

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Mestrado em Bioquímica

***Identificação de glicoproteínas em indivíduos
saudáveis e portadores de Esquistossomose
Mansônica Hepatoesplênica***

Ana Cristina Ferraz Nogueira

Orientadora: Profa. Dra. Russolina B. Zingali
**Co-Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia de Meneses
Lima**

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Mestrado em Bioquímica

Ana Cristina Ferraz Nogueira

*Identificação de glicoproteínas em indivíduos
saudáveis e portadores de Esquistossomose
Mansônica Hepatoesplênica*

Dissertação apresentada ao Mestrado em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Russolina Benedita Zingali
Co - Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia de Meneses Lima

Nogueira, Ana Cristina Ferraz

Identificação de glicoproteínas em indivíduos saudáveis e portadores de Esquistossomose mansônica hepatoesplênica / Ana Cristina Ferraz Nogueira. – Recife: O Autor, 2010.

71 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Russolina B. Zingali.

Co-orientadora: Vera Lucia de Meneses Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Bioquímica, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Proteínas 2. Glicoproteínas 3. Esquistossomose 4.
- Schistossoma mansonii I. Título.

572.68

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-231

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Ana Cristina Nogueira Ferraz**, realizada em 24 de fevereiro de 2006, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 14:10h horas, do dia 24 de fevereiro de 2006, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo de Barros Lins – Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Ana Cristina Nogueira Ferraz**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, Chefe do Departamento de Bioquímica, no impedimento da Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, Coordenadora do Curso de Mestrado em Bioquímica e Co-orientadora da mestranda em pauta e a Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva – Vice Coordenadora do curso supra mencionado, fez a apresentação da aluna e de sua orientadora Profa. Dra. Russolina Zingali, do Depto. de Bioquímica Médica-UFRJ, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, na qualidade de Presidente, Maria Tereza dos Santos Correia, ambas do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE e Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo, Pesquisadora do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE. Após as apresentações, a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia passou a palavra para a Sra. Presidente que convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Identificação de Glicoproteínas em Indivíduos Saudáveis e Portadores de Esquistossomose mansônica hepatoesplênica"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 45 minutos. Após a apresentação da mestranda, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Daí a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, a Sra. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovada com distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 24 de fevereiro de 2006.

Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Maria Tereza dos Santos Correia
Adriana Carla Cavalcante Malta Argôlo

Em tempo: nas linhas 1 e 7, onde se lê "Ana Cristina Nogueira Ferraz", leia-se "Ana Cristina Ferraz Nogueira". Em 24/02/2006.

“Para cultivar a sabedoria, é preciso força interior. Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica. O impossível torna-se possível com a força de vontade” – Dalai Lama.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho, e em especial a:

Primeiramente a DEUS, pela força e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis de minha vida.

A minha família, avós, tios, tias, primos e primas pelo apoio e incentivo e mais do que tudo a pessoa que mais amo nesse mundo minha mãe Maria Zilma a quem credito a totalidade do meu sucesso.

Aos meus amigos e companheiros de jornada, Ana, César, a “galera” de glicoproteínas, enfim todos que compõem o departamento. Não poderia esquecer as amizades feitas na faculdade e que serão eternas Flaviana, Polianna, Michelle, Manuella, Marcelo mesmo a distância amo todos. Aos parceiros de vida que sempre estiveram ao meu lado desde sempre e numa época em que nem pensava em fazer ciência.

Aos meus orientadores, Vera Menezes e Lina Zingali pela oportunidade de fazer ciência e me confiar à responsabilidade em desenvolver um trabalho tão interessante e prazeroso.

Não poderia esquecer os amigos do laboratório de proteômica cuja paciência e apoio foi incondicional. Sem dúvida foi uma jornada inesquecível.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica.	6
Figura 2 – Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> .	8
Figura 3 – Representação esquemática das lectinas Cramoll e Concanavalina A.	16
Figura 4 – Figura esquemática demonstrando os tipos de cadeias oligossacarídicas encontradas em glicoproteínas.	18
Figura 5 – Figura esquemática de uma vesícula lipoprotéina.	26
Figura 6 – Reação catalisada pela LCAT.	28
Figura 7 – Visualização de uma eletroforese bidimensional após separação das amostras segundo gradiente de pH (IEF) e Peso molecular (SDS-PAGE).	31
Figura 8 – Componentes básicos dos espectrômetros de massas	32
Figura 9 – Representação esquemática do processo de ionização por MALDI e Eletrospray	34
Figura 10 – Representação esquemática da separação de massa através do analisador Tof.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. – Perfil protéico plasmático em reações de fase aguda.	20
Tabela 2. - Peso molecular das principais proteínas de fase aguda.	26

LISTA DE ABREVIATURAS

2D - Eletroforese bidimensional.
A1AT – Alfa 1-antitripsina.
ACN - Acetonitrila.
Con A - Concanavalina A.
CRD - Domínio de reconhecimento de carboidrato.
Da – Dalton.
DTT - Ditioltreitol.
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético.
ESI – do inglês *electrospray ionization*- espectrometria de massa baseada na ionização por pulsos elétricos em meio líquido.
FNT - Fator de necrose tumoral.
HDL - lipoproteínas de alta densidade.
IAA – Iodoacetamida.
Ig – imunoglobulina.
IL – Interleucina.
IPG - immobilized pH gradient pre-cast.
kDa - Quilodáltons.
LCAT - lecitina: colesterol aciltransferase.
LDL - lipoproteínas de baixa densidade.
M - Molar.
mA – Miliamper.
Maldi – do inglês “*matrix-assisted laser desorption ionization*” - espectrometria de massas com base na dessorção e ionização das proteínas com laser auxiliado por uma matrix.
mM – Milimolar.
MS - Espectrometria de massa.
PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida.
PFA - Proteínas de fase aguda.
pI - ponto isoelétrico.
RBP – do inglês “*retinol binding protein*”.
Rpm - Rotação por minuto.
SAA – Amilóide sérico A .
SDS - Dodecilssulfato de Sódio.
Temed - N, N- tetrametiletilenodiamina.
TFA - ácido trifluoroacético.
TOF - Tempo de voo.
Vhr- Voltagem/ hora.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
SUMÁRIO	IV
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
ESQUISTOSSOMOSE: HISTÓRICO MUNDIAL DA DOENÇA	4
A ESQUISTOSSOMOSE NO BRASIL	5
CICLO EVOLUTIVO	7
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	8
TRATAMENTO	10
LECTINAS	11
GLICOPROTEÍNAS	16
LIPOPROTEÍNAS E LECITINA COLESTEROL ACILTRANSFERASE	26
PROTEÔMICA	29
ESPECTROMETRIA DE MASSAS	31
RELEVÂNCIA DO TRABALHO	36
OBJETO GERAL	37
OBJETIVO ESPECÍFICO	37
ARTIGO	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

RESUMO

Sendo a esquistossomose uma patologia de grande incidência no nordeste brasileiro, estudos a cerca das glicoproteínas particularmente as hepáticas encontradas em pacientes portadores dessa parasitose pode representar importante passo no entendimento de sua fisiopatologia. Além disso, a utilização de duas diferentes lectinas, uma comercial e amplamente caracterizada (Concanavalina A) e outra isolada de sementes de planta típicas da região nordeste (lectina Cramoll) possibilita análise comparativa dos diferentes glicoconjugados plasmáticos ligados a partir da utilização de colunas de afinidade. Numa primeira abordagem, foram realizadas identificações de glicoproteínas plasmáticas, a partir do plasma de indivíduos saudáveis, pré-purificadas em duas diferentes lectinas de mesma especificidade oligossacarídica (glicose/manose). Num segundo momento, identificou-se glicoconjugados em indivíduos, já cirurgiados, acometidos pela esquistossomose no seu mais avançado nível. Nesse contexto, foram realizadas abordagens proteômicas que incluem eletroforeses bidimensionais com posterior digestão enzimática, análise em espectrômetro de massas do tipo Maldi-tof e Maldi-tof/tof e, por fim, a partir dos espectros obtidos, busca em banco de dados através da ferramenta Mascot. A grande maioria das glicoproteínas identificadas constituem proteínas de fase aguda incluindo hemopexina, componente 3 do complemento, imunoglobulinas e subunidades, transferrina, haptoglobina, inibidor de protease (c1), beta 2- glicoproteína I, antitrombina, alfa 1-beta-glicoproteína, subunidades de fibrinogênio e alfa-1 antiqumiotripsina. A Concanavalina A diferentemente da lectina Cramoll, ligou-se a proteínas tais como PRO 1400, PRO2619, eritropoietina, KIAA1492, proteína SPTAN1, R32611_2, cadeia beta do fibrinogênio, alfa-1-B-glicoproteína e Beta-2-glicoproteína. Por outro lado, a lectina Cramoll ligou-se a SH2/SH3 adaptor NCK-beta, proteína de Bence-Jones, anidrase carbônica II e apolipoproteína A-I. Ao analisar o plasma de pacientes cirurgiados utilizando a Concanavalina A e os mesmos parâmetros experimentais, observou-se ausência de proteínas tais como PRO 1400, PRO2619, KIAA1492, proteína SPTAN1 e R32611_2. Em contra partida, foram identificadas proteínas tais como glicoproteína rica em histidina e deferentes subunidades de imunoglobulinas.

PALAVRAS- CHAVES: PROTEÍNAS, GLICOPROTEÍNAS, ESQUISTOSSOMOSE, SCHISTOSSOMA MANSONI.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a serious public health problem in several regions around the world, including the northeast of Brazil. The identification of hepatic glycoproteins in complex mixtures derived from human blood seems to be valuable in order to better understand the physiopathology of this chronic disease. Our work intends to identify plasma glycoproteins from healthy individuals and hepatosplenic schistosomiasis patients submitted to surgery, using two different lectins with the same oligosaccharides specificity, the commercial Concanavalin A (Con-A) lectin and Cramoll lectin, isolated from *Cratylia mollis* seeds, a typical leguminous from the Northeast. The identification of biomarkers was performed using as preliminary screen, SDS-PAGE and dot blotting and as second approach, two-dimension differential gel electrophoresis were all resolved proteins spots were first excised, trypsin digested, analyzed by mass spectrometry using Maldi-tof and Maldi-tof/tof and finally the spectrum of peptides was analyzed by MASCOT program databases. Most of the spots identified, were glycoproteins of acute-phase including hemopexin, albumin, complement component 3, subunits of immunoglobulin, transferrin, haptoglobin, plasma protease (c1) inhibitor, beta 2- glycoprotein I, antithrombin, alpha-1-beta-glycoprotein, fibrinogen beta chain and alpha-1-antitrypsin. Comparative analyses between controls using Con-A and Cramoll lectin demonstrated that even with the same oligosaccharides specificity they adsorbed same different plasma proteins. Concanavalin A lectin was capable to bound a named protein PRO 1400, PRO2619, fibrinogen beta chain, alpha-1-B-glycoprotein, erythropoietin, antithrombin III, KIAA1492, SPTAN1 protein, R32611_2 and Beta-2-glycoprotein. Otherwise, Cramoll lectin bound proteins like SH2/SH3 adaptor NCK-beta, Rei, Bence-Jones, carbonic anhydrase II and apolipoprotein A-I. Using the same parameters plasma of hepatosplenic schistosomiasis patients submitted to surgery showed similar results except for the absence of erythropoietin, antithrombin III, KIAA1492, SPTAN1 protein, PRO1400, PRO2619, R32611_2 and presence of proteins like histidine-rich glycoprotein and some different subunits of immunoglobulin.

KEYWORDS: PROTEINS, GLYCOPROTEINS, SCHISTOSOMIASIS,
SCHISTOSSOMA MANSONI.

I - INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica, doença causada pelo parasita *Schistosoma mansoni*, encontra-se como uma das mais prevalentes parasitoses humanas particularmente em países subdesenvolvidos e tropicais tais como o Brasil (Chitsulo *et al.*, 2000).

A hepatopatia constitui a principal lesão esquistossomótica, caracterizada por uma reação inflamatória localizada nos ramos portais intra-hepáticos e pelo desenvolvimento de granuloma e fibrose periportal (Arruda, 1996).

Diante do acometimento hepático varias funções metabólicas correlatas podem ser comprometidas o que pode agravar ainda mais o estado do paciente (Coutinho & Domingues, 1993). O desequilíbrio causado por essa condição patológica depende, em grande parte, da carga parasitária, da fase da doença, do tempo de duração da infecção esquistossomótica e das condições do hospedeiro (Lambertucci, 1993).

Sob essas condições, a identificação e caracterização de glicoproteínas de origem hepática são um dos mais relevantes estudos uma vez que ocorrem registros de microheterogenicidade, em decorrência de condições patológicas, afetando seu amplo espectro de funcionalidade (Glitz, 1997).

Nesse contexto, a utilização do plasma humano como objeto de estudo constitui uma das estratégias mais utilizadas uma vez que se trata de uma mistura complexa constituída de centenas de moléculas com as mais variadas funcionalidades. Interessante observar que devido à grande variedade de moléculas, mostra-se de fundamental importância a utilização de etapas de pré-purificação e nesse sentido, as lectinas são essenciais ao processo.

As lectinas, proteínas capazes de reconhecer carboidratos livres e/ou conjugados constitui uma das mais importantes armas para a análise de glicoconjugados (Licastro *et al.*, 1993). A utilização das mesmas como matrizes de afinidade possibilita o isolamento de glicocomponentes seja sob condições de normalidade ou patológica.

Além da etapa de pré-purificação previamente citada, o aperfeiçoamento de técnicas proteômicas com conseqüente identificação e seqüenciamento, tem possibilitado a descoberta e análise de constituintes plasmáticos que podem contribuir para o diagnóstico e prognóstico de enfermidades. Há décadas ocorrem tentativas de correlacionar o surgimento de componentes no plasma humano com doenças tais como câncer, dengue, esquistossomose mansônica, dentre outras (Thompson *et al.*, 1987).

A análise da expressão global protéica através do proteoma permite revelar proteínas envolvidas em processos dinâmicos que ocorrem, por exemplo, após perturbação de um dado estado fisiológico. Além disso, a identificação de modificações pós-traducionais possibilita obter informações a cerca do tráfego protéico, bem como funcionalidade e nível de atividade, sendo, portanto, crucial para a compreensão das complexas redes de regulação subjacentes às respostas celulares diante de qualquer perturbação ambiental (Graves & Haystead, 2002; Hunter, 1995).

Esquistossomose: Histórico mundial da doença

A esquistossomose é uma endemia parasitária, conhecida desde a antigüidade uma vez que foram encontrados registros sobre lesões causadas pela doença em múmias do antigo Egito (FUNASA, 1999).

Os primeiros relatos de aspectos clínicos da doença datam de 1847, pelo japonês Fuji. Em 1852, o parasita tornou-se conhecido com a descrição de Theodor Bilharz, justificando a denominação bilharziose usada em alguns países. O médico inglês Patrick Manson, quarenta anos mais tarde, levantou a hipótese da existência de duas espécies de *Schistosoma* parasitas do homem. Hoje, sabe-se que são muitas: *S. japonicum* (esquistossomose japonesa), *S. haematobium*, (esquistossomose hematúria, vesical ou urinária), *S. intercalatum* (esquistossomose intestinal, típica de países da África Central), *S. mekongi* (esquistossomose intestinal, comum no vale do rio Mekong, no Laos e Camboja), *S. bovis*, *S. mattheei* e *S. rodhaini* (esquistossomose de animais que, eventualmente, parasitam o homem na África) e *S. mansoni*

(esquistossomose mansônica, única espécie de interesse médico para a saúde pública brasileira) (Paraense, 1986; Paraense & Corrêa, 1983).

A espécie de parasita existente no Brasil foi descrita, em 1907, pelo inglês Sambon que a nomeou *Schistosoma mansoni* em homenagem ao renomado médico inglês Patrick Manson. No mesmo ano, o médico brasileiro Manoel Augusto Pirajá da Silva, estudou uma espécie encontrada na Bahia relatando que, provavelmente, seria uma nova espécie e a chamou de *Schistosoma americanum*. Com as observações cuidadosas de Pirajá da Silva as incertezas taxonômicas foram suprimidas. Em 1908 surgiram estudos que revelavam a existência de casos da doença. Neste mesmo ano, Pirajá da Silva publicava no periódico *Brazil Médico*, o resultado de uma pesquisa pioneira feita a partir da ocorrência da doença em 20 pacientes (Andrade, 2002).

Em 1913, Miyaki e Suzuki realizaram a descrição do hospedeiro intermediário da doença, moluscos do gênero *Biomphalaria*, bem como demonstraram que a cercária (larva do *Schistosoma*) transmitia a doença ao homem quando penetrava em sua pele. A descrição do ciclo evolutivo das espécies *S. mansoni* e *S. haematobium* foi realizada, pela primeira vez, em 1915, pelo egípcio Leiper. Um ano depois, Adolfo Lutz estudou, no Brasil, a evolução do *S. mansoni* em caramujos da espécie *Biomphalaria olivacea*, atualmente denominada *B. glabrata*. Esses estudos o levaram também à descoberta de um novo hospedeiro intermediário, o também caramujo *Biomphalaria straminea* (Amaral *et al.*, 1994; Lambertucci, 1987).

Embora escravos africanos estivessem infectados por duas espécies do esquistossomo, *S. mansoni* e *S. haematobium*, somente a primeira se desenvolveu no Brasil. O ciclo evolutivo do *S. haematobium* não prosseguiu nas Américas, devido à falta do hospedeiro intermediário próprio dessa espécie (Araújo, 1986; Paraense, 1978).

A Esquistossomose no Brasil

A esquistossomose, conhecida popularmente como xistosa, “xistossomose”, “doença dos caramujos” ou “Barriga d’água” é uma das mais

relevantes parasitoses mundiais apresentando elevados índices de morbidade e mortalidade, particularmente em países subdesenvolvidos (Rey, 1991).

No Brasil o maior número de casos ocorre numa faixa contínua, ao longo do litoral em estados como Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Maranhão, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul; para o oeste, a esquistossomose tem sido encontrada em Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso (Figura 1) (Passos & Amaral, 1998).

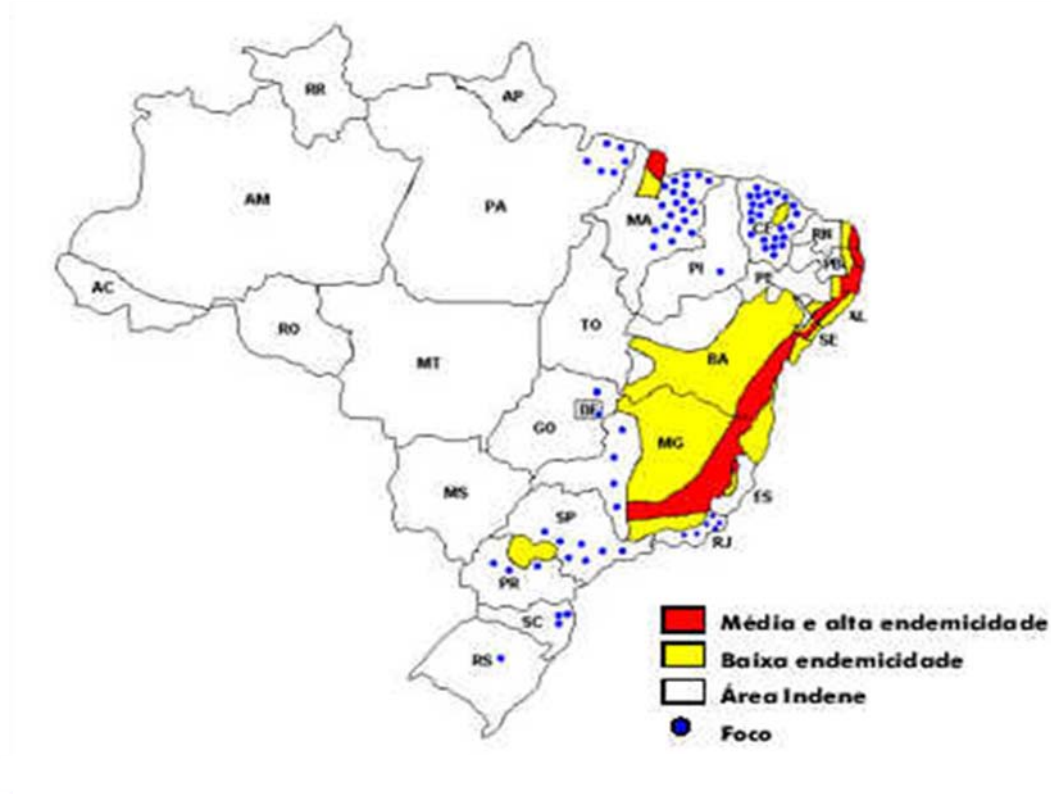


Figura 1 - Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica. Brasil, 2002. (Fonte: GT- esquistossomose/CGVEP/CDTV/CENEPI/FUNASA/MS)

Apesar dos esforços empreendidos na tentativa de erradicar a doença através de tratamento da população atingida com drogas esquistossomicidas, controle de caramujos, educação para a saúde e medidas sanitárias, a esquistossomose continua a ser uma das doenças parasitárias mais importantes e com grande potencial de disseminação (Kalife *et al.*, 2000). Trata-se de um problema de saúde pública em mais de 76 países

particularmente na África, Ásia e América, onde 600 milhões de pessoas se encontram sob risco de adquirir a infecção, estimando-se que cerca de 200 milhões possam estar infectadas por uma das diferentes espécies de *Schistosoma* que atingem o homem (Chitsulo *et al.*, 2000; Gibodat & Bergquist, 2000; WHO, 2001; 1997).

No Brasil, a esquistossomose é considerada importante endemia parasitária. Em 1987 o Brasil apresentava população estimada de 160 milhões de pessoas, dos quais cerca de 10 milhões de pessoas mostravam-se infectadas e outros 30 milhões encontravam-se expostas à infecção (CEGET-CNRS/OMS, 1987). Já no ano de 1997 estimou-se 6,3 milhões de indivíduos portadores dessa helmintose (Katz & Peixoto, 2000).

A disseminação da esquistossomose é atribuída à migração de indivíduos provenientes das áreas endêmicas do nordeste e leste brasileiros, observando-se o surgimento de novos focos em áreas antes consideradas indenes, como por exemplo, no Rio Grande do Sul (Graeff-Teixeira *et al.*, 1999). Além disso, tem-se observado a urbanização da doença, com o registro de casos em regiões periurbanas das grandes cidades brasileiras (Katz & Peixoto, 2000).

Ciclo Evolutivo

O ciclo de evolução começa quando fezes ou urina de algum indivíduo infectado com ovos entram em contato com a água. Os ovos eclodem e liberam a primeira forma larval do *S. mansoni*, conhecida como miracídio. Assim que sai do ovo, o miracídio busca e penetra o caramujo (hospedeiro intermediário), onde, multiplica-se e transforma-se em outra larva, conhecida como cercária. Um caramujo é capaz de liberar milhares de cercárias em um só dia, dando início à segunda fase do ciclo (Rey, 2001). Uma vez na água, as cercárias infectantes nadam, penetram na pele do hospedeiro humano e perdem sua cauda bifurcada tornando-se um esquistossômulo, o qual migra através da corrente sangüínea e/ou linfática para o fígado e outros órgãos. Com um dia de infecção, é possível encontrar larvas nos pulmões e nove dias depois as mesmas rumam para o fígado, onde se alimentam de sangue e iniciam sua

maturação (Katz & Almeida, 2000). No sistema porta hepático, os vermes já adultos acasalam e migram para as vênulas da parede intestinal com o intuito de realizar a ovoposição. Os ovos podem chegar à luz intestinal, o que permite sua eliminação nas fezes, ou podem ser arrastados para o fígado (Figura 2) (Neves, 2001; Rey, 2001).

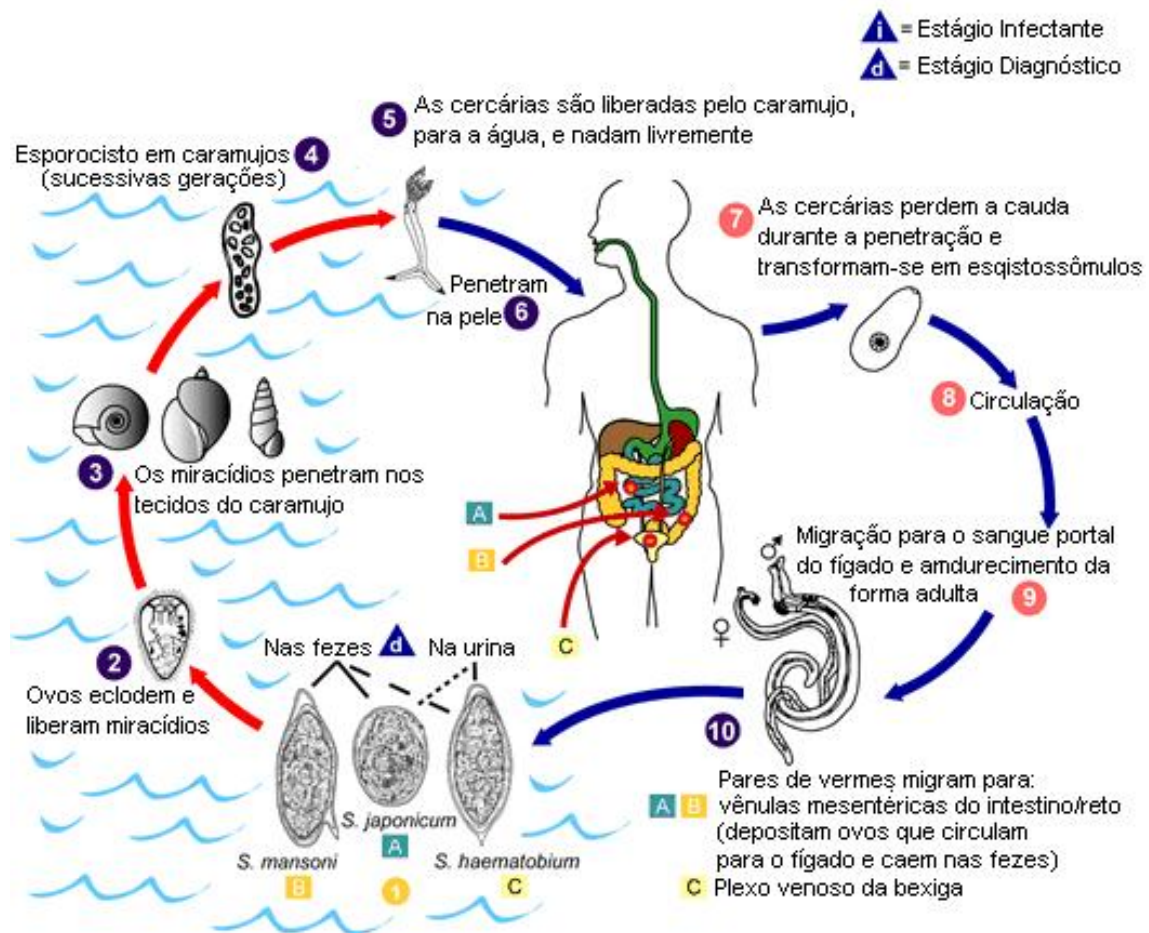


Figura 2 - Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*.
(Fonte: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_ESQUI05.htm)

Manifestações clínicas

A intensidade e variação das manifestações clínicas da esquistossomose dependem da interação entre o parasito e o hospedeiro, bem como da fase da doença (Passos & Amaral, 1998). Uma vez infectado, o hospedeiro pode permanecer assintomático ou desenvolver uma variedade de

manifestações clínicas, desde sintomas locais mínimos até doença multissistêmica, algumas vezes de evolução letal (Atkin *et al.*, 1986).

O espectro clínico da esquistossomose varia desde uma síndrome sistêmica aguda a uma doença crônica, indolente, fibro-obstrutiva, com alta morbidade e mortalidade, não sendo incomum decorrerem 20 anos ou mais desde o início dos sintomas até a instalação de hipertensão portal (Wilson, 1974).

Todas as fases pela qual passa o parasita, no interior do organismo do hospedeiro, podem provocar reação patológica. Entretanto, o ovo constitui o mais importante agente patogênico uma vez que nos órgãos onde são depositados provocam granuloma tecidual inflamatório (Raso & Pedroso, 1987). O principal órgão acometido pela doença é o fígado, onde a partir da deposição de ovos forma-se granulomas e lesões fibróticas (Arruda, 1996; Coutinho & Domingues, 1993).

Na fase aguda alguns indivíduos podem apresentar manifestações cutâneas, do tipo urticariforme, em seguida ao contato com águas contaminadas com cercárias. Outros indivíduos, dependendo da sensibilidade pessoal e do número de vermes, podem apresentar um quadro clínico toxêmico conhecido como febre de Katayama (Heyneman, 2001; Mahmoud, 1995). Os sintomas surgem subitamente após a terceira ou quarta semana da contaminação e incluem, entre outros: febre, dor de cabeça, calafrios, sudorese, fraqueza, falta de apetite, dor muscular, tosse e diarreia. Em alguns casos o fígado e o baço podem estar aumentados e com características inflamatórias (Doherty, 1996; Cooke, 1999).

O último estágio da doença, a fase crônica, resulta da deposição de ovos nos tecidos, particularmente, no intestino, aparelho urinário, fígado e sistema nervoso. Esta fase costuma ser dividida em: intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica compensada e descompensada (Katz & Almeida, 1982). Na fase intestinal os sintomas são geralmente vagos e incluem: perda de apetite, desconforto abdominal, sensação de plenitude intestinal, pirose e até diarreias mucosanguinolentas alternando-se com prisão de ventre. Na fase crônica hepatointestinal os sintomas são parecidos aos da fase intestinal com predomínio das diarreias (Farah *et al.*, 1997; Boros *et al.*, 1975).

A fase crônica hepatoesplênica compensada caracteriza-se pela presença de hepato-esplenomegalia. Ocorrem transtornos na circulação portal em decorrência das lesões perivasculares intra-hepáticas e hipertensão com conseqüente congestão passiva do baço. Nessa fase o estado geral do paciente é comprometido uma vez que é formada uma circulação colateral e aparecem varizes no esôfago (Domingues & Domingues, 1994). 9

A forma hepatoesplênica descompensada constitui o estado mais avançado da doença, sendo responsável na maioria dos casos pelo óbito do paciente. Esse estágio é caracterizado pela ocorrência de fígado volumoso ou já contraído pela fibrose perivascular, anemia acentuada, desnutrição, esplenomegalia avantajada, ascite, circulação colateral, varizes do esôfago e hematêmese (Domingues & Domingues, 1994; Paranaguá-Vezozzo, 1992; El-Rooby, 1985; Mousa *et al.*, 1967).

Tratamento

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o tratamento clínico para a esquistossomose deve ser baseado na administração de drogas como o oxamniquine e praziquantel. Os medicamentos indicados apresentam baixa toxicidade e a eficácia do tratamento gira em torno de 80% dos casos, em adultos e 70% em crianças de até 15 anos (Petroianu, 2003; Allen *et al.*, 2002; WHO, 1985).

Ainda não existe vacina para a esquistossomose, o que poderia auxiliar como medida preventiva da doença. A importância do tratamento reside não só no fato de diminuir a carga parasitária dos pacientes, como, principalmente, impedir a evolução para formas graves (Allen *et al.*, 2002).

Em pacientes que apresentam estágio patológico avançado pode ocorrer quadro hipertensivo do sistema porta. O mesmo, decorrente principalmente da deposição dos ovos nos ramos intra-hepáticos, constitui uma das principais complicações clínicas em indivíduos que apresentam a esquistossomose na forma hepatoesplênica, sendo responsável pela diminuição do fluxo da veia porta e aumento da pressão em todo sistema venoso que afluí para esse vaso (Petroianu, 2003).

Quanto maior a infestação e a deposição de ovos, mais intensa é a oclusão venosa e mais grave a hipertensão. Com o tempo, o calibre das varizes aumenta e também o risco de hemorragia. Na esquistossomose hepática, ocorre fibrose do fígado e, na forma hepatoesplênica, fibrose periportal e aumento do baço (Coelho, 1996). No caso de infestação maciça esse quadro oclusivo também pode ser provocada pelo próprio parasita vivo ou principalmente morto (Andrade *et al.*, 1984).

Os pacientes portadores de hepatoesplenomegalia esquistossomótica e varizes do esôfago devem ser submetidos a tratamento clínico e cirúrgico. A terapêutica cirúrgica busca tratar e prevenir sangramento evitando rompimento de varizes esofágicas e gástricas (Lacerda *et al.*, 2000; Kelner, 1992). O protocolo cirúrgico consiste de esplenectomia, autoimplante de tecido esplênico em bolsa no omento maior e ligadura da veia gástrica esquerda (Brandt *et al.*, 1995; 1997). O transplante autólogo de tecido esplênico é uma tentativa de manter as funções esplênicas. O mesmo objetiva minimizar os riscos de septicemia fulminante após esplenectomia, sendo realizada em indivíduos com hipertensão porta severa, devido a hepato-esplenomegalia esquistossomótica (Steely *et al.*, 1988; Traub *et al.*, 1987; Hays *et al.*, 1986). Segundo Brandt (1998) o transplante autólogo de tecido esplênico em bolsa do omento maior é eficiente na manutenção da função esplênica em mais de 90% dos pacientes estudados.

Lectinas

O estudo das lectinas, proteínas ou glicoproteínas, que apresentam a capacidade de interagir de forma não covalente e com considerável especificidade a carboidratos (Licastro *et al.*, 1993), foi iniciado por Kober e colaboradores numa pesquisa que caracterizava proteínas tóxicas de espécies de euforbiáceas e leguminosas (Torns & Westem, 1871). O primeiro pesquisador a descrever o processo de aglutinação em eritrócitos foi Stellmark (1888), ao isolar das sementes de *Ricinus communis*, uma fração protéica altamente tóxica que foi denominada ricina (Pusztai, 1989b; Lis & Sharon, 1972). Diante dessas características, o termo hemaglutinina foi proposto para

denominar essa classe proteica, que conforme observado tinham ação antigênica sem necessariamente serem tóxicas (Pusztai, 1989a).

Em 1936, Samner e Howell caracterizaram a aglutinação produzida por Concanavalina A, lectina isolada de *Canavalia ensiformis*, demonstrando sua inibição pela sacarose. Já em 1948, Renkonnen verificou que alguns extratos de leguminosas apresentavam especificidade antigênica para os antígenos do sistema ABO, evento uma vez mais reportado em 1987, num estudo que ainda demonstrou especificidade para o sistema MN (Sharon & Lis, 1987). Com a descoberta da especificidade, Boyd e Shapleigh (1954) propuseram o termo lectinas, do latim “lectus/legere”- meio de seleção ou escolha, referindo-se à capacidade de ligação seletiva destas proteínas com carboidratos.

Diante de todas as características anteriormente citadas, o termo lectina passou a ser utilizado para proteínas que aglutinam células ou precipitam polissacarídeos e glicoproteínas, graças à habilidade de ligar específica e reversivelmente a determinados carboidratos, sejam eles açúcares simples ou complexos (Sharon & Lis, 1987). Interessante observar que muitos estudos demonstram que a interação lectina-carboidratos ocorre através de pontes de hidrogênio, coordenação metálica, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (Elgavish & Shaanan, 1997).

As lectinas, diferentes das imunoglobinas uma vez que não são produtos de resposta imune (Loris *et al.*, 2002; Lis & Sharon, 1998), podem ser encontradas em animais, vegetais e microorganismos (Sharon, 1993). As mesmas apresentam dois ou mais sítios de ligação para carboidratos, di ou polivalentes e podem ser caracterizadas e detectadas por sua habilidade em aglutinar eritrócitos, processo no qual seus sítios se combinam com açúcares da superfície das células acarretando ligação cruzada com subsequente precipitação, em certos casos com alta especificidade (Correia & Coelho, 1995; Goldestein *et al.*, 1980; Lis & Sharon, 1973).

Os carboidratos possuem um enorme potencial de codificação biológica e podem ser encontrados ligados a proteínas ou lipídeos. Estas moléculas (glicoproteínas e glicolipídeos) encontram-se livres em fluidos biológicos e na superfície exterior de células, funcionando como meio de identificação e

reconhecimento celular (Nangia–Makker, 2002). Diante da capacidade e especificidade de reconhecer e se ligar a açúcares simples, tais como glicose, manose, galactose, as lectinas passaram a ser utilizadas em pesquisas na área biológica e médica (Donaldson & Shuler, 1999; Kennedy *et al.*, 1995). As mesmas são importantes na investigação estrutural e funcional de complexos de hidratos de carbono, especialmente glicoproteínas e na identificação de alterações que ocorrem na superfície celular durante os processos patológicos e fisiológicos. As lectinas são importantes devido ao seu potencial de reconhecimento celular em diversos processos biológicos, tais como, eliminação de glicoproteínas do sistema circulatório, no controle intracelular do transporte de glicoproteínas, na adesão de agentes infecciosos a células hospedeiras, no recrutamento de leucócitos para locais de inflamação assim como nas interações celulares no sistema imunológico em caso de metástases e tumores malignos (Lis & Sharon, 1998).

Algumas lectinas são mitogênicas e apresentam a capacidade de transformar linfócitos; outras aglutinam células cancerosas. Esses achados são particularmente importantes para estudos relacionados à imunologia e câncer (Lis & Sharon, 1973; Liener, 1981).

As lectinas são encontradas em uma ampla variedade de espécies de plantas e animais, entretanto, estas substâncias estão presentes em maior quantidade em grãos de leguminosas e gramíneas (Pusztai, 1989; Mancini Filho *et al.*, 1979). As mesmas, particularmente as extraídas de plantas, podem ser facilmente imobilizadas em suportes inertes (Ryder *et al.*, 1992; Hock *et al.*, 1980; Gioannini *et al.*, 1982). Dessa forma, podem ser utilizadas como matriz de afinidade objetivando a purificação de glicoproteínas (Torres & Smith, 1988), glicolipídios (Delanghe *et al.*, 1989), caracterização de enzimas (Gioannini *et al.*, 1982) e receptores (Hock *et al.*, 1980; Tsuji *et al.*, 1983).

O fato das lectinas terem larga distribuição em plantas sugere alguma importância fisiológica (Liener, 1976; Etzler, 1986). As funções da mesma podem ser variadas e parecem ter relação com os estádios de maturação, germinação das sementes e mecanismos de defesa da planta contra o ataque de fungos (Liener, 1976).

As lectinas de leguminosas são formadas por duas ou quatro subunidades, com massa molecular variando entre 25000 dáltons e 35000

dáltons e cada uma das subunidades possui um sítio de ligação para carboidratos, sendo o processo de ligação ao açúcar dependente da presença simultânea de Ca^{2+} e Mn^{2+} (ou de outro metal de transição) (Sharon & Lis, 1990).

Em algumas lectinas as subunidades são capazes de se dissociar e reassociar. A Concanavalina A (Con-A) possui estrutura tetramérica que se dissocia em dímeros se o pH for inferior a seis (Carvalho, 1990; Akedo *et al.*, 1972).

A região molecular de ligação ao carboidrato é denominada de domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) e cada subunidade da lectina possui pelo menos um domínio. A divalência ou polivalência permite a interação com carboidratos localizados na superfície de células adjacentes, resultando em aglutinação (Lis & Sharon, 1986).

Na maioria das lectinas de leguminosas a oligomerização se dá pela associação dos domínios de estrutura secundária tipo folha beta (*beta sheet*). Na Con A a formação do dímero envolve a associação, lado a lado, dos monômeros através da interação entre os seis domínios de estrutura beta com outros seis domínios da outra subunidade, formando uma estrutura de doze domínios (Lis & Sharon, 1998; Loris *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1975; Hardman & Ainsworth, 1972).

Várias lectinas provenientes de leguminosas da região semi-árida do nordeste brasileiro tem sido purificadas e caracterizadas. Em 1995, Correia e colaboradores purificaram uma lectina, denominada Cramoll-lectina, proveniente de uma planta nativa denominada *Cratylia mollis*, Mart. A atividade hemaglutinante da mesma foi fortemente inibida por metil alfa-D-manosideo sendo, portanto classificada como lectinas ligantes de manose/glicose semelhante àquelas isoladas do feijão de porco (*Canavalia ensiformis* D.C.). As sementes da *Canavalia ensiformis* contêm aproximadamente 2-3% de lectinas (Alvarez, 1989) das quais se podem extrair a Concanavalina A, de largo uso em pesquisas médicas, genéticas e como agente de proteção de plantas (Cavada *et al.*, 1999).

As lectinas de leguminosas apresentam elevada similaridade estrutural particularmente no que concerne a sua estrutura primária. Entretanto ocorrem

marcantes variações quanto à especificidade de ligação aos carboidratos (Sharon & Lis, 1990).

As estruturas responsáveis pela seletividade, a partir do reconhecimento e ligação ao açúcar revelaram que o sítio primário de ligação das lectinas extraídas de leguminosas estão localizadas na superfície de estruturas bem conservadas (Derewenda *et al.*, 1989; Loris *et al.*, 1998). A afinidade de ligação pelos carboidratos complexos é aumentada pela ocorrência de subsítios que permitem um melhor encaixe do monossacarídeo (Rini, 1995; Loris *et al.*, 1998).

A lectina Cramoll, purificada das sementes de *Cratylia mollis* (Correia & Coelho, 1995), mostra-se taxonomicamente relacionada a Con A. Ambas apresentam a mesma especificidade monossacarídica (mannose/glucose), arquitetura topológica, e conformação tridimensional. A homologia de seqüência entre as duas é de 82%, diferindo apenas em 42 dos 236 resíduos (Beltrão *et al.*, 1998).

Entretanto, mesmo apresentando grande similaridade quanto aos sítios de ligação a carboidratos e íons Ca^{2+} e Mn^{2+} , as formas imobilizadas dessas duas lectinas ligam diferentes glicoproteínas presentes no plasma humano (Lima *et al.*, 2003), bem como apresentam diferentes padrões de ligações quando comparadas células mamárias normais e transformadas (Beltrão *et al.*, 1998).

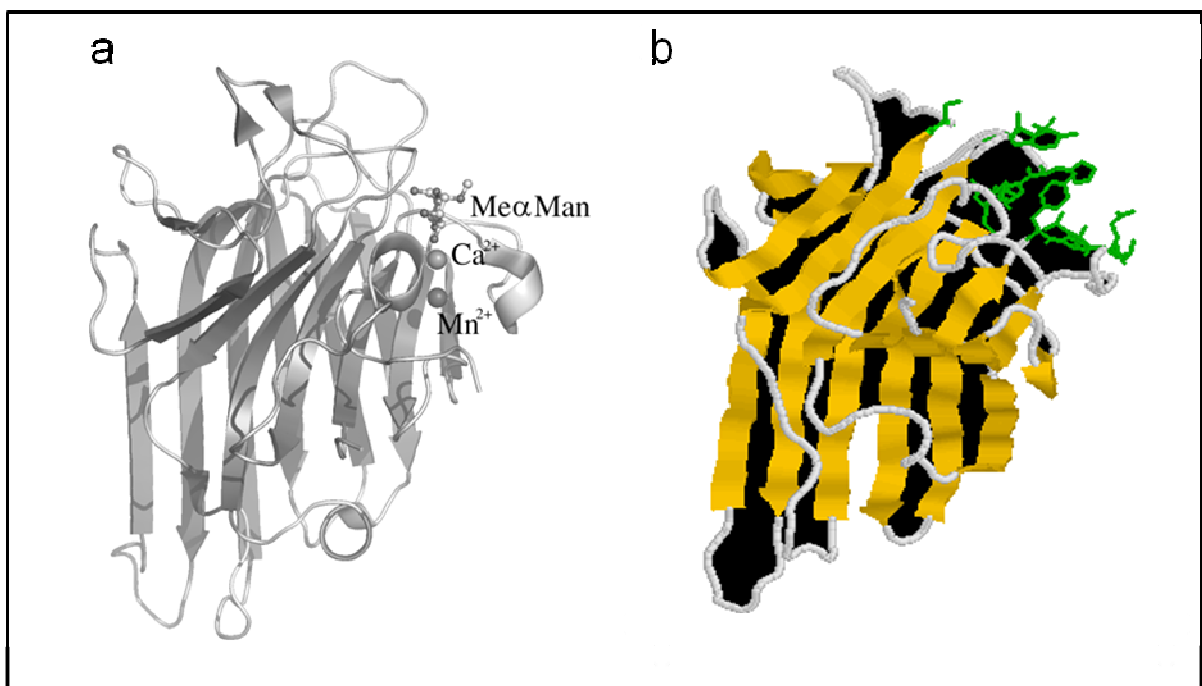


Figura 3 – Representação esquemática das lectinas Cramoll e Concanavalina A. a - Estrutura terciária da Cramoll, demonstrando os sítios de ligação Me α Man, íons Ca $^{2+}$ e Mn $^{2+}$ (Souza *et al.*, 2003); b – Cadeia polipeptídica da Concanavalina A demonstrando sítio de ligação a carboidratos (verde) (Rastall, 2005).

Glicoproteínas

Glicoproteínas são proteínas que apresentam um ou mais resíduos glicídicos covalentemente ligados a sua estrutura peptídica (Bochkov, 1993).

A glicosilação proteica é um processo importante uma vez que a porção glicídica altera as propriedades, modificando a estabilidade, solubilidade e volume físico das proteínas. Além disso, os carboidratos em glicoproteínas atuam como sinais de reconhecimento, que são centrais para aspectos de direcionamento de proteínas, para o reconhecimento celular e de outras células (Helenius & Aebi, 2001; Wormald & Dwek, 1999; Gagneux & Varki, 1999).

As glicoproteínas podem ser moléculas de transporte, enzimas, receptores e hormônios. As mesmas são formadoras de muco nos tecidos e

nas secreções e, do ponto de vista estrutural, intervêm como componentes de ligamentos, tendões, cartilagens, dentre outros (Olden *et al.*, 1982).

As cadeias polipeptídicas das glicoproteínas, como as de todas as proteínas, são sintetizadas sob controle genético. Por outro lado, as cadeias de carboidratos são geradas enzimaticamente através de um conjunto de reações pós-traducionais. Interessante observar que essas cadeias são formadas sem o controle rígido dos moldes de ácidos nucleicos e por isso tendem a apresentar composição variável (microheterogeneidade) (Voet *et al.*, 2000).

Ocorrem dois tipos principais de ligações entre proteínas e carboidratos, as ligações do tipo N e do tipo O. Os carboidratos N ligados apresentam um átomo de nitrogênio (N) na ligação entre um oligossacarídeo, em seu terminal redutor, e a cadeia lateral do aminoácido Asparagina (Asn). Nos carboidratos O ligados, o oxigênio (O) é o átomo envolvido na ligação entre o terminal redutor de um açúcar simples ou um oligossacarídeo e a cadeia lateral dos aminoácidos Serina (Ser), Treonina (Thr), Hidroxilisina (Hyl) ou Tirosina (Try) (Voet *et al.*, 2000; Chai *et al.*, 1999).

A Asparagina N-glicosilada encontra-se dentro de uma sequência específica (ou “sequon”): Asn-X-Ser/Thr; onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina. Nem toda sequência Asn-X-Ser/Thr é glicosilada. O sequon deve estar ao alcance da enzima que adiciona os carboidratos (a oligossacaril-transferase) durante o processo de biossíntese da proteína (Nelson *et al.*, 2000). A oligossacaril-transferase, na face interna da membrana do retículo endoplasmático, transfere os sacarídeos de um oligossacarídeo doador pré-fabricado (oligossacarídeo-P-P-dolicol) para o resíduo de asparagina presente em um sequon Asn-X- Ser/Thr acessível (Voet *et al.*, 2000; Gebhart & Ruddon, 1986).

Quanto a sua constituição estrutural, as glicoproteínas Asn-ligadas geralmente são divididas em dois tipos, alta manose onde oito resíduos D-manose encontram-se ligados à cadeia polipeptídica, e oligossacarídeos complexos cujas glicoproteínas com três resíduos D-manose mostram-se ligadas aos últimos dois ácidos siálicos, D-galactose e N-acetil-D-glicosamina (Mountreuil *et al.*, 1994; Gebhart & Ruddon, 1986; Sharon, 1984). Ainda ocorre

um terceiro tipo, que é uma mistura híbrida das duas anteriormente citadas (Figura 4) (Dwek, 1995; Peters *et al.*, 1986; Lima *et al.*, 2003).

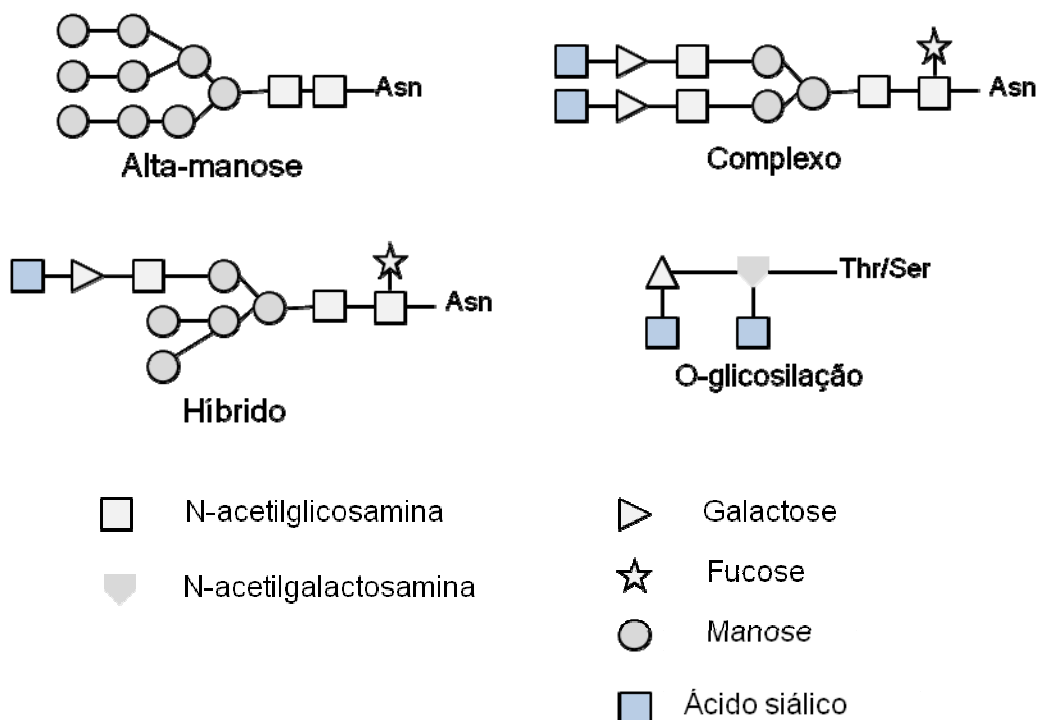


Figura 4 – Figura esquemática demonstrando os tipos de cadeias oligossacarídicas encontradas em glicoproteínas (adaptado de Lima *et al.*, 2003).

A maioria das glicoproteínas do plasma humano apresenta um ou mais oligossacarídeos N-ligados. Por outro lado, os O-glicanos são menos frequentes no plasma sendo mais comumente encontrado em mucinas (Turner, 1992).

Dentre as principais glicoproteínas plasmáticas utilizadas para o diagnóstico de enfermidades, a constituição de carboidratos é variável. Em condições de normalidade podem ocorrer em baixas percentagens, como na imunoglobulina G (IgG), em torno de 3%, bem como podem representar quase 50% da massa molecular como na glicoproteína alfa-1 ácida (45%). Podemos ainda citar a alfa1-antiquimiotripsina (27%), haptoglobina (16%), alfa1-antitripsina (13%), transferrina (7%), ceruloplasmina (7%), alfa-fetoproteína (4%) e hemopexina (20%) (Turner, 1992; Katz *et al.*, 1985).

Nas diversas patologias que decorrem de lesão tecidual, infecção, inflamação, queimaduras, cirurgias, entre outras injúrias estressantes, ocorre uma resposta sistêmica denominada resposta de fase aguda (Kushner, 1982). O fígado é o principal órgão envolvido na reação de fase aguda uma vez que citocinas, principalmente o fator de necrose tumoral (FNT) e as interleucinas IL-1 e IL-6, agem sobre receptores específicos da membrana dos hepatócitos, estimulando dessa maneira, a síntese dessas proteínas de fase aguda (PFA) (Steel & Whitehead, 1994). Dessa forma, em situações de estresse, como na vigência de processos inflamatórios agudos, a concentração plasmática de algumas proteínas séricas aumenta (proteínas de fase aguda positivas), enquanto a de outras diminui (proteínas de fase aguda negativas) (Tabela 1) (Steel & Whitehead, 1994; Baumann & Gauldie, 1994).

Vários estudos têm investigado o real valor desses marcadores na complementação diagnóstica de quadros inflamatórios e infecciosos (Huseby *et al.*, 1997).

As PFA positivas têm importantes funções relacionadas à restauração da homeostase quando a integridade do organismo é afetada por uma injúria (Baumann & Gauldie, 1994). Fazem parte deste grupo a haptoglobina, a ferritina, a proteína C-reativa, a alfa 1-antitripsina, ceruloplasmina e o fibrinogênio. Já as PFA negativas são proteínas cujas funções também contribuem para a homeostase através de mecanismos de hemodinâmica, transporte e nutrição. Pertencem a este grupo a albumina, a transferrina, as lipoproteínas e a RBP (*retinol binding protein*), dentre outras (Schultz & Arnold, 1990; Kushner, 1982).

Além de alteração nos valores séricos, ocorrem registros de microheterogenicidade estrutural de glicoproteínas em decorrência de enfermidades (Helander *et al.*, 1997; Huseby *et al.*, 1997).

Tabela 1 - Perfil protéico plasmático em reações de fase aguda (Schultz & Arnold, 1990; Kushner, 1982).

Proteína	Aumenta	Diminui
Proteína de Coagulação	Fibrinogênio	
Inibidores de Proteínas/ Proteases	Alfa 1-antitripsina Alfa 1-antiquimiotripsina	
Proteínas Transportadoras	Hemopexina Haptoglobulina Ceruloplasmina	Transferrina
Proteínas do Sistema Complemento	C1s, Inibidores de C1, C2 Fator B, C3, C4, C5, C6	Properdina
Outras	Alfa 1-glicoproteína ácida Globulinas insolúveis no frio Proteína relacionada ao amilóide sérico A (SAA)	Albumina Pré – albumina Alfa 1-lipoproteína Beta - lipoproteína

A Alfa 1-glicoproteína ácida, cujo peso molecular é de 44000 dáltons, não apresenta função biológica bem definida, mas constitui um dos principais marcadores de atividade inflamatória. A função fisiológica é desconhecida, no entanto a mesma apresenta a capacidade de se ligar a hormônios como progesterona, anestésicos, antibióticos, psicotrópicos, anticoagulantes, antiarrítmicos, entre outros (Fournier *et al.*, 2000) e a porção carboidrato da molécula parece relacionada a processos de modulação do sistema imune (Shiyan & Bovin, 1997). A mesma apresenta 45% da sua estrutura composta por carboidratos sendo hexose, hexosamina e ácido siálico em iguais proporções (Burtis & Ashwood, 1999; Bornstein *et al.*, 1969).

A Alfa 1-glicoproteína ácida é útil para o diagnóstico de quadros inflamatórios e (ou) infecciosos agudos, doença pulmonar, abuso crônico de álcool, cirrose alcoólica, Doença de Hodgkin e como preventivo de patologias coronarianas. Por ser uma proteína de fase aguda, altos títulos podem ser observados em doenças auto-imunes como artrite reumatóide e lupus

eritematoso sistêmico, em traumas, queimaduras e obesidade. Encontra-se diminuída em hepatopatias crônicas e desnutrição, bem como na síndrome nefrótica (Ballou, 1996; Mitre, 1996; Bornestein *et al.*, 1969).

A transferrina é uma glicoproteína plasmática sintetizada no fígado com um peso molecular de 79570 dáltons. A mesma é constituída por uma cadeia polipeptídica, com duas cadeias de oligossacarídeos ligados N-glicosidicamente e existe em diversas isoformas (Wick *et al.*, 1996; Kreutzer, 1976). A taxa de síntese no fígado pode ser modificada de acordo com as necessidades e as reservas de ferro do organismo. Tal proteína é responsável pelo transporte de ferro circulante, obtido de fontes dietéticas ou da decomposição de hemácias pelas células retículo-endoteliais, para a medula óssea para uso na síntese da hemoglobina ou para o fígado, baço e medula óssea para estoque (Wick *et al.*, 1996; Lievens *et al.*, 1994; Haupt & Baudner, 1990; Kreutzer, 1976).

Níveis alterados de transferrina podem levar à síntese prejudicada de hemoglobina e, possivelmente, anemia. Os níveis séricos deprimidos podem indicar produção inadequada de transferrina devido a danos hepáticos ou excessiva perda de proteína em razão de doença renal ou inflamação aguda ou crônica. Os níveis diminuídos de transferrina podem, também, resultar de infecção aguda ou crônica e câncer. Níveis elevados da glicoproteína no soro podem indicar deficiência grave de ferro, desnutrição ou gravidez (Posettihalli & Surolia, 2001). A ocorrência de desialo-transferrina em soros de pacientes tem servido como marcador bioquímico do alcoolismo crônico e das doenças hepáticas alcoólicas. Isoformas da transferrina deficientes em carboidratos estão presentes em maior quantidade na vigência de alcoolismo. Esse tem sido o marcador bioquímico para monitorização de consumo alcoólico mais promissor e mais estudado na literatura recente. Também, ocorrem registros de variabilidade estrutural da transferrina em grávidas, na anemia por deficiência de ferro e artrite reumatóide (Helander *et al.*, 1997; Huseby *et al.*, 1997, van Pelt, 1997; Lesch & Walter, 1996; Sharpe *et al.* 1996; Mihas & Tavassoli, 1992).

A alfa1-antitripsina (A1AT), é uma glicoproteína plasmática, de peso molecular 52000 dáltons, que apresenta a capacidade de inibir enzimas proteolíticas como a elastase dos neutrófilos (Paone & Brantly, 1998; Gadek *et*

al., 1981; Janoff, 1972) demonstrando também propriedades tanto pro - como anti-inflamatórias (Rouhani *et al.*, 2000; Panyutich *et al.*, 1995).

Esta proteína de produção hepática apresenta papel relevante quanto à proteção dos tecidos, impedindo que os mesmos sejam danificados, uma vez que apresenta a capacidade de formar complexos com proteases tais como elastase, a tripsina, a quimiotripsina, a catepsina G e a collagenase da pele e do líquido sinovial nos espaços extra vasculares (Brantly *et al.*, 1998; Gadek *et al.*, 1981; Janoff, 1972). Além disso, pode se ligar a proteases pertencentes ao sistema fibrinolítico e de coagulação, como a plasmina, a trombina e ao fator XI (Blanco *et al.*, 2001).

Apesar de ser um inibidor de grande espectro de ação, seu principal papel é inibir a elastase neutrofílica, glicoproteína de 29000 dáltons. Em decorrência da maior taxa de associação com a elastase neutrofílica e a alta concentração observada no líquido superficial das vias aéreas a mesma mostra-se importante para o perfeito funcionamento pulmonar (Hohn *et al.*, 1989). Ocorre associação da deficiência da alfa 1-antitripsina à ocorrência de enfisema pulmonar bem como, cirrose hepática (Stockley, 1994; Gadek *et al.*, 1981; Janoff, 1972).

A Haptoglobina é uma alfa 2-sialoglicoproteína plasmática tetramérica (alfa2-beta2) de peso molecular 38941 dáltons, descoberta por Polonovski e Jayle em 1938 (Yano *et al.*, 1998; Langlois & Delanghe, 1996), cuja biossíntese ocorre principalmente no fígado, em resposta à secreção de citocinas (Van Vlierberghe *et al.*, 2004). Trata-se de uma glicoproteína cuja função é ligar-se à hemoglobina livre no plasma, liberada pela destruição intravascular das células vermelhas, conservando o ferro corpóreo e prevenindo a possível nefrotoxicidade causada pela hemoglobina durante a filtração glomerular (Langlois & Delanghe, 1996; Sadrzadeh & Bozorgmehr, 2004). O complexo formado pela haptoglobina e hemoglobina livre é removido pelo sistema reticuloendotelial, no qual o grupo heme da hemoglobina é degradado em ferro e em bilirrubina. A haptoglobina é também uma proteína de fase aguda positiva, com habilidades imunomodulatórias que podem ser inibitórias ou estimulatórias da resposta imune (Van Vlierberghe *et al.*, 2004; Wassel, 2000). Ocorrem pelo menos 3 variantes genéticas, três fenótipos diferentes (HAP1, HAP2-1, HAP1-1), das haptoglobinas. Vários autores têm investigado a

influência dos genótipos/fenótipos de Hp na suscetibilidade e evolução de diversas patologias humanas. Há diferenças de peso molecular entre os diferentes tipos de Hp: a proteína Hp1-1 é a menor molécula (86 KDa), Hp2-2 apresenta o maior peso molecular (170-900 KDa), enquanto Hp2-1 possui um peso intermediário (86-300 KDa) (Langlois & Delanghe, 1996).

Os níveis de haptoglobina podem estar elevados em numerosas situações que levam à reação de fase aguda como na síndrome nefrótica. Os níveis séricos dessa proteína apresentam-se diminuídos nas hepatopatias graves, nas situações de aumento da hemoglobina livre pela hemólise aumentada de eritrócitos, como em hemoglobinopatias, reações transfusionais, anemia megaloblástica, eritropoiese ineficaz associada à destruição medular de células vermelhas, queimaduras extensas, coagulação intravascular disseminada, reabsorção de grandes hematomas, síndrome nefrótica em que, dependendo do fenótipo, podem diminuir seus níveis séricos por perda urinária (geralmente fenótipo HAP1-1), e terapia com estrogênios e corticóides. (Dobryszczycka, 1997; Langlois & Delanghe, 1996).

A ceruloplasmina é uma fração alfa 2-globulina do sangue, sintetizada no fígado, responsável pelo transporte de 80 a 95% do cobre plasmático. Essa glicoproteína apresenta em sua estrutura três oligossacarídeos ligados por asparagina e seis sítios que ligam o Cu^+ ou Cu^{2+} (Schilsky & Tavill, 1998). A mesma é principalmente utilizada para o diagnóstico diferencial entre várias doenças hepáticas e a doença de Wilson, que é classicamente acompanhada pela diminuição dos níveis séricos da ceruloplasmina (Underwoode & Suttle, 1999). É uma doença autossômica recessiva, em que ocorre diminuição da capacidade de ligação do cobre à ceruloplasmina, resultando no aumento dos níveis de cobre livre no plasma e nos tecidos, especialmente fígado e cérebro (Roberts *et al.*, 2004; Schilsky & Tavill, 1998).

Outras patologias, que levam a lesão hepática grave, desnutrição, síndrome nefrótica e enteropatias com perda de proteína, podem cursar com níveis diminuídos de ceruloplasmina. A mesma apresenta elevados níveis séricos em diferentes distúrbios que levam à reação de fase aguda, tais como: carcinomas, leucemias, doença de Hodgkin, traumas, obstrução biliar, gravidez, intoxicação por cobre, uso de contraceptivos orais, fenitoína e terapia com estrogênios (Underwoode & Suttle, 1999).

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática de elevado peso molecular, 340000 dáltons, cuja estrutura trinodular, onde duas metades da molécula são simétricas, possui três pares de cadeias de polipeptídeos designadas alfa, beta e gama. Essas cadeias apresentam 610, 461 e 411 aminoácidos respectivamente, com peso molecular de 66.500 dáltons para cadeia alfa, 52.000 para cadeia beta e 46.000 dáltons para cadeia gama. Esses três diferentes pares de cadeias polipeptídicas, todas com uma grande heterogeneidade, são ligadas por pontes dissulfureto (Toss *et al.*, 1997).

Além de sua importância primária na etapa final da cascata de coagulação, quando sob a ação proteolítica da trombina vai formar fibrina, malha do coágulo sangüíneo, o fibrinogênio é também uma proteína de fase aguda e, portanto, se eleva em todas as situações que envolvem dano, infecção ou inflamação tissular e na gestação. Sendo assim, pode estar elevado no decurso de processos inflamatórios e infecciosos agudos como traumas, neoplasias, pós-operatório, uso de anticoncepcionais orais e síndrome nefrótica (Toss *et al.*, 1997). Entretanto, pode estar reduzido em decorrência da diminuição da produção hepática, em doenças hepáticas graves, ou por aumento de consumo, com conversão excessiva de fibrinogênio em fibrina, sem tempo para reposição adequada, como nos quadros de coagulação intravascular disseminada. Sendo assim, sua avaliação tem um papel importante no diagnóstico diferencial das coagulopatias adquiridas, na coagulação intravascular disseminada, na fibrinólise primária e secundária, na disfibrinogenemia e na afibrinogenemia (Woodward *et al.*, 1998; Toss *et al.*, 1997; Zimmerman & Ruggeri, 1987).

As imunoglobulinas, constituída por duas cadeias pesadas idênticas associadas a duas cadeias leves também idênticas (kappa ou lambda) são glicoproteínas produzidas pelos linfócitos B quando os mesmos são submetidos a estímulo antigênico (Abbas *et al.*, 2003). Os linfócitos B originam plasmócitos de diferentes linhagens e clones celulares, que irão produzir as cinco frações de imunoglobulinas, denominadas imunoglobulinas G ou IgG (cuja principal função parece ser a neutralização de toxinas nos espaços teciduais.), A ou IgA (imunoglobulina predominante nas secreções), M ou IgM (primeira imunoglobulina encontrada na resposta a estímulo antigênicos), D ou IgD (de função biológica pouco conhecida, parecendo envolvida na

diferenciação dos linfócitos antigenicamente estimulados) e E ou IgE (presente na superfície de basófilos e mastócitos, o que resulta na liberação de mediadores da resposta de hipersensibilidade imediata) (Roitt *et al.*, 2003).

O aumento policlonal das imunoglobulinas séricas representa uma resposta normal a uma série de patologias, como infecções, doenças hepáticas, desordens pulmonares e alterações auto-imunes. O aumento de IgG tende a predominar nas respostas crônicas e nas doenças hepáticas; já o aumento de IgA predomina nas infecções de pele, aparelho respiratório, intestinal e renal. A IgM está relacionada às fases agudas das infecções primárias e às infecções intra-uterinas bem como cirrose biliar primária enquanto a IgE encontra-se aumentada em quadros alérgicos. Níveis séricos aumentados de IgD ocorrem diante de infecções crônicas (Roitt *et al.*, 2003; Abbas *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1984).

Tabela 2 - Peso molecular das principais proteínas de fase aguda.

Proteínas	Peso Molecular
Alfa 1-glicoproteína ácida	44000 dáltons
Transferrina	79570 dáltons
Alfa 1-antitripsina (A1AT)	52000 dáltons
Haptoglobina	38941 dáltons
Ceruloplasmina	122212 dáltons
Fibrinogênio	340000 dáltons
Imunoglobulinas:	
Cadeias pesadas	55.000-70.000 dáltons
Cadeias leves	23.000 dáltons
Hemopexina	52385 dáltons

Lipoproteínas e Lecitina-colesterol aciltransferase

As lipoproteínas são vesículas plasmáticas responsáveis pelo transporte de lipídios circulantes. As mesmas formam micelas globulares constituídas por núcleo não polar formado de triglicerídeos e ésteres de colesterol recobertos por uma camada anfifílica de proteínas, fosfolipídeos e colesterol livre (Voet *et al.*, 1995; Gotto *et al.*, 1986).

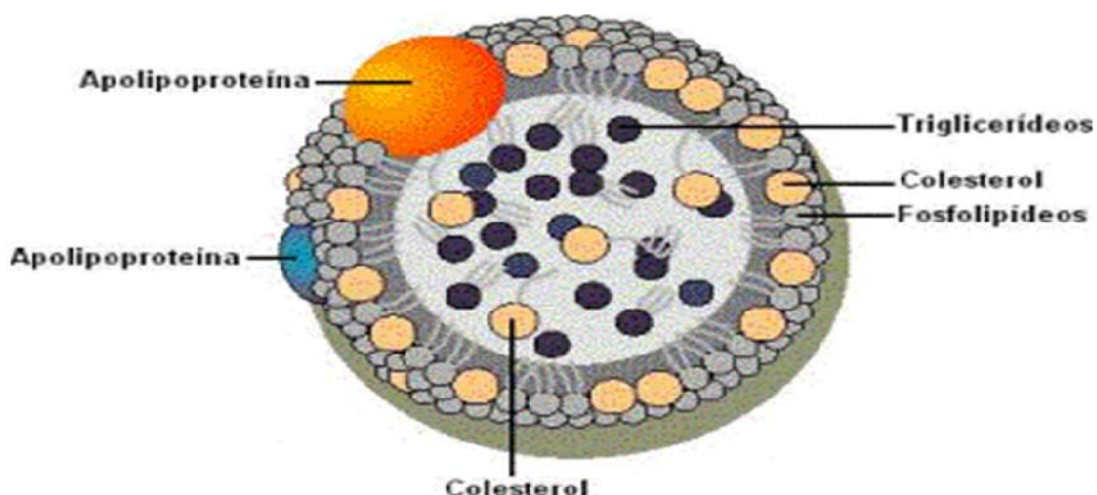


Figura 5 - Figura esquemática de uma vesícula lipoprotéica (Fonte: www.afh.bio.br).

Para o transporte do colesterol no sangue faz-se necessário a participação de lipoproteínas de baixa (LDL) e alta densidade (HDL). As vesículas de LDL transportam o colesterol do fígado para os tecidos periféricos, enquanto as vesículas de HDL, sintetizadas principalmente no fígado e em menor proporção no intestino, são responsáveis pela captação do colesterol liberado das membranas dos tecidos periféricos e posterior transporte ao fígado, processo denominado transporte reverso do colesterol (Kasid *et al.*, 2001). A HDL funciona como umceptor do fluxo de colesterol de células periféricas para eventuais remoções hepáticas (Lima *et al.*, 2003).

Uma vez no fígado, o colesterol pode ser excretado sob a forma de sais biliares ou participar da síntese de hormônios esteróides (Fielding & Fielding, 1995).

Durante o transporte reverso do colesterol, ocorre a esterificação do mesmo, por ação da enzima lecitina: colesterol aciltransferase (LCAT), através da transferência de um ácido graxo insaturado da posição 2-sn da fosfatidilcolina para a hidroxila do colesterol livre, produzindo dessa forma lisofosfatidilcolina e colesterol esterificado (CE) (Figura 6) (Lima *et al.*, 1997b). Sendo assim, durante esse processo, a LCAT transforma o colesterol livre em colesterol esterificado, facilitando a sua internalização no núcleo das HDL e permitindo o estabelecimento de um gradiente, necessário para a passagem do colesterol livre das células para as partículas lipoproteicas de alta densidade (Lima *et al.*, 1997a; 1988; Gillett *et al.*, 1989).

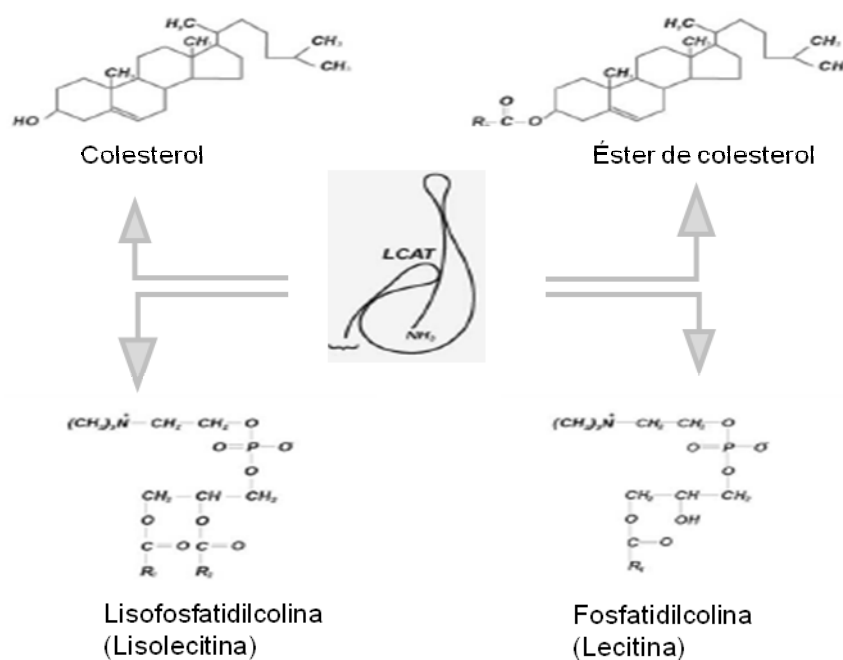


Figura 6 - Reação catalisada pela LCAT (Adaptado de Lima *et al.*, 2003).

A LCAT (EC 2.3.1.43) é uma glicoproteína, cuja concentração sérica é de aproximadamente 6 mg/mL (Silva *et al.*, 2002), produzida pelos hepatócitos e liberada na circulação sangüínea, onde circula na forma livre ou complexada à lipoproteínas de alta densidade (Lima *et al.*, 1987a). A mesma apresenta

massa peptídica de 47089 dáltons e elevada constituição de carboidratos, representando $\frac{1}{4}$ de uma massa molecular total de 65000 - 68000 dáltons (Lima *et al.*, 2003).

Segundo Dweek (1995), e Chung e colaboradores (1979), a LCAT apresenta, quanto ao conteúdo de carboidratos, aproximadamente, 9,2 % manose, 6% de galactose, 5% de glucosamina e 3,9 % de ácido siálico. Em 1997, Lima e colaboradores reportaram semelhantes resultados: 5,3% de manose, 6,4% de galactose, 5,3% de glicosamina, 3% de galactosamina, e 5% de ácido siálico.

Ocorrem registros de microheterogenicidade na cadeia polissacarídica da molécula de lecitina: colesterol aciltransferase tanto sob condições fisiológicas, pelo menos seis isoformas com pontos isoelétricos variando entre 3.9 e 4.8, (Holmquist & Bjellqvist, 1988; Doi & Nishida, 1983; Utermann *et al.*, 1980) quanto sob condições patológicas em indivíduos acometidos pela esquistossomose mansônica hepatoesplênica (Lima *et al.*, 1997).

Pacientes com deficiência familiar ou secundária de LCAT podem apresentar graves alterações na composição e estrutura das lipoproteínas plasmáticas ocasionando efeitos adversos no funcionamento e metabolismo do colesterol (Owen *et al.*, 1978).

A quantificação da atividade enzimática confere um importante teste de função hepática (Silva *et al.*, 2002). Sob condições debilitantes tais como doenças hepáticas ou deficiências genéticas, tem-se observado redução da atividade da mesma bem como níveis séricos reduzidos ou até mesmo ausentes (Gillett, 1976; Lima *et al.*, 1987a). Segundo Gillett e colaboradores (1976) a medida de sua atividade pode refletir o grau da severidade da esquistossomose mansônica e a sua determinação torna-se importante na avaliação da eficácia de tratamentos em pacientes esquistossomóticos.

Proteômica

O termo Proteoma foi introduzido por Wilkins e Humphery-Smith em 1995 e corresponde ao conjunto de proteínas expressas por um determinado genoma (Anderson & Anderson, 1998).

O comportamento dos sistemas biológicos não se deve exclusivamente ao genoma uma vez que são as proteínas e não os genes que determinam o fenótipo de um organismo (Graves & Haystead, 2002). Em resposta a um estímulo interno ou externo, ou como consequência de uma patologia, a síntese de algumas proteínas pode ser estimulada ou inibida. As mesmas podem sofrer modificações pós-traducionais, podem ser degradadas ou, ainda, recolocadas em diferentes locais da célula (Schlz-Knappe *et al.*, 2001).

A proteômica estuda os processos biológicos através da consequência direta das condições externas e do estado do organismo em um determinado momento. Nesse sentido, obter o proteoma de um organismo corresponde a uma "fotografia instantânea" das proteínas expressas naquele determinado momento (Graves & Haystead, 2002). A mesma constitui um importante instrumento na pesquisa médica, uma vez que permite, por exemplo, comparar o quadro protéico expresso de uma célula ou de um tecido afetado por uma doença com o mesmo quadro expresso em condições normais. A identificação e caracterização dessas proteínas alteradas possibilitam a identificação de "marcadores moleculares", que permitam o diagnóstico e o controle da progressão de uma doença (Jung *et al.*, 2000; Blackstock & Weir, 1999; Dunn, 1992).

A análise proteômica baseia-se em metodologias complementares, onde inicialmente ocorre a separação dos componentes multiprotéicos e num segundo momento obtêm-se informações relativas à estrutura primária dos peptídeos coletados permitindo a sua identificação com alta precisão (Dunn, 2000). Tais procedimentos permitem comparações tanto qualitativas, indicando se uma proteína está presente ou não na amostra estudada, quanto quantitativas revelando as concentrações relativas de determinada proteína nas diferentes condições analisadas (Schlz-Knappe *et al.*, 2001).

Técnicas como a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida permite separar diferentes frações da amostra segundo suas propriedades físico-químicas. Dessa forma, a primeira abordagem técnica consiste no estabelecimento de um gradiente de pH e conseqüente separação protéica segundo ponto isoelétrico (pI) e num segundo momento separação das frações em decorrência das variações de peso molecular (Figura 7) (Gorg, 2000; Bjellqvist *et al.*, 1993). Diante das purificações realizadas as amostras podem ser analisadas e identificadas. Para tanto, utiliza-se a espectrometria de massa cuja sensibilidade, precisão e poder de resolução permitem a identificação sem ambigüidades das proteínas ao fornecer uma lista de massas moleculares de peptídeos obtidos depois de uma digestão química e/ou enzimática (Rappsilber *et al.*, 2000; Laemmli, 1970).

A proteína isolada é clivada por proteases em vários pontos específicos que dependem da seqüência dos aminoácidos e da própria enzima usada, resultando em vários fragmentos menores de massas moleculares diferentes. A tripsina, normalmente utilizada para a digestão das proteínas, faz clivagem específica C-terminal adjacente a resíduos de arginina e lisina gerando um conjunto de peptídeos. Tal processo possibilita obter um mapeamento peptídico (Shevchenko *et al.*, 1996). O padrão de clivagem fornecido pelas diversas massas moleculares dos fragmentos da proteína é então comparado com um padrão teórico de clivagem de uma seqüência protéica extraída de um banco de dados de seqüências genômicas ou protéicas (Graves & Haystead, 2002).

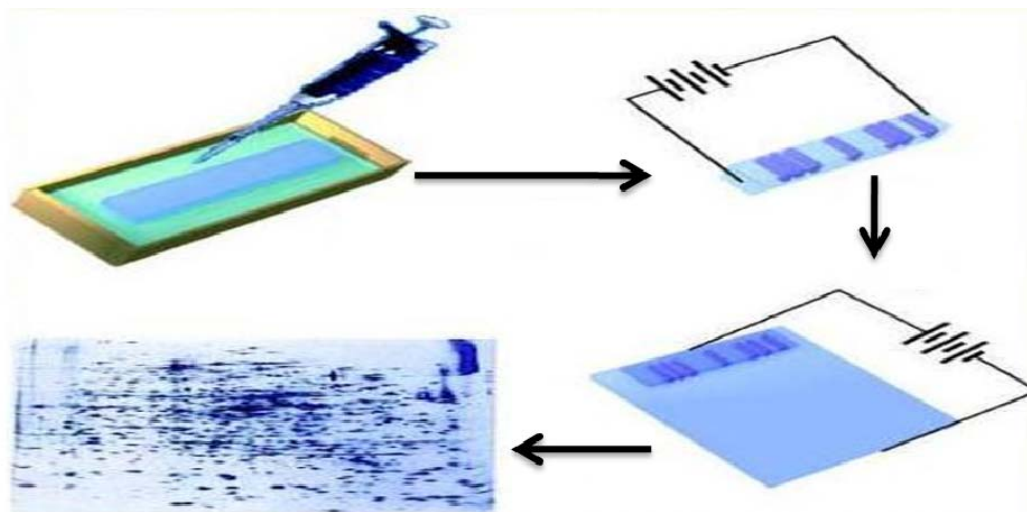


Figura 7 - Visualização de uma eletroforese bidimensional após separação das amostras segundo gradiente de pH (IEF) e Peso molecular (SDS-PAGE).
(Fonte: http://www.biotechnologia.com.br/bio/7_c.htm)

O crescimento e aperfeiçoamento da análise proteômica deve-se a grande quantidade de dados acumulados nos últimos anos sobre seqüenciamento gênico e, também, ao melhoramento no campo da espectrometria de massas (Aebersold *et al.*, 2000).

Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma arma valiosa na análise de compostos orgânicos uma vez que possibilita a determinação rápida, precisa e sensível da massa de biomoléculas como proteínas, açúcares, ácidos nucleicos, lipídios e outros compostos orgânicos. Essa técnica mede a massa molecular em daltons a partir da razão entre a massa e a carga de moléculas ionizadas (Qin *et al.*, 1997; Karas & Hillenkamp, 1988).

O primeiro espectrômetro de massas (MS) foi desenvolvido em 1912 por J.J.Thompson (Thompson *et al.*, 1921). Até a década de 80, o uso dessa importante técnica era restrito a um pequeno número de moléculas capazes de serem ionizadas sem que houvesse quebra inespecífica da molécula ao

fenômeno de ionização. Nessa época, moléculas maiores tais como proteínas intactas não podiam ser analisadas sem a presença de grupos protetores para um aumento da estabilidade e volatilidade.

Já no fim da década de 80, graças ao desenvolvimento de técnicas de ionização mais suaves tais como MALDI (Karas et al., 1987) e ESI (Yamashita & Fenn, 1984), é que se começou a utilizar a espectrometria de massas na análise de diferentes tipos de macromoléculas e compostos com elevada eficiência e para diferentes finalidades (Siuzdak, 1996). Seguindo a evolução dos equipamentos, a década de 90 caracterizou-se pela melhoria dos analisadores de m/z , e o aparecimento de equipamentos comerciais tais como ToF-ToF, Q-ToF e *ion trap* (Kinter & Sherman).



Figura 8 - Componentes básicos dos espectrômetros de massa: a fonte de ionização (responsável pela introdução de cargas e vaporização de amostras), o analisador (determina a relação m/z do analito) e o detector (detecta a presença do analito). Os íons são produzidos na fonte de ionização e subseqüentemente separados em um analisador, seguindo para um detector.

Na ionização do tipo ES (*electrospray ionization*), a amostra, solubilizada, é passada por um tubo capilar submetido à alta voltagem. Na saída do tubo forma-se uma nebulização, e as moléculas aprisionadas nas gotículas suspensas em vácuo são, então, ionizadas (Figura 9) (Yates, 1998; Fenn et al., 1989).

Na ionização do tipo Maldi (*matrix-assisted laser desorption ionization*), a amostra é misturada a uma matriz inorgânica solubilizada em um solvente bifásico. A mistura é aplicada em uma placa de metal e, quando se promove a

evaporação do solvente, as moléculas da amostra cristalizam-se junto com a matriz. Esses cristais são então bombardeados por um feixe de raio laser para a ionização das moléculas. Esses íons de proteínas são acelerados através de um campo elétrico, atravessam o tubo de vôo, e de acordo com seu tamanho podem chegar mais rápido, quando menores, ao detector (Qin *et al.* 1997; Karas & Hillenkamp, 1988). Com isso, o tempo de vôo (TOF, do inglês *time of flight*) no campo elétrico é uma medida da massa (ou, mais exatamente, da relação massa/carga) (Figura 10). Essa técnica permite analisar pequenas quantidades de biomoléculas, na ordem de até picomoles (pmol) a fentomoles (fmol) (Antelmann *et al.*, 2001).

A figura 9 é uma representação esquemática das fontes de ionização MALDI e ESI, enquanto na figura 10, observamos o analisador de íons utilizado em nosso trabalho.

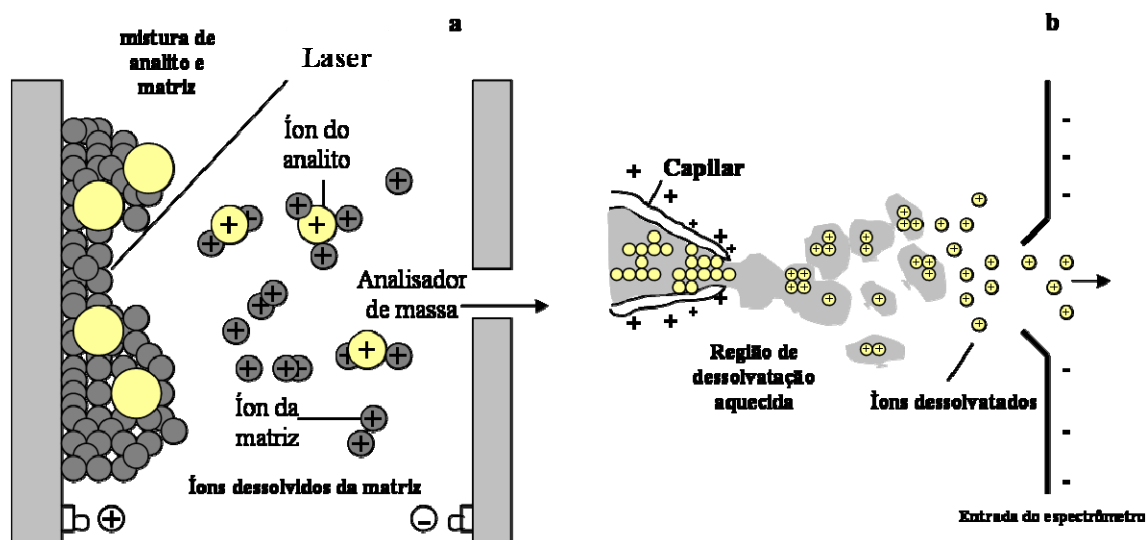


Figura 9 - Representação esquemática do processo de ionização por MALDI e Eletrospray. (a) Quando os cristais formados entre os solventes da matriz e da amostra são submetidos a tiros de laser na faixa de absorção do cromóforo de uma matriz orgânica, provoca uma foto-ionização dos analitos pela transferência de carga dos íons da matriz para a amostra e posterior dessorção. Nessa condição, os íons do analito são formados em fase gasosa pela transferência de prótons de moléculas de matriz protonadas para moléculas neutras do analito (Aebersold & Mann, 2003; Beavis & Chait, 1996; Karas et al., 1987).

(b) Representação esquemática do processo de ionização por Eletrospray. Produção de íon em “*eletrospray*” a partir da dispersão de gotas altamente carregadas quase à pressão atmosférica seguida de condições que permitem a evaporação da gota para formação de íons. O analito em forma líquida é injetado e uma alta voltagem é aplicada. Sob influência do campo elétrico, cargas semelhantes do analito (por exemplo: íons positivos) são acumulados na extremidade de um tubo capilar, ejetadas e dispersas no interior do espectrômetro (Moraes & Lago, 2003; Jonsson, 2001). (Fonte: adaptado de <http://www.magnet.fsu.edu/education>).

A partir da conjugação em sequência de analisadores de massa a espectrometria de massa torna possível selecionar uma só molécula ionizada e fragmentá-la pela colisão com um gás inerte (em geral argônio ou mesmo ar). A análise das massas dos fragmentos obtidos fornece informações sobre a estrutura da molécula original, permitindo determinar, por exemplo, a sequência de aminoácidos de um peptídeo (Ekstrom *et al.*, 2000; Kaufmann *et al.*, 1996; Spengler, *et al.*, 1994).

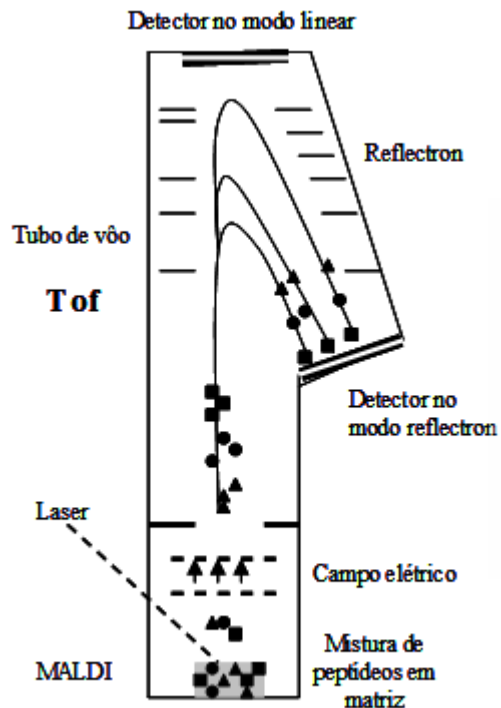


Figura 10 - Representação esquemática da separação de massa através do analisador ToF. (a) Os íons recebem a mesma energia através da voltagem de aceleração para posteriormente entrar em um tubo livre de campo elétrico e no vácuo, até atingir o detector. Os íons com valores menores de m/z apresentam maior velocidade e os íons com valores maiores de m/z apresentam menor velocidade (Jonsson, 2001).

(Fonte: adaptado de www.dia.unisa.it; www.proteomicsnijmegen)

RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Sendo a esquistossomose uma doença de grande importância médica, os conhecimentos a cerca das glicoproteína plasmáticas produzidas sob essa condição é relevante para a saúde pública brasileira. Além disso, a avaliação da especificidade e capacidade de ligação a glicoproteínas plasmáticas da lectina Cramoll em comparação a Concanavalina A mostra-se importante uma vez que estamos comparando a aplicação biotecnológica de uma lectina comercial, amplamente utilizada e caracterizada e uma outra extraída a partir de plantas nativas da Região Nordeste no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar glicoproteínas de plasma de indivíduos saudáveis e de portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a capacidade das colunas de afinidade Cramoll-Sepharose e Concanavalina A em isolar glicoproteínas plasmáticas de indivíduos saudáveis e pacientes portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica descompensada.
2. Identificar proteínas diferencialmente expressas em condições fisiológicas de normalidade e patológicas.
3. Realizar análise comparativa das proteínas plasmáticas isoladas a partir de lectinas que apresentam a mesma especificidade oligossacarídica - Cramoll e Concanavalina A - utilizando, para tanto, abordagens proteômicas tais como eletroforese bidimensional e espectrometria de massa.

ARTIGO

Use of Cramoll and Concanavalin A lectins as tools for plasma glycoconjugate purification and comparative profile of hepatosplenic schistosomiasis patients and healthy controls identified by Proteomics-Based Approach

Abstract

Identify glycoproteins in complex moistures could indicate pathological state. In this sense, our work intends to identify and compare glycoconjugates of health individuals and schistosomiasis patients using Concanavalin A and Cramoll lectins. As preliminary screen, SDS-PAGE and dot blotting were performed attend to recognize a soluble glycoprotein that converts the cholesterol to cholesterol esters named Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT). As well, proteomic analyses by two-dimensional differential gel electrophoresis were performed in order to investigate the effect of the disease on proteins expressions. Most of the spots identified were glycoproteins of acute-phase including hemopexin, albumin, complement component 3, subunits of immunoglobulin, transferrin, haptoglobin, plasma protease (c1) inhibitor, beta 2-glycoprotein I, antithrombin, alpha-1-beta-glycoprotein, fibrinogen beta chain and alfa-1-antitrypsin. We observed no significant differences between eluted glycoproteins from patients and controls. Otherwise, comparative analyses between Concanavalin A and Cramoll lectin showed some differences. This series of experiments demonstrate that affinity chromatography by Con-A and Cramoll can be used in order to purify glycoproteins in human plasma under pathological and healthy conditions.

Introduction

Lectins are protein or glycoprotein substances, capable of specific recognition of and reversible binding to, carbohydrate moieties of complex glycoconjugates without altering the covalent structure of any of the recognized glycosyl ligands (Sharon, 1993; Lis & Sharon, 1998; Loris *et al.*, 2002). Different lectins display a variety of binding specificities and because of that affinity separation using this components has become a standard and widely used technique to isolate glycoproteins, glycopeptides and oligosaccharides from all kinds of biological sources (Torres & Smith, 1988; Delanghe *et al.*, 1989; Giannini *et al.*, 1982; Hock *et al.*, 1980; Tsuji *et al.*, 1983). Interesting to observe that protein glycosylation is one of the major post-translational modifications with significant effects on protein folding, stability and activity. It is estimated over 80% of all plasma proteins are glycosylated (Bertozi & Kiessling, 2001). Post-translational modifications result in protein heterogeneity and existence of multiple isoforms. These modifications are extremely important because they may alter physical and chemical properties and consequently, function of the proteins (Wormald & Dwek, 1999; Gagneux & Varki, 1999; Helenius, A. & Aebi, 2001).

Cra-lectin, purified from *Cratylia mollis* seeds (Correia and Coelho, 1995), belongs to the mannose/glucose binding class, similar to those isolated from *Canavalia ensiformis* (Concanavalin A, Con A). These both lectins have similar topological architecture, equal monosaccharide binding sites and are from the same Leguminosae family and Diocleinae subtribe. Nevertheless, the literature reports different binding ligands which includes glycoproteins purified from human plasma (Lima *et al.*, 1997) and human mammary cells (Beltrão *et al.*, 1998). Interesting to observe that Concanavalin A is one of the most well characterized lectin and has broad applicability primarily because recognizes a commonly occurring sugar structure. It has been shown that Con-A predominately recognizes alpha-mannose, which is very common in N-linked glycans (Kobata, 1992). Since a wide variety of serum glycoproteins have a "core oligosaccharide" structure which includes alpha-linked mannose residues, many glycoproteins can be examined or purified with Con A and its conjugates (Cavada *et al.*, 1993; Alvarez, 1989).

Besides the use of lectins to pre-purified complex mixtures, its essential employ complementary approaches in order to characterize proteins mainly in different physiological conditions. Since the introduction and development of proteomics techniques, the identification of glycoproteins in complex mixtures became more clear and reliable (Graves & Haystead, 2002; Hunter, 1995). Two dimensional gel electrophoresis (2-D) is an effective technology for separating complex protein samples that can be formerly identified by mass spectrometry (MS/MS) (Griffin & Aebersold, 2001). However, glycoproteins are problematic in the 2-D gel electrophoresis approach to proteomics. Oligosaccharide heterogeneity often causes proteins of identical primary structure to appear in multiple spots. Glycoform resolution occurs because of differences in charge, often due to differences sialic acid content and this can make difficult identification in several ways. Besides that, protein isoforms typically appear as "spot trains" in 2D electrophoresis (Gooley *et al.* 1997). This is particularly true for glycoproteins that have isoforms that vary in pI (due to addition of sialic acid) and molecular weight (due to addition of different size and number of glycan chains).

The major problem in profiling plasma proteins are the presence of high concentrations of a small number of proteins (Gygi et al., 2000). The 5 to 10 most abundant serum proteins comprise over eighty-five percent of total serum protein content. Some proteins of interest are likely present at significantly lower concentrations. The most abundant plasma proteins make it difficult to run two dimensional gels reproducibly (Corthals et al., 2000). These abundant proteins mask differential expression of lower abundance proteins with similar molecular weights and isoelectric points (Herbert et al., 2001). Because of that, it is important to use techniques of prior purification for the identification of the low-copy-number gene products may be more decisive in, for example, discovering novel markers or drug targets (Fountoulakis et al., 1999; Gygi et al., 2000).

In response to injury, local inflammatory cells (neutrophil granulocytes and macrophages) secrete a number of cytokines into the bloodstream, most notably the interleukins IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α . The liver responds by producing a large number of acute phase reactants, most notably C-reactive protein, α 1-antitrypsin, α 1 anti-chymotrypsin, α 2- macroglobulin, some coagulation factors (Fibrinogen, prothrombin, factor VIII, von Willebrand factor, plasminogen), complement factors, molecules of blood transport like ferritin and serum amyloid proteins (Kushner , 1982; Bauman & Gaudeie, 1994). These hepatic glycoproteins, are object of several studies including disease diagnostic. Plasmatic glycoproteins from patients and normal healthy controls can be detected in order to identify abnormalities and aberrantly expressed proteins. In this sense, Schistosomiasis disease, represents an important problem of public health in Brazil, especially in the northeastern region where prevalence of this illness is still high. This sickness has the liver as the major focus of its histological lesions, physiopathological alterations and clinical manifestations (Silva et al., 2002). The most severe form of schistosomiasis, named hepatosplenic, usually is related to portal hypertension, esophageal, intra-abdominal, retroperitoneal and abdominal wall varices (Brandt et al., 1999).

Previous studies have shown alteration on lipid metabolism in the hepatosplenic form of Schistosomiasis. One of the main alterations is the reduction on lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) activity, a hepatic enzyme that catalyze the esterification of cholesterol in plasma. The Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT, EC 2.3.1.43), is a plasma glycoproteins (Collet and Fielding, 1991) with molecular mass of 68 kDa and one-quarter of its apparent molecular mass composed by four N-linked oligosaccharide chains (Chung et al., 1979; Hill et al., 1993). LCAT is a key enzyme in maintaining cholesterol homeostasis and regulating its transport in blood, process named reverse cholesterol transport.

Materials and Methods

Samples

Human blood samples, anticoagulated with EDTA (1mg/mL), were taken from healthy controls and patients with the most severe form of schistosomiasis. Plasma was separated by

centrifugation of blood at 1500 rpm for 15 min and dialyzed with phosphate buffer 20mM, pH 7.4. After this process, lipoproteins of very low density (VLDL) and low density (LDL) were precipitate by the addition of sodium phosphotungstate (4% - p/v) and magnesium chloride (2M). The samples were stirred for 30 minutes, at 4^o C and were then centrifuged at 2000 rpm for 30 minutes. The supernatant, free of VLDL and LDL, was separated and once again dialyzed in phosphate buffer (20 mM, pH 7.4). Aliquots of plasma (1 mL) were taken and stored at - 20^oC until ready for use.

Purification of Cra lectin and conjugation in Sepharose 4B

Cra lectin was purified by extract of *Cratylia mollis* 10% (w/v) in 0.15 M NaCl. In this process, proteins were precipitated using 40-60% ammonium sulphate fractionation, and submitted to posterior affinity chromatography with sephadex G-75 column. Purified Cra lectin was covalently attached in CNBr activated Sepharose 4B (pharmacia) according to the instructions of the manufactured.

Cra-sepharose affinity chromatography

Cra ¼ Lectin -sepharose and commercial Con-A immobilized (Pharmacia) on CNBr-activated sepharose columns (6.5 x 1.0 cm) were used in order to purify glycoproteins from plasma. These columns were equilibrated with the phosphate buffer 20mM, pH 7.4. Plasma sample (1mL) was applied in the column, with a flow rate of 1mL/h. After 15 hours, all unbound proteins are removed with phosphate buffer and the adsorbed material was eluted with 0.25 M methyl alfa-D-mannoside and/or 0.25 M methyl alpha-D-glucoside. Aliquots of the bound fractions eluted (aprox. 1 mL) were collected and the peak of protein, identified by absorbance at 280 nm, were put together and dialyzed against ammonium bicarbonate buffer (5mM) and EDTA (0.5 mM) at 4^oC and the samples were lyophilized.

SDS-PAGE

SDS-PAGE was performed as described by Laemmli using 12% polyacrylamide gel in a vertical gel apparatus (Bio-Rad system). Sample buffer , including 47.5% water, 12.5% 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 20% SDS (10%) solution, 5% 2-mercaptoethanol, and 5% bromophenol blue (1%) , was added to the lyophilized protein samples (50 µg).The mixture was vortexed and then boiled at 100^oC for 5 minutes. Electrophoresis was performed using vertical electrophoresis gel apparatus (Bio-Rad system) at a constant voltage of 100 volts when samples were in the stacking gel. When the dye front reached the resolving gel, voltage was increased to 200 volts. The run was stopped when the dye front was 2 to 3 mm away from the bottom edge of the gel. The gel was then silver stained using the commercial silver staining kit.

Dot Blotting

2 µl of eluted fraction from column affinity Con-a and Cra ¼ were applied onto a nitrocellulose membrane. At room temperature, the membrane were first fixed with TBS buffer, pH 7.5 (Tris 20 mM, NaCl 150 mM and Thiomersal 0.01 %) and secondly her nonspecific sites were blocked using TBS buffer including 2% of desnated milk. After four hours, the membrane were once again washed with TBS-T pH 7,5 (TBS solution including Tween 20 0,05%) and incubate with the polyclonal antibody ,diluted 1:500 in TBS with 0,5% desnated milk, from habbit against human LCAT. After wash three times with TBS-T, the sample were incubate with secondary antibody (IgG from caprine against habbit) with Horseradish peroxidase (HRP) (diluted 1:3000 onto TBS buffer with 0,5 % of desnated milk). After wash several times with TBS-T the membrane were incubed with colorimetric solution, at dark condition, who includes horseradish peroxidase (30 mg) onto 10 mL of methanol and TBS with H₂O₂ (30%).

2-D Gel Electrophoresis

Briefly, the lyophilized samples, were solubilized in 125 µL (150 µg protein) in electrofocalization solution that include, urea (8M), CHAPS (6%) (non ionic detergent), 25 mM DTT, 0.002 % bromofenol blue and 125µL of IPG buffer (Amersham Biosciences). The samples were subjected to isoelectric focusing in immobilized pH gradient precast (IPG) strips 7 cm from pH 4–7 or pH 3-10 using an IPGphor focusing apparatus (immobilized pH gradient gel strips – Amersham Biosciences) at 20° using as protocol six steps. First rehydration at low voltage (60V for 12 hours) and after isoeletric focalization (200 V ,200 Vhr; 500 V, 500 Vhr; 1000 V ,1000 Vhr; 8000 V, 4000 Vhr; and 8000 V ,75067 Vhr). All process happens in 20 hours. Before the second dimension electrophoresis, the IPG strips were equilibrated with equilibrium buffer (50 mM Tris-HCl, 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS) supplemented with 1% DTT, followed by 2.5% iodoacetamine. The second running was performed in gels 12% SDS – PAGE (18,5x50x1mm), (LAEMMLI, 1970) at inicial 120 V, 30 mA when samples were in the stacking gel. When the dye front reached the resolving gel, were used 120 V, 40 mA . The run was stopped when the dye front was 2 to 3 mm away from the bottom edge of the gel. The gel was then silver stained using the commercial silver staining kit. Gels were stained with Comassie Brilliant Blue and protein spot-features of interest were picked for further analysis.

Tryptic digestion

Fragments of the gel containing proteins of interest obtained after one-dimensional electrophoresis (1-DE) were first destained by incubation with 100 µl of 50 mM ammonium bicarbonate and 50%. ACN for 15 min at room temperature. After repeat this process several times the samples were washed one time in 100 % Acetonitrile and lyophilized. Dried pieces of gel were rehydrated in 50 mM ammonium bicarbonate containing trypsin at 0.1 µg/µl. After overnight incubation at 37°C, elution of the peptides was performed by sequencial washes with

30 µl of 5 % TFA 50%. After this extracted process, the volume of the pooled extracts was reduced to 10 µl by liofilization.

MS/MS and Database Analysis

All resolved protein spots of interest were excised, digested with trypsin and submitted to identification by MALDI-TOF. Mass analyses were performed by mixing 0.5 µL of extracted sample with 1 µL volume of matrix solution consisting of 50 mg/mL alpha-cyano- 4-hydroxycinnamic acid in 0.1% TFA and 50% Acetonitrile. Samples were spotted on stainless steel MALDI sample plates. The instrument was external calibrated using a mixture of peptides (1,297.51; 2,094.46; 2,466.72; 2,867.80; 3,660.19; 5,734.59), in the linear mode using accelerating, grid and guide wire potentials of 20.000, 19.000 and 10V, respectively, and a 400ns delayed extraction setting.

After MALDI analyses, the spectrum of peptides were performed by MASCOT program databases (<http://www.matrixscience.com>). The parameters used in the searches were NCBI nr database, trypsin digest (one missed cleavage), species: *Homo sapiens* and mass value Monoisotopic. When used MALDI-TOF, peptide mass tolerance were between 30 ppm and 100 ppm. In MS/MS analyses peptide charge state: 1+ and peptide mass tolerance were 30 ppm.

Results and Discussion

Describing the outcome in general terms, the combination of the lectin affinity chromatography (LAC) and mass spectrometry differentiate glycoproteins from plasma of healthy individuals and hepatosplenic schistosomiasis mansoni patients. Besides that, it was found differences of 2-D electrophoresis behaviours of samples purified from two different lectins with the same oligosaccharides specificity, the commercial Concanavalin A and Cra ¼ lectin isolated from native plant of the northeast (*Cratylia mollis* Mart).

In order to characterize relevant glycoproteins from healthy individual, mainly lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT), SDS-PAGE and dot blotting were performed. A representative example of chromatographic elution profile is shown in figure 1. As can be seen (figure 1 (A)), both lectins showed similar lines and has band corresponding to molecular weight of 68 kDa. This data suggest the presence of LCAT, result confirmed by incubation with specific LCAT peroxidase-coupled antibody (dot blotting) (figure 1-B). Interesting to observe that plasma LCAT have been reported as sensitive indicator for early detection of hepatic damage. The decrease in plasma LCAT activity is accompanied by increase levels of free cholesterol in LDL

and, the reduction in esterification of cholesterol by LCAT may contribute to the decrease in plasmatic cholesterol that could be observed in patients with liver diseases (Silva et al.2002).

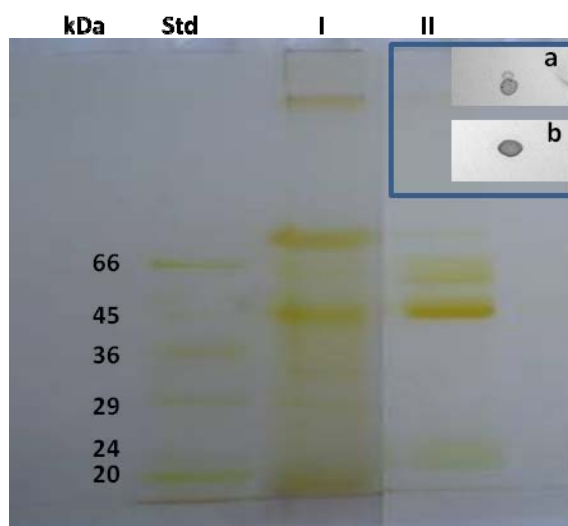


Figure 1 – a. Electrophoresis (SDS-PAGE 10 %) of plasma glycoproteins purified by Con-A-sepharose (I) and Cra- ¼ Sepharose (II) chromatography. Inlet: “dot blotting ” of eluted fraction from Con-A (a) and Cra ¼ lectin (b).

After initial analysis by one-dimensional SDS-PAGE, two-dimensional electrophoresis was performed. At this point, we began to use as samples plasma of healthy individuals and schistosomiasis patients and, adsorbed protein samples were separated first according to they isoelectric point (pI) and secondly by molecular mass (Mw).

To investigate glycoproteins from three different and healthy controls purified by Concanavalin A lectin, we made isoelectric focalization using two different strips, including pH ranges of 4-7 and 3-10. A good resolution of several spots, mainly when were used dry strip with pH between 4 and 7, gave the possibility of identified some relevant glycoproteins. Based in this found, the subsequent set of experiments were realized using only strips with pH 4 – 7. Figures 2, 3 and 4 shows two-dimensional electrophoresis maps of proteins identified from three different healthy controls. Using the fraction eluted map as a standard, the spot pattern in the six maps was analyzed, counting 21 different spots using as strip 3-10 and 20 spots using 4-7 (table 1). This found include glycoproteins as hemopexin, complement component 3, subunits of immunoglobulin, transferrin, haptoglobin, plasma protease (c1) inhibitor, beta 2-glycoprotein I, antithrombin, alpha-1-beta-glicoprotein, fibrinogen beta chain and alfa-1-antitrypsin.

Table1 - Elution profile of proteins purified by affinity chromatography with Concanavalin A lectin. pH strips of 3-10 (a) and 4-7 (b).

a	Reported Con-A (3-10)	b	Reported Con-A (4-7)
	Cationic Tripsinogen		Homopexin
	Plasma protease (c1) inhibitor		Hp2-alpha
	Transferrin		Immunoglobulin Alpha2 Heavy chain
	Hemopexin		Immunoglobulin alpha-1 chain C region
	Albumin		Fibrinogen beta chain
	Fibrinogen beta chain		Haptoglobin
	MYO1D protein		Beta-2-glicoprotein
	Haptoglobbin		Alpha 1-E-glicoprotein
	Antithrombin		Antithrombin
	Apha 1 – antitripsyn		Albumin
	Beta 2- glicoprotein I		Chain C, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin
	Immunoglobulin alpha-1 heavy chain		PRD1400
	Chain E, Fragment Double-D From Human Fibrin		Erythropoietin
	Chain C, Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin		Transferrin
	Immunoglobulin Aalpha 1 Bur		Immunoglobulin alpha-1 heavy chain
	Immunoglobulin alpha-2 chain C region		Immunoglobulin kappa chain constant region
	Complement component 3		Alpha 1 – antitripsyn
	Immunoglobulin G Kappa Chain		Chain A, Crystal Structure Of The Ga Module Complexed With Human Serum Albumin
	Immunoglobulin alpha-2 heavy chain		Chain E, Fragment Double-D From Human Fibrin
	HP2- alpha		Immunoglobulin kappa light chain
	alpha-1-beta-glicoprotein		

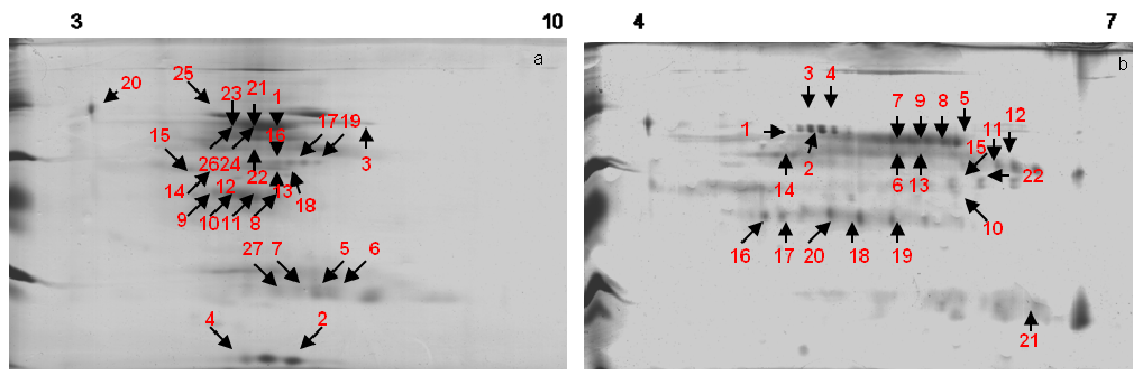


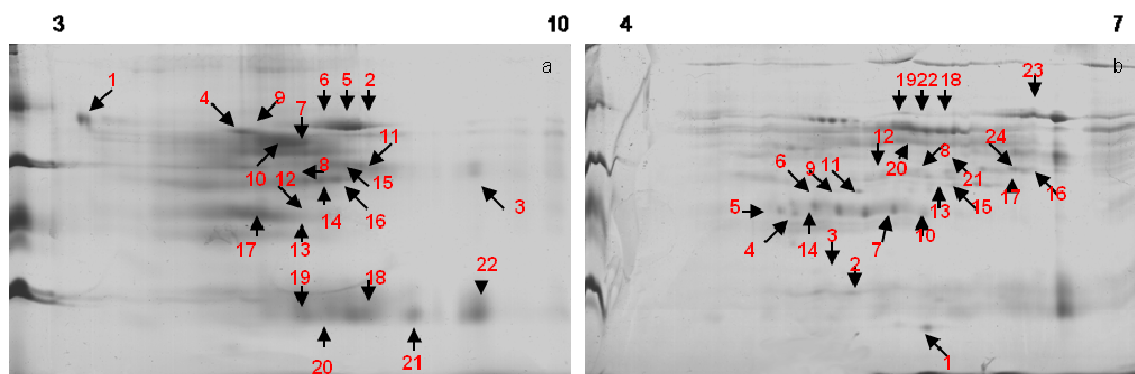
Figure 2 – Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of glycoproteins purified by Concanavalin A column. Glycoproteins from healthy control (control 1) were subjected to IEF in a 7-cm IPG strip spanning pH 3-10 (a) and pH 4-7 (b).

a. pH 3-10. 1. Complement component 3; 2. Fibrinogen beta-B (1-118); 3. Transferrin; 4. Immunoglobulin kappa chain VK-1; 5. IgG Kappa Chain; 6. IgG Kappa Chain; 7. Ig alpha-2 heavy chain; 8. Haptoglobin; 9. Hemopexin; 10. Haptoglobin 2-alpha; 11. Haptoglobin; 12. Haptoglobin2 - alpha; 13. Beta-2 - glycoprotein; 14. Antitrombin III; 15. Alpha- 1 – antitripsyn; 16. Alpha-1-beta-glycoprotein; 17. Hemopexin; 18. Hemopexin; 19. Fibrinogen beta chain; 20. C1 esterase inhibitor; 21. Complement component 3; 22. Hemopexin; 23. Complement

component 3; 24. Albumin; 25. Cationic Tripsinogen; 26. Albumin. 27. Immunoglobulin G Alfa-1 heavy chain.

b. pH 4-7. 1. Erythropoietin; 2. Albumin; 3. Albumin; 4. Albumin; 5. Transferrin; 6. Immunoglobulin alpha-1 heavy chain; 7. Hemopexin; 8. Albumin; 9. Hemopexin; 10. Alpha-1-B-glycoprotein; 11. Beta-2-glycoprotein I; 12. Beta-2-glycoprotein I; 13. Immunoglobulin alpha-1 heavy chain; 14. Antithrombin III; 15. Alpha-1-B-glycoprotein; 16. Haptoglobin; 17. Alfa-1-antitripsyn; 18. Haptoglobin; 19. Haptoglobin 2-alfa; 20. Haptoglobin; 21. Immunoglobulin kappa chain constant region; 22. Fibrinogen beta chain.

Figure 3 – Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of glycoproteins purified by Concanavalin A column. Glycoproteins from healthy control (control 2) were subjected to IEF in a 7-cm IPG strip spanning pH 3-10 (a) and pH 4-7 (b).



a. pH 3-10. 1. Plasma protease (C1) inhibitor; 2. Transferrin; 3. Hemopexin; 4. Albumin; 5. Fibrinogen beta chain; 6. MYO1D protein; 7. Albumin; 8. Albumin; 9. Albumin; 10. Albumin; 11. Haptoglobin; 12. Antithrombin Iii; 13. Alpha-1 beta Antitrypsin; 14. Fibrinogen beta chain; 15. Fibrinogen beta chain; 16. Alpha-1-antitrypsin; 17. Beta 2- glycoprotein ; 18. Immunoglobulin alfa-1 heavy chain; 19. Chain E, Fragment Double-D From Human Fibrin; 20. Chain C, Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin; 21. Ig Aalpha 1 Bur; 22. Ig alpha-2 chain C region.

b. pH 4-7. 1. Hemopexin; 2. Hemopexin 2-alfa; 3. Hemopexin 2-alfa; 4. IgA2 H chain; 5. Ig alpha-1 chain C region; 6. Fibrinogen beta chain; 7. Haptoglobin; 8. Hemopexin; 9. Haptoglobin; 10. Beta-2-glicoprotein I; 11. Hemopexin; 12. Hemopexin; 13. Alpha 1-B-glicoprotein; 14. Antithrombin Iii; 15. alpha-1-B-glycoprotein; 16. Fibrinogen beta chain; 17. Fibrinogen beta chain; 18. Albumin; 19. Albumin; 20. Albumin; 21. Albumin; 22. Chain A, Crystal Structure Of The Ga Module Complexed With Human Serum Albumin; 23. Transferrin; 24. PRO1400.

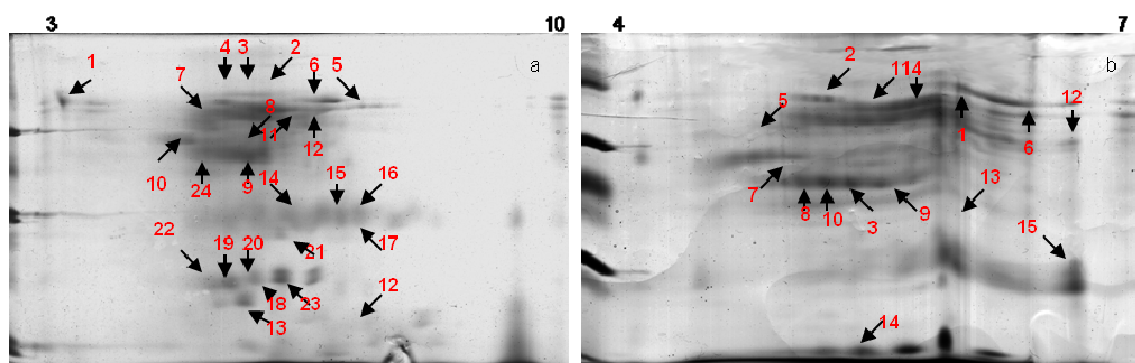


Figure 4 – Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of glycoproteins purified by Concanavalin A column. Glycoproteins from healthy control (control 3) were subjected to IEF in a 7-cm IPG strip spanning pH 3-10 (a) and pH 4-7 (b).

a. pH 3-10. 1. Plasma protease (c1) inhibitor; 2. Albumin; 3. Albumin; 4. Albumin; 5. Transferrin; 6. Transferrin; 7. Alpha - 1 - B- glycoprotein; 8. Haptoglobin 2 - alfa; 9. Haptoglobin 2 - alfa; 10. Antithrombin; 11. Hemopexin; 12. Fibrinogen beta chain; 13. Immunoglobulin A heavy chain allotype 2; 14. MRDS1 protein; 15. Fragment of IgG kappa chain; 16. Haptoglobin; 17. Haptoglobin; 18. Immunoglobulin A heavy chain; 19. Immunoglobulin alpha-1 heavy chain; 20. Immunoglobulin kappa-chain VK-1; 21. Immunoglobulin Kappa light chain; 22. Immunoglobulin alpha-2 heavy chain 23. Chain C, crystal structure of the fab fragment of a human monoclonal IgM cold agglutinin; 24. Immunoglobulin A heavy chain allotype 2.

b. pH 4-7. 1. Fibrinogen beta-chain; 2. Alpha-1-antitrypsin; 3. Hemopexin; 4. Hemopexin; 5. Alpha-1-B-glycoprotein; 6. Transferrin; 7. Antithrombin; 8. Haptoglobin; 9. Albumin; 10. Chain E, fragment double-D from human fibrin; 11. Hemopexin; 12. Beta-2- glycoprotein - I; 13. Haptoglobin 2-alpha; 14. Immunoglobulin kappa light chain; 15. Immunoglobulin alpha-1 heavy chain.

In order to better understand elution profile of glycoproteins purified by Concanavalin A lectin and incorporate new findings, the next set of experiments includes two-dimensional electrophoresis maps under pathological conditions.

In this sense, it was used plasma from patients with chronic hepatic disease. Figure 5 show elution profiles of proteins from three hepatosplenic cirrurged schistosomiasis patients and Table 2 compare proteins identification from one health reference control and three chronic hepatic patients.

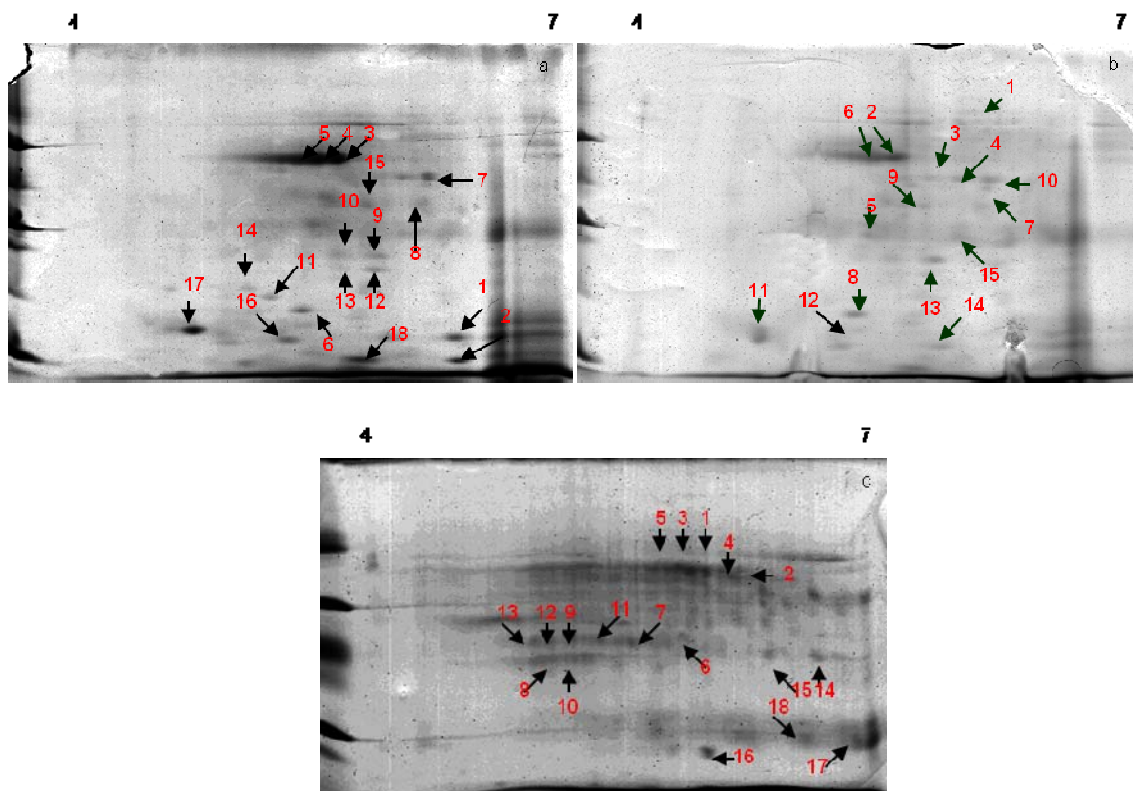


Figure 5 – Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of glycoproteins purified by Concanavalin A lectin. Glycoproteins from three different patients: patients 1 (a), 2 (b) e 3 (c) were subjected to IEF in a 7-cm IPG strip spanning pH 4-7.

Patient 1 (a). 1. Complement component 3; 2. Complement component 3; 3. Albumin; 4. Albumin; 5. Albumin; 6. Immunoglobulin alpha-2 heavy chain; 7. Transferrin; 8. Fibrinogen beta chain; 9. alpha 1-B glycoprotein; 10. Alpha 1-B glycoprotein; 11. HP2-alfa; 12. Haptoglobin; 13. Haptoglobin; 14. Beta-2-glycoprotein I; 15. Hemopexin; 16. Immunoglobulin alfa-1-heavy chain constant region; 17. Crystal structure of the fab fragment of a human monoclonal IgM cold agglutinin; 18. Immunoglobulin kappa light chain VLJ region.

Patient 2 (b). 1. Transferrin; 2. Albumin; 3. Histidine-rich glycoprotein precursor; 4. Hemopexin; 5. Alfa1 anti-trypsin; 6. Albumin; 7. Fibrinogen beta chain; 8. Ig A alpha1 Bur; 9. Alpha 1- beta glycoprotein; 10. Fibrinogen beta chain; 11. Immunoglobulin alpha-2 heavy chain; 12. Immunoglobulina alpha-1 heavy chain; 13. Haptoglobin; 14. Immunoglobulin kappa-chain VK-1; 15. HP2 alpha.

Patient 3 (c). 1. Albumin; 2. Transferrin; 3. Albumin; 4. Transferrin; 5. Albumin; 6. Fibrinogen beta chain; 7. Hemopexin; 8. Immunoglobulin A heavy chain IgA2H; 9. Ig gamma-1 chain C region; 10. Ig alpha-2 chain C region; 11. Hemopexin; 12. Alpha-1-beta glycoprotein; 13. Alpha1-antitrypsin; 14. Beta 2- glycoprotein acid; 15. HP2-alfa; 16. Chain C, crystal structure of the fab fragment of a human monoclonal IgM cold agglutinin; 17. IgG kappa chain; 18. Immunoglobulin kappa light chain.

As can be seen on table 2, almost all proteins isolated from healthy controls were found in patients and the majority of glycoproteins identified are produced by the liver. In this sense, it is clear that even if the pathological state influenced the production of these glycoproteins, they still remain in the eluted fraction. This data suggest as future experiments structural analyses of this protein in order to identify effects of the pathological states. A great number of studies try making correlation between pathologies and structural heterogeneity, mainly abnormal glycosylation. As example of well characterized disease, carbohydrate-deficient glycoproteins syndromes (CDGSs), now called congenital disorders of glycosylation, are a multi systemic pathology, typically associated with major nervous system impairment (Dell & Morris, 2001). Furthermore, structural abnormalities seem to be important for diagnosis. Heterogeneity of the N-glycans on glycoproteins creates different glycoforms and this phenomenon affects protein activity and biological function (Strauber et al., 1995). As example of this found, the distribution of sialoforms of human serum transferrin caused by alcohol abuse and the presence of transferrin (CDT) isoforms from human serum samples of chronic alcohol consumption patients. In this sense, we can conclude that the study of these heterogenic glycoproteins could be used as fingerprinted technique for alcoholism diagnosis (Strauber et al., 1995).

Table 2 – Plasma proteins purified by Con-A and identified using mass spectrometry approach. List of proteins identified from one reference control and three different patients.

Protein ID	Control D	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Erythropoietin	x			
Complement component 3		xx		
Albumin	xxxx	xxx	xx	xxx
Transferrin	x	x	x	xx
Fibrinogen beta chain		x	xx	x
Alpha 1-B glycoprotein	xx	x	x	x
HP2-alpha	x	x	x	x
Haptoglobin	xx	xx	x	
Beta-2-glycoprotein I	xx			X
Immunoglobulin G Kappa chain				X
immunoglobulin kappa light chain VLJ region		x		
Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin		x		X
Chain C, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin				X
Histidine-Rich glycoprotein precursor			x	
Hemopexin	xx	x	x	Xx
Alpha1-Antitrypsin	x		x	X
Immunoglobulin Aalpha1 Bur			x	
Immunoglobulin kappa-chain VK-1		x	x	
Immunoglobulin G kappa Chain		xx		X
Immunoglobulin kappa light chain				X
Immunoglobulin Alpha -1 heavy chain	xx		x	
Immunoglobulin Alpha-2 heavy chain		x	x	X
Immunoglobulin Alfa-1-heavy chain constant region		x		
Immunoglobulin Alpha-1 chain C region		x		
Immunoglobulin Alpha-2 chain C region				X
Immunoglobulin Gamma-1 chain C region				X

The analysis of elution profile of two different lectins showed differences of glycoprotein affinity even when both have the same carbohydrate specificity. As well, Figure 6 exemplifies glycoproteins usually acknowledged when we integrate both lectins and mass spectrometry analysis. In this sense, proteins identified in all samples were surrounded by colours. We can note, as yellow albumin, blue haptoglobin, green haptoglobin A2 isoform, red transferrin, brown alfa-1-antitrypsin and lilies hemopexin. Considering potential sample losses during the process, most of the large amount of non-glycosilated material was due to albumin. Besides that, when we use Concanavalin A lectin, we identification different proteins such as PRO 1400, fibrinogen beta chain, alpha-1-B-glycoprotein and Beta-2-glicoproteina. On the other hand, Cramoll ¼ lectin isolate SH₂/SH₃ adaptor protein NCK-beta, protein with no known catalytic function but seems to be involved with regulation of receptor protein tyrosine kinases (Tanaka et al., 1997). Another relevant found was the detection of the protein Rei, Bence-Jones. The literature reports that this immunoglobulin kappa light-chain dimmer is secreted in immunoproliferative disorders and is frequently involved in renal complications, including specific proximal tubule impairment, Fanconi's syndrome (Roussel et al., 1999). Furthermore, the O-linked apolipoprotein A-I (apoA-I, 243 amino acids), eluted by Cra ¼, are the major protein of high-density lipoproteins (HDL) and plays an important structural and functional role in lipid transport and metabolism.

The majority of glycoproteins identified are acute phase proteins like as fibrinogen and antithrombin (proteins who participated of coagulation process), alfa-1-antitrypsin (protein inhibitor), hemopexin, transferrin and haptoglobin (proteins responsible for blood transport), acid Alpha 1 glicoprotein and inhibitor of C1 (proteins of complement system). This data could be important when this acute phase proteins could be correlated with diagnostic disease. A large amount of studies linked serum and plasma levels of these proteins with inflammatory response.

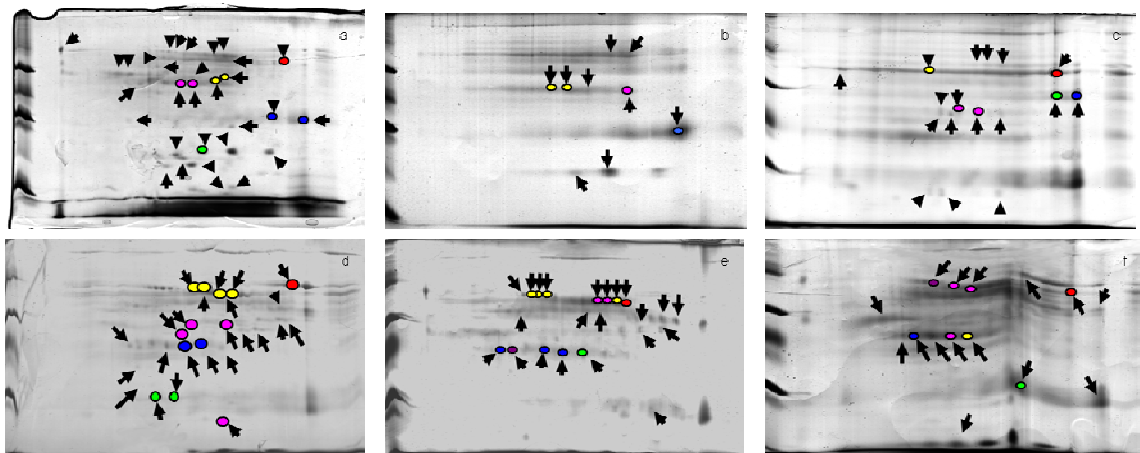


Figure 6 – Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of glycoproteins purified by Concanavalin A lectin (d,e,f) and Cra $\frac{1}{4}$ lectin (a,b,c) . Glycoproteins from three different controls were subjected to IEF in a 7-cm IPG strip spanning pH 4-7. Every colors circle represents one relevant protein found in all six gels.

Antithombin-III and beta-2-glicoprotein I are involved with blood coagulation process and because of that, they can be linked with coagulation disorders (Guidi, 1991). Honegger and collaborators identified correlation between deficiency of antithombim-III and cancer of the colun, ovary and prostate. Haptoglobin are one acute phase protein whose association with the angiogenesis of the carcinoma have been reported (Ward *et al.*, 1977; Hannisdal *et al.*, 1994). Furthermore, it was made connection of haptoglobin and chronic liver disease as cirrhosis and acute hepatitis . As well, it has been associated increases of haptoglobin concentrations and colorectal cancer (Ward *et al.*, 1977; Walker *et al.*, 1983). Salas-Valdes and colleagues reported increase of the acude phase hemopexin in cancer patients (Dziegielewska *et al.*, 1986; Nishi *et al.*, 1991). A serine protease inhibitor Alpha 1-antitrypsin or α_1 -antitrypsin (A1AT) protects tissue, particularly in the acute phase reaction, from

enzymes of inflammatory cells, especially elastase. Disorders of the enzyme could be involved with emphysema and leads to liver cirrhosis in severe cases (Axelson et al., 1965).

It is known that dysfunction of the liver can lead to a decrease or abnormal production of another important hepatic glycoprotein named fibrinogen, a symmetrical dimer composed of 6 paired polypeptide chains (alpha, beta, and gamma chains) (Plow et al., 1982).

The non glycosylated albumin was identified in all samples. Yang et al, reported using as lectins Con-A, WGA and Jacalin the presence of large amounts of non-glycosylated proteins such as albumin in the serum sample. They believed that this happen because of the glycosylated proteins were only a small fraction of the loaded sample. The presence of high abundant proteins, such albumin, can affect the identification of low abundance proteins. Significantly, 10 or more orders of magnitude in concentrations separate albumin, the most abundant protein in serum, from the scarcest of proteins (Anderson et al., 2002). Albumins represent from 55% to 75% of the total protein content of human serum. This found suggest the importance of eliminate high abundant proteins in order to improve the dynamic range of protein identification (Corthals *et al.*, 2000; Herbert et al., 2001). The literature reports depletion process such as ion exchange-based techniques or the use of removal kit using antibody-based affinity methods. Chromy and colleagues reported the increase of 76% in protein detection capability with over 660 additional lower abundant protein spots detected. In the same study they identified after removal of high-abundant protein, proteins including Vitamin D binding proteins as a biomarkers for prostate cancer, haptoglobin as a marker of lung cancer and serum amyloid component and transthyretin as biomarkers for neurodegeneration (Hlavaty et al., 2003; Koo et al., 1993).

The presence of high abundant proteins could be responsible for no data of less abundant plasma glycoproteins such as lecithin cholesterol acil transferase (first object of your study). Besides that, glycoproteins are problematic in 2-D gel electrophoresis approach. Oligosaccharide heterogeneity often causes proteins of identical primary structure to appear in multiple spots. Glycoform resolution occurs because of differences in charge, often due to differences sialic acid content and this can make difficult identification in several ways. Protein isoforms typically appear as "spot trains" in 2-D electrophoresis. This is particularly true for glycoproteins that have isoforms that vary in pI (due to addition of sialic acid) and molecular weight (due to addition of different size and number of glycan chains) (Gooley *et al.* ,1997)

Table 3 – Plasma proteins purified by Con-A and Cramall lectin. (X) Represents abundance of the protein in sample.

Expected	Cramall (1)	Con A (2)
Immunoglobulin M heavy chain	100X	
SH2B3 adaptor protein NCK-beta	10X	
Protein, lipid binding apolipoprotein A-I	10X	
Carbonic Anhydrase II (Carbonic Dehydratase)	10X	
Protein Scl, Sance-Jones	1000X	
Lamb-4a-chain precursor (AA -20 to 213)	X	
Immunoglobulin J chain	X	
IgO kappa chain		
Ig kappa chain VH	X	
Immunoglobulin k	X	
Haptoglobin Hp2	1000X	1000X
Hemopexin	10000X	10000000X
Complement component3	1000000000000000X	
Transferrin	100X	1000X
Immunoglobulin lambda light chain	X	
Immunoglobulin kappa chain VK-1	X	
Plasma protease (tr) inhibitor	10X	
Immunoglobulin kappa chain constant region	X	X
Lipoglobulin	100X	100000X
alpha-1-antitrypsin	X	10X
Erythropoietin		X
Ig kappa chain		X
IgH2H chain		X
Ig alpha 2 heavy		X
Ig alpha-1 chain C region		X
Fibrinogen beta chain		1000X
Beta-2-glycoprotein I		1000X
alpha-1-G-glycoprotein		10000X
Chain B, antithrombin III		100X
Immunoglobulin kappa chain	10X	X
Immunoglobulin alpha-1 heavy chain		100X
Ig kappa light chain		X
Albumin	10000X	100000000X
Chain F, Fragment Fc(bis-D From Human Fibrin		X
Ig alpha-1 chain C region		X
Chain A, Crystal Structure Of The G4 Module		10X
Chain C, Human Monoclonal IgM Cold Agglutinin		X
FR01400		X

Conclusions

In conclusion, Con-A-Sepharose chromatography and Con A lectin-Sepharose, combined with 2D-PAGE is a consistent, reproducible and reliable method to isolate glycoproteins from plasma samples. This method makes separation of proteins with different glycosylation patterns and this finding gives the possibility of purified different proteins with potential to become biomarkers for diagnostic diseases. Otherwise, to improve even more the results, seems to be important to optimize the methodology and its parameters to identify proteins with low concentration. In this sense, the depletion of such proteins like albumin could help to isolate less abundant glycoproteins.

Referências Bibliográficas

- Aebersold, R., Rist, B.; Gygi, S. P. i. Quantitative proteome analysis: methods and applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 919:33-47. 2000.
- Akedo, H.; Mori, Y.; Kobayashi, M.; Okada, M. Changes of isoelectric point of concanavalin A induced by binding of carbohydrates. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 49:107-113. 1972.
- Allen G.P, Paul B., et al.: Review Article: Schistosomiasis, *N. Engl. J. Med.*, 346(16), 1212-1220, abr 2002.
- Álvares, N.G. La rotación con leguminosas como alternativa para reducir el daño causado por fitopatógenos del suelo y elevar la productividad del agro ecosistema maíz en el trópico húmedo. (Tese de Mestrado). Montecillo. México, Colégio de Posgraduados, 1989.
- Amaral RS, Porto MAS. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27 (supl III): 73-90, 1994.
- Anderson, N. L.; Anderson, N. G. The Human plasma proteome- History, character and diagnosis prospects. *Mol.Cell. Proteomics* 1, 845-867 2002.
- Antelmann, H.; Tjalsma, H.; Voigt, B.; Ohlmeier, S., Bron,S; Marten Van Dijk, J.; Hecker, M.. *A Proteomic View on Genome-Based Signal Peptide Predictions. Genetical Research* 11: 1484-1502. 2001.
- Anderson, N. G., and N. L. Anderson.. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* 17:443-453.1996.
- Andrade, Z. A. *A esquistossomose no Brasil após quase um século de pesquisas. In: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. V. 35, nº 5, Uberaba, set/out. 2002.*
- Andrade, Z.; Andrade, S. A.,.: Patologia da Esquistossomose Hepatoesplênica. In.: Aspectos peculiares da infecção por *Schistosoma mansoni*, Salvador – Centro Editorial e Didático da UFBA – 1984.
- Araujo JD A pesquisa em esquistossomose no Brasil. In *Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica. Biblioteca da Academia Mineira de Medicina* 14: 9-18. 1986.
- Arruda, S. M. B. Doppler fluxometriaportal em esquistossomóticos com e sem hemorragia digestiva. Recife, 75p. (Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina – UFPE). 1996.
- Atkin SL, Kamel M, El-Hady AMA, El-Badawy SA, El-Ghobary, Dick WC: Schistosomiasis and inflammatory polyarthritis: a clinical, radiological and laboratory study of 96 patients infected by *S. mansoni* with particular reference to the diarthrodial joint. *Q J Med* 59: 479-487, 1986.
- Askar, A. Faba beans (*Vicia faba* L.) and their role in the human diet. *Food and Nutrition Bulletin*, Tokyo, v.8, n.3, p.15-24, 1986.
- Axelson, U; Laurel, C.B.; Hereditary variants of serum alpha 1 Antitrypsin, *Am J. Hum genety* 17:466-472; 1965.
- Ballou, S.P. et al., Quantitative and qualitative alterations of acute-phase proteins in healthy elderly persons. *Age Ageing*, 25(3):224-38,1996.
- Baumann H, Gaudie J: The acute phase proteins:C-reactive protein, serum amyloid A protein, alfa-1acid glycoprotein and fibrinogen . *Arthritis Rheum* 20:129-147, 1990.

Becker, J. W., Reeke, G. N.; Wang, J. L., Cunningham, B.A., Edelman, G. M. The covalente and three-dimensional structure of peanut lectin-lactose complex. J. Biol Chem., 250:1513-1524. 1975.

Bilharz TM Fernere Beobachtungen uber das die Pfortader des Menschen bewohnende *Distomum haematobium* und sein verhaltniss zu gewissen patalogischen Bildungen aus brieflichen Mitheilungen an Professor v. Siebold vom 29 Marz 1852. *Zeitschr Wschft Zool, Leipzig* 4: 72-76. 1852.

Bilharziasis. In: Mostofi FK, ed. Bilharziasis. Berlin: Springer, 1967.

Bornestein, I.;Wagh, P.V. & winzer R.J. the structure of a glycopeptide from human orosomucoid (alpha-1-acid glycoprotein). J. Biol. Chem., 244 (4):658-655, 1969.

Boros, D.L.; Pelley, R.P.; Warren, K.S. Spontaneous modulation of granulomatous hipersensitivity in schistosomiasis mansoni.. Journal of Immunology, San Francisco, USA, v.114, p.1437-1443, 1975.

Bjellqvist, B., C. Pasquali, F. Ravier, J. C. Sanchez, and D. Hochstrasser.. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* 14:1357-1365. 1993.

Blackstock,W. P.; Weir, M. P.Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends Biotechnol. 17:121-127. 1999.

Boyd, W.C.; Sharpleigh, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119:419. 1954.

Brandt CT, Tavares DJS, Caneca OAF. Splenectomy associated with ligature of the left gastric vein in children with surgical schistosomiasis: analysis of the hepatic functional reserve. Acta Cir Bras 8: 150- 153. 1997.

Brandt CT, Tavares DJS, Caneca OAF, Ávila Jr L. Surgical hepatosplenic mansonic schistosomiasis in children: a Doppler Duplex study of the portal vein and hepatic artery. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 70-71. 1995.

Brandt,C. T., Araujo, L. B.; Barbosa, C. M. Autotransplantation of spleen tissue in children with mansonic schistosomiasis who underwent splenectomy: Evaluation of splenic residual functions. *Acta Cir. Bras.*, Out./Nov./Dez., vol.13, no.4, p.212-216. ISSN 0102-8650. 1998.

Cavada, B.S., Moreira, R.A., Oliveira, J.T.A.; Granheiro, T.B. Primary structures and functions of plants lectins. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 5:193-201. 1993.

Cerri GG, Alves VAF, Magalhães A. Hepatosplenic schistosomiasis mansoni: ultrasound manifestations. *Radiology*;153:777 ,80 1984.

Chai , W et al., *Eur J .biochem*, 263, 879, 1999.

Chromy, B. A.; Gonzales, A. D.; Perkins, J.,Choi, W.; Corzett, M. H.; Chang, B.C., Corzett, H.;McCutchen-Maloney; Proteomics Analysis of human Serum by Two-dimentional Differential Gel Electrophoresis after Depletion of High-Abundant Proteins. *Journal of proteome Reseach*, 3, 1120-1127, 2004.

Chung, J., Abano, D. A., Fless, G.M., & Scanu, A.M. Isolation, properties and mechanism of in vitro action of lecithin:cholesterol acyltransferase from human plasma. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 7456-7464. 1979.

Cooke GS; Lalvani, A; Gleeson FV, Conlon CP. Acute pulmonary schistosomiasis in travelers returning from Lake Malawi, sub-Saharan Africa. Clin Infect Dis 1999; 29: 836-9.

Correia, M.T.S.; Coelho, L.C .B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectins, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis*, Mart. (Camaratu bean). Applied Biochemistry and Biotechnology, 55(3): 261-273, 1995.

Corthals, G.L.; Wasinger, D.F.Hochstrasser; Sanchez, Electrophoresis 21 1104 2000.

Davidson*, W. S.; Hazlett, T.; Mantulin, W. and Ana Jones. The role of apolipoprotein AI domains in lipid binding Biochemistry Vol. 93, pp. 13605-13610, November, 1996.

Delanghe, J.R., De Buyzede, M. L. De Scheeender, I. K., Faust, U. and Wieme, R.J. Activation energy and lectin affinity chromatography of gamma glutamyltransferase as a marker for enzyme heterogeneity. Clin. Biochem. 22, 115-199. 1989.

Derewenda, Z., Yariv, J., Helliwell, J.R., Kalb, A.J., Dodson, E.J., Papiz, M.Z., Wan, T., Campbell, J., The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A; *EMBO J.*, 8, 2189-2193, 1989.

Dell, A. Morris, H.R.Glycoprotein Structure determination by mass spectrometry. Science, vol.291 23 march, 2001.

Doherty JF, Moody AH, Wright SG. Katayama fever: an acutemanifestation of schistosomiasis. BMJ 1996; 313 : 1071-2.

Doi, Y.; Nishida, T. Microheterogeneity and physical properties of human lecitin: cholesterol acyltransferase. Journal of Biological Chemistry, 1983 258, 5840-5846.

Domingues, A. L. C.; Domingues, L. A. W. Esquistossomose humana. Quadro clínico, cap. 5 , p91-105. Ed. Universitária – UFPE, 1994.

Donaldson, M.S.; Shuler, M. L. the use of lectins to select subpopulations of insect cells. Biotechnology Bioenginner. 64: 616-619, 1999.

Dunn, M. J.. Studying heart disease using the proteomic approach. Drug Discov. Today 5:76-84. 2000.

Dwek, R. A. Glycobiology: towards understanding the function of sugars. Biochemical Society Trasactions, 23, 1-25. 1995.

Dziegielewska, K.M.; Saunders, N.R. ; Schejter, E.J.; Zakut, H.; Zevin-Sonkin, D.; Zisling, R.; Soreq, H. Dev. Biol 115 93 1986.

Ekstrom, S., P. Onnerfjord, J. Nilsson, M. Bengtsson, T. Laurell ; G. Marko-Varga. Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification. Anal. Chem. 72:286-293. 2000.

Elgavish, S.; Shaanan, B. Lectin – carbohydrate interactions: different folds, common recongnition principles. Trends in Biochemical Sciences, 22: 462-467, 1997.

El-Rooby A. Management of hepatic schistosomiasis. Semin Liver Dis 1985;5:263-76.

Etzler, M.E. Plant lectins: molecular and biological aspects. *Annual Review Plant Physiology*, Palo Alto, v.36, p.209-234, 1985.

Farah, I.O.; Nyindio, M.; Suleman, M.A.; Nyaundi, J.; Kariuki, T.M.; Blanton, R.E.; Elson, L.H.; King, C.L. *Schistosoma mansoni*: development and modulation of the granuloma after single. 2000.

Faust EC. An inquiry into the ectopic lesions in schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine* 28: 175-199, 1948.

Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246:64-71, 1989.

Fielding, C.J., Fielding, P.E. *J. Lipid Res.* 36 (1995) 211-218.

Fountoulakis, M.; Takacs, M.F.; Takacs, B. *Journal Chromatogr. A* 833 157 1999.

Fuji, Katayama disease, Katayamaki. *Chugai Iji Shimpo* 691: 55-56.

Fundação Nacional de Saúde – funasa. Esquistossomose mansônica (guia texto). Belo Horizonte, 1999. 52p. BRASIL, Ministério da saúde.

Garrels, J. I., B. Futcher, R. Kobayashi, G. I. Latter, B. Schwender, T. Volpe, J. R. Warner, and C. S. McLaughlin. Protein identifications for a *Saccharomyces cerevisiae* protein database. *Electrophoresis* 15:1466-1486, 1994.

Gibodat, M.; Bergquist, N. R. Post-transmission schistosomiasis: a new agenda. *Acta Trop.*, v. 77, p. 3-7, 2000.

Gillett MPT, Owen JS, Coutinho A. Plasma free and esterified cholesterol in schistosomiasis mansoni. *The Lancet* 1976; 971.

Gillet, M. P. T. deficiency associated with hepatic Schistosomiasis mansoni. *Journal of Clinical and Laboratorial Investigation*, 38(S150): 194 - 198, 1978.

Gillet, M. P. T. M.; Sibrian, A. M. K.; Dimenstein, R.; Carvalho, V. C. O.; Gonçalves, M. M. C.; Chaves-Filho, M. Alterations in the fatty acyl composition of plasma cholesteryl esters in Brazilian patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 22: 949 - 957, 1989.

Gioannini, T., Foucaud, B., Hiller, J.M., Hatten, M.E. and Simon, E. J. Lectin binding of solubilized opiate receptors: evidence for their glycoprotein nature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 1128-1134, 1982.

Glomset, J. A., in: Nelson, G. J. (ed.), *Plasma Lipids and Lipoproteins*, Wiley Interscience, pp.745-787, New York, 1972.

Goldstein, J.; Hughes, R.C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N. What would be called lectin? *Nature*, 285:66, 1980.

Gooley AA, Packer NH in: Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF (Eds.), *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Springer-Verlag, 8. Berlin, Heidelberg, pp. 65-91. 1997.

Gorg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, and W. Weiss.. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21:1037-1053. 2000.

Gotto, A. M.; Pownall, H. L.; Havel, R. J. Introduction to plasma lipoproteins. In Alberts, J.J.; Segrest, J. P. *Methods in Enzymology*, New York: academic press, v.128, p. 3-41, 1986.

Graeff-teixeira, C. *et al.* Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the Southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 9-10, 1999.

Graves, P. R.; Haystead, T. A. J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 39-63, Vol. 66, No. 1 March, 2002.

Guidi, L.; Bartoloni, C.; Pelicano, P.; Capelli, F.; Cursi, R. Pili, A.; Tricerri, F.; Patriarca, G.; Gambassi, G.; *Clin. Ter.* 136; 367. 1991

Hannisdal, E.; Tveit, K.M.Theodorsen, L.; Host, H., *Acta Oncol.* 33 415 1994.

Hardman, K. D.; Agarwal, R.C.; Freiser, M. J. Manganese and calcium binding sites of concanavalina A. *J. Mol. Biol.*, 157:69-89, 1982.

Herbert, B. R.; Harry, N. H., Packer; Gooley, A. A.; Peterson, S. K.; Williams, K. L., *Trends Biotechnol.* 19 S3 2001.

Heyneman, D.: Medical parasitology. In: Lange D Jawetz, Melnick and Adelberg *Medical Microbiology*, 22nd ed. McGraw-Hill. p. 591-93. 2001.

Hlavaty, J.; Partin, A; Shue, M.; Mangold, L.; Derby, J.; Javier, T.; Kelley, S.; Stieg, A.; Briggman, J.; Hass, G.; Wu, Y.-J. Identification and preliminary clinical evaluation of a 50.8kDa serum marker for prostate cancer. *Urology*, 61, 1261-1265. 2003.

Hock, R. A., Nexø, E. and Hollenberg, M.D. Solubilization and isolation of human placenta receptor for epidermal growth factor urogastrone. *J. Biol. Chem.* 255, 10737-10743, 1980.

Holmquist, L.; Bjellqvist, B. Microheterogeneity of human plasma lecithin: cholesterol acyltransferase examined by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 9, 580-582, 1988.

Honegger, H.; Anderson, N., Hewitt, L.A.; Tullis, *Thromb. Haemost.* 46; 500 1981.

Howard, I., Sage, H.J., Horton, C.B. Communication: studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, New York, v.149, n.1, p.323-326, 1972.

Hunter, T.. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-236, 1995.

Jung, E., M. Heller, J. C. Sanchez, and D. F. Hochstrasser.. *Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes. Electrophoresis* 21:3369- Jones, A *Lecithin cholesterol acyltransferase Review, Biochimica et Biophysica Acta* 1529 245-256 3377. 2000.

Kalife, J.; Cêtre, C.; Pierrot, C.; Capron, M. Mechanisms of resistance to *S. Mansoni* infection: the rat model. *Parasitology International*, 49: 339-345, 2000.

Karas, M.; Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60:2299-2301. 1988.

Kaside, A.; Rhyne, J.; Zeller, K.; Pritchard, H.; Miller, M. A novel TC deletion resulting in pro²⁶⁰ stop in the human LCAT gene is associated with a dominant effect on HDL cholesterol. *Atherosclerosis*, v. 156, p. 127-132, 2001.

Katz, Naftale; Almeida, Karina. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Cienc. Cult.*, Jan./Mar vol.55, no.1, p.38-43. ISSN 0009-6725, 2003.

Katz, N.; Peixoto, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 33, p. 303-308, 2000.

Kaufmann, R., P. Chaurand, D. Kirsch; B. Spengler. Post-source decay and delayed extraction in matrix-assisted laser desorption/ionization-reflectron time-of-flight mass spectrometry. Are there trade-offs? *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10:1199-1208. 1996.

Kelner, S. Critical evaluation of surgical treatment of schistosomotic portal hypertension. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 357-368 1992.

Kennedy, J. F.; Paiva, P.M.G.; Correia, M. T. S.; Cavalcante, M.S.M.; Coelho, L.C.B. Lectin, versatile protein og recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, 26: 219-30, 1995.

Kushner I: The phenomenon of the acude phase response. *N.Y. Acad Sci* 389:39-48,1982.

Koo, E.; Lansbury, P.; Kelly, J.W. Amiloid diseases:abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *PNAS*, 96, 989-9990. 1999.

Lacerda CM, Evangelista Neto J, Melo PSV. Hemorragia por varises esofágicas: aspectos atuais. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* 45: 57-68. 2000.

Laemmli, U. K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685,1970.

Lambertucci JR, Barraviera B. Esquistossomose mansônica. Estudo Clínico. *Jornal Brasileiro de Medicina* 67: 59-100, 1994.

Lambertucci, J. R. Schsitossoma mansonii: pathological and clincal aspects. In: Jordan P, Webbe G, Sturrock, R.F. (eds). *Human schistosomiasis*. Cab international Wallingford, p195- 235, 1993.

Lambertucci JR, Rocha RS, Carvalho OS, Katz N. A esquistossomose mansonii em Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 20: 47-52, 1987.

Leiper RT 1915. Report on the results of the bilharzias mission in Egypt,. Part I. Transmission. *J R Army Med Corps* 25: 1-55, 1915.

Loris, R., Hamerlyck, T., Bouckaert, J.; Wyns, L. Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1383: 9-36, 1998.

Licastro,F.; Davis, L.J. ; Morini, M.C. Lectins and superantigens:membrane interactionof these with T lynfocy affect imunoresponse .*Int . J.Biochem.* , 25 845-852. 1993.

Liener, I.E. The nutritional significance of the plant lectins. In: ORY, R.L. *Antinutrients and natural toxicants in foods*. Westport: Food & Nutrition Press,. p.143-157. 1981.

Liener,I.E. Phytohemagglutinins (phytolectins). *Annual Review Plant Physiology*, Palo Alto, v.27, p.291-319, 1976.

Lima, V. L. M.; Coelho, L. C. B. B; Kennedy, J.F.; Owen, J. S.; Dolphin, P. J. Lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) as a plasma glycoprotein: an overview. *Carbohydrate Polymers*, 55: 179 - 191, 2004.

Lima, V. L. M.; Correia, M. T. S.; Cechinel, Y. M. N.; Sampaio, C. A. M.; Owen, J. S.; Coelho, L. C. B. B. Immobilized Cratylia mollis lectin as a potencial matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin- cholesterol acyltransferase. Carbohydrate Polimers, 33: 27-32, 1997.

Lima, V. L.M.; Harry, D. S.; McIntyre, N.; Owen, J. S.; Chaves, M. E. C. Characterization and potential uses of rabbit polyclonal antibodies against human plasma lecithin-cholesterol aciltransferase. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 29, p. 957-968, 1996.

Lima,V.L.M., McIntypere N, Owen JS. Secretion of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) by the human cell line, Hep G2. Biochem Soc Trans; 16: 155-156 1988.

Lis, H; Sharon, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. Chem. Rev., 98: 637-674, 1998.

Lis, H.; Sharon, N. Lectins as molecules and as tools. Annu. Rev. Biochem.,55:35-67.1986.

Lis, H.; Sharon, N. the biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinis). Annu. Rev.Biochem.,42:541-574. 1973

Lis, H; Sharon, N. Soy bean (Glycine max) agglutinin. Meth. Enzimol., 28:360-365.1972.

Loris, R., Hamelryck, T., Boukaert, J., and Wyns, L.. Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1383: 9–36, 1998.

Mahmoud AAF. Thematodes (Schistosomiasis) and other flukes. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandel GL,Bennet JE, Dolin R, eds. New York: Churchill Livingstone Inc. 1995. p. 2538-41.

Mancini Filho, J., Lajolo, F.M., Vizeu, D.M. Lectins from red kidney beans: radiation effect on agglutinating and mitogenic activity. *Journal of Food Science*, Chicago, v.44, n.4, p.1194-1196, 1200, 1979.

Manson,P 1902. Report of a case of bilharzia from West Indies. *Brit Med J* 2: 1894-1995.

Medsa, 2ª ed, 1996, p. 1071-1084.

Mitre, L. relevância clinica e laboratorial da alfa-1-glicoproteina ácida . Laes & Haes, 103: 94-6, 1996

Miyari K, Suzuki M The intermediate host of *Schistosoma japoniam* Katsurada. *Mitt Med Fak Kaiser University* .1914.

Nangia-Makker, P. et al. Carbohydrate-binding proteins in cancer and their ligands as therapeutic agents. *Trends Mol Med*, v. 8, n. 4, p. 187-92, 2002.

Neves D.P.: Schistosoma mansoni. In.: Parasitologia Humana, Rio de Janeiro: Atheneu, 8ª ed, , p. 197. 1991.

Nishi, S.; Nishita, T., Ohkawa, K Tumour Biol. 12 184 1991.

Owen, J. S.; McIntyre, N. Plasma lipoprotein metabolism and lipid transport. Trends in Biochemical Sciences, 1982, 7,95-98. 1982.

Paraense WL Distribuição dos caramujos no Brasil. In *Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansonica no Brasil. Biblioteca da Academia Mineira de Medicina* 14: 117-128. 1986.

Paraense WL. *Biomphalaria amazonica* and *B. cousini*; two new species of Neotropical planorbid mollusc. *RevBras Biol* 26: 115-126. 1966.

Paranaguá-Vezozzo DC, Cerri GG. Duplex hemodynamic evaluation of hepatosplenic mansoní schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87:149-51.

Passos, A. D. C.; Amaral, R. S. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 31 (2), 61-74, 1998.

Petroianu. A.: Tratamento cirúrgico da hipertensão porta na esquistossomose mansoni, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36(2):253-265, mar-abr, 2003.

Plow, E.F.; Marguere, G.; Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by the tetrapeptide Glycyl-L-prolyl-L-arginyl-L-proline. Biochemistry 79 p.3711-3715 1982.

Pusztai, A. Plant lectin. Cambridge University Press, Cambridge, 1991.

Qin, J., D. Fenyo, Y. Zhao, W. W. Hall, D. M. Chao, C. J. Wilson, R. A. Young, and B. T. Chait.. A strategy for rapid, high-confidence protein identification. Anal. Chem. 69:3995-4001. 1997.

Qin, J., D. Fenyo, Y. Zhao, W. W. Hall, D. M. Chao, C. J. Wilson, R. A. Young, and B. T. Chait.. A strategy for rapid, high-confidence protein identification. Anal. Chem. 69:3995-4001. 1997.

Rappsilber, J., S. Siniosoglou, E. C. Hurt, and M. Mann. A generic strategy to analyze the spatial organization of multi-protein complexes by cross-linking and mass spectrometry. Anal. Chem. 72:267-275, 2000.

Raso, P.; Pedroso, E. R. P. Patologia das principais doenças tropicais do Brasil – Esquistossomose mansônica. In: BOGLIOLO, L. Patologia. 4 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro,. 1141p. p. 1065-1086.1987.

Rey, L. *Parasitologia* 2. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; p 363-368. 1991.

Rini, J. M.. Lectin structure. Annu. Rev. Biomol. Struct. 24: 551-77. 1995

Ryhage, R.; *Mass Spectrom. Rev.* 12, 1. 1993.

Ryder, S.D., Smith, J.A. and Rhodes, J. M. Peanut lectin: A mitogen for normal human colonic epithelium and human HT29 colorectal cancer cells. J. Natl. Cancer Inst. 84, 1410-1416.1992.

Salas-Valdes, A.; sanches-Hidalgo, V. M.; Rabago-Velasco, M; Sanchez-Leon, P.; Vargas, C.; Salas-Valdes, R.; Arch. Invest. Méd. (Mex.) 31 1980.

Sarkar, M., Majender, G. and Chatterjee, T. Goat sperm membrane: lectin-binding sites of sperm surface and lectin affinity chromatography of the mature sperm membrane antigens. Biochim. Biophys. Acta 1070, 198-204. 1991.

Schulz-Knappe, P., Zucht, H. D., Heine, G., Jurgens, M., Hess, R.; Schrader, J. *Peptidomics: The Comprehensive Analysis of Peptides in Complex Biological Mixtures. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 4: 207-217, 2001.

Sharon, N. Lectin-carbohydrates complexes of plants and animals. An atomic view. Trends Biochem. Sci., 18:221-226. 1993.

Sharon, N.; Lis, H. Legumes lectins- a large family of homologous proteins. FASEB, 4:3198-3208. 1990.

Sharon, N; Lis, H; A century of lectin research (1888-1988). Trends Biochem. Sci., 12:488-491. 1987.

Silva, C. A., Oliveira, K. F., Carvalho, V. C. O.; Surgical treatment effect on the liver lecitin: cholesterol acyltransferase (LCAT) in schistosomiasis mansoni. *Acta Cir. Bras.*, 2002, vol.17 suppl.1, p.28-30. ISSN 0102-8650.

Spengler, B., D. Kirsch, R. Kaufmann, and E. Jaeger. Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6:105-108. 1992.

Stauber, R.E.; Stepan, V.; Trauner, M.; Wilders-Truschning, G.; Krejs, G. J. Evaluation of carbohydrate – deficient transferrin for detection of alcohol in patients with liver dysfunction abuse. *Oxford Journal* vol.30 (2) 171-176, 1995.

Torres, B. V.; Smith, D. F. Purification of Forssmann and human blood group A glycolipids by affinity chromatography on immobilized Helix pomatia lectin. *Anal. Biochem.* 170, 209-219. 1988.

Tanaka, M.; Lu, W.; Gupta, R.; Mayer, B. J. Structural insight into the binding diversity between the Tyr-phosphorylated human ephrinBs and Nck2 SH2 domain. *J Biol Chem.* 2005 May 13;280(19):19205-12. Epub Mar 11. 2005

Toms, G.C., Western, A. Phytohaemagglutinins. In: *Chemotaxonomy of the Leguminosae* (Harbone, J. B., Boulter, D.; Turnes, B. L., eds.). Academic press, London, 1971.

Tsuji, T., Tsunehisa, S., Watanabe, Y., Yamamoto, H. and Osawa, T. the carbohydrate moiety of human platelet glycolipin. *J. Biol. Chem.* 258, 6335-6339. 1983.

Utermann, G.; Menzel, H. J.; Adler, G.; Dieker, P.; Weber, W. Substitution in vitro of lecithin: cholesterol acyltransferase. Analysis of changes in plasma lipoproteins. *European Journal of Biochemistry*, 107, 225-241, 1980.

Voet, D.; Voet, J. G. Lipoproteins, In: *Biochemistry*. ed. New York: John Wiley & Sons, cap. 11, p. 304-313, 1995.

Walker, C.; Gray, B.N.; *Cancer* 52 150 1983.

Ward, A.M.; Cooper, E.H., Turner, R.; Anderson, J.A; Neville, A.M. *Br J. Cancer* 35 170, 1977.

Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. Humphrey-Smith, D. F. Hochstrasser, and K. L. Williams.. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13:19-50. 1995.

Wilson JD et al: In *Harrison's-Principles of Internal Medicine*, 1984.

World health organization (WHO). Schistosomiasis and soil-transmitted helminth infections. *Wkly Epidemiol. Rec.*, v. 76, p. 73-76, 2001.

World health organization (WHO). Tropical Diseases Research. Schistosomiasis In Progress 1995-1996: Thirteenth programme report of the UNDP/ World Bank/ WHO Special Programme for Research and Training Diseases- Geneva. 1997. cap. 5, p. 62-73.

World health Organization The control of schistosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series 728. WHO, Geneva, 113 pp. 1985.

Yang, Ziping & Hancock Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *Journal of Chromatography A*, 1053 79-88 2004.

Yates, J. R., III. 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.* 33:1-19.

GT- esquistossomose/CGVEP/CDTV/CENEPI/FUNASA/MS

http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_ESQUI05.htm

<http://www.magnet.fsu.edu/education>

www.dia.unisa.it; www.proteomicsnijmegen