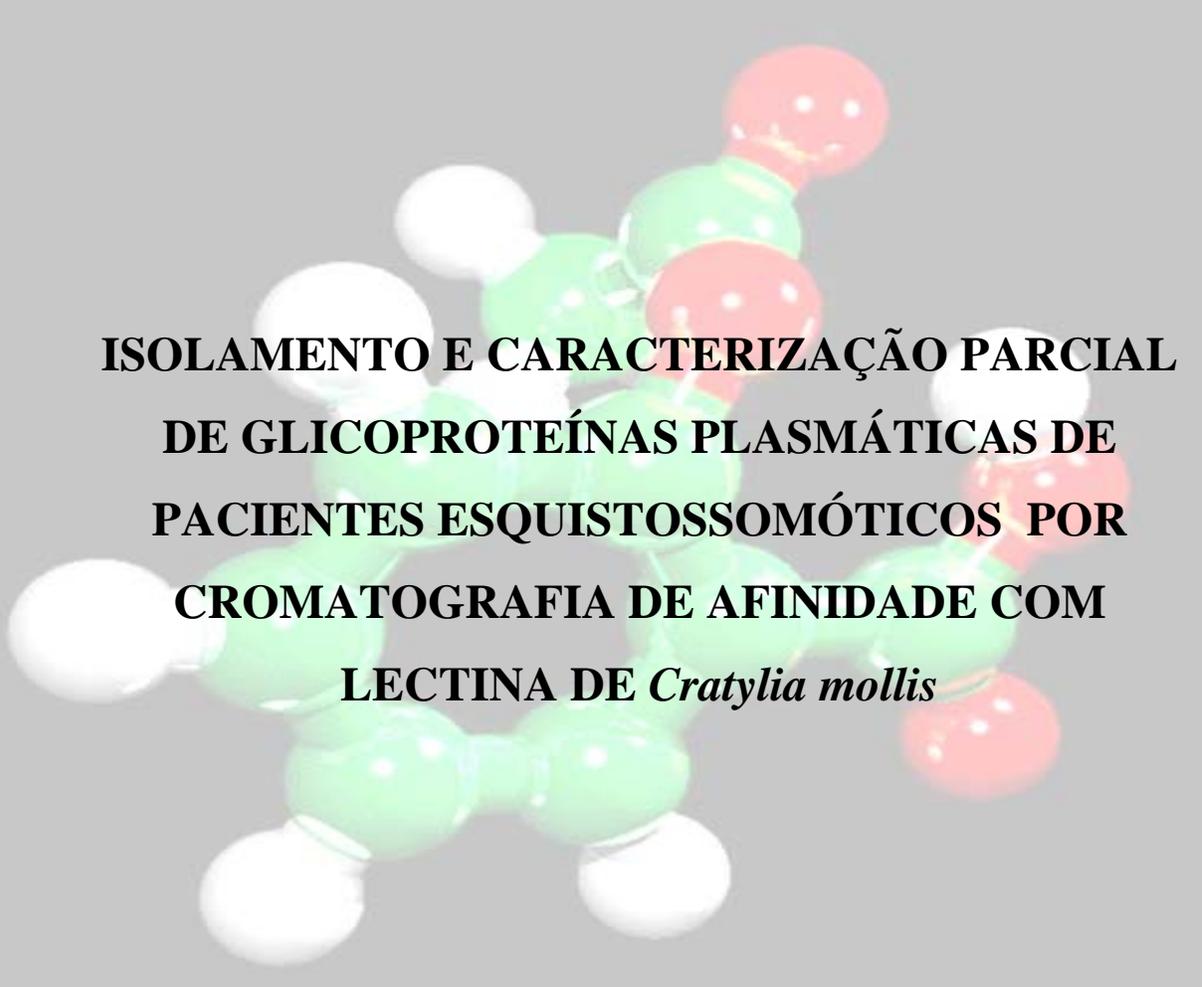


Cláudio Ângelo Ventura



**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DE GLICOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE
PACIENTES ESQUISTOSSOMÓTICOS POR
CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM
LECTINA DE *Cratylia mollis***

Recife, 2001

Cláudio Ângelo Ventura

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DE GLICOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE
PACIENTES ESQUISTOSSOMÓTICOS POR
CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM
LECTINA DE *Cratylia mollis***

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima, B.Sc., M.Sc., Ph.D.

Recife, 2001

Este trabalho, dedico aos meus pais, Maria Lena e Elias Ventura.

Agradecimentos

A Deus, por me conceder mais uma conquista.

A meus pais, Maria Lena e Elias Ventura, pelo apoio constante.

A Vera Lúcia de Menezes Lima, professora doutora do Departamento de Bioquímica – UFPE, responsável pela orientação científica desse projeto.

A Lúcia Coutinho, Médica do Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas – HC/UFPE, pela ajuda na seleção dos pacientes esquistossomóticos.

A Maria Tereza dos Santos Correia, professora doutora do Departamento de Bioquímica – UFPE, por ter concedido as preparações de lectina de *Cratylia mollis*.

A Rayckson J. L. da Fonsêca, pelo companheirismo e ajuda prestada durante toda a realização desse projeto.

A Michelle Rabello, aluna de iniciação científica do departamento de Bioquímica - UFPE, e a Vera Cristina de Oliveira, professora do Departamento de Bioquímica – UFPE, pela ajuda na execução de algumas técnicas.

A Schirley Nóbrega e César Augusto, mestrandos do Departamento de Bioquímica – UFPE, pela amizade e ajuda durante a etapa final desse projeto.

A Luana C. B. B. Coelho, professora doutora do Departamento de Bioquímica – UFPE, pela colaboração científica.

A Neide Fernandes, secretária do departamento de Bioquímica – UFPE, pela sua gentileza e por sua boa vontade de sempre estar disposta a ajudar

SUMÁRIO

Agradecimentos	IV
Sumário	V
Lista de Figuras	VII
Lista de Tabelas	IX
Lista de Abreviaturas	X
Resumo	XI
1.0-Introdução	01
2.0 - Objetivos	12
2.1 - Geral	12
2.2 - Específicos	12
3.0 - Metodologia	13
3.1 - Seleção de pacientes e controles	13
3.2 - Obtenção das Amostras Plasmáticas	14
3.3 - Diálise	14
3.4 - Dosagem de Proteínas Plasmáticas Totais	14
3.5 - Precipitação das Lipoproteínas de muito baixa densidade e de baixa densidade	15
3.6 - Imobilização da lectina de <i>Cratylia mollis</i> à Sepharose - 4B ativada com brometo de cianogênio (CNBr)	15
3.7 - Preparação das Colunas de Cromatografia por Afinidade	16
3.8 - Isolamento das Glicoproteínas	16
3.9 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) de Proteínas Desnaturadas e Reduzidas	17
3.10 - Dot Blotting	18
4.0 – Resultados	20
4.1- Determinação da Concentração das Proteínas Plasmáticas Totais	20
4.2 - Precipitação de LDL e VLDL	21
4.3 - Imobilização das Isoformas de lectina de <i>Cratylia mollis</i>	22
4.4 - Perfil de Eluição na Coluna de Cromatografia de Con A	22
4.5 - Perfil de Eluição na Coluna de Cromatografia de Cra	23
4.6 - Determinação da Concentração das glicoproteínas isoladas da coluna de Cra-Sephadex	24
4.7 - Influência da Temperatura no Tempo de Eluição nas Colunas de cromatografia de Cra e Con A	25
4.8 - Dot blotting com anticorpos Anti-LCAT e Cra-peroxidase	26

4.9 - SDS - PAGE das glicoproteínas isoladas pela coluna de Cra	27
4.10 - SDS - PAGE das glicoproteínas isoladas pela coluna de ConA	29
5.0 – Discussão	30
6.0 – Conclusões	38
7.0 - Referências Bibliográficas	39
Anexos	

Lista de Figuras

Figura 01 - Esquema do processo de formação da cadeia oligossacarídica inicial comum a maioria das glicoproteínas plasmáticas N-ligadas	03
Figura 02 – Estrutura primária típica de oligossacarídeos N-ligados	04
Figura 03 - Concentração protéica plasmática nas diferentes formas clínicas da esquistossomose mansônica	20
Figura 04 – Representação gráfica da massa lipoprotéica (VLDL e LDL) precipitadas nas diferentes formas da esquistossomose mansônica	21
Figura 05 – Eficiência na imobilização da lectina de <i>Cratylia mollis</i> à Sepharose-4B	22
Figura 06 - Perfil de eluição na coluna de Con A-sepharose das glicoproteínas isoladas das diferentes fases da Esquistossomose mansônica	23
Figura 07 - Perfil de eluição na coluna de Cra-Sepharose das glicoproteínas isoladas das diferentes fases da Esquistossomose mansônica.	24
Figura 08. Concentrações de glicoproteínas ligadas às colunas de Cra e Con A	25
Figura 09 - Influência da temperatura no tempo de eluição das proteínas ligadas as colunas de Con A-Sepharose e Cra-Sepharose	26
Figura 10 - Dot blotting das glicoproteínas purificadas das colunas de Cra e Con A	27
Figura 11 – Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10 % das glicoproteínas isoladas pela coluna de Cra-Sepharose nas diferentes formas clínicas da esquistossomose mansônica	28

Figura 12 – Gel de eletroforese SDS-PAGE a 10 % das glicoproteínas isoladas pela coluna de Con A-Sepharose nas diferentes formas clínicas da esquistossomose mansônica 29

Lista de Tabelas

Tabela 01 – Composição de carboidratos das principais glicoproteínas plasmática avaliadas em doenças	07
Tabela 02 – Sumário de algumas lectinas que são comumente imobilizadas em colunas de cromatografia para o estudo de glicoconjugados e seus respectivos carboidratos utilizados no processo de eluição	10

Lista de abreviaturas

APS – Persulfato de amônio

Con A – lectina de *Canavalia ensiformes*, concanavalina A

Cra – Lectina de sementes de *Cratylia mollis*

EDTA – Ácido etileno diaminotetraácetico

HI – Hepatointestinal

HEC – Hepatoesplênico Compensado

HED – Hepatoesplênico Descompensado

HRP – do inglês, “*Horseradish peroxidase*”

LCAT – Lecitina colesterol acil transferase

P - Proteína

SDS – Sulfato sódico de dodecila

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila

TBS – Tampão fosfato de sódio em NaCl

TBS-T - Tampão fosfato de sódio em NaCl contendo Tween

TEMED – N,N,N',N' - Tetrametilenodiamino

TRIS – Tri-(hidroximetil)-aminometano

Resumo

Lectinas são moléculas que possuem a capacidade de reconhecer carboidratos específicos e têm sido bastante utilizadas em importantes técnicas laboratoriais. Lectinas imobilizadas são utilizadas para estudo de glicoconjugados através da cromatografia de afinidade. O isolamento de glicoproteínas através dessa técnica e a avaliação de seu poder de ligação a várias lectinas tem fornecido informações importantes a respeito de suas cadeias oligossacarídicas e das suas possíveis modificações. Patologias como câncer, processos inflamatórios e doenças hepáticas têm sido relacionadas com alterações da porção carboidrato. O presente estudo tem como objetivo avaliar a capacidade da lectina de sementes de *Cratylia mollis* (cra) e a Concanavalina A (Con A) em isolar glicoproteínas plasmática de pacientes com esquistossomose mansônica, uma doença hepática inflamatória, nas diferentes fases clínica da doença: hepato-intestinal (HI), hepatoesplênica compensada (HEC) e hepatoesplênica descompensada (HED).

Cra e Con A foram hábeis no isolamento de glicoproteínas plasmáticas de pacientes esquistossomóticos nas diferentes formas clínicas. O processo cromatográfico realizado a 4 °C demonstrou uma maior capacidade dessas lectinas em adsorver glicoproteínas quando comparado ao realizado a temperatura ambiente (27 °C). Um aumento na reatividade de glicoproteínas foi observada para os pacientes nas fases HED e HEC. As glicoproteínas caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila, sob condições desnaturantes e redutoras, determinaram padrões diferentes das formas HEC e HED onde o surgimento de bandas protéicas e outras bandas mais coradas definiram a diferença em relação aos indivíduos controles e hepato-intestinal.

1.0 – Introdução

As glicoproteínas ocorrem em todas as formas de vida e sua importância torna-se mais evidente quando analisamos o seu amplo espectro de funções, incluindo proteínas de transporte, estruturais (Devlin, 1998), enzimas (Collet & Fielding, 1991), hormônios (Dufau *et al.*, 1972; Stuart *et al.*, 1981) e proteínas de defesa como as imunoglobulinas (Roitt *et al.*, 1999). O papel preciso que o conteúdo de carboidratos exerce nas glicoproteínas ainda é pouco compreendido. Estudos realizados com inibidores da N-glicosilação, como a tunicamicina, e o uso de glicosidases comprovam a importância dos carboidratos nos processos de secreção, estabilidade da molécula (Collet & Fielding, 1991) e interação célula-célula (Feizi, 1985). As porções carboidrato das glicoproteínas podem atuar, inclusive, como receptores para adesinas, proteínas bacterianas, que se ligam especificamente à porção carboidrato de glicoproteínas de células epiteliais do trato urinário, causando infecções (Kuehn *et al.*, 1992).

A glicosilação de proteínas é a modificação pós-tradução mais frequente, superando todos os outros processos pós-tradução juntos (Lodish, 1988). O componente polipeptídico é codificado geneticamente e processado enzimaticamente pela adição e modificação de oligossacarídeos. A porção oligossacarídica das glicoproteínas é classificada em dois grupos principais, de acordo com o tipo de ligação glicosídica. Os oligossacarídeos N-ligados são unidos à cadeia polipeptídica através de uma ligação β -N-glicosídica a um resíduo de asparagina. O outro grupo é das glicoproteínas com oligossacarídeos O-ligados a resíduos de serina, treonina ou 5-hidroxilisina através de ligações do tipo α -O-glicosídica (Lodish *et al.*, 1995). A maioria das

proteínas plasmáticas está associada covalentemente a cadeias oligossacarídicas ou unidades de açúcares constituindo as glicoproteínas (Voet *et al.*, 1998). A maior parte das proteínas plasmáticas possui um ou mais açúcares N-ligados. O conteúdo de carboidratos nas glicoproteínas é bastante variável e pode representar de 1 - 90% do seu peso molecular (Voet *et al.*, 1998). A glicoproteína α_1 ácida, proteína plasmática sintetizada pelo fígado, possui 45% da sua massa molecular atribuída a oligossacarídeos ou açúcares da sua composição (Turner, 1992). A enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), uma glicoproteína sintetizada por células hepáticas, responsável pela esterificação do colesterol no plasma (Glomset, 1968), possui 25% de carboidrato no seu peso molecular de 66.000 (Collet & Fielding, 1991; Hill *et al.*, 1993). Entretanto, uma quantidade muito menor de carboidrato é encontrada na imunoglobulina G (IgG), a qual possui apenas 3% de seu peso composto por açúcar (Roitt *et al.*, 1999). Como exemplo de proteínas plasmáticas não glicosiladas, podemos citar a albumina que representa aproximadamente 50% das proteínas totais plasmáticas (6 a 8 g.dL⁻¹).

A síntese das glicoproteínas N-ligadas requer inicialmente um intermediário lipídico, o dolicol fosfato, o qual encontra-se ancorado na superfície do retículo endoplasmático rugoso (RER) e serve como um acceptor de N-acetilglicosamina (GlcNAc). Resíduos de manose são adicionados a GlcNAc-fosforildolicol, sintetizado anteriormente, formando o complexo (Man)₅(GlcNAc)₂-pirofosforildolicol no lado citoplasmático da membrana do RER. Esse intermediário é reorientado para o lúmen do RER onde quatro manoses e três resíduos de glicose são seqüencialmente acrescentados para completar a estrutura. É, portanto, formada uma cadeia comum para as glicoproteínas N-ligadas que é, então, transferida para a serina existente na seqüência Asn-X-Ser/Thr no polipeptídeo em processamento (Devlin, 1998).

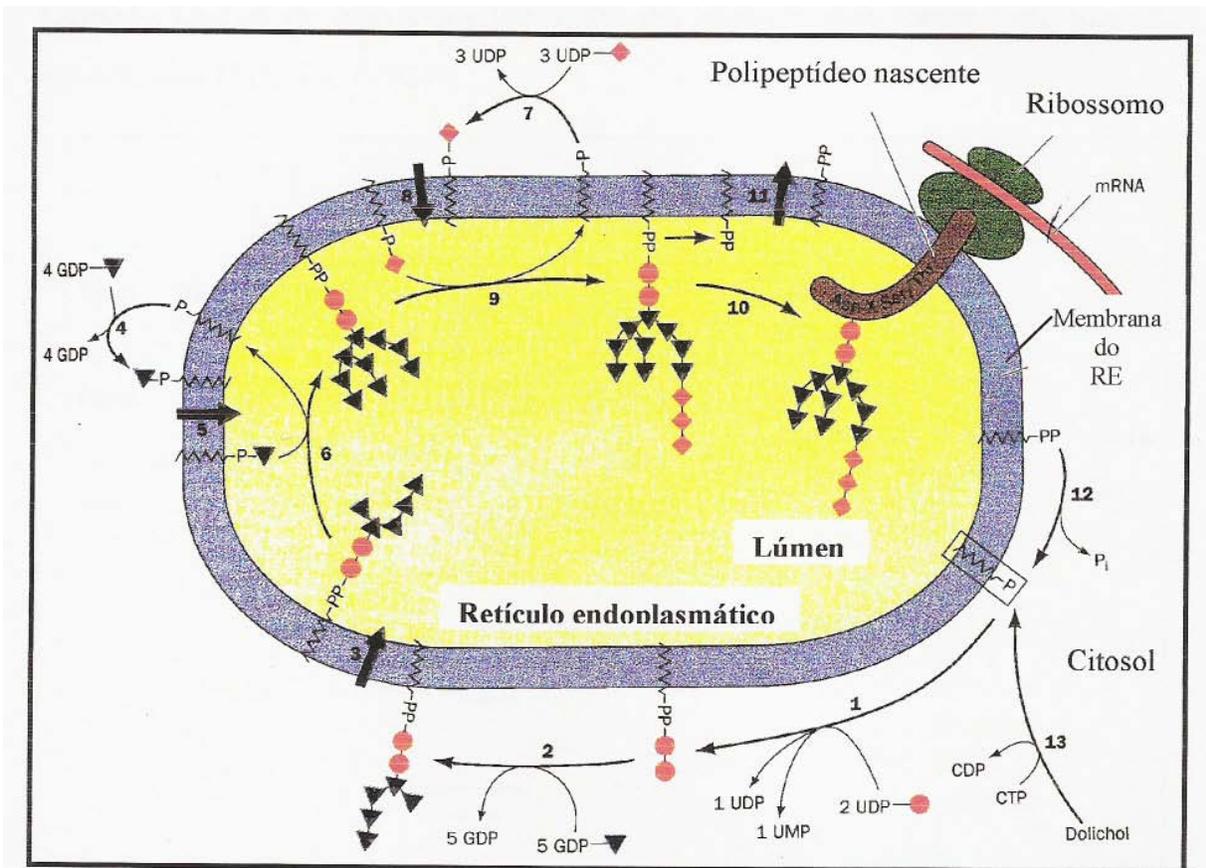


Figura 01- Esquema do processo de formação da cadeia oligossacarídica inicial comum à maioria das glicoproteínas plasmáticas N-ligadas. (●), N-acetilglicosamina; (▲), manose; (♦), glicose (Voet, 1995).

As modificações dos oligossacarídeos por glicosidases envolvem a remoção de três resíduos de glicose e um de manose e essa etapa parece ser o ponto chave do transporte para o complexo de golgi onde ocorrem modificações até sua posterior secreção através de vesículas (Lodish, 1988). Os oligossacarídeos resultantes da atuação das diversas glicosiltransferases e glicosidases são muito diversos, mas três tipos principais podem ser destacados na Figura 02: a) o tipo alta manose, com nove resíduos de manose; b) o tipo complexo, no qual resíduos de manose são ligados a GlcNAc; c) o tipo híbrido,

formado a partir de oligossacarídeos de alta manose que foram parcialmente processados (Fukuda, 1994).

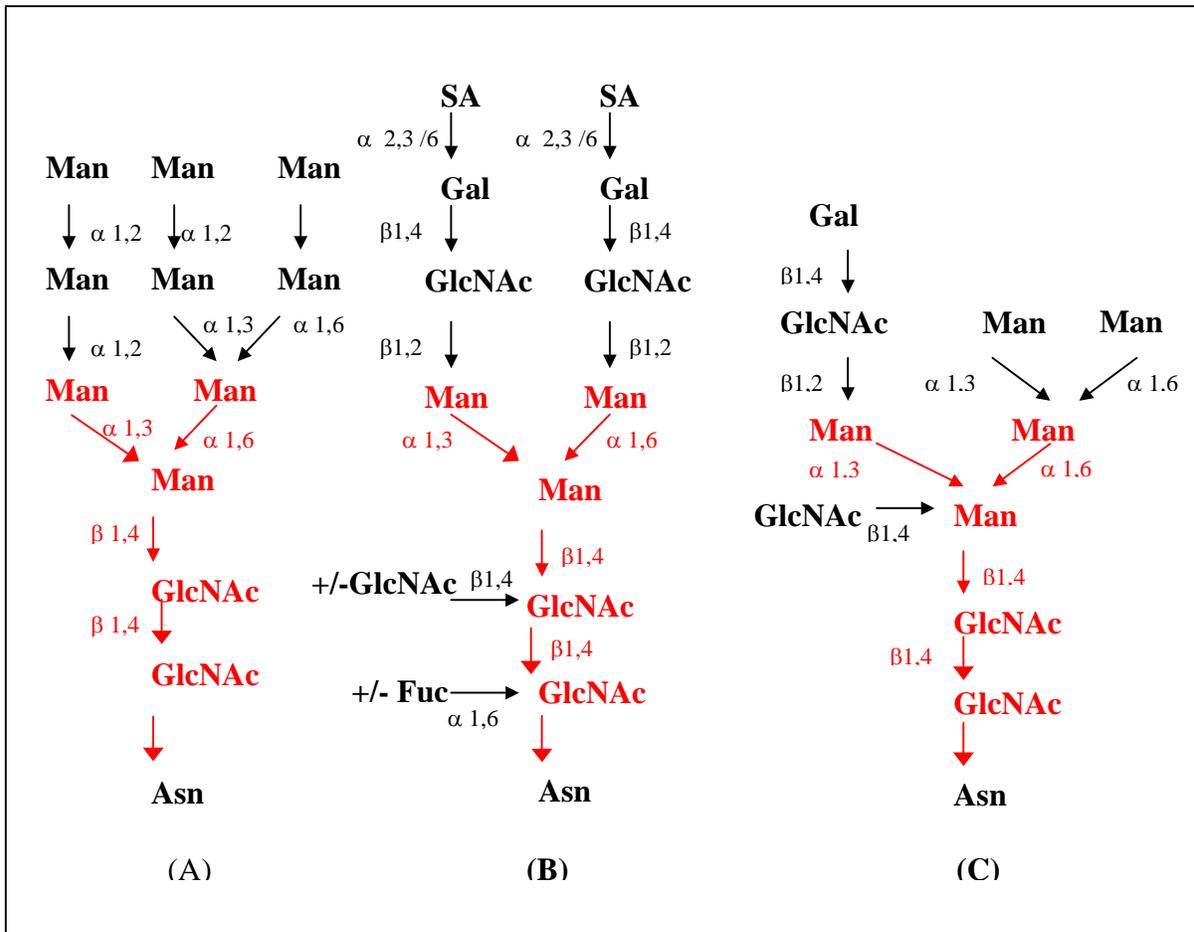


Figura 02 - Estrutura primária típica de oligossacarídeos N-ligados. (A) Alta manose; (B) Complexo; (C) Híbrido (Voet e Voet, 1995).

Há algumas décadas existe a tentativa de correlacionar a modificação da concentração e/ou surgimento de componentes no plasma humano com doenças. O aumento da concentração de uma macromolécula pode constituir potente marcador biológico de determinada patologia (Stimson, 1975).

Antígeno carcinoma embrionário, coriogonadotropina humana e α -macroglobulina são exemplos de marcadores que refletem patologias como câncer de mama; entretanto, a α -macroglobulina está associada também a gravidez (Tormey *et al.*, 1975). Pacientes com câncer de mama apresentam

aumentadas concentrações de glicoproteínas (MacBeth *et al.*, 1962; Silverman *et al.*, 1977; Dermer *et al.*, 1980), mas mudanças similares acontecem também em processos degenerativos, traumáticos ou inflamatórios (Greenspan, 1954). Análises densitométricas da eletroforese em acetato de celulose do soro de pacientes com doenças proliferativas benignas (fibroadenoma) e malignas (pré e pós-operatória) revelam padrões eletroforéticos distintos. O surgimento de uma banda entre as regiões α_2 e β globulinas foi um achado comum e que caracterizou os casos malignos estudados de adenocarcinoma. Esse mesmo perfil foi obtido para análise do meio de cultura das células mamárias cancerosas (Dermer *et al.*, 1980).

A artrite reumatóide, uma doença inflamatória crônica, sistêmica e autoimune, possui seu fator antigênico localizado na fração Fc da imunoglobulina G, IgG (Dorner *et al.*, 1987). Nesses pacientes as cadeias oligossacarídicas N-ligadas da IgG diferem dos controles em relação ao nível de galactose os quais apresentam-se diminuídos (Parekh *et al.*, 1985). A indução da produção dos fatores reumatóides pelo organismo tem sido atribuída a essa diferença (Parkkinen, 1989).

Em doenças hepáticas como hepatites ativas crônicas, cirroses, carcinoma hepatocelular primário ou com metástase, a glicoproteína α -fetoproteína possui sua concentração aumentada, mas nenhum diagnóstico diferencial quantitativo pode ser estabelecido para diferenciação entre essas diversas formas de injúrias hepáticas (Buamah *et al.*, 1984).

Isoformas protéicas, ou seja, microheterogeneidade das proteínas, especialmente as glicoproteínas, são comuns e podem estar presentes no plasma em condições normais e em doenças (Altland *et al.*, 1982; Buamah *et al.*, 1986; Silvestrini, 1989; Stibler, 1991; Henry *et al.*, 1999). Isoformas da enzima fosfatase alcalina é dependem do local de síntese (por exemplo: intestino,

placenta, osso) sob codificação de locus genético separado que diferem apenas por seus padrões de glicosilação (Schiele *et al.*, 1983). Entretanto, modificações pós-tradução podem gerar outras isoformas em consequência de doenças hepáticas e ósseas (Crofton, 1992).

O uso abusivo do álcool exibe diversas alterações químico-clínicas, algumas das quais vêm sendo usadas como marcadores do alcoolismo (Stibler, 1991; Henry *et al.*, 1999). A glicoproteína plasmática transferrina constitui potente marcador devido à sua sensibilidade e especificidade (Vesterberg *et al.*, 1984). A caracterização de isoformas anormais de transferrina demonstra que são deficientes em vários níveis dos trissacarídeos terminais, fato consistente com o consumo regular do álcool e cujo padrão é totalmente reversível durante a abstinência do álcool (Stibler, 1991). A estrutura dos carboidratos da transferrina em doenças hepáticas malignas tem sido avaliada e foi observado maior ramificação das cadeias carboidrato com grande aumento de fucose (Yamashita *et al.*, 1989). Mudanças significativas também são observadas na glicoproteína α_1 ácida em doenças hepáticas com aumento da quantidade de ácido siálico (Bordas *et al.*, 1982; Serbouce-Goguel *et al.*, 1983) e fucose (Biou *et al.*, 1989); nos processos inflamatórios é também bastante analisada devido à sua modificação, sendo de acordo com o tipo de doença analisada ou à fase da doença; muitos desses testes são avaliados através da reatividade dessa glicoproteína com lectinas. Intensa modificação no padrão de glicosilação das proteínas de fase aguda também são observadas em pacientes com sarcoidose ativa, caracterizada pelo aumento de glicose. Essa modificação interfere na função e atividade biológica dessas proteínas afetando negativamente na sua ação sob a modulação proliferativa de linfócitos (Hrycaj *et al.*, 1996).

Em pacientes diabéticos foi observada a presença de altas concentrações de glicoproteínas de fase aguda anormalmente fucosiladas (McMillan, 1972). As causas de anormalidades no mecanismo de glicosilação protéica é de difícil entendimento. Estudos recentes demonstraram não haver influência da insulina e do aumento da concentração de açúcar (glicose) no processo de fucosilação de proteínas plasmáticas de pacientes diabéticos (Wiese *et al.*, 1997).

Proteína	Carboidrato (% p/p)	Unidades oligossacarídicas
Glicoproteína α_1 -ácida	45	5
α_1 -antitripsina	27	4
Haptoglobina	16	8
α_1 -antitripsina	13	3
Transferrina	7	2
Ceruloplasmina	7	4
α -fetoproteína	4	1
Imunoglobulina G	3	2

Tabela 01 – Composição de carboidratos das principais glicoproteínas plasmáticas avaliadas em doenças (Turner, 1992).

A pesquisa visando identificação e caracterização de glicoproteínas sempre constituiu alvo de muito interesse, devido ao seu amplo espectro de funções.

Muitos dos estudos iniciais de glicoproteínas plasmáticas em doenças baseavam-se na separação das proteínas plasmáticas através de eletroforese em acetato de celulose com posterior coloração com ácido periódico

de Schiff, e análise densitométrica das bandas protéicas (Silverman *et al.*, 1977; Dermer *et al.*, 1980).

Os métodos cromatográficos surgiram como uma forma mais rápida e precisa de análise. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada, a cromatografia de afinidade tomou lugar especial entre os métodos e pode ser definida como uma técnica a qual faz uso de interações biológicas para separação e análise de componentes de uma amostra. É de grande utilidade entre o grupo de técnicas em laboratórios clínicos modernos e para a ciência farmacêutica e biotecnologia. As interações biológicas que ocorrem nas técnicas cromatográficas incluem a ligação entre enzima e inibidor ou anticorpo com antígeno, por exemplo. Tais processos fazem uso, portanto, de um agente ligante que interage seletivamente com o analito desejado (Hage, 1999). A interação do analito desejado e o ligante acontecem mais eficientemente sob condições que simulem o ambiente natural das moléculas envolvidas. Essas condições, em geral, resumem-se ao pH e à força iônica na qual está sendo realizado o procedimento (Hage, 1998).

Na cromatografia por afinidade a amostra é aplicada na coluna e após retirado o material que não interagiu com o ligante segue-se um tampão de eluição para dissociar o analito adsorvido; esse procedimento envolve mudança do pH, na composição do tampão da fase móvel, ou adição de um agente que compete com o analito (Mayer, 1983).

Uma das classes de ligantes que vem sendo explorada na cromatografia de afinidade são as lectinas, as quais são proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um sítio de ligação a carboidratos sem apresentar função catalítica nem características estruturais imunológicas (Grubhoffer *et al.*, 1997). A forma pela qual ocorre a interação lectina-carboidrato é complexa e acredita-se que sejam interações fracas semelhantes ao

modelo de ajuste induzido anteriormente proposto para ligação enzima-substrato (Maciel, 1996).

A distribuição de lectinas é muito ampla e pode ocorrer em animais, nos quais podem ser determinantes de reconhecimento em processos imunológicos (Grubhofer, 1997), endocitose, adesão celular (Stryer, 1996), entre outros. Em vegetais, as lectinas atuam mediando simbiose entre plantas e microrganismos (Diaz *et al.*, 1989), contra ataques fitopatógenos (Broekaert *et al.*, 1989), além de outras funções.

Lectinas puras são bastante utilizadas como ligantes em cromatografias de afinidade e têm recebido atenção particular devido à sua potencial aplicação para análises laboratoriais e clínicas (Sarkar *et al.*, 1991). Elas são imobilizadas em suportes inertes e usadas para isolamento de compostos que contêm carboidratos, tais como glicoproteínas e glicolipídeos (Buamh *et al.*, 1986; Parkkinen, 1989; Torres & Smith, 1988; Lima *et al.*, 1997). A cromatografia de afinidade tem sido muito útil nos processos de purificação parcial de glicoproteínas, como enzimas (Lima *et al.*, 1997; Gioannini *et al.*, 1982), isoenzimas (Gonchroff *et al.*, 1989) e, inclusive para purificar glicoproteínas do tegumento de parasitas como *Schistosoma mansoni* (Hayunga *et al.*, 1986). Os procedimentos para isolamento e caracterização de glicoproteínas por cromatografia de afinidade com lectinas sempre estão associados a outras técnicas, como por exemplo, a eletroforese utilizando padrões protéicos, bem como por interação das glicoproteínas com anticorpos específicos através da técnica conhecida como “Western blotting” (Silvestrini *et al.*, 1989; Stibler, 1991).

Uma grande variedade de glicoproteínas tem sido estudada através de diversos métodos que empregam lectinas (Atland, 1989; Pitkänen *et al.*, 1984; Gravel *et al.*, 1996), os quais avaliam a microheterogeneidade de glicoproteínas

observadas em doenças do fígado, processos inflamatórios e câncer (Henry *et al.*,1997). A eletroforese de afinidade utilizando a lectina de *Concanavalina ensiformes*, Concanavalina A (Con A) tem sido usada para análise de microheterogeneidade de glicoproteínas de fase aguda em pacientes com sarcoidose pulmonar onde se observa uma diminuição da reatividade das glicoproteínas a essa lectina (Hrycaj *et al.*, 1996). A reatividade da IgG em soro de pacientes com artrite reumatóide pode ser avaliada utilizando ensaios imunofluorimétricos com lectinas de *Ricinus communis* (Parkkinen, 1989).

A cromatografia de afinidade é um dos métodos práticos para a avaliação de glicoproteínas plasmáticas, bem como para avaliar mudanças na glicosilação protéica. Possui muitas aplicações no estudo do câncer, doenças inflamatórias, entre outras (Thompson *et al.*, 1987).

lectina	Carboidrato de maior especificidade
Sementes de <i>Cratylia mollis</i> (Cra)	α - metil-manosídeo/ α - metil-glicosídeo
Concavalina A	α - metil-manosídeo
<i>Lens culinaris</i> aglutinina	α - metil-manosídeo
<i>Ricinus communis</i> aglutinina (RCA – 60))	N-acetilgalactosamina (GalNAc)
<i>Ricinus communis</i> aglutinina (RCA - 120)	Galactose (Gal)
Aglutinina de gérmen de trigo (WGA)	N-acetilglicosamina (GlcNAc)

Tabela 02 – Sumário de algumas lectinas que são comumente imobilizadas em colunas de cromatografia para o estudo de glicoconjugados e seus respectivos açúcares utilizados no processo de eluição.

Doenças inflamatórias como a esquistossomose mansônica, a qual possui patogenicidade comprometedora sob o sistema hepático, tem motivado o desenvolvimento de estudos em Universidades e Centros de Pesquisa (Hall *et al.*, 1995; Khoo *et al.*, 1995; Costa-Cruz *et al.*, 1994; Pereira *et al.*,

1993). A hepatopatia é sem dúvida a principal lesão da esquistossomose, caracterizada pela reação inflamatória ao ovo e, às vezes, ao verme morto que se aloja nos ramos portais intra-hepáticos desenvolvendo o granuloma e a fibrose periportal descrita por Symmers (1904), achado esse patognomônico da esquistossomose mansônica (Frumento, 1974; Vezozzo *et al.*, 1992). O grau de fibrose periportal, avaliada pela ultrassonografia, correlaciona-se diretamente com a gravidade da doença caracterizada pela esplenomegalia, aumento dos diâmetros das veias porta e esplênica, hipertensão portal e hemorragia digestiva (Davidson *et al.*, 1991; Shibayama, 1990).

Finalmente, é importante acrescentar que a infecção por *Schistosoma mansoni* é comum no Nordeste do Brasil. Trabalhos realizados por Lima *et al.* (1997), no Laboratório de Química e Metabolismo de Lipídeos e Lipoproteínas-UFPE, com pacientes portadores de esquistossomose mansônica na fase hepatoesplênica compensada e descompensada, utilizando cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e focalização isoelétrica, demonstraram a presença de isoformas anormais da LCAT. Como descrito anteriormente, foram encontradas alterações em glicoproteínas nos processos inflamatórios (Thompson *et al.*, 1987; Turner, 1992; Silverman *et al.*, 1977; Dermer *et al.*, 1980). Contudo, até a presente data não existe nenhum relato na bibliografia nacional e internacional referente à avaliação do perfil de glicoproteínas plasmáticas de pacientes portadores de esquistossomose mansônica.

2.0 - Objetivos:

2.1 – Geral:

- Isolar e caracterizar glicoproteínas de indivíduos portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica.

2.2 – Específicos:

- Imobilizar a Cra em Sepharose-CL-4B e preparar colunas cromatográficas.
- Verificar a habilidade da coluna de Cra - Sepharose em isolar glicoproteínas plasmáticas de pacientes portadores de esquistossomose mansônica nas diferentes formas clínicas.
- Identificar o perfil cromatográfico das glicoproteínas isoladas de plasma de pacientes esquistossomóticos pela coluna de Cra-Sepharose e comparar com o perfil obtido de indivíduos aparentemente saudáveis.
- Caracterizar parcialmente as glicoproteínas de pacientes esquistossomóticos isoladas pela Cra-Sepharose.

3.0 – Metodologia

3.1 - Seleção de pacientes e controles:

O projeto para desenvolvimento dessa pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e do Hospital das Clínicas - UFPE.

Os pacientes, na sua totalidade oriundos das cidades do interior de Pernambuco, foram selecionados no Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas-UFPE com diagnóstico confirmado de esquistossomose hepatoesplênica nas diferentes formas clínicas. Para seleção, foram excluídos todos os pacientes com história de alcoolismo, cirrose hepática, vírus para hepatites ou qualquer patologia de comprometimento hepático e cardíaco, além de processos inflamatórios. Todos os pacientes foram consultados se desejariam participar deste estudo e em caso afirmativo houve, então, a assinatura do termo de consentimento (Anexo I).

O grupo controle foi constituído por funcionários, professores, alunos e estagiários do Departamento de Bioquímica da UFPE, de ambos os sexos que não apresentavam história de problemas hepáticos assim como nenhuma doença infecciosa.

Todos as informações adicionais e necessárias para o estudo foram obtidas mediante respostas a um questionário (Anexo II).

3.2 - Obtenção das Amostras Plasmáticas

As amostras de sangue, aproximadamente 20 mL, de pacientes e controles em jejum de 12 h, foram coletadas por punção venosa periférica e anticoaguladas com EDTA (1 mg/mL). Para obtenção do plasma, as amostras sanguíneas foram centrifugadas a 2000 x g por 30 min, a 4 °C. O plasma obtido foi dialisado em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4.

3.3 – Diálise

Todos os processos de diálise realizados neste trabalho foram feitos utilizando membrana Dialysis Tub. (12-14.000 / VISKAGE CORPORATION). As amostras eram colocadas em sacos confeccionados com as membranas e dialisados em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4), por 16 h seguidas de três trocas sucessivas de 500 mL a cada 3 h.

3.4 – Dosagem de Proteínas Plasmáticas Totais

A quantificação das proteínas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951). A 0,2 mL das amostras plasmáticas, convenientemente diluídas, foi adicionado 1 mL de uma solução cúprica alcalina, preparada no momento do uso, a qual é composta por 50 mL de solução de carbonato de sódio anidro 2 % (p/v) em hidróxido de sódio 0,1 % (p/v) e 1 mL de sulfato cúprico a 0,5 % (p/v) em citrato de sódio a 1 % (p/v). A mistura foi agitada e colocada em repouso por 10 min. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Merck) previamente diluído

(1:2) em água, sendo imediatamente agitado. Após 30 min, a absorvância foi medida a 720 nm em espectrofotômetro.

A concentração protéica foi determinada utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (Sigma, Fração V-98 a 99 %), com amplitude de 0–250 µg pela determinação da absorvância em espectrofotômetro.

3.5 - Precipitação das Lipoproteínas de muito baixa densidade e de baixa densidade

Às amostras plasmáticas (10 mL) foi adicionado 1 mL de fosfotungstato de sódio 4 % (p/v) e 0,25 mL de cloreto de magnésio 2 M. A mistura ficou sob agitação durante 30 min, a 4 °C. Em seguida, foi centrifugada a 2.000 x g por 30 min e o sobrenadante, plasma livre das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), foi separado e dialisado em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) e armazenado a -20 °C até o momento de uso.

3.6 - Imobilização da lectina de sementes de *Cratylia mollis* à Sepharose – 4B ativada com brometo de cianogênio (CNBr)

Sepharose – 4B ativada por brometo de cianogênio (1g) foi hidratado com 200 mL de HCl 1 mM e filtrada em filtro de vidro G3. Tanto a Sepharose-4B hidratada quanto a lectina liofilizada (6,5 mg) foram misturadas separadamente em volume de 7 mL do tampão acoplador (NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3, contendo NaCl 0,5 M). Em seguida, a solução de lectina foi misturada à suspensão do gel e colocados em agitação leve, durante a noite, a 4 °C. Após

esse período juntou-se o agente bloqueador (tampão bloqueador: glicina 0,2 M, pH 8,3) dos sítios ativos remanescentes, que foram agitados levemente durante 2 h, em temperatura ambiente. Posteriormente, a lavagem do gel foi efetuada e consistiu em uma série alternada (aproximadamente cinco vezes) com o tampão acoplador seguido de um tampão acetato 0,1 M, pH 4,0. A suspensão da lectina acoplada à Sepharose foi armazenada a 4 °C, até o momento do uso (Lima *et al.*, 1997). A lectina Concanavalina A (Con A) acoplada a Sepharose - 4B foi obtida comercialmente da Pharmacia LKB.

3.7 - Preparação das Colunas de Cromatografia por Afinidade

Foram preparadas duas colunas de cromatografia de afinidade com Cra-Sepharose e Con A-Sepharose. Aproximadamente 1 mL de lectina imobilizada foi utilizada para preparar as colunas (6,5 x 0,5 cm) as quais foram equilibradas com tampão fosfato 20 mM, pH 7,4

3.8 – Isolamento das Glicoproteínas

Usualmente, amostras de plasma livre de VLDL e LDL (1 mL) foram aplicadas às colunas e ficaram circulando, a um fluxo de 1mL/h, por aproximadamente 15 h, a 4 °C. Após esse período, o tampão fosfato (pH 7,4) foi aplicado, a um fluxo de 8 mL/h, durante cerca de 5 h, para remoção do material não bioespecificamente ligado. Em seguida, a eluição das glicoproteínas adsorvidas à lectina foi realizada pela adição dos carboidratos específicos para cada coluna (solução de α -D-metil-glicosídeo / α -D-metil-manosídeo 0,25 M

para as colunas de Cra-Sepharose e Con A-Sepharose), a um fluxo de 8 mL/h. As aliquotas (1 mL) coletadas, contendo o pico protéico identificado por leitura das absorvâncias a 280 nm, foram reunidas em uma única fração, dialisada (como descrito em 3.3) e liofilizada. Após a liofilização, as glicoproteínas isoladas foram ressuspensas em volumes de 0,5 mL e tiveram a concentração protéica determinada como descrito no item 3.4.

3.9 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) de Proteínas Desnaturadas e Reduzidas

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando minicubas e suportes (Bio - Rad) para eletroforese e placas de vidro rigorosamente lavadas e desengorduradas.

Foi preparado um gel de corrida, a 10 % (p/v), o qual consistia de uma mistura de 2,4 mL de água deionizada + 1,5 mL de tampão TRIS-HCl 1,5 M, pH 8,8 + 2 mL de uma solução de acrilamida/bisacrilamida (acrilamida 30 % e bisacrilamida 0,8 %) + 10 µL de sulfato sódico de dodecila (SDS) a 10 % + 37,5 µL de persulfato de amônio (APS) a 10 % + 5 µL de N,N,N'N'-tetrametilenodiamino (TEMED). Aproximadamente 3 mL desse gel foi aplicado à placa e, após polimerização, um gel de concentração a 5 % (p/v), consistindo de uma mistura de: 2,25 mL de água deionizada + 1,12 mL de tampão Tris-HCl a 0,25 M, pH 6,8 + 0,75 mL de acrilamida/bisacrilamida, descrita acima + 45 µL de SDS a 10 % + 45 µL de APS a 10 % + 7,5 µL de TEMED foi colocada no topo do gel contendo pente separador de espaços. O conjunto placas/gel, com os poços formados, foi ajustado à cuba contendo o tampão do eletrodo (Tris 0,05 M + glicina 0,384 M e SDS 0,1 M).

As amostras protéicas, liofilizadas, e os padrões de massa molecular foram ressuspensos em 30 μ l do tampão de amostra, o qual consiste em uma mistura de: 20 mL de SDS 10 % + 125 μ L de tampão Tris-HCl a 0,25 M, pH 6,8 + 50 μ L de β -mercaptoetanol a 5 % (v/v) + 4 μ L de azul de bromofenol 0,1 % (p/v) e 100 μ L de glicerol 10 % (v/v). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C, por 5 min, imediatamente resfriadas, aplicadas nos poços do gel e a corrida foi realizada inicialmente a 50 mA, por 20 min e posteriormente modificada para 75 mA, por 90 min, em temperatura ambiente.

Após a corrida, o gel foi colocado em uma solução fixadora (ácido tricloroacético (TCA) a 10 %) e posteriormente foi realizada a coloração para visualização das bandas protéicas com uma solução que consistia de: Coomassie Blue 0,4 % (p/v) + etanol a 25 % (v/v) + ácido acético 8 % (v/v), por 15 h, em temperatura ambiente. Para a descoloração foi utilizada a mesma solução descrita acima sem azul de Coomassie.

3.10 – *Dot Blotting*

Em membrana de nitrocelulose foram aplicados 2 μ L de plasma (66,4 mg/mL), 2 μ L de proteínas purificadas pelas colunas de cromatografia de Cra-Sepharose (5,3 mg/mL) e Con A-Sepharose (8,2 mg/mL) de paciente com esquistossomose hepatoesplênica descompensada (HED). Após a secagem, em temperatura ambiente, a membrana foi umedecida em solução tampão Tris 20 mM com NaCl a 150 mM e Thimerosal a 0,01 % (p/v), pH 7,5 (TBS), contendo 20 % de metanol, a qual foi mergulhada na solução em ângulo de 45 graus. Essa solução foi imediatamente desprezada e a membrana foi imersa na solução bloqueadora (Leite Mólico desnatado a 2 % (p/v) em TBS), em

recipiente de vidro, o qual ficou sob agitação lenta e constante durante 4 h. Após o descarte da solução bloqueadora foi realizada a incubação com anticorpo policlonal de coelho contra LCAT humana (Lima *et al.*, 1997) diluído de 1/100 em TBS contendo leite desnatado a 0,5 %, durante 16 h a 4 °C. Após a incubação realizou-se uma seqüência de 5 lavagens cada uma com a duração de 5 min com TBS-T (solução TBS mais Tween-20 a 0,05 %), pH 7,5. Posteriormente, a membrana foi incubada, durante 4 h a 4 °C, com o segundo anticorpo, IgG de cabra, anti IgG de coelho marcado com peroxidase, diluído de 1/3000 em TBS contendo leite desnatado a 0,5 % (p/v). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T (procedimento descrito acima) seguida por uma rápida lavagem com água deionizada. Com o controle negativo para essas mesmas amostras, foi realizada a incubação com IgG de coelho não imunizado que seguiu todo procedimento descrito acima. Experimento similar foi realizado com a lectina Cra ligada à peroxidase e nesse caso os passos de utilização do segundo anticorpo não foram necessários. Para todos os experimentos, foi realizada a etapa de coloração através da incubação, durante 15 min, das membranas de nitrocelulose com uma solução desenvolvedora de cor composta por uma solução A (30 mg de *horseradish peroxidase* (HRP) + 10 mL de metanol) misturada a uma solução B (50 mL de TBS + 30 µL de H₂O₂ a 30 %). As soluções de coloração foram preparadas no momento de uso e as etapas do desenvolvimento de cor foram realizadas na ausência de luz. A reação é parada pela remoção da solução desenvolvedora da coloração e lavagem da membrana com água deionizada.

4.0 - Resultados

4.1 – Determinação da Concentração das Proteínas Plasmáticas Totais

As concentrações protéicas plasmáticas determinadas através do método de Lowry *et al.* (1951), mostraram alterações nos grupos (N=10) avaliados (figura 03). Em pacientes portadores de esquistossomose na fase HI ($8,71 \pm 0,16$ g/dL) e HED ($10,09 \pm 0,42$ g/dL) houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da proteinemia em relação ao grupo controle ($6,46 \pm 0,30$ g/dL). A elevação na concentração das proteínas plasmáticas não foi significativa nos pacientes portadores de HEC ($7,40 \pm 0,09$ g/dL).

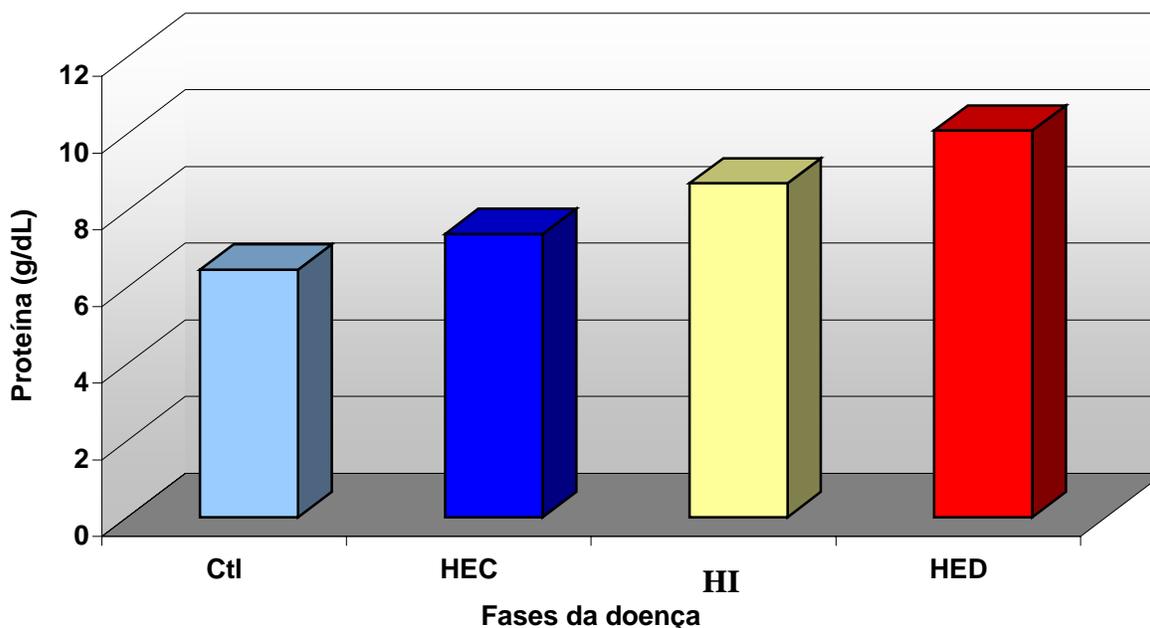


Figura 03 – Concentração protéica plasmática em pacientes com as diferentes formas clínicas da esquistossomose mansônica. Ctl, grupo controle; HI, pacientes portadores de esquistossomose hepatointestinal; HEC, portadores de esquistossomose hepatoesplênica compensada; HED, portadores de esquistossomose hepatoesplênica descompensada. Concentração protéica determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951).

4.2 – Precipitação de LDL e VLDL

A massa lipoprotéica de LDL e VLDL precipitada, obtida para as diferentes formas clínicas da esquistossomose, sofreu um aumento significativo ($p < 0,024$) em pacientes na forma HI. As LDL E VLDL precipitadas em plasma de pacientes portadores das formas hepatoesplênicas foram similares às de controles (figura 04).

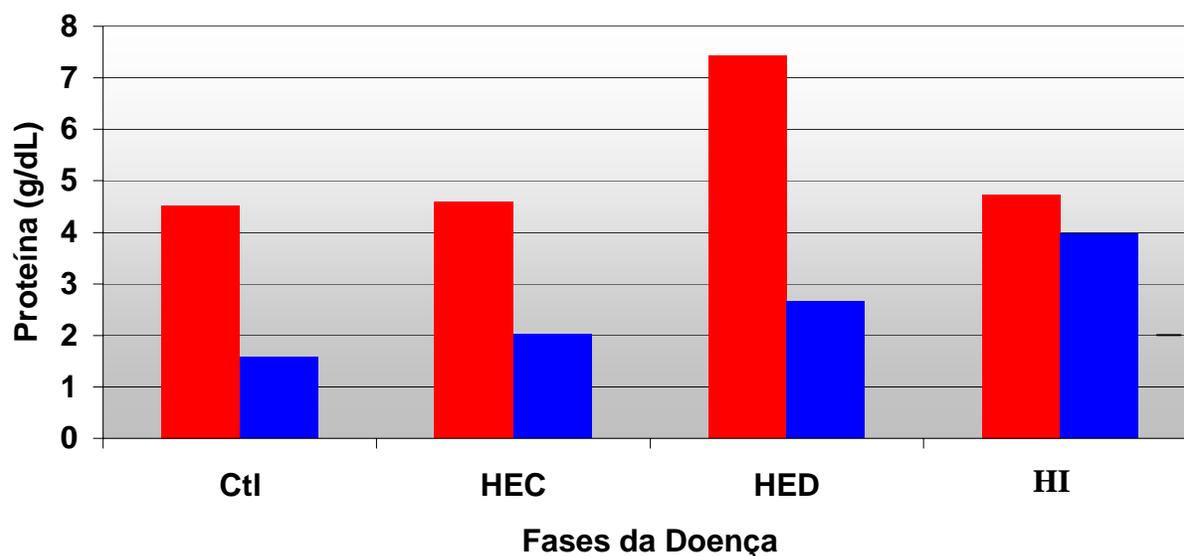


Figura 04 – Representação gráfica da massa lipoprotéica (VLDL e LDL) precipitadas nas diferentes formas da esquistossomose mansônica. Ctl, grupo controle; HI, pacientes portadores de esquistossomose hepatointestinal; HEC, portadores de esquistossomose hepatoesplênica compensada; HED, portadores de esquistossomose hepatoesplênica descompensada. (■), concentração da massa lipoprotéica precipitada; (■), concentração das proteínas plasmáticas após deslipoproteínização.

4.3 – Imobilização da lectina de sementes de *Cratylia mollis*

A imobilização ocorreu de forma satisfatória. Foram imobilizados 6,37 mg de lectina (Cra) na preparação de 3 mL de gel, correspondendo a 98 % de eficiência de acoplamento a Sepharose-4B (figura 05). A lectina Con A-Sepharose, adquirida comercialmente, continha aproximadamente 6 vezes a massa protéica presente na Cra-Sepharose.

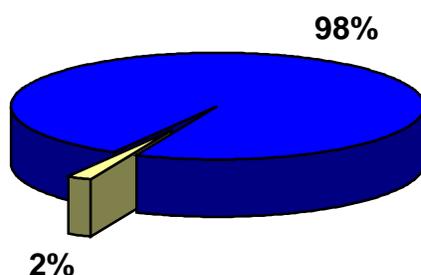


Figura 05 – Eficiência na imobilização da lectina de *Cratylia mollis* a Sepharose-4B. (■), percentual imobilizado; (■), percentual não imobilizado.

4.4 - Perfil de Eluição na Coluna de Cromatografia de Con A

A eluição das glicoproteínas ligadas à coluna de cromatografia utilizando Con A, a 4 °C, ocorreu imediatamente após aplicação do eluente (figura 06). Aproximadamente 30 mL de α -D-metil-manosídeo/ α -D-metil-glicosídeo 0,25 M foi suficiente para concluir todo o processo que determinou o pico principal para todos os indivíduos (controle e pacientes) o qual foi obtido nos primeiros 4 mL coletados. Um pico secundário foi obtido após 5 a 8 mL de eluição e um terceiro pico entre 9 e 12 mL.

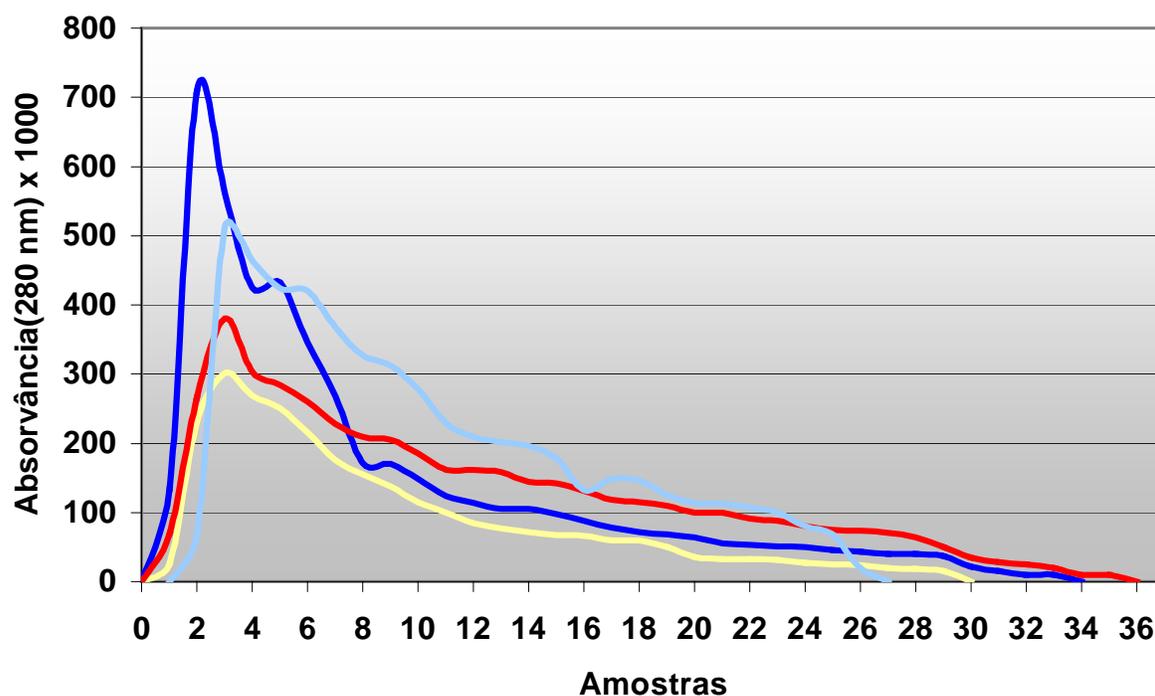


Figura 06 - Perfil de eluição na coluna de Con A-Sepharose das glicoproteínas isoladas das diferentes fases da esquistossomose mansônica. (■), HEC, portadores de esquistossomose hepatoesplênica compensada; (■), Ctl, grupo controle; (■), HED, portadores de esquistossomose hepatoesplênica descompensada; (■), HI, pacientes portadores de esquistossomose hepatointestinal.

4.5 - Perfil de Eluição na Coluna de Cromatografia de Cra

A eluição da coluna de Cra apresentou pico principal para todas as amostras analisadas nos primeiros 6 mL, perfil similar ao observado para coluna de Con A (figura 07), contudo de características mais uniformes.

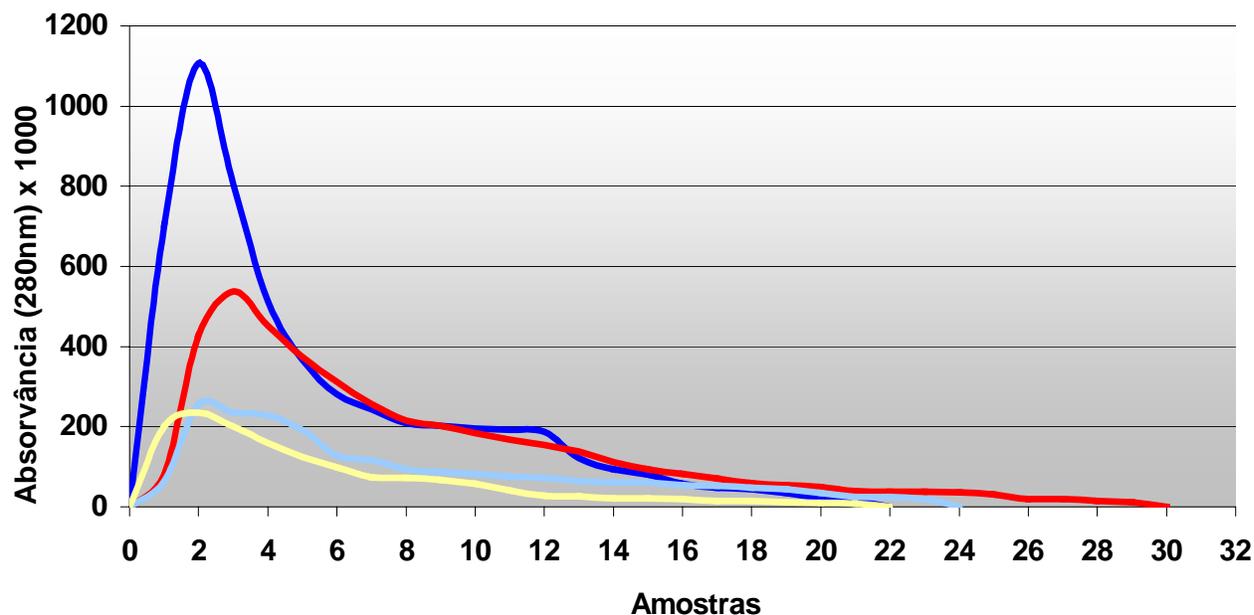


Figura 07 - Perfil de eluição na coluna de Cra-Sepharose das glicoproteínas isoladas das diferentes fases da esquistossomose mansônica. (■), HEC, portadores de esquistossomose hepatoesplênica compensada; (■), Ctl, grupo controle; (■), HED, portadores de esquistossomose hepatoesplênica descompensada; (■), HI, pacientes portadores de esquistossomose hepatointestinal.

4.6 - Determinação da concentração das glicoproteínas isoladas da coluna de Cra-Sepharose

A concentração das glicoproteínas isoladas do plasma para cada forma da esquistossomose mansônica mostra diferenças significativas. Apesar de pacientes HI apresentarem maior concentração protéica na amostra de plasma deslipoproteinizado (Figura 04) aplicado às colunas comatográficas de Con A e Cra, a concentração de proteínas ligadas a ambas as colunas foi a menor obtida (Figura 08). As maiores concentrações de glicoproteínas isoladas foram obtidas para os pacientes HEC e HED. Comparando com a concentração de

glicoproteínas isoladas pela coluna de Con A, pode-se observar que essa última isolou uma quantidade maior de glicoproteínas para todos os grupos analisados (figura 08), em relação à coluna de Cra. O material protéico ligado a coluna de Con A foi reunido em uma única alíquota devido a pouca definição para a separação dos picos.

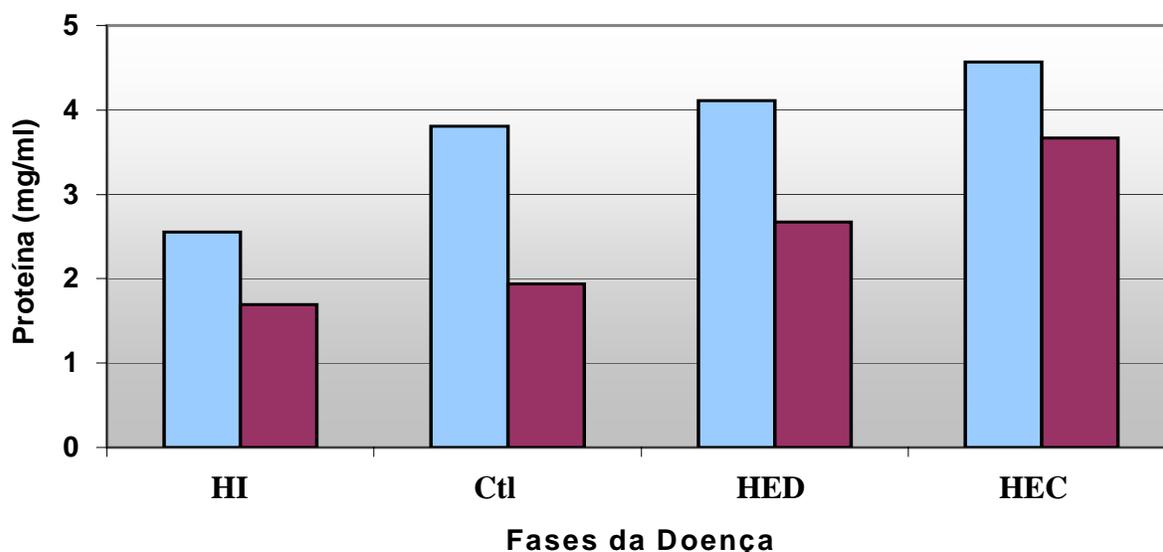


Figura 08. Concentrações de glicoproteínas ligadas às colunas de Cra (■), e Con A (■). Ctl, controles; HI, pacientes com esquistossomose mansônica hepatointestinal; HEC, pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica compensada e HED, pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica descompensada.

4.7 - Influência da Temperatura no Tempo de Eluição nas Colunas de cromatografia de Cra e Con A

Foi observada haver variação no tempo de eluição das proteínas ligada às colunas de Con A-Sepharose e Cra-Sepharose em temperatura ambiente (27 °C) e a 4 °C. Tanto as proteínas ligadas às colunas de Con A como

a de Cra tiveram seu pico total de eluição em aproximadamente 60 min, diferentemente da eluição a 4 °C, onde as proteínas ligadas a ambas as colunas necessitam do dobro do tempo (120 min) para que todo processo de eluição fosse concluído (figura 09), a um fluxo de 8 mL/h. A concentração protéica determinada para as glicoproteínas eluídas em temperatura ambiente para ambas colunas determinou uma diminuição de 43,7 % na sua capacidade de adsorver glicoproteínas.

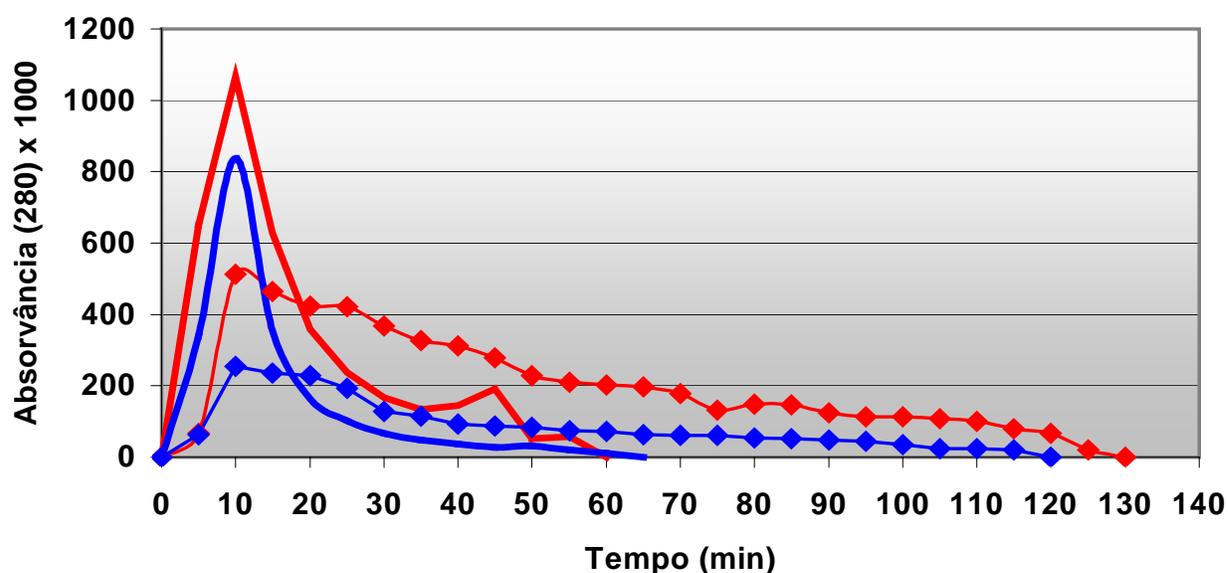


Figura 09 - Influência da temperatura no tempo de eluição das proteínas ligadas às colunas de Con A-Sepharose e Cra-Sepharose. Eluição com α -D-metil-manosídeo/ α -D-metil-glicosídeo 0,25 M em Con A-Sepharose a 27 °C (—) e a 4 °C (◆) e em coluna de Cra a 27 °C (—), e 4 °C; (◆).

4.8 - Dot Blotting com anticorpos Anti-LCAT e Cra-peroxidase

O dot blotting realizado com anticorpos de coelho contra LCAT humana foi positivo para as glicoproteínas purificadas pela coluna de Cra e Con

A e negativo para o plasma humano. Entretanto, a intensidade de cor foi maior para as glicoproteínas isoladas na coluna de Con A. A incubação da membrana de nitrocelulose contendo glicoproteínas purificadas pelas colunas de Con A-Sepharose e Cra-Sepharose com Cra-peroxidase apresentou grande intensidade de coloração para as proteínas ligadas à coluna de Cra-sepharose (figura 10).

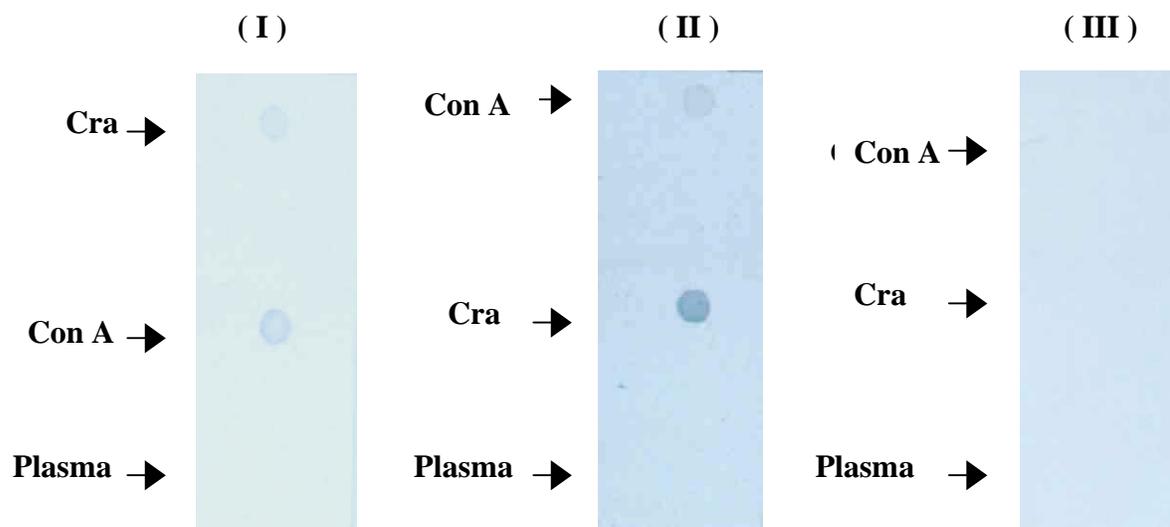


Figura 10 - *Dot blotting* das glicoproteínas purificadas das colunas de Cra e Con A. (I), incubação com anticorpos anti-LCAT; (II), incubação com Cra-peroxidase; (III), incubação com anticorpo anti-IgG de coelho, conforme descrito no ítem 3.10.

4.9 - SDS - PAGE das glicoproteínas isoladas pela coluna de Cra

Várias bandas protéicas (P) de P1 a P9 foram identificadas tanto em controles como nos pacientes. Bandas protéicas de peso molecular: 153 kDa (P1), a qual aparece fortemente corada, 123 kDa (P2) a qual é menos evidente

nos pacientes HED, 94 kDa (P4) corada mais intensamente nos pacientes HEC, 66 kDa (P5), 42 kDa (P8) e 19 kDa (P9), mais fortemente corada e difusa nos pacientes HEC e HED, podem ser identificadas em todos os grupos avaliados. Proteínas de peso molecular: 104 kDa (P3) e 55 kDa (P6) foram bem identificadas nos pacientes HEC e HED e aparentemente ausentes nos controles e pacientes HI. Uma proteína de 52 kDa (P7) mostrou-se ausente nos pacientes HI (Figura 11).

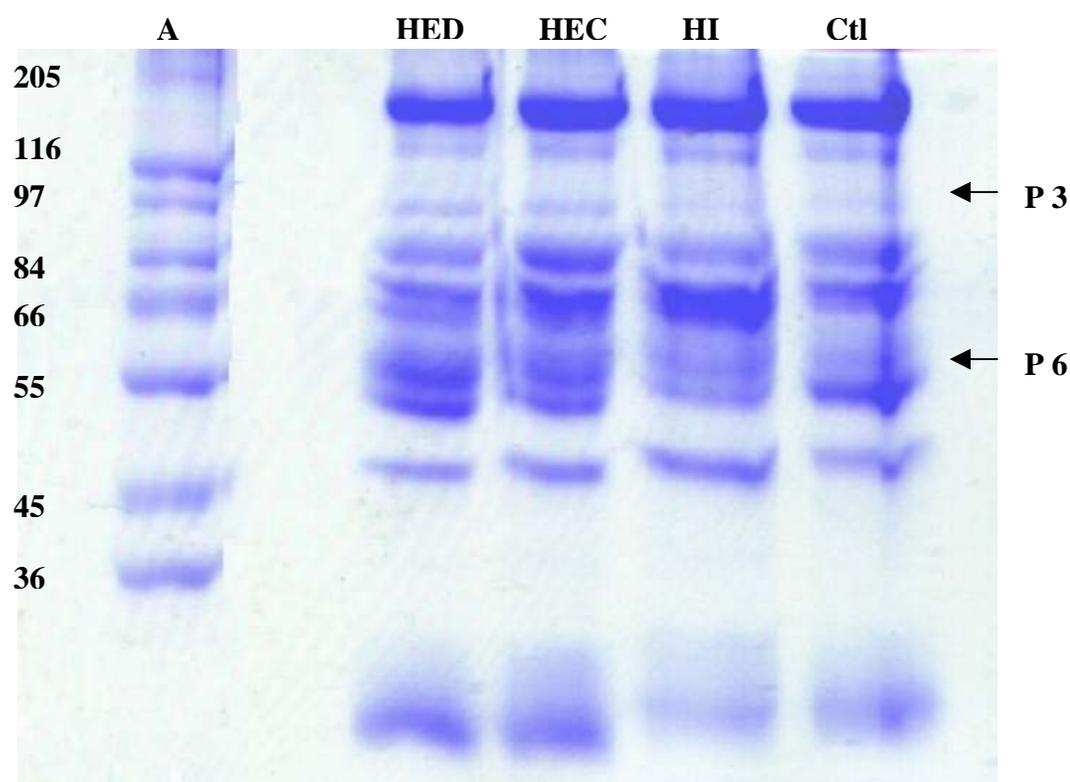


Figura 11 – SDS-PAGE a 10 % das glicoproteínas isoladas pela coluna de Cra-Sepharose nas diferentes formas clínicas da esquistossomose mansônica Ctl, controles; HI, pacientes com esquistossomose mansônica hepato-intestinal; HEC, pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica compensada e HED, pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica descompensada. A, padrão de peso molecular (205-36 kDa – Bio-Rad).

4.10 - SDS - PAGE das glicoproteínas isoladas pela coluna de Con A

Proteínas de peso molecular : 153 kDa, 123 kDa (a qual apresenta-se menos evidente nos pacientes HED e HEC), 66 kDa, 52 kDa, 42 kDa e 19 kDa foram observadas, similar aquelas reveladas no gel de eletroforese das proteínas purificadas pela Cra. Poucas informações diferenciam as diferentes formas da esquistossomose mansônica (Figura 12).

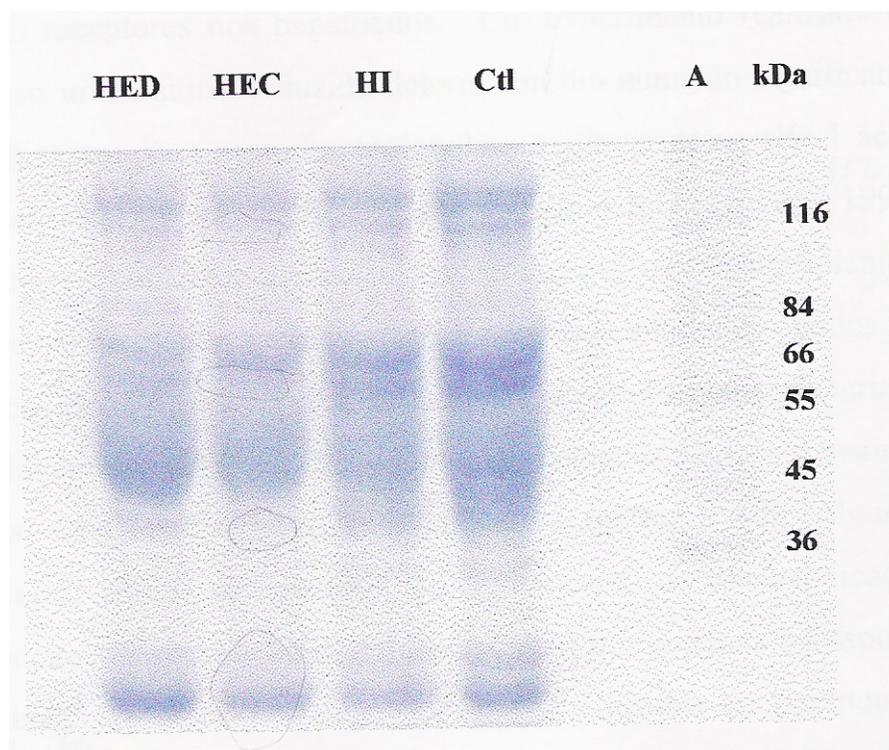


Figura 11 – SDS-PAGE a 10 % das glicoproteínas isoladas pela coluna de Con A-Sepharose nas diferentes formas clínicas da esquistossomose mansônica Ctl, controles; HI, pacientes com esquistossomose mansônica hepato-intestinal; HEC, pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica compensada e HED, pacientes com esquistossomose mansônica hepatoesplênica descompensada. A, padrão de peso molecular (205-36 kDa – Bio-Rad).

5.0 - Discussão

Durante os processos inflamatórios, principalmente na fase aguda das doenças, ocorre uma série de produção e liberação de glicoproteínas, mais comumente chamadas de proteínas de fase aguda, as quais possuem produção aumentada diante do estímulo da interação de citocinas, liberadas nos sítios inflamatórios, com receptores nos hepatócitos. Um experimento realizado em ratos, com processo inflamatório induzido determinou um aumento significativo na produção de glicoproteínas como haptoglobulina e glicoproteína alfa 1 ácida (Smith & Ovington, 1994), como também imunoglobulinas IgG (Truyens, 1994). Nesse experimento, os pacientes avaliados, especialmente os hepatoesplênicos descompensados e compensados apresentavam, de acordo com dados obtidos por inspeção de exames de ultrassonografia, granulomas hepáticos que caracterizam um processo inflamatório instalado. Nos indivíduos hepatoesplênicos intestinais e decompensados, uma hiperproteinemia significativa foi observada. Algumas funções importantes como participação de fenômenos de desintoxicação, promoção da fagocitose e prevenção de injúria tecidual por enzimas lisossomais são funções atribuídas a essas proteínas que são sintetizadas no parênquima hepático (Mehta, 1977). Diferentemente de infecções virais, as inflamações causadas por bactérias e parasitas levam a uma intensa produção de proteínas que podem ser detectadas em plasma de humanos, ratos e camundongos (Gauldie *et al.*, 1985). Uma hiperproteinemia caracterizada por uma hipergamaglobulinemia foi observada em ratos infectados com *Schistosoma bovis* e isso se deve a resposta imune direcionada aos ovos do parasita, como também para vermes adultos, durante o processo infeccioso inicial e que passa a

ser significativamente reduzido após 9 a 11 semanas de infecção (Murare *et al.*, 1987).

Infecções parasitárias por *S. mansoni*, tanto em humanos quanto em roedores, induzem granulomas intestinais e hepáticos (Lenzi *et al.*, 1987; Wynn *et al.*, 1993) produzidos, geralmente, devido à intensa resposta inflamatória aos ovos do parasita presentes no fígado. Os granulomas constituem uma forma distinta de inflamação crônica caracterizada pela agregação de macrófagos ao redor dos ovos e durante a fase aguda a formação deles é vigorosa (Aloe *et al.*, 1996), com intensa liberação de compostos biologicamente ativos, como as citocinas (Caulfield *et al.*, 1981; Amiri *et al.*, 1992; Stadecker *et al.*, 1994) as quais junto com as interleucinas (Amiri *et al.*, 1992), determinam através da ligação a receptores nos hepatócitos a expressão genética e posterior liberação de proteínas (Caulfield *et al.*, 1981). Nos pacientes descompensados, um aumento da proteinemia caracterizada por elevação na produção e liberação de glicoproteínas de fase aguda e, nos indivíduos intestinais, caracterizados por uma hipergamaglobulinemia devido a reação imune aos determinantes antigênicos de ovos e vermes, pode ser a justificativa para a hiperproteinemia encontrada nessas duas formas clínicas da esquistossomose mansônica.

Diversas patologias são responsáveis pela alteração nos níveis das lipoproteínas plasmáticas (Feussner *et al.*, 1991; Sammalkorpi *et al.*, 1988; Mendez *et al.*, 1987). Estudos correlacionam a influência das diferentes fases de doenças com uma modificação diferencial nos níveis plasmáticos de lipídeos e lipoproteínas (Sammalkorpi *et al.*, 1988). Na doença de Kawasaki, a concentração de colesterol HDL, apolipoproteína A-I (apo A-I) e A-II são significativamente diminuídos durante a fase aguda da doença e a concentração de triglicerídeos nas lipoproteínas VLDL e HDL foi significativamente maior que os indivíduos controles (Chiang *et al.*, 1997). A análise de doentes com

infecções causadas por vírus e bactérias demonstrou uma redução na concentração em massa de LDL a qual atingiu diminuição máxima durante a infecção aguda (Sammalkorpi *et al.*, 1980). Doenças inflamatórias sistêmicas como artrite reumatóide levam também a uma alteração dos níveis de HDL, LDL e VLDL (Bakkaloglu, 1996).

Fatores de necrose tumorais (TNF), interleucinas e citocinas, parecem estar correlacionados com resposta hipertrigliceridêmica durante os processos inflamatórios agudos (Cabana *et al.*, 1989; Grunfeld & Feingold, 1992). A administração em ratos de TNF alfa humana recombinante leva a um aumento, dentro de 90 min, da massa de VLDL; esse achado é consistente com a diminuição da atividade de lipases lipoprotéicas em tecidos e com o surgimento de IDL e LDL, produtos do processo lipolítico de VLDL, após 2h (Krauss, 1990). Cabana *et al.* (1989), verificaram que o colesterol e fosfolídeos mostraram mudanças mínimas durante processo inflamatório agudo, enquanto que a lipoproteína VLDL aumentou de 6-10 vezes e deteve cerca de 30-40% dos triglicerídeos, colesterol, fosfolídeos e Apo-B plasmáticos. Os dados obtidos nesse trabalho mostraram uma maior precipitação da massa lipoprotéica de LDL e VLDL para os indivíduos hepatoesplênicos descompensados e intestinais, fases onde o processo inflamatório já se encontra instalado; sendo nos indivíduos intestinais um aumento significativo. Nos indivíduos hepatoesplênicos compensados, onde o processo inflamatório encontra-se diminuído, não houve quase diferença em relação ao grupo controle. Dimenstain *et al.* (1992), demonstraram que em indivíduos esquistossomóticos compensados os níveis de VLDL não encontram-se alterados. O achado é consistente com a liberação de compostos liberados nas fases agudas, como interleucinas e citocinas, as quais parecem estar intimamente ligadas com o aumento de VLDL nos estágios iniciais de doenças inflamatórias. O método utilizado na precipitação é seletivo

para lipoproteínas que contêm apolipoproteína B (apoB), ou seja, lipoproteínas cuja relação proteínas/lipídeos é baixa, com as quais formam complexos insolúveis com cátions divalentes ou poliânions (fosfotungstato de sódio). As únicas limitações que poderiam trazer erro na precipitação seriam a utilização incorreta nas concentrações e a natureza dos reagentes (Burnstein & Scholnick, 1973).

A enzima LCAT apresenta diminuição da sua atividade durante inflamação aguda em primatas não humanos, dessa forma, contribuindo no surgimento das deslipidemias até então observadas (Ettinger *et al.*, 1992).

Cabana *et al.* (1998) relatou que esse acúmulo de VLDL parece vir a ser uma fonte de reserva metabólica, uma vez que as fases agudas de processos inflamatórios são sempre acompanhadas de jejum e/ou falta de apetite.

A pesquisa de doenças inflamatórias (Hrycaj *et al.*, 1996; Silvestrini, 1989), doenças hepáticas benignas (Buamah, 1986) e malignas (Yamashita *et al.*, 1989) e outras patologias sempre tiveram especial atenção sob as glicoproteínas, pois nessas existe intensa modificação quando essas patologias estão instaladas (Turner *et al.*, 1992). A pesquisa de glicoproteínas utilizando cromatografia de afinidade com lectinas imobilizadas sempre forneceu informações importantes (Hage, 1998). A imobilização de lectina pura em suportes absorventes insolúveis constitui ponto de crucial atenção no processo cromatográfico. A Sepharose-4B ativada com brometo de cianogênio é o suporte inerte até hoje mais utilizado o qual liga-se aos grupos amino das lectinas (Cuatrecasas *et al.*, 1971). Neste trabalho a Cra foi quase que totalmente imobilizada a Sepharose, diferentemente de uma das suas isoformas, denominada Cra Iso-3 a qual possui rendimento de imobilização um pouco mais que 50% a esse mesmo suporte. As imobilizações de lectinas são realizadas através da reação dos seus grupos amino aos resíduos imidocarbonado da Sepharose ativada por brometo de cianogênio, exigindo assim que a conformação protéica da

lectina disponibilize seus grupos amino (Wilchek & Minon, 1987; Ito *et al.*, 1985).

Neste estudo a Cra foi utilizada para isolar glicoproteínas de pacientes esquistossomóticos, nas diferentes formas clínicas, e algumas diferenças na atividade de ligação pode ser observado em relação à Con A comercial, apesar de ambas possuírem especificidade para glicose/manose. A presença de íons para atividade biológica de uma lectina pode ser de extrema importância (Kennedy *et al.*, 1995). A Cra, assim como a Con A, durante todo o experimento foram tratadas com tampão fosfato totalmente ausente da adição de íons e sua capacidade em isolar proteínas plasmáticas foi eficiente. Algumas lectinas, como as extraídas de semente de araucária, possuem sua atividade biológica de hemaglutinação melhorada pela adição de Ca^{2+} e Mn^{2+} (Datta *et al.*, 1991), enquanto que as isolectinas BDL2 e BDL3, purificadas de hemolinfa de *Blaberus discoidalis*, somente permanecem viáveis pela adição de Ca^{2+} (Chen *et al.*, 1993). Lima *et al.* (1997), utilizou tampão tris-HCl para isolar glicoproteínas de pacientes saudáveis através de cromatografia de afinidade.

Neste trabalho, todo experimento foi realizado a 4°C para garantir a estabilidade da coluna, evitar a proliferação de microrganismos, como fungos e a desnaturação das proteínas plasmáticas. Entretanto, dados obtidos através da realização desse experimento em temperatura ambiente (27°C) comprovam uma maior reatividade do monossacarídeo específico, levando a uma eluição em menor tempo. Apesar de uma eluição mais rápida, a capacidade de adsorver proteínas do plasma foi diminuída, ou seja, uma menor quantidade de proteínas foi ligada às colunas de Cra e Con A-Sepharose. Eugene *et al.* (1986), fizeram a observação da importância de um bom processo de adsorção a lectinas imobilizadas em baixas temperaturas, assim como os procedimentos de lavagem; mas afirmam que uma boa eluição é sempre bem obtida em temperatura

ambiente quando da utilização do açúcar específico. A estabilidade de lectinas pode ser mantida após meses de congelamento (Mock & renwranztz, 1991; Correia & Coelho, 1995). Correia *et al.* (1996) observaram uma estabilidade das isoformas de lectinas de *Cratylia mollis* em relação a temperatura; Cra Iso 1 e 3 mantêm atividade após aquecimento a 70°C, por 30 min; Cra Iso 2 e 4 permaneceram ativas mesmo após aquecimento a 90°C por 30 min. A estabilidade da atividade de uma lectina também pode ser avaliada em relação a variação de pH. Cra possui uma boa estabilidade numa variação de pH entre 7 - 9, havendo uma queda na sua atividade nos valores de pH 2 e 12 (Silva, 2000). Similar a Cra, as lectinas de *Agardhiella tenera* têm atividade reduzida nos mesmos valores de pH (Gypta & Srivastana, 1998). O tampão utilizado para purificação das glicoproteínas de pacientes esquistossomóticos em pH 7,4, condições que simulam o da corrente sanguínea evitando a desnaturação protéica. Cra possui sua atividade hemaglutinante aumentada cerca 28% em pH 10 e, assim, possivelmente poderia aumentar sua capacidade em adsorver glicoproteínas em pH mais elevado (Silva, 2000), mas esse pH provavelmente causaria modificação na conformação das proteínas plasmáticas e conseqüentemente no padrão de adsorção à lectina.

O perfil eletroforético das proteínas isoladas pelas colunas Cra e Con A, determinaram similaridades. Lectinas que possuem a mesma bioespecificidade podem determinar formas diferentes de ligação com proteínas (Hayunga & Sumner, 1986). Este trabalho representa a primeira descrição do uso da lectina de sementes de *Cratylia mollis* para purificação de proteínas em doença inflamatória causada por parasita. Cra é hábil para a purificação de glicoproteínas como já foi observado por Lima *et al.* (1997). As lectinas, nos estudos de glicosilação de proteínas são usadas para explorar glicoconjugados com cadeias de açúcar N-ligadas; poucas lectinas prestam-se para uso no

isolamento e/ou no estudo das glicoproteínas O-ligadas (Magne *et al.*, 1992). Entretanto, no caso da Cra sua habilidade em reconhecer glicoproteínas plasmáticas N-ligadas de pacientes esquistossomóticos nas diferentes formas clínicas foi comprovada pelas várias bandas protéicas reveladas após coloração do gel (SDS-PAGE). Tal padrão, com um grupo de proteínas (P1 – P9) com pesos moleculares de 19 – 153 KDa, encontra-se diferenciado para as formas mais graves (HEC, HEI) nas quais algumas bandas aparecem mais coradas e difusas. De fato, em muitos mamíferos, especialmente em humanos, inflamações agudas e crônicas, infecções bacterianas, injúria tecidual e crescimento neoplásico induzem o aparecimento ou mudanças na concentração de um grupo de proteínas denominadas de proteínas de fase aguda (α_1 - antitripsina, α_1 - antiquimiotripsina, ceruloplasmina, glicoproteína α_1 - ácida) (Schreiber *et al.*, 1987), a maior parte delas, com peso molecular situados na mesma faixa de peso das glicoproteínas purificadas pela coluna de Cra. Entretanto, sua produção é intensificada durante os processos inflamatórios (Parkkinen, 1989; Dermer *et al.*, 1980). Neste experimento podemos verificar que as formas mais graves da esquistossomose mansônica apresentaram uma maior reatividade com as glicoproteínas. Muitas patologias de comprometimento hepático levam à modificação das cadeias carboidrato nas glicoproteínas levando a uma maior ramificação e adição de monossacarídeos e, conseqüentemente, sua maior reatividade a lectinas (Buamah *et al.*, 1986; Parkkinen, 1989). Aqui, não podemos afirmar se na esquistossomose mansônica existe uma modificação nas cadeias carboidrato de algumas proteínas ou uma alteração na concentração de glicoproteínas circulantes. O surgimento de uma banda de peso aparentemente de 104 KDa nas formas HED e HEC não pode ser atribuído a uma mudança na cadeia carboidrato.

A capacidade de Cra purificar glicoproteínas com cadeias N-ligadas foi comprovada através da sua revelação no procedimento do *dot blotting* com anticorpos anti-LCAT. A LCAT possui cadeias oligossacarídicas N-ligadas (Lima *et al.*, 1997) e a sua microheterogeneidade demonstrada por diferentes pontos isoelétricos (Lima *et al.*, 1997) pode determinar uma forma alta manose a qual justifica a sua elevada capacidade de ligar-se a lectinas glicose/manose específicas como Cra. Sabe-se que durante a esquistossomose mansônica a enzima LCAT encontra-se com sua atividade diminuída (Owen *et al.*, 1978), mas não é conhecido se isso se deve a algum comprometimento das cadeias oligossacarídicas. Algumas moléculas alteradas podem determinar a modificação na sua atividade. As cadeias oligossacarídicas da LCAT em pacientes esquistossomóticos não sugerem modificação quanto à sua adsorção a lectina. Lima *et al.* (1997), demonstraram que a Cra purificava uma proteína de mobilidade eletroforética similar à LCAT purificada por coluna de imunoafinidade com anticorpos anti-LCAT e/ou através de procedimento que envolve várias etapas.

No presente estudo, não podemos afirmar que a mudança da reatividade observada nas formas mais graves da esquistossomose mansônica, especialmente para as proteínas purificadas na coluna de Cra-Sepharose, reflita um aumento na concentração dessas proteínas ou uma alteração da glicosilação. Um estudo mais detalhado da mudança da reatividade de proteínas plasmáticas de pacientes portadores de esquistossomose mansônica com a Cra possibilitará nossa compreensão sob a influência de doenças inflamatórias parasitárias para a síntese e glicosilação de proteínas plasmáticas.

6.0 - Conclusões

- Cra e Con A immobilizadas em Sepharose-4B são hábeis para isolamento de glicoproteínas plasmáticas de pacientes esquistossomóticos;
- A temperatura na qual é realizado o processo cromatográfico influencia na capacidade de adsorção das glicoproteínas às colunas de cromatografia;
- Os perfis cromatográficos para todos os grupos avaliados mostraram-se similares em ambas as colunas, com características mais uniformes para a coluna de Cra;
- O padrão eletroforético das glicoproteínas isoladas em coluna de Cra mostra-se diferente daquele observado para as glicoproteínas isoladas pela coluna de Con A;
- As glicoproteínas das fases mais graves da esquistossomose mansônica (HED e HEC) mostraram uma maior reatividade para ambas as lectinas, Cra e Con A.

7.0 - Referências Bibliográficas

- ALOE, L.; MORONI, R.; FIORE, M. & ANGELUCCI . Chronic parasite infection in mice induces brain granulomas and differentially alters brain nerve growth factor levels and thermal responses in paws. *Acta Neuropathologica*, **92**, 300 – 305, 1996.
- ATLAND, K.; ROEDER, T.; JAKIN, H. M.; ZIMMER, H. G. & NEUHOFF, V. Demonstration of alpha 1-acid glycoprotein (orosomuroid) by double one-dimensional slab gel electrophoresis: evidence for intra- and interindividual variability of the microheterogeneity pattern in health and disease. *Clinical Chemistry*, **28**, 1000 – 1010, 1982.
- BAKKALOGLU, A; KIREL, B.; OZEN, S.; SAATCI, U.; TOPALOGLU & BESBAS, N. Plasma lipids and lipoproteins in juvenile chronic arthritis. *Clinical Rheumatology*, **15 (4)**, 341 – 345, 1996.
- BROEKAERT, W.F.; NSIMBA-LUBAKI, M.; PETERS, B. & PEUMANS, W. J. A lectin from elder (*Sambucus nigra*) bark. *Biochemical Journal*, **221**, 163 – 169, 1984.
- BUAMAH, P. K.; GIBB, I.; BATES, G. & MILFORD, W. A. Serum alpha fetoprotein heterogeneity as a mean of differentiating between primary hepatocellular carcinoma and hepatic secondaries. *Clinical Chemical Acta*, **139**, 313 – 316, 1984.
- BUAMAH, P. K.; HARRIS, R.; JAMES. O. F. W. & SKILLEN, A. W. L Lentil-lectin-reactive alpha-fetoprotein in the differential diagnosis of benign and malignant liver disease. *Clinical Chemistry*, **32**, 2083 – 2084, 1986.
- BURSTEIN, P. S. & SCHOLNICK, H. R. Lipoprotein-polyanion-metal interactions. *Advances in Lipid Research*, **11**: 68, 1973.
- CABANA, V. G.; SIEGEL, J. N. & SABESIN, S. M. Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. *Journal of Lipid Research*, **30 (1)**, 39 – 49, 1989.

- CHEN, C.; RATCLIFFE, N. A. & ROWLEY, A.F. Detection, isolation and characterization of multiple lectins from the hemolymph of the cockroach *Blaberus discoidals*. *Biochemistry Journal*, **294**, 181 – 190, 1993.
- CHIANG, A. N.; HWANG, B.; SHAW, G. C.; LEE, B. C.; LU, J. H.; MENG, C. C. & CHOU, P. Changes in plasma levels of lipids and lipoprotein composition in patients with Kawasaki disease. *Clinical Chemical Acta*, **260** (1), 15-26, 1997.
- COLLET, X. & FIELDING, C.J.; Effects of inhibitors of N-linked oligosaccharide processing on the secretion, stability and activity of lecithin; cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*, **30**, 3228 – 3234, 1991.
- CORREIA, M. T. S. & COELHO, L.C.B.B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **55** (3), 261 – 273, 1995.
- CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, P. C. & COELHO, L.C.B.B. Lectinas do feijão Camarat : purificação para uso biotecnológico. *Anais da 4^a Reunião Anual Especial da SBPC*, Feira de Santana, 197 – 200, 1996.
- COSTA-CRUZ, J. M.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; FERREIRA, A. W.; CAMARGO, M. E.; BRITO, T. & SILVA, L. C. *Schistosoma mansoni* circulating polysaccharide and protein antigens recognized by sheep antisera in patients with different clinical forms of Schistosomiasis before and after treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **36** (4), 321-325, 1994.
- CROFTON, P. M. Wheat-germ lectin affinity electrophoresis for alkaline phosphatase isoforms in children: Age-dependent reference ranges and changes in liver and bone disease. *Clinical Chemistry*, **38**, 663 – 670, 1992.
- DATTA T. K. & BASU, P. S. Identification, isolation and some properties of lectin from the seeds of Indian coral tree [*Erythrina variegata* (Linn.) var. *orientalis* (Linn) Merrill]. *Biochemical Journal*, **197**, 751 – 753, 1991.
- DAVIDSON, R.N.; HOUSTON, S. & KIRE, C. F. Schistosomal Periportal Fibrosis in Zimbabwe: Use of Ultrasound in Patients with esophageal Varices. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**, 380 - 382, 1991.

- DERMER, G. B.; SILVERMAN, L. M.; GENDLER, S. J. & TOBES, Z. A. Incidence of a split alpha 2-glycoprotein band in the electrophoretic pattern for serum of adenocarcinoma patients. *Clinical Chemistry*, **26**, 392 – 395, 1980.
- DIAZ, C. L.; MELCHERS, L. S.; HOOYKAAS, P. J. J.; LUGTEMBERG, B. J. J. & KIJNE, L. W. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium legume symbiosis. *Nature*, **338**, 579 – 581, 1989.
- DIMENSTEIN, R.; CARVALHO, V. C.; OLIVEIRA, D. N. & GILLET, M. P. Alterations in the levels and lipid composition of plasma lipoproteins (VLDL, LDL and HDL) in Brazilian patients with hepatoesplenic schistosomiasis mansoni. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **25 (11)**, 1091 – 1102, 1992.
- DORNER, R. W.; ALEXANDER, R. L. & MOORE, T. Rheumatoid factors [Review]. *Clinical Chemical Acta*, **167**, 1 – 21, 1987.
- DUFAU, M. L.; TSURAHARA, T. & CATT, K. J. Interaction of glycoprotein hormones with agarose-concavalin A. *Biochemical Biophysical Acta*, **278**, 281 – 292, 1972.
- ETTINGER, W. H.; MILLER, L. A.; SMITH, T. K. & PARKS, J. S. Effect of interleukin-1 alpha on lipoprotein lipids in cynomolgus monkeys. *Biochemical Biophysical Acta*, **1128 (2-3)**, 186 – 192, 1992.
- FEUSSNER, G.; SCHUSTER, M. & ZIEGLER, R. Serum amyloid Apoprotein in very low density and high density lipoproteins during the course of acute myocardial infarction. *Electrophoresis*, **12 (4)**, 283 – 286, 1991.
- FRUMENTO, A.S. Hemodinâmica. In: *Biofísica*. 2^a Edicion, Buenos Aires. Inter-Médica, 1974.
- GIOANNINI, T.; FOUCAUD, B.; HILLER, J. M.; HATTEN, M. E. & SIMON, E. J. Lectin binding of solubilized opiate receptors: evidence for their glycoprotein nature. *Biochemical Biophysical Research Communication*, **105**, 1128 – 1134, 1982.

- GLOMSET, J. A. The plasma lecithin: cholesterol acyl-transferase reaction. *Journal of Lipid Research*, **9**, 155 – 167, 1968.
- GRAVEL, P.; WALZER, C.; AUBRY, C.; BALANT, L. P.; YERSIN, B.; HOCHSTRASSER, D. F. & GUIMON, J. New alterations of serum glycoproteins in alcoholic and cirrhotic patients revealed by high resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Biochemical Biophysical Research Communication*, **220** (1), 78 - 85, 1996.
- GREENSPAN, E. M. Survey of clinical significance of serum mucoprotein level. *Arch. Intern. Med*, **93**, 863, 1954.
- GRUBHOFFER, L.; HYPASA, V. & VOLFF, P. Lectins (hemagglutinins) in the gut of the important disease vectors. *Parasite*, **4**, 203 – 216, 1997.
- GRUNFELD, C. & FEINGOLD, K. R. Tumor necrosis factor, interleukin, and interferon induced changes in lipid metabolism as part of host defense. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **200** (2), 224 – 227, 1992.
- GYPTA, N. & SRIVASTAVA, P.S. Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus mauritiana*. *Plant Cell Reports*, **17**, 552 – 556, 1998.
- HAGE, D. S. A survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography*, **715**, 03 – 28, 1998.
- HAGE, D. S. Affinity chromatography: A review of clinical applications. *Clinical Chemistry*, **45**, 593 – 614, 1999.
- HALL, T. M. T.; JOSEPH, G. T. & STRAND, M. *Schistosoma mansoni*: Molecular cloning and sequencing of the 200-Kda chemotherapeutic antigen. *Experimental Parasitology*, **80**, 242 – 249, 1995.
- HAYUNGA, E. G. & SUMNER, M. P. Characterization of surface glycoproteins on *Schistosoma mansoni* adult worms by lectin affinity chromatography. *Journal of Parasitology*, **72** (2), 283 – 291, 1986.

- HENRY, H.; FROEHLICH, F.; PERRET, R.; TISSOT, J.; EILERS-MESSERLI, B.; LAVANCHY, D.; DIONISI-VICI, C.; GONVERS, J. & BACHMANN, C. Microheterogeneity of serum glycoproteins in patients with chronic alcohol abuse compared with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Clinical Chemistry*, **45**, 1408 – 1413, 1999.
- HILL, J. S. O.; WANG, X.; PARANJAPE, S.; DIMITRIJEVICH, D.; LACKO, A. G. & PRITCHARD, P.H. Expression and characterization of recombinant human lecithin: cholesterol acyl-transferase. *Journal of Lipid Research*, **34**, 1245 – 1251. 1993.
- HRYCAJ, P.; WURM, K.; MENNET, P. & MULLER, W. Microheterogeneity of acute-phase glycoproteins in patients with pulmonary sarcoidosis. *European Respiratory Journal*, **9** (2), 313 - 318, 1996.
- KENNEDY, J.L.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M. & COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, **26**, 219 – 230, 1995.
- KHOO, K. H.; SARDA, S.; XU, X.; CAULFIELD, J. P.; McNIEL, M. R.; HOMANS, S. W.; MORRIS, H. R. & DELL, A. A unique multifucosylated $-3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\alpha 1-$ motif constitutes the repeating unit of the complex *O*-Glicans derived from the cercarial glycocalix of *Schistosoma mansoni*. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*, 17114-17123, 1995.
- KRAUSS, R. M.; GRUNFELD, C.; DOERRLER, W. T. & FEINGOLD, K. R. Tumor necrosis factor acutely increases plasma levels of very low density lipoproteins of normal size and composition. *Endocrinology*, **127**(3), 1016 – 1021, 1990.
- KUEHN, M. J.; HEUSER, J.; NORMARK, S.; & HULTGREN, S. J. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature*, **356**, 252 – 255, 1992.
- 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* Mollys lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acytransferase. *Carbohydrate Polymers*, **33**, 27-32, 1997.

- LIMA, V. L. M.; CANNIZARRO, H. M. & OWEN, J. S. Microheterogeneity studies of lecithin: cholesterol acyltransferase in plasma from individual patients infected with *Schistosoma mansoni*. *International Hepatology Communications*, **6**, 300 – 305, 1997.
- LIMA, V. L. M.; CANNIZARRO, H. M. & OWEN, J.S. Isolation and preliminary microheterogeneity studies of lecithin: cholesterolacyltransferase in plasma from individual patients infected with schistosomiasis mansoni. *International Hepatology Communications*, **6**, 300 – 305, 1997.
- LODISH, H. F. Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the golgi. *The Journal of Biological Chemistry*, **263** (5), 2107 – 2110, 1988.
- MACBETH, R. A. L. & BEKESI, J. G. Plasma glycoproteins in various disease states including carcinoma. *Cancer*, **22**, 1170, 1962.
- MAGNE, D.; SET, N.; LEBRUN, D.; DURAND, G. & DURAND, D. Factors influencing the reaction of α_1 -fetoprotein with Concanavalin A and *Lens culinaris* agglutinin in crossed affinoimmoelectrophoresis. *Clinical Chemistry*, **38** (8), 1418 – 1424, 1992.
- MACIEL, M. I. S. Proteínas de ligação a carboidratos. *Qualificação para doutorado*, p. 25 – 45, Doutorado em Ciências Biológicas, CCB, UFPE, Recife, 1996.
- MAYER, T. K. & FREEDMAN, Z. R. Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurements and of their clinical utility. *Clinical Chemical Acta*, **127**, 147 – 184, 1983.
- MENDEZ, I.; HACHINSKI, V. & WOLFE, B. Serum lipids after stroke. *Neurology*, **37**(3), 507 – 511, 1987.
- MOCK, A. & RENWRANTZ, L. Isolation and characterization of a lectin from the cephalochordate *Brachiostoma lanceolatum* (Pallas). *Comparative Biochemical Physiology*, **99**, 699 – 707, 1991.
- OWEN, J. S. & GILLET, M. P. T. Lecithin: cholesterol acyl transferase deficiency associated with hepatic schistosomiasis mansoni. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **38** (150), 194 – 198, 1978.

- PAREKH, R. B.; DWEK, R. A. & SUTTON, B. J. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosilation pattern of total serum IgG. *Nature (London)*, **316**, 452 – 457, 1985.
- PARKKINEN, J. Aberrant lectin-binding activity of immunoglobulin G in serum from rheumatoid arthritis patients. *Clinical Chemistry*, **35**, 1638 – 1643, 1989.
- PEREIRA, G.; SANTOS, R. P.; ALEXANDRE NETO, J.; AZEVEDO, A. P. & CARVALHEIRA, A. E. Formas graves da Esquistosomose mansonica: Dados de internação hospitalar em Pernambuco. *Anais da Faculdade de Medicina*, **38**, 12 – 18, 1993.
- PITKÄNEN, E. M.; PALOSUO, T.; AHO, K.; PUTUS-TIKKANEN, T. & ESSEN, R. V. Nephelometry of acute-phase glycoproteins by binding to concanavalin A. *Clinical Chemistry*, **30**, 1834 – 1835, 1984.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J. & MALE, D. Anticorpos e seus receptores. In: *Imunologia*, 5 ed, cap. 7, p. 71 – 82, 1999.
- SAMMALKORPI, K.; VALTONEN, V.; KERTTULA, Y.; NIKKILA, E. & TASKINEN, M. R. Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections. *Metabolism*, **37 (9)**, 859 – 865, 1988.
- SARKAR, M.; MAJENDER, G. & CHATTERJEE, T. Goat sperm membrane: lectin-binding sites of sperm surface and lectin affinity chromatography of the mature sperm membrane antigens. *Biochemical Biophysical Acta*, **1070**, 198 – 204, 1991.
- SCHIELE, F.; HENRY, J.; HITZ, J.; PETITCLERC, C.; GUEGUEN, R. & SIEST, G. Total bone and liver alkaline phosphatases in plasma: biological variations and reference limits. *Clinical Chemistry*, **29**, 634 - 641, 1983.
- SHIBAYAMA, Y. The Relation of Periportal Fibrosis to Portal Hypertension. *Journal of Hepatology*, **11**, 313-317, 1990.
- SILVA, F. A. Caracterização de isoformas da lectina de *Cratylia mollis* e sua utilização em aglutinação de plaquetas. *Tese de Mestrado*, p. 26-35, UFPE, Recife, 2000.

- SILVERMAN, L. M.; DERMER, G. B. & TOKES, Z. A. Eletrophoretic patterns for serum glycoproteins reflect the presence of human breast cancer. *Clinical Chemistry*, **23**, 2055 – 2058, 1977.
- SILVESTRINI, B.; GUGLIELMOTTI, A.; SASO, L. & CHENG, C. Y. Changes in concanavalin A-reactive proteins in inflammatory disorders. *Clinical Chemistry*, **35**, 2207 – 2211, 1989.
- STIBLER, H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: A new marker of potentially harmful alcohol consumption [Review]. *Clinical Chemistry*, **37**, 2029 – 2037, 1991.
- STIMSON, W. H., Correlation of the blood-level of a pregnancy-associated alpha-macroglobulin with the clinical course of cancer. *Lancet i*, **777**, 1975.
- STUART, M. C.; ELLIS, S.; GOWLLAND, L. & TUFF, S. Lectins used to prepare serum free of glycoprotein hormones for use as a matrix in radioimmunoassay. *Clinical Chemistry*, **27**, 52 – 56, 1981.
- THOMPSON, S.; LATHAM, A. E. & TURNER, G. A. A simple, reproducible and cheap batch method for the analysis of serum glycoproteins using Sepharose-coupled lectins and silver staining. *Clinical Chemical Acta*, **167**, 217 – 223, 1987.
- TORMEY, D.C.; WAALKES, T. P. & AHMAN, D. A. Biological markers in breast carcinoma. I. Incidence of abnormalities of CEA, HCG, three polyamines, and three minor nucleosides. *Cancer*, **35**, 1095. 1975.
- TORRES, B.V. & SMITH, D. F. Purification of forsmann and human blood group A glycolipids by affinity chromatography on immobilized *Helix pomatia* lectin. *Analytical Biochemistry*, **170**, 209 – 219, 1988.
- TURNER, G. A. N-glycosilation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clinical Chemical Acta*, **208**, 149 – 171, 1992.
- VEZOZZO, A.C.P.; FAINBOIM, H. & CERRI, G.G. Doopler Hepático: Aplicação Clínica e Revisão da Literatura. *Radiol. Bras.*, **24**, 213-221, 1991

- VESTERBERG, O.; PETRÉN, S. & SCHMIDT, D. Increased concentration of a transferrin variant after alcohol abuse. *Clinical Chemical Acta*. **141**, 33 – 39, 1984.
- VOET, D. & VOET, J. G. Other pathways of carbohydrate metabolism. In: *Biochemistry*, 2 ed. John Wiley & Sons, Inc. Canada. cap. 21, p. 599 – 625, 1995
- WIESE, T. J.; DUNLAP, J. A. & YOREK, M. A. Effect of L-fucose and D-glucose concentration on L-fucoprotein metabolism in human Hep G2 cells and changes in fucosyltransferase and alpha-L-fucosidase activity in liver of diabetic rats. *Biochimica Biophysica Acta*, **1335** (1-2) , 61-72, 1997.

Abstract

Lectins are molecules having the capacity to recognize specific carbohydrates and are utilized to important laboratorial techniques. Mobilized lectins are used to glycoconjugated studies through affinity chromatography. Cancer, inflammatory processes and hepatic diseases have been related to carbohydrates manner alterations. The aim this work was available to capacity of the lectin isolated from *Cratylia mollis* seeds (Cra) and Concanalin A (Con A) to isolate plasma glycoproteins from patients with schistosomiasis mansoni, a inflammatory hepatic disease, in different clinical forms :HI, HEC and HED. The lectins Cra and Con A were able to isolation of plasmatic glycoproteins of patients with schistosomiasis. Chromatographic processes were done at 4 °C and showed more capacity of those lectins to adsorption of glycoproteins when compared to the one conducted at 27 °C. A reactivity increasing of glycoproteins was seen to HED and HEC patients. SDS PAGE analysis occurred the appearance of other protein bands to HEC and HED, further on presenting more intensively stained in relation to the controls and the hepatointestinal patients.

ANEXOS

I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Isolamento e caracterização parcial de glicoproteínas plasmáticas de pacientes esquistossomóticos por cromatografia de afinidade com lectinas de *Cratylia mollis*.

Responsável: Cláudio Ângelo Ventura (Biomédico, Mestrando em Bioquímica).

Orientadora: Profª Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, B.Sc., M. Sc., Ph.D.

A esquistossomose mansônica é uma doença muito comum em todo o Estado de Pernambuco, principalmente nas áreas onde as condições de saneamento não são adequadas às necessidades da população. Essa doença apresenta várias formas clínicas e tem estimulado o desenvolvimento de estudos em Universidades e Centros de Pesquisas de todo o mundo.

O atual estudo tem como principal objetivo identificar as possíveis alterações encontradas nas glicoproteínas de pacientes portadores de esquistossomose mansônica.

Com os resultados do nosso trabalho poderemos ajudar o médico, a nível de diagnóstico laboratorial, a avaliar o andamento do tratamento clínico do paciente.

Para que este trabalho possa ser desenvolvido é necessário que tenhamos amostras sanguíneas de pacientes com esquistossomose mansônica. Portanto, venho solicitar a vossa colaboração em permitir a coleta de sangue, indispensável ao desenvolvimento do nosso projeto.

Antecipadamente, agradeço a atenção e o apoio de V. Sra. e aproveito a oportunidade para me colocar à disposição para quaisquer esclarecimentos extras que se fizerem necessários .

NOME: _____

R.G.: _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos a seguir relacionados, concordo em participar.

DIREITOS DO PACIENTE:

1. Garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou dúvida sobre a pesquisa à qual será submetido;
2. Liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;
3. Segurança de não ser identificado e ter informações pessoais mantidas em caráter confidencial;
4. Receber informações atualizadas durante o estudo, ainda que estas possam afetar minha vontade de continuar participando.

Recife, de de .

Assinatura do Pacient

II - FICHA DE ADMISSÃO DE PACIENTES ESQUISTOSSOMÓTICOS

NOME: PRONTUÁRIO:
ENDEREÇO: TEL.P/ CONTATO:
IDADE: PROCEDÊNCIA:
PROFISSÃO:
DATA DE ADMISSÃO:
DATA DA COLETA:
TEMPO DE DOENÇA:
CONTATO COM ÁGUA DE RIOS:

- DOENÇAS ASSOCIADAS/ SINAIS CLÍNICOS/ SINTOMAS

- HEPATITE
 - ETILISMO? QUANTO TEMPO?
 - TABAGISMO? QUANTO TEMPO?
 - PARASITOSE INTESTINAL
 - MELENA
 - ASCITE
 - ANASTOMOSE PORTO-CAVA
 - DIARRÉIAS FREQUENTES
 - TRANSFUSÕES ANTERIORES. Nº:
 - EPSÓDIOS DE HEMORRAGIA DIGESTIVA ALTA?
 - SUBNUTRIÇÃO
 - ICTERÍCIA
 - ESPLENECTOMIA
-

- EXAMES

- PARASITOLÓGICO DE FEZES:
 - BIOQUÍMICOS: TGO: TGP: .TPAE:
BILIRRUBINAS:
 - HEMOGRAMA: .HEMÁCIAS: LEUCÓCITOS:
EOSINÓFILOS: PLAQ.
 - EXAMES COMPLEMENTARES: USG:
-

- MEDICAÇÃO ADMINISTRADA: _____

- DIAGNÓSTICO FINAL DE ALTA: _____

- CONCLUSÃO: FORMA INTESTINAL
 HEPATOESPLÊNICA COMPENSADA
 HEPATOESPLÊNICA DESCOMPENSADA

Ata da defesa de dissertação do mestrando Cláudio Ângelo Ventura, realizada em 19/02/2005, como requisito final para a obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Às 14 horas e 20 minutos do dia 19 do mês de fevereiro do ano 2005, foi aberto, no Auditório Profa. Marcionilo de Barros Lins, Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, o ato de defesa de dissertação de Cláudio Ângelo Ventura aluno do curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos, a Profa. Dra. Maria da Paz Cornwallis da Silva (coordenadora do curso supra citado) fez a apresentação do candidato, de sua orientadora Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima e da Comissão Examinadora composta pelos Professores Doutores Vera Lúcia de Menezes Lima, na qualidade de Presidente, Luana Cassandra Breitenbach Barrero Coelho, Maria Tereza dos Santos Correia, ambas do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE e Maria Inês Sucupira Maciel, do Depto. de Ciências Domésticas/UFPE. Foi a Profa. Maria da Paz passou a palavra para a Presidente da Comissão que convidou o candidato para apresentação de sua dissertação intitulada ~~XXXX~~ "Isolamento e Caracterização Parcial de Glicoproteínas Plasmáticas de Pacientes Esquistosomíoticos por Cromatografia de Afinidade com Lectina de *Cratylia mollis*", e informou que, de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguições para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas da Comissão Examinadora será de 30 (trinta) minutos. O mestrando procedeu a explanação e comentários, acerca do tema em 35 (trinta e cinco) minutos. Terminada a explanação, a Sra. Presidente perguntou ao candidato se ele gostaria de obter um intervalo de 5 minutos, o qual foi aceito pelo mesmo. Iniciando os trabalhos, a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Maria Inês Sucupira Maciel que agradeceu os convites em seguida iniciou sua arguição. Ao final de sua salvação,

a referida professora deu-se por satisfeita, deu algumas sugestões e parabenizou o candidato pelo trabalho. Daí a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia que agradeceu ao convite em seguida iniciou sua arguição. Ao final de sua sabatina, a referida professora deu-se por satisfeita, deu algumas sugestões e parabenizou o candidato. Daí a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Luana Camandra Breitenbach Barros Coelho que agradeceu ao convite, em seguida iniciou sua arguição. Ao final de sua sabatina, a referida professora deu-se por satisfeita, deu algumas sugestões e parabenizou o candidato pelo trabalho. Continuando os trabalhos, a Sra. Presidente, na qualidade de orientadora, fez uma exposição de motivos sobre o candidato e seu trabalho e parabenizou o mesmo, em seguida suspendeu a sessão pelo julgamento pela Comissão Examinadora que pediu aos presentes para se retirarem e permitisseu no local. Após alguns comentários, a Comissão Examinadora decidiu, por unanimidade, conceder a menção "Aprovado com Distinção". Nada mais havendo a relator lavrou a presente ata que vai arquivada por mim Secretário e demais membros de Comissão Examinadora. Recife, 19/05/2001.

Assinatura
Maria Inês Suelina Maciel,
Dezeza Correia
Luana Camandra Breitenbach Barros Coelho