFI, 2008).

O granuloma periovular é formado quando o ovo encontra-se retido dentro do tecido vivo, no qual não consegue ser expulso (**Figura 6**). É uma lesão essencialmente inflamatória, que logo se torna encapsulada pela formação de anéis concêntricos de colágeno (ANDRADE, 2009). Durante a infecção inicial, os granulomas periovulares no fígado são grandes, ricos em eosinófilos e com centros necróticos de periferia irregular. Com o tempo, os granulomas mais velhos vão sofrendo involução, e os eosinófilos vão sendo substituídos por macrófagos. Há formação de células gigantes, as quais englobam resquícios da casca do ovo. Raramente se formam células de Langhans. Por fim, inicia-se um processo de collagenização, sendo, ao final, substituído por um nódulo de fibras hialinas concêntricas (ANDRADE, 2009).

Embora a formação do granuloma possa ser benéfica para o hospedeiro por bloquear os efeitos hepatotóxicos dos antígenos dos ovos, esse processo leva à fibrose, com excessiva acumulação de colágeno e proteínas de matriz extracelular no espaço periportal (HAMS et al., 2013). Essa fibrose acontece por um balanço das citocinas TH1 e TH2 em infecções pelo *Schistosoma* com grande carga de parasitas, cuja intensa liberação de ovos causa bloqueio de vasos periféricos portais de pequeno calibre (ANDRADE, 2009).

Para garantir que o sangue continue circulando, associado à fibrose, existe angiogênese, como um passo importante na patogênese das lesões na doença, cuja função se torna evidente durante a formação dos granulomas periovulares, bem como na gênese da fibrose portal esquistossomótica (ELBAZ; ESMAT, 2012). O resultado são vasos portais muito dilatados, que se assemelham a cachimbos, com coloração clara em comparação ao parênquima hepático e que atravessam o fígado, recebendo o nome de fibrose de Symmers (BURKE et al., 2009). Deve-se notar, no entanto, que embora haja essas transformações, a morfologia externa do fígado permanece conservada.

Quando os vermes são eliminados pela quimioterapia e a inflamação diminui, ocorre degradação da matriz em excesso e há uma tendência a restabelecer uma situação próxima do normal da relação parênquima/estroma. Quanto mais jovem a fibrose mais rápida a degradação do colágeno. Além disso, lesões obstrutivas vasculares são parcialmente reparadas ao mesmo tempo em que pequenos vasos sanguíneos brotam em diversas direções (ANDRADE, 2009).

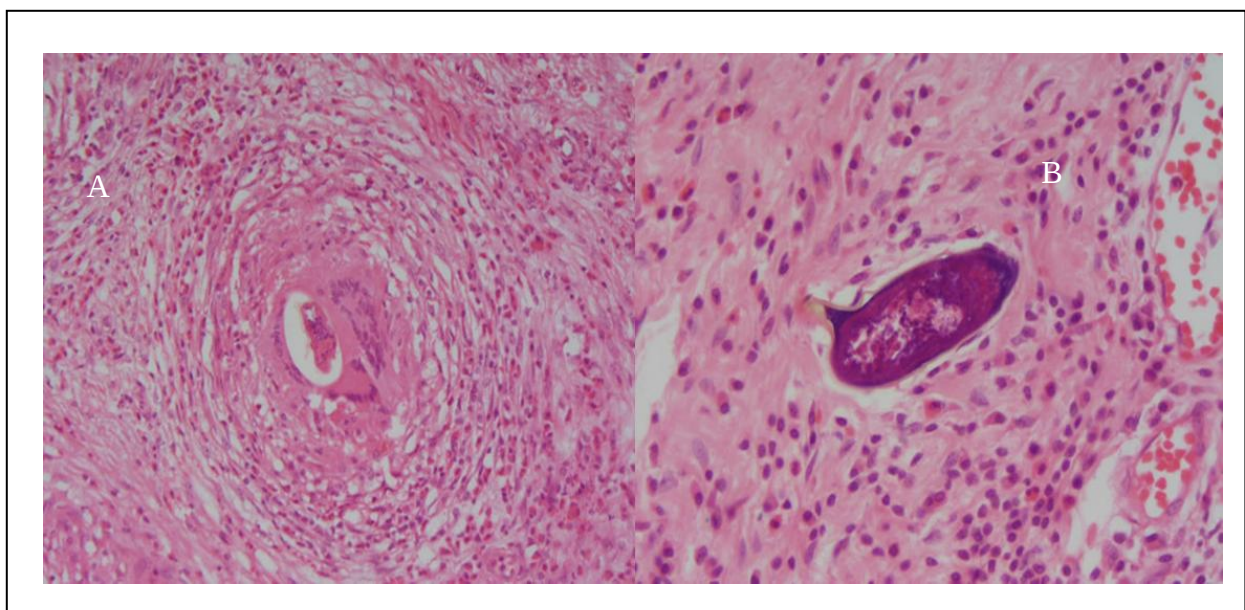


Figura 6: Granuloma com macrófago multinucleado englobando ovo de *S. mansoni* (A); mucosa de intestino grosso sem alterações. Ovo de *Schistosoma mansoni* na sub-mucosa (B)

Fonte: http://www.medicina.ufba.br/patologia_i/microscopia/icesquis.htm

2.5 Glicobiologia do *Schistosoma mansoni*

Dentre as quatro maiores classes de moléculas orgânicas, os carboidratos são os mais abundantemente encontrados na natureza, e praticamente todos os organismos possuem a capacidade de sintetizá-los e metabolizá-los. A heterogeneidade dos carboidratos em um sistema vivo é resultado de determinadas características, tais como a habilidade de diferentes tipos e números de resíduos de açúcar para formar ligações glicosídicas, as características estruturais dessas moléculas, o tipo de ligações anoméricas, a posição e a ausência ou presença de ramificações (GORELIK; GALILI; RAZ, 2001).

As moléculas monoméricas de carboidrato podem se juntar e formar oligossacarídeos. Estes, por sua vez, podem formar ligantes glicosídicos com proteínas e lipídios por dois principais tipos de ligação. O primeiro deles envolve a ligação de N-acetilglicosamina à cadeia lateral de asparagina e são assim chamadas N-ligantes. O segundo tipo envolve a ligação do carbono C-1 do N-acetilgalactosamina ao hidroxil da serina ou trionina e é chamado O-ligante (GORELIK; GALILI; RAZ, 2001).

A variabilidade estrutural dos glicanos de superfície celular permite funções diversas como sinalização, reconhecimento e adesão de moléculas. Tais glicanos estão envolvidos em papéis fisiológicos que incluem envolvimento embrionário, diferenciação e crescimento celular, desenvolvimento de doenças, rigidez de membrana e interação patógeno-hospedeiro. Muitos patógenos humanos utilizam glicanos da superfície celular como receptores ou ligantes para promover adesão e infecção. Por exemplo, a *Escherichia coli* liga-se a resíduos de manose, enquanto que o vírus *influenza* a resíduos de ácido siálico (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

Como forma de invasão e para auxiliar no parasitismo, muitos protozoários e helmintos também sintetizam estruturas antigênicas de carboidratos e proteínas ligadoras de glicanos (GBP). O protozoário *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, possui um revestimento de glicanos na superfície, que possui função de proteção, permitindo ao parasita a sobrevivência em ambientes hidrolíticos, além de promover a adesão de formas evolutivas desse parasita em macrófagos do hospedeiro definitivo para posterior invasão (CUMMINGS; TURCO, 2009).

O *Schistosoma mansoni* e, particularmente seus ovos, produzem grandes quantidades de glicoproteínas, glicolipídios e ligantes de membrana circulatórios contendo antígenos fucosilados (VAN DIE et al., 2005). Esses glicanos possuem um

importante papel na facilitação da passagem dos ovos pelos tecidos do hospedeiro, particularmente no intestino. Quando secretados pelos ovos, aprisionados nos vasos e tecidos, são altamente antigênicos e podem acelerar a resposta inflamatória (CUMMINGS; NYAME, 1999).

Entre as estruturas antigênicas secretadas durante a invasão, estão inclusos antígenos Lewis^X (Le^X), LacdiNAc (LDN), LacdiNAc fucosilado ((LDNF) e ramificações de polifucose (**Figura 7**). Além disso, os esquistossomos são ricos em estruturas de complexo de glicanos e contêm um grande conjunto de glicoesfingolipídios e O- e N-glicanos ligados a uma grande quantidade de glicoproteínas (NYAME et al., 2003). Estudos apontam que soros de portadores de esquistossomose contêm certas quantidades de anticorpos contra Galb1-4(Fuca1-3)GlcNAc (Le^x, CD15), um epítipo de glicano existente tanto em humanos quanto nas espécies de *Schistosoma*. Esses anticorpos Le^x podem induzir respostas autoimunes no hospedeiro (VAN DIE et al., 2005).

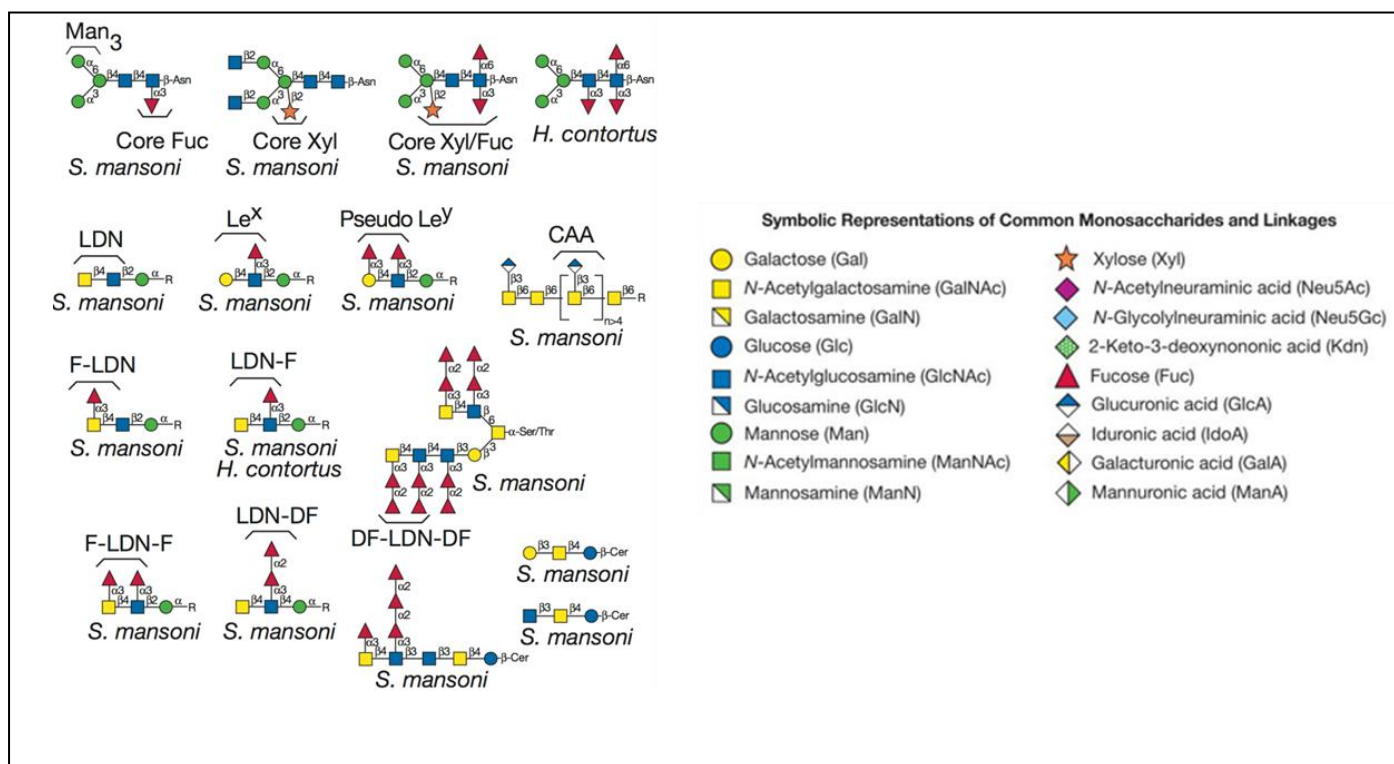


Figura 7: esquema representativo das estruturas de glicanos em *Schistosoma mansoni* e *Haemonchus contortus*. Os antígenos estão indicados pelas estruturas em parenteses. (LDN) LacdiNAc; (Le^x) Lewis^x; (CAA) antígeno anódico circulante; (F–) fucosilado; (DF–) difucosilado

Fonte: Varki et al., 2009

A identificação de muitos desses glicoconjugados antigênicos, por meio de diversas técnicas moleculares e histoquímicas, ajudam no desenvolvimento de novos procedimentos diagnósticos para a esquistossomose. Além disso, a caracterização desses glicoconjugados e das enzimas responsáveis pela biossíntese de antígenos glicanos, juntamente com as enzimas do hospedeiro intermediário, podem ajudar na identificação de novas drogas alvo e desenvolver vacinas baseadas em carboidratos (CUMMINGS; TURCO, 2009).

2.6 Biomarcadores na Esquistossomose

O diagnóstico para a esquistossomose mansônica é baseado na clínica, em aspectos epidemiológicos e em achados laboratoriais. Muitas vezes, a técnica de Kato-Katz para pesquisa de ovos nas fezes do indivíduo infectado não é tão eficiente. Isto se deve ao fato de que é uma técnica falha quando a intensidade da infecção é baixa, além de não poder ser feita em amostras diarreicas, apesar de ser este um quadro comum na infecção por *S. mansoni* (CARNEIRO et al., 2012).

Para contornar este problema, diversas técnicas vêm se utilizando de marcadores imunológicos e moleculares para detecção da esquistossomose mansônica em tecidos e soro dos pacientes infectados. Um dos meios de se identificar a doença é através da pesquisa de anticorpos IgG e IgM específicos para hemocianina do molusco *Megathura cremulata*, presente em portadores de esquistossomose em fase aguda (referencia tese (ALVES-BRITO et al. 1992, RABELLO et al. 1994). Além destes, há citocinas também associadas à fase aguda, tais como IL-5, IL-10 e IL-3. Dentre os marcadores moleculares, a pesquisa da proteína recombinante RP26 (26kDa) do *S.mansoni* é capaz de diferenciar a fase aguda da crônica por ensaio de ELISA, além da pesquisa de fragmentos de DNA do parasito (MAKAROVA et al., 2003; RABELLO et al., 2008).

Existem também marcadores antigênicos, como contra proposta à utilização de anticorpos na pesquisa da doença. Dentre os antígenos circulantes, os mais utilizados são o Antígeno Catódico Circulante (CCA) e o Antígeno Anódico Circulante (CAA), glicoproteínas de pH neutro que se destacam entre os antígenos excretados/secretados pelo *Schistosoma* na corrente sanguínea do hospedeiro (VARKI et al., 2009) e podem ser identificados no soro de indivíduos infectados e até mesmo na urina destes pacientes (VAM DAM, et al., 2004)

Há ainda os marcadores para investigação de fibrose hepática associada à esquistossomose mansônica, como produtos da síntese do colágeno ou de sua degradação, enzimas envolvidas na síntese ou degradação da matriz, glicoproteínas da matriz extracelular, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Porém, nenhum destes marcadores é fígado específico e pode ser alterado por alterações na purificação, metabolismo e excreção. Além destes, para identificação da fibrose existe o ácido hialurônico, um polissacarídeo, o TGF- β , uma citocina, e YKL40, uma glicoproteína, que estão aumentados em doenças hepáticas fibrosantes (KELLEHER et al, 2005; DOMINGUES; MEDEIROS; LOPES, 2011).

2.7 Lectinas

Por volta do século 19, foram iniciados estudos de proteínas extraídas de plantas com a propriedade de aglutinar hemácias, chamadas então de hemaglutininas. Acredita-se que o estudo de lectinas foi iniciado com Peter Hermann Stillmark em 1888, que isolou uma proteína altamente tóxica de uma árvore de mamona (*Ricinus communis*), denominando-a de ricina. Subsequentemente, H. Hellín demonstrou a presença de outra hemaglutina tóxica, dessa vez retirada de extratos de *Abrus precatorius* (jequiriti), e chamou-a de abrina. Juntas, ricina e abrina foram empregadas pelo Royal Institute of Experimental Therapy (Frankfurt) em modelos de estudos imunológicos (SHARON; LIS, 2004)

De maneira abrangente, lectinas correspondem a uma classe de proteínas, de origem não imune, caracterizadas por possuir pelo menos um domínio catalítico, que se liga reversível e especificamente a um mono ou oligossacarídeo (BIES; LEHR; WOODLEY, 2004). São amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em plantas, animais vertebrados e invertebrados e em microrganismos, e tem a propriedade de aglutinar eritrócitos (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). Quando em presença destes, combinam não só com açúcares da superfície dessas células, como também promovem uma ligação cruzada com outras células e sua subsequente precipitação (SHARON; LIS, 2004).

Em geral, cada molécula de lectina possui dois ou mais sítios de combinação a carboidratos, podendo ser bi ou polivalente. Baseado na sua especificidade, as lectinas que ligam monossacarídeos podem ser classificadas em cinco grupos, de acordo com o açúcar ao qual possui maior afinidade: manose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-

acetilglicosamina, fucose e ácido N-acetilneuramínico (LIS; SHARON, 1998). Certas lectinas possuem a mesma especificidade de ligação a determinados carboidratos, podendo se ligar à porção α - ou β -glicídica. Glicosídios aromáticos ligam-se muito mais fortemente a lectinas que os alifáticos, atestando a presença de regiões hidrofóbicas fechadas para sítios de combinação a carboidratos (SHARON; LIS, 2004).

Algumas lectinas interagem melhor com determinados tipos de oligossacarídeos. Do ponto de vista funcional, a ligação a esses carboidratos é de essencial importância, uma vez que eles são os mais prováveis ligantes naturais de lectinas. Essa afinidade maior pode ser explicada pelo fato de serem moléculas flexíveis com considerável liberdade de rotação em torno das ligações glicosídicas, ligando constituintes monossacarídeos individuais (LIS; SHARON, 1998).

Outra forma de classificação das lectinas vegetais é quanto aos seus domínios ligantes. São assim chamadas merolectinas aquelas que possuem um único domínio de ligação a carboidratos; hololectinas, as que apresentam dois ou mais sítios de ligação, cujos domínios são idênticos ou homólogos; e quimerolectinas, proteínas de fusão, possuem um domínio de ligação a carboidratos e outro domínio com função catalítica ou biológica (**Figura 8**) (PEUMAS; VAN DAMME, 1995). Há ainda uma classificação posterior, de 1998, denominada superlectina, que corresponde àquelas lectinas com dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, cujos domínios possuem especificidades diferentes (SULÁK et al., 2011).

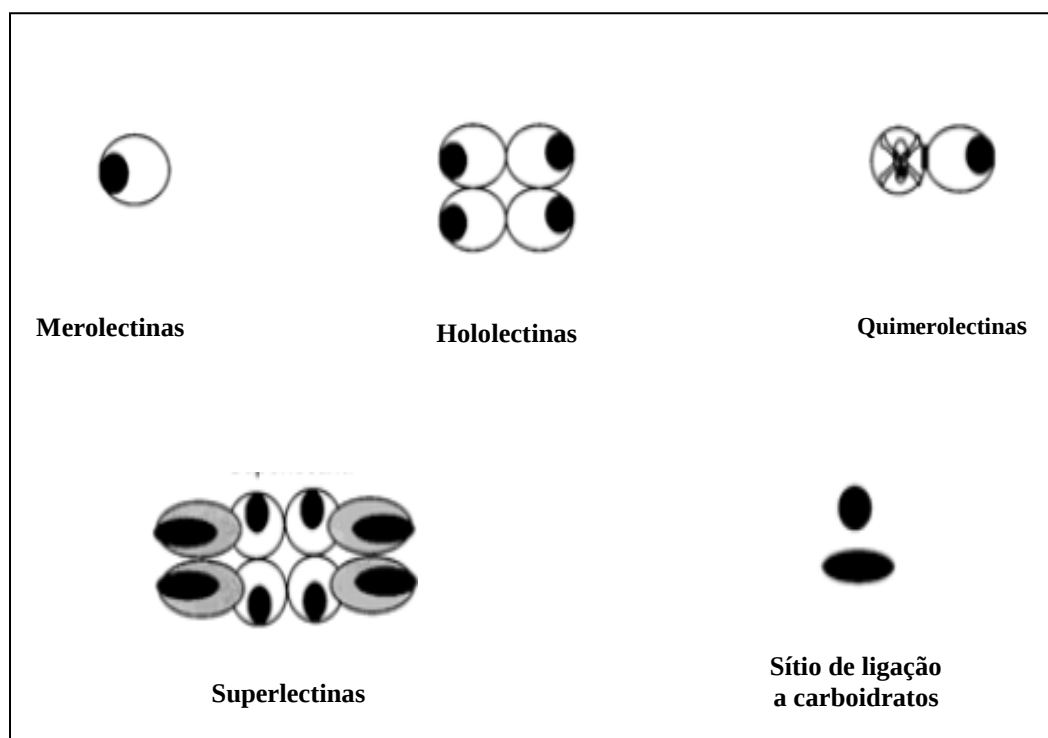


Figura 8: Representação esquemática dos quatro tipos de lectinas de plantas, modificado a partir de Lis & Van Damme, 1998

2.7.1 Con A

A Concanavalina A (Con A) é uma lectina que foi isolada do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) primeiramente por Summer e Howell, ocasião na qual foi observada a propriedade de hemaglutinar hemácias (BALLERSTADT et al., 2006). É uma proteína tetramérica, $\text{Ca}^{+2}/\text{Mn}^{+2}$ dependente, sendo ambos os metais fundamentais para a estabilização da conformação da proteína. A Con A é manose/glicose ligante e a interação com esses carboidratos acontece pela ligação dessa proteína aos metais cálcio e manganês, o que deve ocorrer em cada uma das quatro unidades monoméricas (LI et al., 2011).

Cada monômero desta lectina é constituído por 237 resíduos de aminoácidos, os quais formam duas fitas antiparalelas, e se associa por interações polares, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas. A estrutura organizacional é pH dependente: para valores de pH acima de 5,5, encontra-se como tetrâmero, com as subunidades ligadas possuindo um peso molecular de aproximadamente 110.000 Da e abaixo desse valor, está no seu formato de dímero, cujo peso molecular corresponde a 55.000Da (BALLERSTADT et al., 2006).

Existem muitos estudos a respeito da interação da Con A com células normais e neoplásicas, explorando seus efeitos biológicos de mitogenicidade, citotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade (BALLERSTADT et al., 2006). Sabe-se, por exemplo, que esta lectina possui a capacidade de agir como linfocitomitógeno e melhorar a resposta imunitária (REIS et al., 2008).

2.7.2 WGA

A lectina do germe de trigo (Wheat germ agglutinin – WGA) foi caracterizada por Nagata e Burger, em 1974, quando foi extraída de sementes de *Triticum vulgaris* a partir de estudos de sedimentação e análise de aminoácidos (OHBA; BAKALOVA; MURAKI, 2003). É uma proteína de massa molecular 36 kDa em pH neutro, que forma dímeros e apresenta três isoformas, denominadas WGA 1, WGA 2 e WGA 3. Preferencialmente, possui afinidade por N-acetil-glicosamina, mas também apresenta ligação a terminais de ácido N-acetil-neuramínico (SCHWEFEL et al., 2010).

Quanto às suas propriedades biológicas, a WGA induz a síntese de Interferon β e atua ao mesmo tempo como mitógeno e antimitógeno de linfócitos humanos, uma vez que em baixas doses de WGA estimula a síntese de DNA em linfócitos totais e em altas

does promove a supressão da síntese de DNA nessas células. Apresenta ainda a capacidade de retardar o desenvolvimento do tecido de granulação e a síntese de fibras de colágeno durante o processo de reparação tecidual em pele de ratos (SELL; COSTA, 2000).

2.7.3 SNA

A *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA) é uma lectina extraída do sabugueiro (*Sambucus nigra*), tendo sido primeiramente caracterizada por Broekaert, em 1984. É uma proteína de afinidade por resíduos de ácido siálico, ligados ao terminal de galactose α -2, 6 e, em menor grau α -2, 3 (ISKRATSCH et al., 2009).

Apresenta cinco isoformas, de massa molecular aproximadamente 33KDa, denominadas SNA-I SNA-II, SNA-III, SNA-IV e SNA-V. Apenas a SNA-I apresenta a forma de tetrâmero e as outras são dímeros. Estas isoformas são consideradas proteínas ribossomo-inativadoras, pois têm a capacidade de retirar um resíduo de adenina de uma região altamente conservada na subunidade maior do RNA ribossomal, interrompendo a síntese de proteínas em determinadas células (MAVEYRAUD et al., 2009).

A SNA possui propriedades de defesa de plantas contra vírus, insetos e predadores, com papel também de armazenamento em organelas de plantas. Além disso, estas proteínas possuem um grande potencial de exploração para seres humanos, uma vez que podem atuar como agentes antivirais e inseticidas, bem como na detecção de células tumorais, através de biomarcadores e efeitos antiproliferativos (SHAHIDI-NOGHABI et al., 2010).

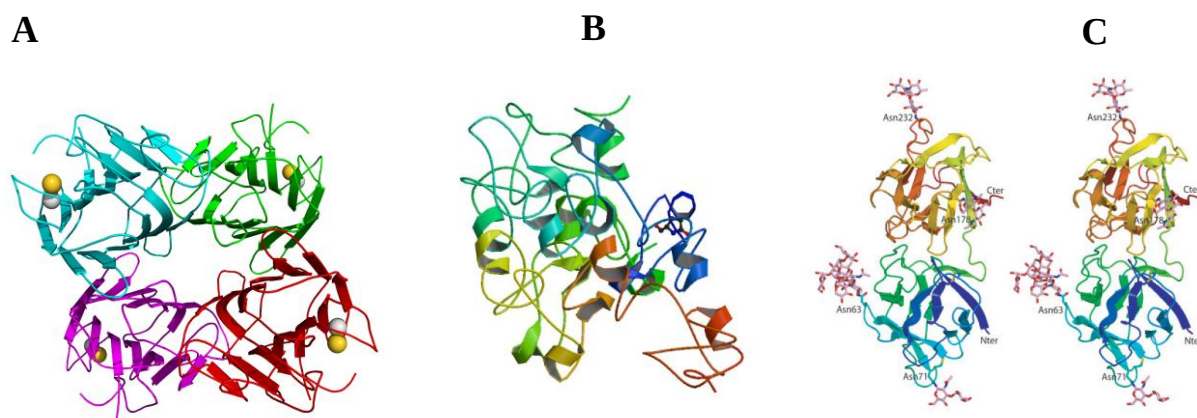


Figura 9: Representação da estrutura tridimensional da Con A (A), WGA (B) e SNA-II (C).

2.7.4 Aplicações das lectinas

Lectinas possuem propriedades que vão desde imunomodulação, ação antifúngica e antitumoral até inibidores de atividades da transcriptase reversa do HIV-1, podendo ser encontradas na natureza, através de extração a partir de sementes, cascas ou frutos, ou ser produzidas em laboratório através de técnicas recombinantes (ZHANG et al., 2009; LAM; NG, 2011).

Essas glicoproteínas vêm sendo usadas como promissores agentes contra insetos que atingem plantações. Elas aumentam a mortalidade ou atrasam o desenvolvimento desses animais. A lectina de *Arisaema jacquemontii*, por exemplo, afeta o desenvolvimento de larvas de *Bactrocera cucurbitae* (KAUR et al., 2006). As propriedades anti-inseticidas das lectinas podem também atuar nas atividades enzimáticas das formas larvais, como é o caso de larvas de *Zabrotes subfasciatus*. Após tratamento com diferentes lectinas, a atividade de esterases nas larvas aumentou, enquanto que as atividades de fosfatase ácida e fosfatase alcalina diminuíram. Além disso, houve diminuição de oviposição e deficiência no crescimento de besouros adultos (LAGARDA-DIAZ et al., 2009).

Apenas lectinas vegetais possuem atividades anti-fúngicas, particularmente as quimerolectinas pertencentes à classe de I-quitinase. A atividade antifúngica destas proteínas é atribuída a seu domínio catalítico, uma vez que essas lectinas não conseguem se ligar nem aos glicoconjugados sobre as membranas dos fungos nem penetrar no citoplasma (LAM; NG, 2011).

Os efeitos anti-tumorais das lectinas são bem documentados na literatura, podendo atuar como drogas antineoplásicas e impedir a proliferação das células malignas. Lin e colaboradores, em 2008, descobriram que a lectina da soja preta (*Glycine max*), por exemplo, impede a proliferação de células MCF7 relacionadas ao câncer de mama e células HepG2 de hepatoma. A lectina da banana Del Monte, por sua vez, retarda a proliferação das células (L1210), além de também atuar nas células do hepatoma HepG2 (CHEUNG; WONG; NG, 2009).

As propriedades antivirais dessas glicoproteínas são usadas principalmente em estudos com retrovírus, como o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1). A lectina específica de D-manose extraída de *Gerardia savaglia*, por exemplo, foi utilizada para prevenir a infecção de células humanas H9 pelo vírus HIV-1 (MULLER et al., 1988). As lectinas WGA, Con A, PSA (*Pisum sativum* agglutinin) e Vicia faba aglutinina

foram utilizadas para se ligar à proteína gp 120, que envolve o capsídeo do vírus. Estas lectinas, uma vez ligadas a essa glicoproteína, foram capazes de inibir a fusão do vírus a células CD4, por interação específica do carboidrato com a célula infectada por HIV (HANSEN et al., 1989).

Além da utilização anti-viral, recentes trabalhos vêm mostrando a eficácia da utilização de lectinas em estudos contra parasitas. Cramoll 1,4 (*Cratilia mollis*), quando colocadas em meio contendo formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foi capaz de reconhecer glicoconjugados na superfície dessas células, o que promoveu a aglutinação das mesmas, diminuindo sua viabilidade e proliferação (FERNANDES et al., 2010). A mesma Cramoll 1,4, quando administrada em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, mostrou-se eficaz, como atividade anti-inflamatória, por reduzir os granulomas hepáticos provocados pela doença. Ainda, diminuiu a atividade helmíntica, reduzindo a quantidade de ovos liberados pelos vermes, quando comparado ao grupo controle, através da observação do Kato-Katz (MELO et al., 2011).

A ConBr, uma lectina extraída da *Canavalia brasiliensis*, da flora brasileira, muito parecida com a ConA, reduziu o tamanho de lesões em camundongos BALB/c infectados por leishmaniose, além de ter estimulado a produção de IFN- γ (BARRAL-NETO et al., 1996). A ConBr também foi avaliada como um estimulante de células Th1 para um antígeno específico de imunização contra *Leishmania amazonensis*. Em um estudo em conjunto com mais duas lectinas, a PAA (*Pisum arvense*) e KM+ (*Artocarpus interfolia*), observou-se uma redução no número de parasitas e uma alta resposta inflamatória (TEXEIRA et al., 2006).

Em outro estudo utilizando a ConBr, o efeito imunomodulatório desta lectina foi observado em indivíduos com e sem infecção ativa de *S. mansoni*. Foi percebido que houve aumento na produção de IL-5, embora não tenha sido muito significativa diferença da produção entre indivíduos pertencentes ao grupo positivo e grupo negativo. Porém, o estudo indicou que a lectina testada não foi capaz de mudar a resposta Th2 típica da esquistossomose mansônica. Isto impede a sua utilização como potencial adjuvante ou agente imunomodulador em modelos experimentais da doença ou mesmo no tratamento de imunização, em contraste com os efeitos benéficos vistos na leishmaniose experimental (REIS et al., 2008).

Afora tais atividades de toxicidade, as lectinas vêm sendo empregadas também como sondas bioquímicas. Sua utilização como instrumento analítico permite a identificação de glicoconjugados, devido à sua ligação específica com os mesmos. Para tanto, é necessária a conjugação dessas proteínas a substâncias reveladoras, de modo que permita a visualização da ligação lectina-carboidrato, como, por exemplo, a peroxidase, substâncias fluorescentes e quimiluminescentes (CAMPOS et al., 2006; BRUSTEIN et al., 2012; FERREIRA et al., 2013).

Desta forma, lectinas têm sido empregadas em histoquímica em diversos ramos. Entre eles, detecção de mudanças na glicosilação em diversos tipos de neoplasias (CAMPOS et al., 2006; BRUSTEIN et al., 2012) e reconhecimento de glicoconjugados no tegumento de *Schistosoma mansoni*, além de utilizados na avaliação de granulomas hepáticos de camundongos infectados (**Figura 10**) (MELO-JUNIOR et al., 2008; ARAÚJO et al., 2011).

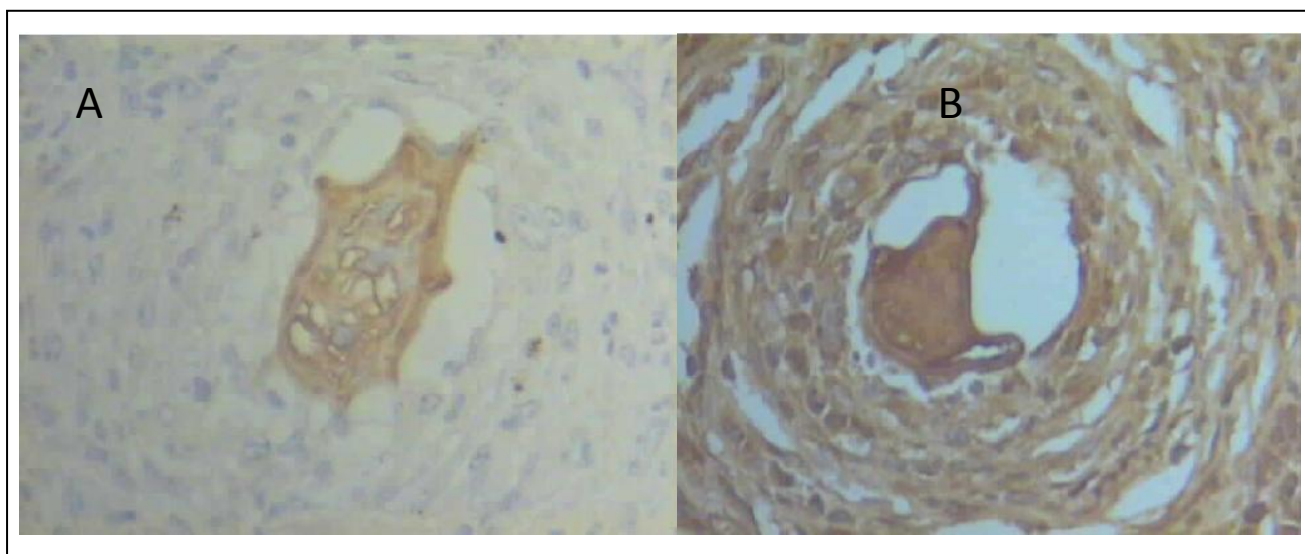


Figura 10: Detecção de resíduos de n-acetilglicosamina (A) e galactose (B) respectivamente pelas lectinas WGA e PNA
Fonte: (Melo-Junior et al, 2008)

2.8 Quimiluminescência

Luminescência é um termo usado para descrever a emissão de luz que ocorre quando uma molécula excitada volta ao seu estado normal e libera energia na forma de luz. Essa energia pode ser fornecida por radiação magnética (fotoluminescência, também conhecida como fluorescência ou fosforescência), impacto eletrônico (catodoluminescência), calor (piroluminescência), força friccional (triboluminescência) ou cristalização (cristaloluminescência). Na quimiluminescência, a energia é produzida por uma reação química (DODEIGNE; THUNUS; LEJEUNE, 2000).

A quimiluminescência (QL), portanto, é definida como a produção de luz gerada através de uma reação química que é acompanhada pela liberação de energia maior que 45 kcal mol^{-1} . Neste processo são formados radicais que interagem e produzem intermediários instáveis que se decompõem com a formação de espécies excitadas ou são desativadas para o estado fundamental ou através da transferência de energia para moléculas luminóforas de rendimento quântico elevado (LIU; LIN; LIN, 2010).

O fenômeno da QL foi descrito primeiramente em 1877, por Radziszewski, que observou a emissão de luz amarela quando o oxigênio entrava em contato com solução alcalina. Mas foi em 1928 que Albrecht relatou as propriedades do luminol (5-amino-2,3-diidrofotalazina-1,4-diona), quando observou a reação de oxidação deste produto com o peróxido de hidrogênio (DODEIGNE; THUNUS; LEJEUNE, 2000).

Os derivados de acridina, por sua vez, só foram conhecidos por suas propriedades quimiluminescentes quando, em 1935, Gleu e Petsch descreveram a emissão de luz verde e azul do nitrato de bis-N-metilacridina, a lucigenina (LARA; GARCÍA-CAMPAÑA; AARON, 2010). Rapidamente, o éster de acridina substituiu o luminol pelas grandes vantagens que oferecem, tais como: alta sensibilidade, fácil manuseio e descarte, e longo tempo de conservação, além de a reação ocorrer em um espaço de tempo muito curto (BRUSTEIN et al., 2012).

Em uma reação envolvendo sais de acridina, para se obter QL deve existir em solução o peróxido de hidrogênio e uma base forte. Esse processo ocorre mesmo na ausência de um catalisador (KING et al., 2007). A cinética dessa reação ocorre da seguinte forma: esses derivados, com seus anéis cíclicos, encontram-se em equilíbrio com uma base neutra não quimiluminogênica. Quando há aumento de pH, o peróxido de hidrogênio, ataca a molécula de acridina e este equilíbrio é deslocado em direção à base

neutra, formando um composto intermediário. Na restauração do equilíbrio, o composto formado na reação anterior se decompõe e produz o N-metilacridona havendo a emissão de fótons de luz (**Figura 11**) (DODEIGNE; THUNUS; LEJEUNE, 2000). Convencionalmente, o éster de acridina quimiluminescente é medido como um flash de emissão rápida (cerca de um segundo) de luz visível, cujo comprimento de onda está em torno de aproximadamente 430 nm (BROWN et al., 2009).

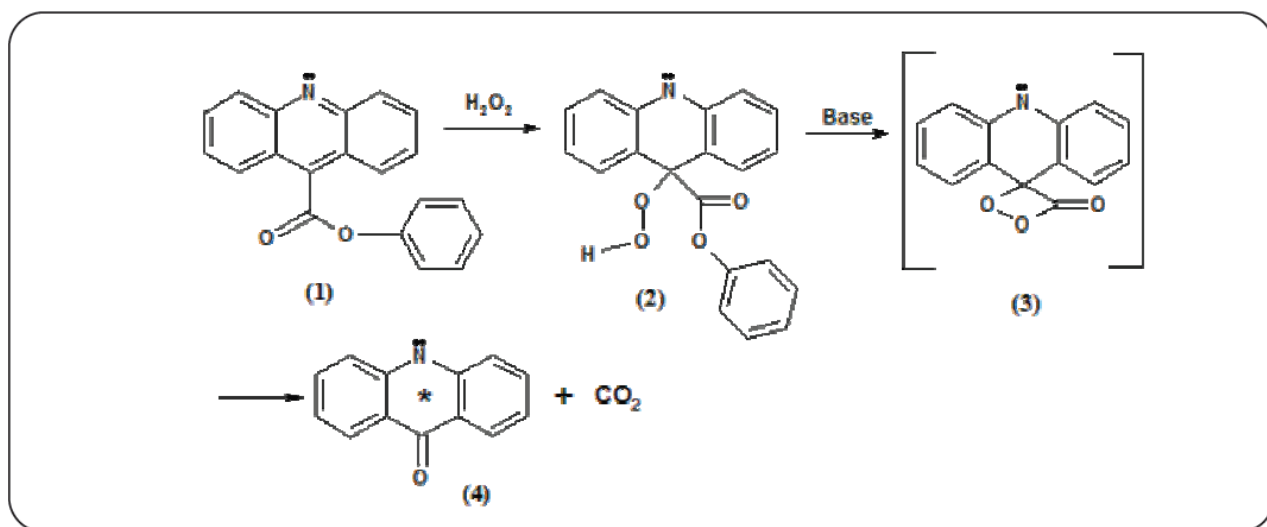


Figura 11: Mecanismo de QL do éster de acridina: equilíbrio com uma base neutra e acréscimo de Peróxido de Hidrogênio (1); ataque da molécula de acridina pelo H_2O_2 (2); formação de um composto intermediário (3); na restauração do equilíbrio, o composto formado na reação anterior se decompõe, havendo a emissão de fótons de luz e liberação de CO_2 (4)

Fonte: (Chaichi et al, 2011)

A utilização da QL depende do acoplamento biomolecular da substância de interesse a um dos participantes da reação ou ao produto no estado excitado, sendo a emissão de luz proporcional à concentração de amostra conhecida (BROWN et al., 2009). Reações envolvendo éster de acridina (EA) se beneficiam do fato de que é possível haver detecções da atividade em limites muito baixos, na faixa de fentomoles ou atomoles, além de os ensaios serem feitos de maneira rápida e haver uma gama de aplicações analíticas (KRICKA, 2003).

Como vantagens inerentes a esta técnica estão à possibilidade de se utilizar instrumentos básicos de análise, além da simplificação do sistema óptico, uma vez que não é necessária uma fonte de luz externa. A cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC) acoplada à detecção quimiluminescente, por exemplo, proporciona uma elevada eficácia na separação e detecção de baixos limites de amostra. Além disso, a reação não requer um catalisador, é muito estável, com grande vida média e o tempo de reação é muito rápido, como dito anteriormente. A utilização da quimiluminescência permitiu a substituição dos radioisótopos, os quais se tornaram obsoletos, já que constituem um perigo potencial à saúde, além dos problemas relacionados aos dejetos gerados (GAMIZ-GRACIA et al., 2009).

Nos últimos anos, marcadores quimiluminescentes tiveram seu emprego aumentado significativamente na área biomédica. Dentre as aplicabilidades, além das técnicas separativas de HPLC, os sais de acridina podem ser usados em imunoensaios com ligação a estreptavidina (HART; TAAFFE, 1987), em ensaios de hibridização de ácidos nucleicos (BROWN et al., 2009) e na análise de alimentos (LIU; LIN; LIN 2010). O EA vem ganhando destaque pelo emprego na histoquímica com lectinas no nosso grupo de pesquisa, como ferramenta para auxiliar a clínica na detecção de perfis de carboidrato em tecidos tumorais (CAMPOS et al., 2006; BRUSTEIN et al., 2012), o que era feito anteriormente pelo emprego da peroxidase (BELTRÃO et al., 1998).

3. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, B.B.L. & GOLDSTEIN, I.J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **Biochemical Journal**, v. 96, p. 23c–25c, 1965.
- ALVES-BRITO, C.F.; SIMPSON, A.J.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; RABELLO, A.L.; ROCHA, R.S.; LAMBERTUCCI, J.R.; GAZZINELLI, G.; KATZ, N.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Analysis of anti-keyhole limpet haemocyanin antibody in Brazilians supports its use for the diagnosis acute schistosomiasis mansoni. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**; v.86, p.53-56, 1992.
- ANDRADE, Z.A. A esquistossomose no Brasil após quase um século de pesquisas **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35(5), p. 509-513, 2002.
- ANDRADE, Z.A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, v. 31, p.656–663, 2009.
- ARAÚJO, R.V.S.; MELO-JÚNIOR, M.R.; BELTRÃO, E.I.C.; MELLO, L.A.; IACOMINI, M.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; CARVALHO JR., L.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Evaluation of the antischistosomal activity of sulfated α -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri* free and encapsulated into liposomes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44(4), p.311-318, 2011.
- BALLERSTADT, R.; EVANS, C.; MCNICHOLS, R.; GOWDA, A. Concanavalin A for in vivo glucose sensing: A biotoxicity review. **Biosensors and Bioelectronics**, v.22, p.275–284, 2006.
- BARBOSA, V. S.; ARAÚJO, K. C.; LEAL NETO, O. B.; BARBOSA, C. S. Spatial distribution of schistosomiasis and geohelminthiasis cases in the rural areas of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(5), p. 633-638, 2012.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T.B.; DE FREITAS, L.A.; BARRAL-NETTO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of

the *Diocleinae* subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p.673–678, 2001.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R.L.; TEIXEIRA, M.; DOS SANTOS, W.L.; POMPEU, M.L.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.; CAVADA, B.S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica** v.60, p.237–250, 1996.

BARSOUM, R.S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human schistosomiasis: Clinical perspective. **Journal of Advanced Research**, v. 4(5), p.433-444, 2013.

BELTRÃO, E.I.C.; CORREIA, M.T.S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L.C.B.B. Binding Evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* Lectin to Human Mammary issues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, p. 125-134, 1998.

BIES, C.; LEHR, C.M.; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery**, v.56 , p.425– 435, 2004.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Esquistossomose Mansônica In _____ **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Ministério da Saúde, 2011, v.10, p.24.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/serie_historica_esquistossomose_25_03_2013.pdf> Acesso em 15 abril 2013.

BROWN, R.C.; LI, Z.; RUTTER, A.J.; MU, X.; WEEKS, O.H.; SMITH, K.; WEEKS, I. Development and application of a novel acridinium ester for use as a chemiluminescent emitter in nucleic acid hybridisation assays using chemiluminescence quenching. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 386–394, 2009.

BRUSTEIN, V.P.; CAVALCANTI, C.L.B.; MELO-JUNIOR, M.R.; CORREIA, M.T.S.; BELTRÃO, E.I.C.; CARVALHO JR, L.B. Chemiluminescent Detection of

Carbohydrates in the Tumoral Breast Diseases. **Appl Biochemical and Biotechnology**, v.166, p.268–275, 2012.

BURKE, M. L.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; LI, Y. S.; ELLIS, M. K.; McMANUS, D. P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis **Parasite Immunology**, v. 31, p. 163–176, 2009.

CALDAS, I.R.; CAMPI-AZEVEDO, A.C.; OLIVEIRA, L.F.A.; SILVEIRA, A.M.S; OLIVEIRA, R.C.; GAZZINELLI, G. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v.108, p. 109–117, 2008.

CAMPOS, L.M.; CAVALCANTI, C.L.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CARVALHO JR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker . **Biomarkers**, v.11(5), p.480-484 , 2006.

CARNEIRO, T.R.; PINHEIRO, M.C.C.; OLIVEIRA, S.M.; HANEMANN.A.L.P.; QUEIROZ, J.A.N.; BEZERRA,F.S.M. Increased detection of schistosomiasis with Kato-Katz and SWAPIgG- ELISA in a Northeastern Brazil low- intensity transmission área, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(4), p.510-513, 2012.

CARVALHO, O.S; JANNOTTI-PASSOS, L.K; CALDEIRA R.L. Importância epidemiológica e biologia molecular aplicada aos estudos dos moluscos do gênero Biomphalaria. In: CARVALHO, O.S; COELHO; P.M.Z; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20 ed., cap. 9, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008.

CHAICHI, M. J.; VA'EZI, Z.; HOSSEINI, M.; HOSSEINKHANI, S.; SHAMSIPUR, M. The Study of Chemiluminescence of Acridinium Ester in Presence of Rhodamin B as a Fluorescer. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering** v. 30, p.89-96, 2011.

CHEEVER, A. W.; LENZI, J. A.; LENZI, H. L.; ANDRADE, Z. A. Experimental Models of *Schistosoma mansoni* Infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97(7), p. 917-940, 2002.

CHEUNG, A.H.; WONG, J.H.; NG, T.B. Musa acuminata (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. **Phytomedicine**, v.16 p.594–600, 2009.

CLERINX, J.; GOMPEL, A.V. Schistosomiasis in travellers and migrants. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v.9, p. 6 a 24, 2011.

COELHO, P.M.Z.; ROSA, F.M.; MACIEL, E; NEGRAO-CORREA, D.; CARVALHO, O.; CALDEIRA, R.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; MOREIRA, L.A.; OLIVEIRA, G.C.; TELES, H.M.S. Transmission control of schistosomiasis mansoni by introduction of a resistant lineage of *Biomphalaria tenagophila* in areas where transmission is maintained by this species. **Acta Tropica**, v. 108, p. 245-248, 2008.

COELHO, R.A.L.; JAQUES, G.A.; BARBOSA, A.D.; VELAZQUEZ, G.; MONTENEGRO, S.M.L.; AZEVEDO, W.M.; CARVALHO JÚNIOR; L.B. Magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol composite as solid-phase in chemiluminescent assays, **Biotechnol Lett**, v. 24, 1705-1708, 2002.

CUMMINGS, R.D.; NYAME, A.K. Schistosome glycoconjugates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1455, p.363-374, 1999.

DODEIGNE, C.; THUNUS, L.; LEJEUNE, R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review **Talanta**, v.51, p.415–439, 2000.

DOMINGUES, A.L.C.; MEDEIROS, T.B.; LOPES, E.P.A. Ultrasound versus biological markers in the evaluation of periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106(7), p.802-807, 2011.

ELBAZ, T. & ESMAT G. Hepatic and intestinal schistosomiasis **Journal of Advanced Research**, v 4(5), p. 445-452, 2013.

FERNANDES, M.P.; INADA, N.M.; CHIARATTI, M.R.; ARAÚJO, F.F.B.; MEIRELLES, F.V.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; ALVES, M.J.M.; GADELHA, F.R.; VERCESI, A.E. Mechanism of Trypanosoma cruzi death induced by Cratylia mollis seed lectin **Journal of Bioenergy and Biomembrane**, v.42, p. 69–78, 2010.

FERREIRA, S.A.; VASCONCELOS, J.L.A.; CAVALCANTI, C.L.B.; RÊGO, M.J.M.B.; BELTRÃO, E.I.C. Sialic acid differential expression in non-melanoma skin cancer biopsies **Medical Molecular Morphology**, 2013.

GAMIZ-GRACIA, L. GARCIA-CAMPAÑA, A.M; HUERTAS-PEREZ, J.F.; LARA, F.J.. Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis - A review **Analytica Chimica Acta**, v. 640, p. 7-28, 2009.

GAZZINELLI, A.; VELASQUEZ-MELENDEZ, G.; CRAWFORD, S. B.; LOVERDE, P. T.; CORREA-OLIVEIRA, R.; KLOOS, H. Socioeconomic Determinants of Schistosomiasis in a Poor Rural Area in Brazil. Running short title: Socioeconomic Determinants of Schistosomiasis in Brazil. **Acta Tropica**, v, 99(2-3), p. 260–271, 2006.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, p. 236-254, 2011.

GORELIK, E.; GALILI, U.; RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev.** v.20, p.245–277, 2001.

GRYSCHKEK, Ronaldo Cesar Borges; CHIEFFI, Pedro Paulo. **Esquistossomose**. In: AMATO NETO, Vicente et al. Parasitologia: uma abordagem clínica. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 175-184, 2008.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P.G. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? **Frontiers in immunology**, v.4, p. 1-8, 2013.

HANSEN, J.E.; NIELSEN, C.M.; NIELSEN, C.; HEEGAARD, P.; MATHIESEN, L.R.; NIELSEN, J.O. Correlation between carbohydrate structures on the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 and HIV-2 and syncytium inhibition with lectins. **AIDS** v.3, p. 635–641, 1989.

HART, R.S. and TAAFFE, LR. The use of acridinium ester-labelled streptavidin in immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v.101, p.91-96, 1987.

ISKRATSCH, T.; BRAUN, A.; PASCHINGER, K.; WILSON, I.B.H. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. **Analytical Biochemistry**, v.386, p. 133–146, 2009.

JANG-LEE, J.; CURWEN, R.S.; ASHTON, P.D.; TISSOT, B.; MATHIESON, W.; PANICO, M.; DELL, A.; WILSON, R.A.; HASLAM, S.M. Glycomics analysis of *Schistosoma mansoni* egg and cercarial secretions. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.6(9), p. 1485-1499, 2007.

KATZ, N. A descoberta da esquistossomose no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v 78 (2), p. 123-125, 2008.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciências e Cultura**. v 55(1) p. 38-41, 2003.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P.J.; SAXENA, A.K.; KHAN, R.H.; ASHRAF, M.T.; KAMBOJ, S.S.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Arch Biochem Biophys**. v. 445, p. 156–165, 2006.

KELLEHER, T.B.; AFDHAL, N. Noninvasive assessment of liver fibrosis. **Clinics in Liver Disease**, v.9, p. 667-683, 2005.

KING, D.W.; COOPER, W.J.; RUSAK, S.A.; PEAKE, B.M.; KIDDLE, J.J.; O'SULLIVAN, D.W.; MELAMED, M.L.; MORGAN, C.R.; THEBERGES, S.M. Flow Injection Analysis of H_2O_2 in Natural Waters Using Acridinium Ester Chemiluminescence: Method Development, **Analytical Chemistry**, v.79, p. 4169-4176, 2007.

KLOSS, H.; CORREA-OLIVEIRA, R.; QUITES, H.F.O.; SOUZA, M.C.C.; GAZZINELL, A. Socioeconomic studies of schistosomiasis in Brazil: A review. **Acta Tropica**, v. 108, p. 194–201, 2008.

KRICKA, L.J. Clinical applications of chemiluminescence **Analytica Chimica Acta**, v.500, p.279–286, 2003.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A.M.; URBANO-HERNANDEZ, G.; ORTEGA- NIEBLAS, M.M.; ROBLES-BURGUEÑO, M.R.; WINZERLING, J.; VAZQUEZ- MORENO, L. Insecticidal action of PF2 lectin from *Olneya tesota* (Palo Fierro) against *Zabrotes subfasciatus* larvae and midgut glycoconjugate binding. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 57, p. 689–694, 2009.

LAMBERTUCCI, J.R.; VOIETA I.; RESENDE, V. Mild, moderate and intense Symmers's fibrosis in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42(5): p.611-612, 2009.

LARA, F.J.; GARCÍA-CAMPAÑA, A.M.; AARON, J.J. Analytical applications of photoinduced chemiluminescence in flow systems - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 679 p. 17–30, 2010.

LEAL NETO, O.B.; GALVÃO, T.Y.C.; ESTEVES, F.A.M.; GOMES, A.M.A.S.; GOMES, E.C.S.; ARAÚJO, K.C.G.M.; BARBOSA, C.S. Análise espacial dos casos humanos de esquistossomose em uma comunidade horticultora da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil **Revista Brasileira de Epidemiologia**; v.15(4) p.771-780, 2012.

LENZI, H.L.; JUBERG, A.D.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, J.A. Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no Hospedeiro Definitivo. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz;. p. 87-146, 2008.

LI, W.W.; YU, J.Y.; XU, H.L.; BAO, J.K. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, p. 282–286, 2011.

LIMA, L.R.A.; BEZERRA, M.F.; ALMEIDA, S.M.V.; SIVA, L.P.B.G.; BELTRÃO, E.I.C.; CARVALHO JR, L.B. Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester. **Disease markers**, v. 35 (3), p.149–154, 2013.

LIN, P.; YE, X.; NG, T. Purification of melibiose-binding lectins from two cultivars of Chinese black soybeans. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)** v.40, p. 1029–1038, 2008.

LIS, H. & SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LIU, M.; LIN, Z.; LIN, JM. A review on applications of chemiluminescence detection in food analysis **Analytica Chimica Acta**, v. 670, p. 1–10, 2010.

LORIS, R. ; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, p. 9-36, 1998.

MAHDAVI, S.A.; FARAHNAK, A.; MOUSAVI, S. J.; MOBEDI, I.; REZAEIAN, M.; GOLMOHAMADI, T.; AZADEH, H.; GOHARDEHI, S. Prevalence of schistosome induced cercarial dermatitis in north of Iran. **Asian Pacific Journal Tropical Disease**, v.3(1), p.37-40, 2013.

MAKAROVA, E.; GOES, T.S.; MARCATTO, A.L.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis using *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26. **Parasitology Int.**, v.52, p.269-279, 2003.

MANIVANNAN, B.; RAWSON, P.; JORDAN, T.W.; SECOR, W. E.; LA FLAMME, A.C., Differential Patterns of Liver Proteins in Experimental Murine Hepatosplenic Schistosomiasis, **Infection and Immunity**, p. 618-628, v. 78 , 2010.

MAVEYRAUD, L.; NIWA, H.; GUILLET, V.; SVERGUN, D.I.; KONAREV, P.V.; PALMER, R.A.; PEUMANS, W.J.; ROUGÉ, P.; VAN DAMME, E.J.; REYNOLDS, C.D.; MOUREY, L. Structural basis for sugar recognition, including the Tn carcinoma antigen, by the lectin SNA-II from *Sambucus nigra*. **Proteins**, v.75, p.89–103, 2009.

MELO, C.M.L.; LIMA, A.L.R.; BELTRÃO E.I.C.; CAVALCANTI, C.C.B.; MELO-JÚNIOR, M.R.; MONTENEGRO, S.M.L.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine Schistosomiasis mansoni **Acta Tropica**, v. 118, p. 152–158, 2011.

MELO-JÚNIOR, M.R.; CAVALCANTI, C.C.B.; PONTES-FILHO, N.T.; CARVALHO JR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Carbohydrates Detection in the Hepatic Egg – Granuloma System Using Lectin Histochemistry **International Journal of Morphology**, v. 26(4), p. 967-972, 2008.

MÜLLER, W.E.; RENNEISEN, K.; KREUTER, M.H.; SCHRÖDER, H.C.; WINKLER, I. The D-mannose-specific lectin from *Gerardia savaglia* blocks binding of human immunodeficiency virus type I to H9 cells and human lymphocytes in vitro. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 1, p. 453–458, 1988.

NYAME, A.K.; LEWIS, F.A.; DOUGHTY, B.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CUMMINGS, R.D. Immunity to schistosomiasis: glycans are potential antigenic targets for immune intervention **Experimental Parasitology**, v.104, p.1–13, 2003.

OHBA, H.; BAKALOVA, R.; MURAKI, M. Cytoagglutination and cytotoxicity of Wheat Germ Agglutinin isolectins against normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines—relationship between structure and biological activity **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1619, p.144– 150, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Weekly epidemiological record** Geneveve, 2013, v. 80, p. 81-88.

PEREIRA, A.S.A.; PADILHA, R. J. R.; LIMA-FILHO, J. L.; CHAVES, M. E. C. **Parasitology Research**, v. 109, p. 1395–1402, 2011.

PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde de Pernambuco. Disponível em <<http://portal.saude.pe.gov.br/programas-e-acoes/controle-de-doencas/projeto-sanar-doencas-negligenciadas/>> Acesso em 17 abril 2013.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M Lectins as Plant Defense Proteins **Plant Physiology**, v.109, p.347-352, 1995.

PORDEUS, L.C; AGUIAR, L.R; QUIMINO, L.R.M; BARBOSA, C.S. A ocorrência das formas agudas e crônicas da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiologia em Serviços de Saúde**, v. 17(3) p. 163-17, 2008.

QUININO, L. R.M.; BARBOSA, C.S.; SAMICO,I. O programa de controle da esquistossomose em dois municípios da zona da mata de Pernambuco: uma análise de implantação. **Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil**, v.10 (Supl. 1), p. 119-129 , 2010.

RABELLO, A.L.T.; PINTO-SILVA, R.A.; ROCHA, R.S.; KATZ, N. Abominal ultrasonography in acute clinical schistosomiasis mansoni. **Am J Trop Med Hyg**; v.50, p.748-752, 1994.

RABELLO, A.; PONTES, L.A.; ENK, M.; MONTENEGRO, S.M.; MORAIS, C.N.L. Diagnostico parasitológico, imunológico e molecular da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H. *Schistosoma mansoni* & **Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz;. p. 895, 2008.

REIS , E. A.G.; ATHANAZIO, D. A.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H.; PINTO, V.P.T.; CARMO, T.M.A.; REIS, A.; TROCOLLI, G.; CRODA, J.; HARN, D.; BARRAL-NETTO, M.; REIS, M. G. Potential immunomodulatory effects of plant lectins in *Schistosoma mansoni* Infection. **Acta Tropica**, v. 108, p. 160–165, 2008.

SCHWEFEL, D.; MAIERHOFER, C.; BECK, J. G.; SEEBERGER, S.; DIEDERICH, K.; MOLLER, H. M.; WELTE, W.; WITTMANN, V. Structural Basis of Multivalent Binding to Wheat Germ Agglutinin. **Journal of American Chemical Society**, v. 132, p. 8704–8719, 2010.

SELL, A.M. & COSTA, C.P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v.22(2), p. 297-303, 2000.

SHAHIDI-NOGHABI, S.; DAMME, E. J. M. V.; IGA, M.; SMAGGHE, G. Exposure of insect midgut cells to *Sambucus nigra* L. agglutinins I and II causes cell death via caspase-dependent apoptosis. **Journal of Insect Physiology**, v.56, p.1101-1107, 2010.

SHARON, N. & LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules **Glycobiology** v, 14 (11), p. 53R–62R, 2004.

SULÁK, O.; CIOCI, G.; LAMEIGNÈRE, E.; BALLOY, V.; ROUND, A.; GUTSCHE, I.; MALINOVSKÁ, L.; CHIGNARD, M.; KOSMA, P.; AUBERT, D.F.; MAROLDA, C.L.; VALVANO, M.A.; WIMMEROVÁ, M.; IMBERTY, A. Burkholderia cenocepacia BC2L-C Is a Super Lectin with Dual Specificity and Proinflammatory Activity. **Plos Pathogens**, v.7, p. 1-14, 2011.

TEIXEIRA, C.R.; CAVASSANI, K.A.; GOMES, R.B.; TEIXEIRA, M.J.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; CAVADA, B.S.; DA SILVA, J.S.; BARRAL, A.; BARRAL-

NETTO, M. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, p.24, v. 3001–3008, 2006.

VAN DIE, I.; VAN LIEMPT, E.; BANK, C. M. C.; SCHIPHORST, W. Interaction of schistosome glycans with the host immune system. **Glycobiology and Medicine**, v. 564, p. 9-19, 2005.

VARKI, A.; CUMMINGS, R.D.; ESKO, J.D.; FREEZE, H.H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C.R.; HART, G.W.; ETZLER, M.E. **Essentials of Glycobiology** Published on line, 2009.

VAN DAM, G.J.; WICHERS, J.H.; FERREIRA, T.M.; GHATI, D.; VAN AMERONGEN, A.; DEELDER, AM. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42 (12), p. 5458-5461, 2004.

VENNERVALD, B.J.; DUNNE, D.W. Morbidity in schistosomiasis: an update. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.17 (5), p.439-447, 2004.

WILSON, S.; DUNNE, D.W., VENNERVALD, B.J. Chronic Hepatosplenomegaly in African School Children: A Common but Neglected Morbidity Associated with Schistosomiasis and Malaria PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 5 (8), p. 1-8, 2011.

ZHANG, G.Q.; SUN, J.; WANG, H.X.; NG, T.B. A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa*. **Acta Biochim Pol**, v.56, p. 415–421, 2009.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar através da quimiluminescência com lectinas o comportamento do tecido hepático de camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*.

4.2 Objetivos específicos

- a) Conjugar lectinas Conavalina A (Con A), Wheat Germ Agglutinin (WGA) e Sambucus nigra Agglutinin (SNA) comerciais ao éster de acridina (EA);
- b) Marcar tecidos hepáticos de camundongos infectados pelo *S.mansoni* com o conjugado lectina-EA;
- c) Quantificar a marcação dos tecidos hepáticos através dos fótons emitidos durante a hidrólise do EA conjugado às lectinas;
- d) Estabelecer a correlação entre os fótons emitidos com o perfil de carboidratos dos granulomas avaliados.

**5. ARTIGO: CHEMILUMINESCENT DETECTION OF
GLYCOPHENOTYPE IN HEPATIC GRANULOMATOUS LESIONS OF
EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASIS.**

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Parasitology Research. Fator de impacto: 2.852

Gabriela Ayres Fragoso Nascimento¹, Luiza Rayanna Amorim de Lima¹, Adriana da Silva Andrade Pereira¹, Carmelita Bezerra de Lima Cavalcanti¹, Maria Elizabeth Cavalcante Chaves^{1,2}, Luiz Bezerra de Carvalho Junior^{1,2}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

²Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil

Abstract

This work describes the use of lectins wheat germ agglutinin (WGA), Concanavalin A (Con A) and *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) labeled to acridinium ester (AE) to evaluate the glycophenotype of mice liver granulomatous lesion caused by infection of *Schistosoma mansoni*. These lectins specifically recognize α -D-glucose/mannose (Con A), N-acetyl-D-glucosamine (WGA) and α -NeuNAc-[2 $\rightarrow$ 6]-Gal/GalNAc (SNA). They were covalently bound to AE (Lectins-AE) and collected by Sephadex G-25 chromatography preserving their hemagglutinating activities. The chemiluminescence expressed in relative light unit (RLU) obtained from the hepatic granuloma tissues (0.25 cm²) treated with the lectins-AE was compared with control tissues. Con A-AE treated tissues showed higher statistically significant values (1,501,182 $\pm$ 163,450 RLU) compared with the control tissue (575,280 $\pm$ 97,216 RLU). WGA-AE results showed lower values (189,654 $\pm$ 20,686 RLU) but higher than that found for the controls (82,878 $\pm$ 24,411). SNA-AE results did not present statistical difference between granulomatous tissues (198,990 $\pm$ 15,131) and controls (167,290 $\pm$ 25,194). These RLU values were markedly lower when previously to lectins-AE tissues treatment they were either incubated with the specific carbohydrates (300 mM) or the tissues incubated with non-labeled acridinium ester lectins. The relationship between the carbohydrate expression (RLU) and tissue area described an allometric curve ($r=0,78$). These results allowed to state that there is a significant increase in glucose/mannose residues and N-acetyl-D-glucosamine in hepatic granuloma caused by *S. mansoni*, while the sialic acid remains virtually unchanged. The understanding of schistosome glycophenotype is relevant for the development of new diagnostic methods for schistosomiasis, design of new drug targets and preparation of glycan-based vaccines.

Key words: *Schistosoma mansoni*; granuloma; lectins; chemiluminescence

Introduction

Schistosomiasis is a parasitic disease that affects about 230 million people around the world and is regarded as a neglected tropical disease. *Schistosoma mansoni* is the specie responsible for the Brazilian endemic parasitosis (Kloss et al. 2008; Clerinx and Gompel 2011; Pereira et al. 2011; Pereira et al. 2013). This parasite lives in the blood vessel of human host, where eggs are deposited and might adhere to the endothelium and migrate through vessels into tissues (Cummings and Turco 2009). Hepatomegaly is a clinical manifestation of chronic schistosomiasis which begins with the deposition of eggs in the liver sinusoids, and induces granulomatous inflammatory responses and egg sequestration. Periovarian granuloma is formed when a live egg is retained within the living tissue, which fails to develop or be expelled. It is essentially inflammatory injury, which soon becomes encapsulated by the formation of concentric rings of collagen (Caldas et al. 2008; Burke et al. 2009; Andrade 2009).

Adult worm has anchored on its structure a complex of carbohydrates that compose their cytoskeleton with dynamic features that allow the host-parasite interaction (van Vliet et al. 2005; Melo-Junior et al. 2008). Among these carbohydrates are fucosylated antigens playing important role in humoral and cellular response in the infected host. When secreted by the eggs trapped in the vessels and tissues are highly antigenic and may accelerate inflammatory response (van Die et al. 2005; Cummings and Turco 2009).

The recognition of the granuloma glycosylation pattern is important issue to understand the disease development in the host for the antigenic glycoconjugates relevance in the host immune response. Thus lectins conjugated to peroxidase have been used as tools for biochemical assessment of *S. mansoni* carbohydrate expression in hepatic tissues containing granuloma (Melo-Junior et al. 2008; Araújo et al. 2011). These glycoproteins of non-immune origin recognize and bind reversibly to specific sugars or conjugated to proteins and / or lipids on the cell surface (Ghazarian et al. 2011). Chemiluminescent markers have significantly increased their employment in the biomedical area (Gamiz-Gracia et al. 2009; Liu et al. 2010). In our lab, tissue glycosylation has been investigated using lectins conjugated to acridinium ester and chemiluminescence as the carbohydrate-lectin complex detection method (Campos et al. 2006; Brustein et al. 2012; Lima et al. 2013).

Here, it was investigated the expression of the following biologically important carbohydrate N-acetyl-D-glucosamine, α -D-glucose/mannose and α -NeuNAc-[2 $\rightarrow$ 6] - Gal/GalNAc on hepatic granulomas in murine experimental schistosomiasis. To accomplish with this goal it was employed lectins that specifically recognize these carbohydrates, respectively, wheat germ agglutinin (WGA), Concanavalin A (Con A) and *Sambucus nigra* agglutinin (SNA).

Materials and Methods

Reagents

N-hydroxysuccinimide-activated dimethyl acridinium ester (DMAE-NHS)/1966-1-53-2/Organic Lab) was kindly supplied by Dr. H. H. Weetall. Con A, WGA, N,N-dimethylformamide, trypsin from porcine pancreas, methyl- α -D-mannoside, N-acetyl-D-glucosamine and Sephadex G-25 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Chemiluminescent detection was performed using Siemens Reagent TSH 500T (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, USA) composed of 0.5% H₂O₂ in 0.1N HNO₃ and 0.25M NaOH. Xylene and ethanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemical reagents used were of analytical grade.

Experimental Model

Female mice (*Mus musculus*) with six weeks old and weighting 35 - 45 g were used in this experiment. The animals (n=20) were housed in cages (20x30x13cm) containing sterile wood shaving bed; standard diet (LABINA[®], Purina do Brasil S.A., Recife-PE, Brazil) and water were available *ad libitum*. Room temperature was kept at 25 $\pm$ 2 °C and 12:12h light/dark cycle. Ten of those mice were used as control group and the others ten mice were infected by *Schistosoma mansoni*. Each mouse was anesthetized and infected individually with 50 *S. mansoni* cercariae on its abdominal region under artificial light for at least 2h. Control group was submitted to the same stress processes than experimental group. Past 60 days of infection, all the animals were euthanized and their livers were removed with surgical scissors. The livers were washed

several times with 0.15 M Phosphate buffer solution and sectioned to histopathological study. This study was approved by the ethical committees for research with animals of the Federal University of Pernambuco, Brazil.

Lectins conjugation with Acridinium-Ester (AE) and chemiluminescent measurement

Lectins Con A, WGA and SNA were conjugated to acridinium ester (DMAE-NHS) as follows: lectins (2 mg of protein/mL) were incubated with 10 μ L of acridinium ester solution (0.2 mg diluted in 400 μ L of N, N-dimethylformamide) for 1 h at 25°C under rotary stirring. The conjugate (lectin-AE) were applied to a column of Sephadex G-25 (10 x 1 cm), previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer, containing 0.15 M de NaCl (PBS), pH 7.2, from known on called PBS, and eluted with this buffer. Aliquots of 1 mL were collected and their protein content and chemiluminescence were, respectively, established spectrophotometrically (280nm) and using a luminometer Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems, USA). For the latter procedure the aliquots (100 μ L containing 100 μ L protein) was introduced into solutions of 0.5% H₂O₂ in 0.1 N H₂O₂ (50 μ L) and 0.25 M NaOH (50 μ L) The light emission intensity was determined as relative light units (RLU) with a counting time of 5 seconds per sample. Fractions corresponding to protein and chemiluminescence peaks were pooled and used throughout this work.

Lectin chemiluminescent

Paraffin section (8 μ m) of samples were cut, transferred to glass slides, deparaffinized in xylene (once 5 min, and three-fold 1 min) and rehydrated in graded alcohols (three-fold 100% and once 70% - 1 min each). Slides were treated with 0.1% (w/v) trypsin solution at 37°C for 2 min. Slides were washed (twice, 5 min each time) with PBS. Afterwards tissue slices were incubated with lectins-AE (100 μ L containing 10 μ g of protein) for 2 h at 4°C, followed by washing (three-fold 5 min) with 15 mL of PBS. The area corresponding to tissue section (square-shaped) was defined as 0.25 cm², containing hepatic granuloma, using a homemade mold. Then the tissues were cut with a bistoury, removed from glass slides and transferred to a polypropylene test tub containing 50 μ L of PBS. Finally, RLU from tissue slices were assayed as described

above. Triplicate measurements were carried out throughout in this study. Lectin binding inhibition assays were accomplished by incubating each lectin solution with 300 mM methyl- α -D-mannoside (Con A) and N-acetyl-D-glucosamine (WGA) for 45 min at 25°C prior to their incubation with tissues. The following steps were as described previously for the binding protocol. The carbohydrate expression *versus* tissue area correlation was evaluated as above described except that the tissue section (square-shaped) was cut from 0.09 cm² to 0.30 cm² using appropriate homemade molds.

Statistical analysis

Software OriginPro8 (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA 01060 USA) was used for the statistical analysis and data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (s.d.). Obtained data were compared using parametric statistic test of Tukey ($p < 0.05$) through SigmaPlot (California, USA).

Results

Figure 1 shows the elution profile for the lectin-AE conjugates using the Sephadex G25 chromatography. The superposition of protein peaks (280 nm) and chemiluminescence (RLU) varied according to the lectin: Con A-AE (5th Fraction), WGA-AE (10th Fraction) and SNA-AE (20th Fraction). These peaks were pooled and used in this work. A second chemiluminescent peak occurred further and can be attributed to free acridinium ester.

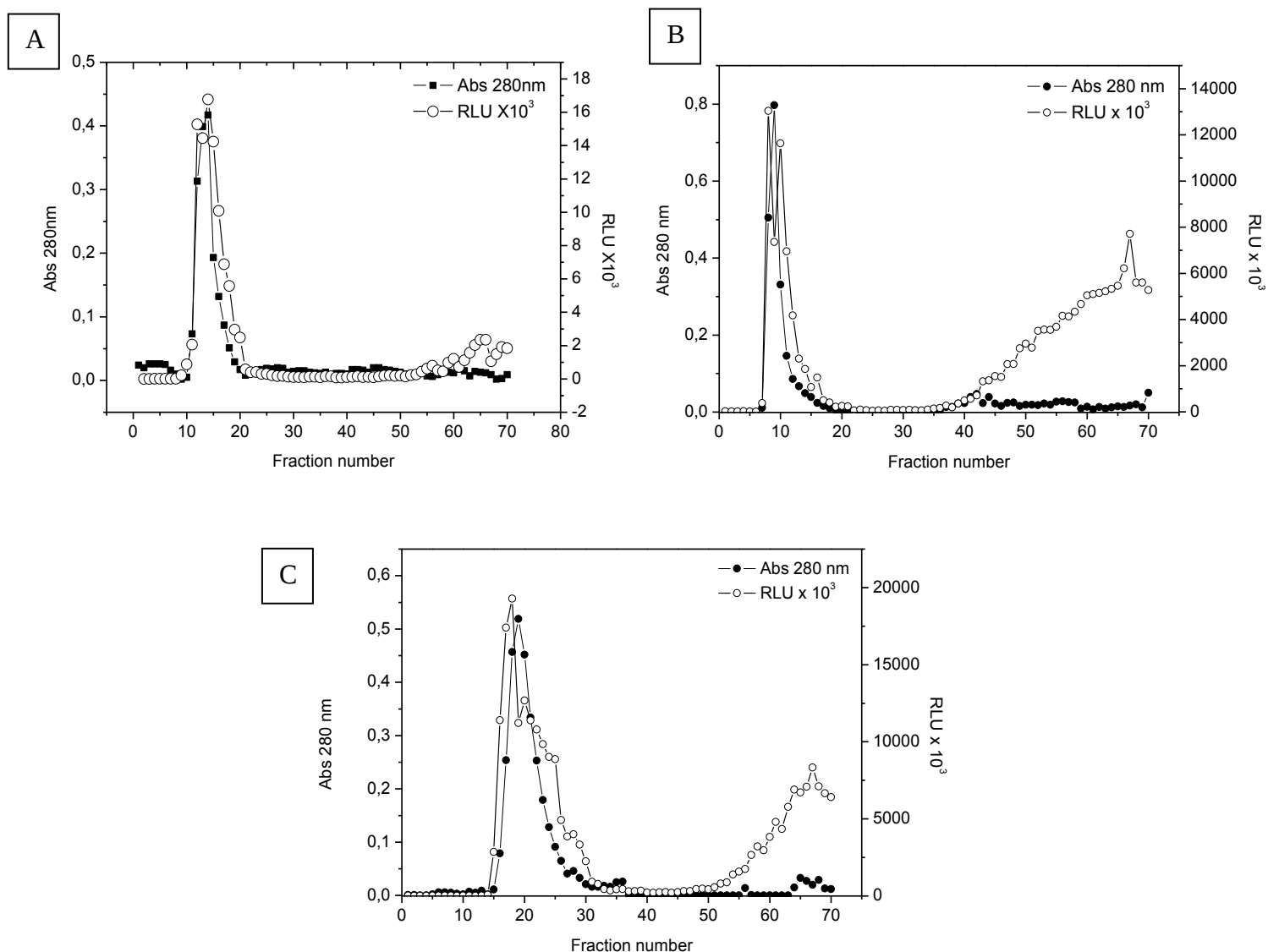


Figure 1: Con A-AE, WGA-AE and SNA-AE purification profile from a Sephadex G-25 column (10 x 1 cm). Elution was carried out with PBS. Fractions (1 mL) were collected and protein (280 nm) and chemiluminescence of Con A-AE (A), WGA-AE (B) and SNA-AE (C) were assayed.

Figure 2 displays the chemiluminescence obtained from the hepatic granuloma tissues (0.25 cm^2) treated with the lectin-AE compared with the control tissues. Firstly, the Con A-AE treated tissues showed about three-fold higher statistically significant values ($1,501,182 \pm 163,450 \text{ RLU}$) compared with the control tissue ($575,280 \pm 97,216 \text{ RLU}$), namely, hepatic tissues from non-infected mice. This approximated three-fold superior value was statistically significant. Regarding the WGA-AE results the value was numerically inferior ($189,654 \pm 20,686 \text{ RLU}$) to Con A-AE but again higher than that value found for the control tissue samples ($82,878 \pm 24,411$), about twice higher and statistically significant. Finally, concerning the results for the SNA-AE no statistical difference was found between the granulomatous tissues ($198,990 \pm 15,131$) and the control ones ($167,290 \pm 25,194$).

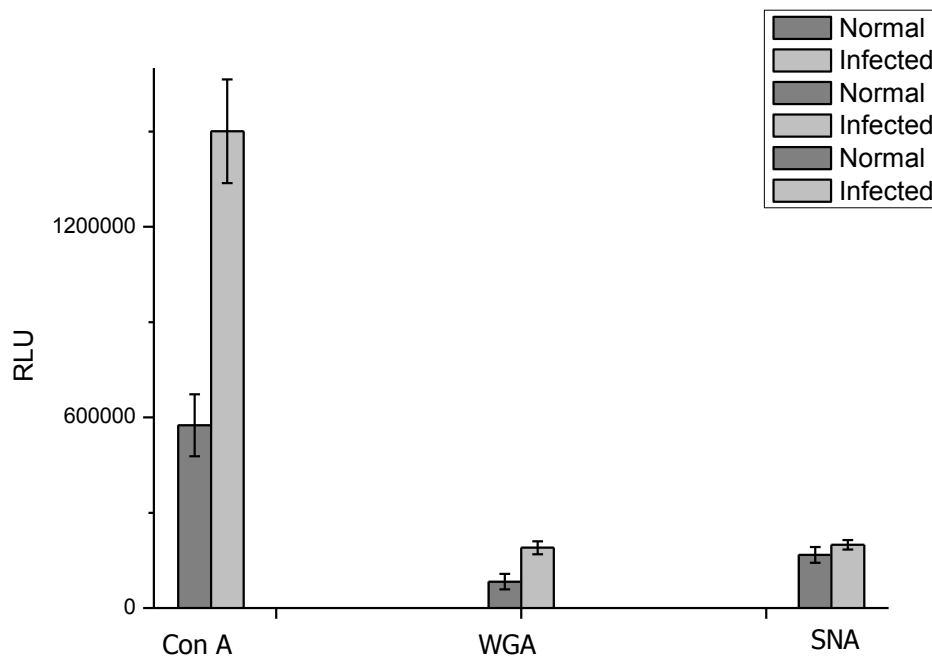


Figure 2: Comparison between chemiluminescence of hepatic tissue ($n = 10$) and tissue infected by *S. mansoni* ($n = 10$) for three lectin conjugates, respectively, Con A-Acridiinium Ester (AE), WGA-AE and SNA-AE

Figure 3 shows the specificity evaluation of the carbohydrate and respective lectin-AE complex formation by using two inhibition procedures: previously either

incubating the lectin-AE with the specific carbohydrate (300 mM) or the tissues with the non-labeled acridinium ester lectin or then measuring the chemiluminescence. The inhibition assays with the specific carbohydrates of Con A-AE and WGA-AE decreased the RLU values in 98, 47%, and 82, 94 % respectively (Figure 3A). Meanwhile the decrease using the non-labeled acridinium ester lectin reduced the values in 94.97 % and 45.48%, respectively (Figure 3B). No inhibition evaluation assays were carried out for the SNA-AE because this lectin did not show difference between the granulomatous and control tissues.

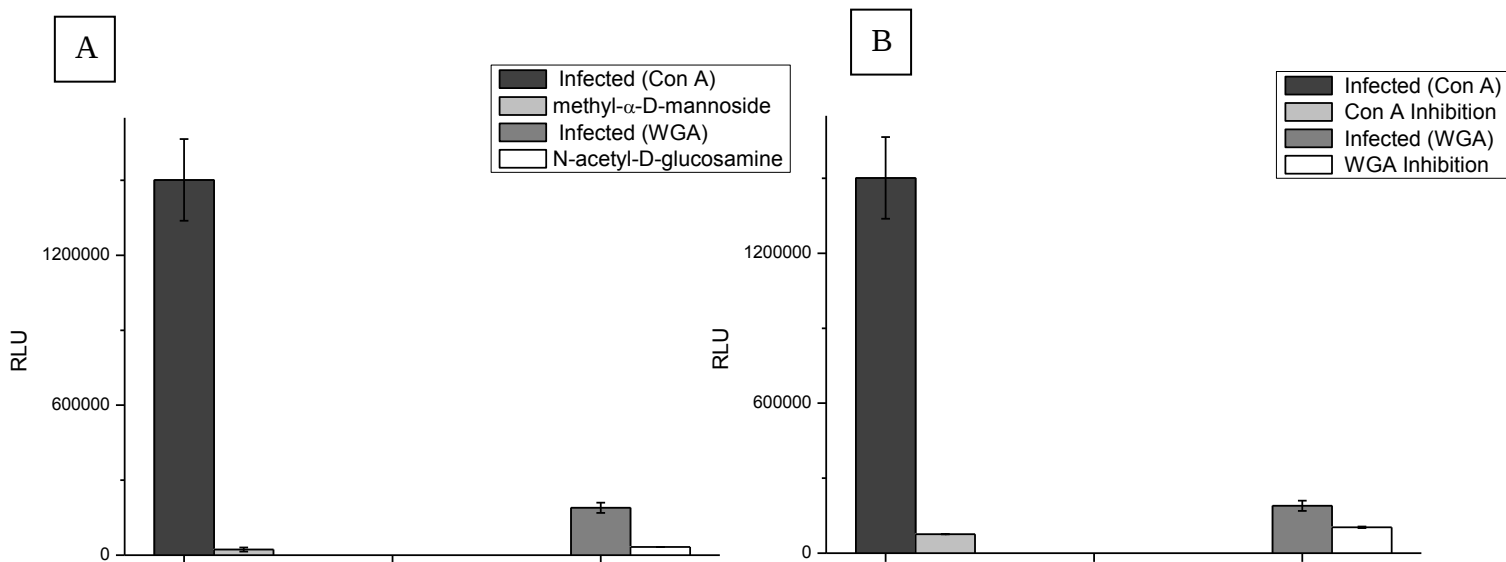


Figure 3: Lectin inhibition: comparison between infected tissue and incubated with lectins (Con A-AE and WGA -AE) and the same tissue when incubated previously by specific carbohydrate (A); competitive inhibition of Con A and WGA when incubated without AE conjugated followed by incubation with Con A-AE and WGA-AE (B).

Figure 4 presents the relationship between the carbohydrate expression *versus* tissue area. An alometric curve was described as the best to fit the RLU values ($r=0,78007$).

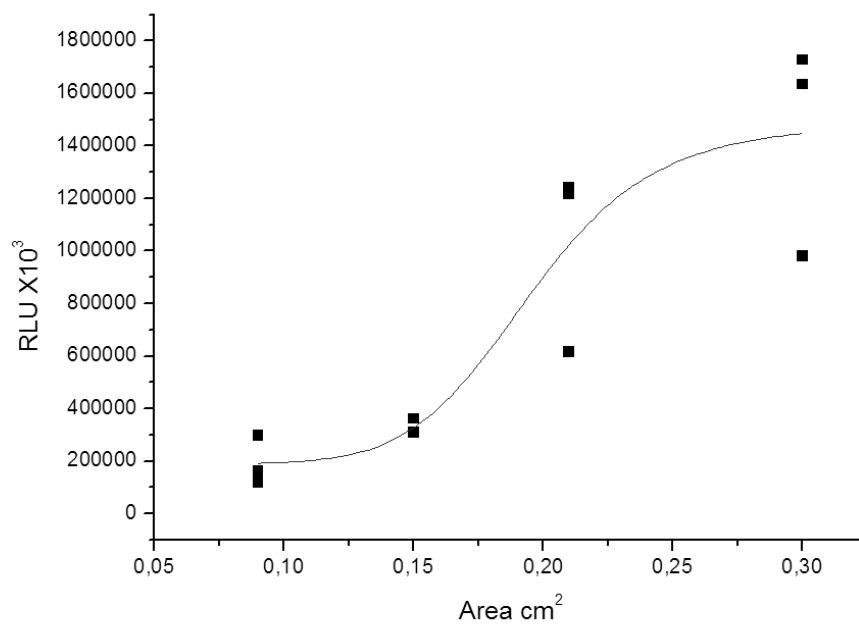


Figure 4: Relation between chemiluminescence and the area of infected tissue. Photon emission, expressed in relative light units, was detected from four different area values: 0.09 cm², 0.15 cm², 0.21 cm² and 0.30 cm²

Discussion

The *S. mansoni* glycoconjugates has been recognized to play important role in host-parasite interactions aiming to increase their survival within the host (Jang-Lee et al. 2007).

Schistosomes are a complex multicellular organisms that a diverse variety of O- and N-linked (Lewis^x antigen, LacdiNAc and fucosylated LacdiNAc) antigen glycoproteins, glycosylphosphatidylinositol anchors and glycolipids (Marques et al. 2001). The eggs generate huge quantities of circulating and surface cell glycoproteins, highly antigenic, containing fucosylated antigens and glycolipids that consist of a backbone of repeating β 1-4 linked GlcNAc residues substituted with Fuc α 1-2Fuc α 1-3 side chains (van Remoortere et al. 2000; Agoston et al. 2002). Although it is known that the cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni* have their glycocalyx rich in fucose residues, it has little known about the granulomatous lesions and carbohydrate alterations in liver with schistosomiasis.

Lectin histochemistry has been usually based on conjugation to peroxidase. Melo-Junior et al. (2008) evaluated carbohydrates on mice's liver in experimental schistosomiasis employing both Con A and WGA lectins conjugated to peroxidase and reported that WGA marked tissue more efficiently than Con A. They also noticed that WGA recognized carbohydrate residues in the tegument of the worm in a homogeneous pattern, showing intense staining in veins of the liver sinusoids whereas Con A recognized mainly granulomas fibrosis rings and liver parenchyma adjacent to these rings. Guimarães et al. (2008) also using lectin-peroxidase conjugates investigated staining patterns of parasite egg-tegument and peri-ovular granuloma in human and experimental schistosomiasis. WGA showed an intense staining on egg-granuloma system in the experimental schistosomiasis, whereas stained only the *S. mansoni* egg in human patients material. WGA and Con A failed to discriminate the cells type found in granuloma.

Araújo et al. (2011) treated *S. mansoni* infected mice with an encapsulated sulfated polysaccharide α -D-glycan and used WGA-peroxidase and Con A-peroxidase for assessing the profile of carbohydrates in animals treated and untreated. The analysis of the tissues allowed realizing that both animals under the treatment and control had excellent marking the WGA lectin. On the other hand, for the Con A lectin marking and

coloring was good only for the tissues of animals which were not treated with the polysaccharide encapsulated. Rêgo et al. (2013) made a brief study of lectin histochemistry lesions of the colon in patients with hepatosplenomegaly in human schistosomiasis. Although Con A had failed to recognize mannose and glucose residues, the expression of N-acetyl-D-glucosamine residues via WGA recognition was effective and had intense staining.

Here Con A-AE, WGA-AE and SNA-AE were employed to evaluate the carbohydrates of hepatic granuloma in experimental schistosomiasis combining the histochemistry approach and the well-known chemiluminescence sensitivity. Inhibition assays proved that this procedure is specific to the carbohydrate-lectin complex detection. The high values of RLU by tissue incubated with Con A-AE can be attributed to the fact that glucose and mannose are the first carbohydrates exposed in a process of glycosylation. During the biosynthesis of oligosaccharides, glucose and mannose residues are added to the nascent polypeptide chain, as the sugar is passing through the endoplasmic reticulum and following for final processing in the Golgi complex (Varki et al., 2009).

It is known that the worm's eggs are highly immunogenic and are involved on interactions to facilitate their passage through the tissues where they remain, usually gut and liver. Some eggs keep attached to host's tissue and immune response that egg promotes contains epitopes with fucose residues, which results in the granuloma formation (Ashton et al. 2001; Marques-Jr et al. 2001). Studies about a comparative analysis of glycans secreted by eggs and cercariae showed that both expressed a sweeping complex of glycans. This study suggested that the N-glycans from proteins secreted by the eggs are rich in mannose structures mainly, and N-acetyl-D-glucosamine too. They both have Lewis^X antigen as compound in common, which has been shown to induce the production of immune mediators such as Interleukin 10 and Prostaglandin E2 that promote Th2 response (Jang-Lee et al. 2007).

Still concerning about antigens secreted by the worm, Frank et al. (2012) characterized glycosphingolipids structures of *S. mansoni* adult worm and cercariae. They observed that Lewis^X antigen has a glucidic portion composed by galactose and fucose at its end, followed by glucose and N-acetyl-D-glucosamine, and N-acetylgalactosamine residues are nearest on lipidic portion of antigen. Both Jang-Lee et al. (2007) and Frank et al. (2012) findings corroborate the high RLU values found in

this work for the WGA-AE results. However, in *S. mansoni* the expression of D-glucose/mannose is higher than N-acetyl-D-glucosamine once the glucose residues are more exposed than the N-acetyl-D-glucosamine.

Sialic acid is a group of carbohydrates with nine carbons each widely distributed among the living beings in the form of oligosaccharides. It can bind to proteins and lipids of the plasmatic membrane and participate in biological processes. It has several functions as cell renewal, recognition and cell-cell adhesion and receptors for bacteria and viruses (Ferreira et al. 2013). *S. mansoni* adult worm does not produce sialic acid (Nyame et al. 1998) but incorporates from the host that is believed to be the parasite *S. mansoni* escape mechanism from the host immune system (Abbas et al. 2008). Therefore, for not producing sialic acid the results of SNA-AE in infected liver tissues were too close to the not-infected ones.

The relationship between the chemiluminescence emitted by the carbohydrate-Con A-AE complex and tissue area showed an increase of RLU with tissue size. This finding is according to previous studies (Campos et al. 2006; Brustein et al. 2012). However, the curve here described (alometric) is different from those reported by these authors (either linear or hyperbolic). This result deserves further investigation.

The evaluation of glycoconjugates has proven important to contribute to the study of the immunopathology of schistosomiasis and immunomodulatory processes involving this disease. Identification of many of these antigenic glycoconjugates by histochemical techniques helps in better understanding the biology of the parasite and the disease itself. The understanding of schistosome glycophenotype is relevant for the development of new diagnostic methods for schistosomiasis, design of new drug targets and preparation of glycan-based vaccines (Cummings and Turco, 2009). Therefore, this study allowed to attend that Con A, WGA and SNA conjugated to acridinium ester demonstrated that there is a significant increase in glucose/mannose residues and N-acetyl-D-glucosamine in hepatic granuloma of *S. mansoni*, while the sialic acid remains virtually unchanged.

References

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2008) *Imunologia Celular e Molecular* Saunders

Andrade ZA (2009) Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunology* 31: 656–663

Agoston K, Kerekgyarto J, Hajko J , Batta G, Lefeber DJ, Kamerling JP, Vliegenthart JFG (2002) Synthesis of Fragments of the Glycocalyx Glycan of the Parasite *Schistosoma mansoni*. *Chem. Eur. Journal* 8 (1) 151-161

Araújo RVS, Melo-Júnior MR, Beltrão EIC, Mello LA, Iacomini M, Carneiro-Leão AMA, Carvalho Jr LB, Santos-Magalhães NS (2011) Evaluation of the antischistosomal activity of sulfated α -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri* free and encapsulated into liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44(4): 311-318

Ashton PD, Harrop R, Shah B, Wilson, RA (2001) The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology* 122: 329-338

Brustein VP, Cavalcanti CLB, Melo-Junior MR, Correia MTS, Beltrão EIC, Carvalho Jr LB (2012) Chemiluminescent Detection of Carbohydrates in the Tumoral Breast Diseases. *Appl Biochemical and Biotechnology* 166: 268–275

Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP (2009) Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology* 31: 163–176

Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Oliveira RC, Gazzinelli G (2008) Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Tropica* 108: 109–117

Campos LM, Cavalcanti CLB, Lima-Filho JL, Carvalho Jr, LB, Beltrão EIC (2006) Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker *Biomarkers* 11(5): 480-484

Clerinx J, Gompel AV (2011) Schistosomiasis in travellers and migrants. *Travel Medicine and Infectious Disease* 9: 6-24

Cummings R, Turco S (2009) Parasitic Infections. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. *Essentials of Glycobiology* Chapter 40 Published on line

Ferreira AS, Vasconcelos JLA, Cavalcanti CLB, Rêgo MJMB, Beltrão EIC (2013) Sialic acid differential expression in non-melanoma skin cancer biopsies. *Medical Molecular Morphology* Published on line

Frank S, van Die I, Geyer R (2012) Structural characterization of *Schistosoma mansoni* adult worm glycosphingolipids reveals pronounced differences with those of cercariae *Glycobiology* 22(5): 676–695

Gamiz-Gracia L, Garcia-Campaña AM, Huertas-Perez JF, Lara FJ (2009) Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis - A review. *Analytica Chimica Acta* 640: 7-28

Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SB (2011) A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica* 113: 236-254

Guimarães MT, Melo-Junior MR, Costa Silva RB, Cavalcante CBL, Beltrão EIC (2008) Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema ovogranuloma hepático na esquistossomose humana e experimental. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 67(1): 59-63

Kloss H, Correa-Oliveira R, Quites HFO, Souza MCC, Gazzinelli A (2010) Socioeconomic studies of schistosomiasis in Brazil: A review. *Acta Tropica* 108: 194–201, 2008

Jang-Lee J, Curwen RS, Ashton PD, Tissot B, Mathieson W, Panico M, Dell A, Wilson RA, Haslam SM (2007) Glycomics Analysis of *Schistosoma mansoni* Egg and Cercarial Secretions. *Molecular & Cellular Proteomics* 6(9): 1485-1499

Lima LRA, Bezerra MF, Almeida SMV, Siva LPBG, Beltrão EIC, Carvalho Jr LB (2013) Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester. *Disease markers* 35 (3): 149–154

Liu M, Lin Z, Lin JM (2010) A review on applications of chemiluminescence detection in food analysis. *Analytica Chimica Acta* 670: 1–10

Marques-Jr ETA, Ichikawa Y, Strand M, August JT, Hart GW, Schnaar RL (2001) Fucosyltransferases in *Schistosoma mansoni* development. *Glycobiology* 11(3): 249-259

Melo-Júnior MR, Cavalcanti CCB, Pontes-Filho NT, Carvalho Jr LB, Beltrão EIC (2008) Carbohydrates Detection in the Hepatic Egg – Granuloma System Using Lectin Histochemistry. *International Journal of Morphology* 26(4): 967-972

Nyame AK, Debose-Boyd R, Long TD, TsangVCW, Cummings RD (1998) Expression of Lex antigen in *Schistosoma japonicum* and *S.haematobium* and immune responses to Lex in infected animals: lack of Lex expression in other trematodes and nematodes *Glycobiology* 8 (6): 615–624

Pereira ASA, Padilha RJR, Lima-Filho JL, Chaves MEC (2011) Scanning electron microscopy of the human low-density lipoprotein interaction with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 109:1395–1402

Pereira ASA, Cavalcanti NL, Nascimento GAF, Nascimento-Silva JLG, Padilha RJR, Viegas LFW, Alves LC, Lima-Filho JL, Chaves MEC (2013) Morphological and morphometric study of cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni* (SLM strain) isolated from infected mice. *Parasitol Res* 112:1087–1096

Rêgo MJB, Vieira-De-Mello GS, Araújo CW, Cavalcanti MSM, Beltrão EIC (2013) Evaluation of WGA and Concanavalin A (Con A) lectin as biomarkers of hepatosplenic schistosomiasis in human biopsies with no evidence of egg-granuloma system *Rev. Inst. Med. Trop* 55(3):213-215

van Die I, van Liempt E, Bank CMC, Schiphorst W (2005) Interaction of schistosome glycans with the host immune system. *Glycobiology and Medicine* 564: 9-19

van Remoortere A, Hokke CH, van Dam GJ, van Die I, Deelder AM, van den Eijnden DH (2000) Various stages of schistosoma express Lewis(x), LacdiNAc, GalNAcbeta1-4 (Fucalpha1-3)GlcNAc and GalNAcbeta1-4(Fucalpha1-2Fucalpha1-3)GlcNAc carbohydrate epitopes: detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins. *Glycobiology*. 10(6):601-609

van Vliet, SJ, van Liempt, E, Saeland, E, Aarnoudse, CA, Appelmelk, B, Irimura, T, Geijtenbeek, TBH, Blixt, O, Alvarez, R, Van Die, I, Van Kooyk, Y (2005) Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *International Immunology* 17(5): 661–669

Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. 2009 *Essentials of Glycobiology* Chapter 40 Published on line

6. CONCLUSÕES

A técnica de quimiluminescência conjugada a lectinas na investigação do perfil de carboidratos se mostrou eficiente, de maneira que pôde determinar de maneira quantitativa as alterações no perfil de carboidrato em esquistossomose mansônica. Pode-se observar que houve alterações nos valores de glicose/ manose e N-acetilglicosamina no sistema ovo-granuloma e que ambos se mostraram elevados quando comparados ao tecido não infectado, enquanto que os valores de α -NeuNAc-[2 $\rightarrow$ 6] -Gal/GalNAc não foram alterados estatisticamente. Isso constata que os valores para ácido siálico não se alteram durante a doença. Este estudo se mostrou importante por contribuir para um melhor conhecimento sobre processos imunomodulatórios da doença, podendo ajudar em um melhor entendimento da biologia do parasita. Como perspectivas, o estudo de esquistossomose será continuado com a otimização da técnica luminescente no intuito de pesquisar antígenos relacionados à doença tanto em extrato bruto de ovo quanto no próprio tecido hepático.