

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

RAIANA APOLINÁRIO DE PAULA

**Caracterização do perfil de glicoproteínas presentes
em soros de indivíduos sadios e pacientes com
dengue clássica e hemorrágica utilizando lectina de
semente de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4)**

ORIENTADORA: Profa Dra. Russolina Benedeta Zingali
CO-ORIENTADORA: Profa Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

RECIFE
2013

RAIANA APOLINÁRIO DE PAULA

**Caracterização do perfil de glicoproteínas presentes
em soros de indivíduos sadios e pacientes com
dengue clássica e hemorrágica utilizando lectina de
semente de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4)**

Dissertação apresentada para o cumprimento
parcial das exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profa Dra. Russolina Benedeta Zingali

Co-orientadora: Profa Dra. Maria Tereza dos Santos
Correia

RECIFE -BRASIL
2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

De Paula, Raiana Apolinário

Caracterização do perfil de glicoproteínas presentes em soros de indivíduos sadios e pacientes com dengue clássica e hemorrágica utilizando lectina de semente de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4). / Recife: O Autor, 2013.

106 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Russolina Benedeta Zingali

Coorientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2013.

Inclui referências

- 1. Dengue 2. Lectinas 3. Imunologia I. Zingali, Russolina Benedeta (orient.) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorient.) III. Título**

616.91852

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 501

RAIANA APOLINÁRIO DE PAULA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE GLICOPROTEÍNAS
PRESENTES EM SOROS DE INDIVÍDUOS SADIOS E PACIENTES
COM DENGUE CLÁSSICA E HEMORRÁGICA UTILIZANDO
LECTINA DE SEMENTE DE *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4)**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de
Pernambuco

Aprovado por:

Profa Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa

Data: 26 / 02 / 2013

*Dedico este trabalho à minha mãe
Aparecida, pelo seu amor incondicional,
esforço, dedicação e compreensão, em
todos os momentos desta e de outras
caminhadas.*

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que comigo colaboraram ao longo desses anos todos, abrindo-me portas para auxiliar nos resultados dos experimentos. Um reagente, um equipamento, uma palavra de consolo nos momentos de desatino, uma reflexão teórica mais aprofundada, uma sugestão, um texto, entre outros. Não importa, elas estiveram presentes e disso eu jamais me esquecerei. A todas elas, quero deixar minha eterna gratidão, meu carinho e também o meu pedido de desculpas pelas falhas que tenha cometido.

Às minhas orientadoras e amigas Professoras Russolina Benedeta Zingali e Maria Tereza dos Santos Correia, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissional e de mulheres as quais sempre farão parte da minha vida.

À minha querida mainha Aparecida, por ser tão dedicada e amiga, a pessoa que mais me apóia e acredita na minha capacidade, o meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo, sem dúvida foi quem me deu o maior incentivo para conseguir concluir esse trabalho e a quem credito a totalidade do meu sucesso. E principalmente por me ensinar o significado do amor.

A- mizade.

M- omentos felizes.

O- orgulho de ter você.

R- azão de viver.

Minha Linda te amo!!

À minha querida avó Edite, por todo o seu amor, paciência, dedicação e apoio sempre demonstrado. Meu eterno amor e agradecimento.

Ao meu querido avô Rodrigo, por me fazer acreditar que nada é impossível, pessoa que sigo como exemplo, dedicado, amigo, batalhador, uma pessoa que mostrou que muitas vezes um gesto marca mais que muitas palavras, coração bondoso que dedicou toda sua vida à família. Meu eterno amor e agradecimento. Ressalto ainda, o maior exemplo de amor nesses 70 (setenta) anos de casamento!!!!

Ao meu pai Paulo Ferreira, por seu amor e entender minhas prioridades e por acreditar sempre no meu potencial. Papito te amo!!

A minha querida tia e Madrinha Cristina dos Santos, por seu exemplo de determinação, coragem, competência, pelo seu amor, alegria, e atenção sem reservas...

Ao meu querido tio e Padrinho Pedro dos Santos, pela amizade, amor, companherismo, inúmeros momentos de descontração e força nessa minha caminhada.

Ao meu querido tio Marcelo, pelo amor, carinho, companherismo e todas as contribuições para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectualmente.

À minha amiga e futura Dra. Amanda Lucena, por seu carinho, inigualável convivência, vários momentos de discussões que proporcionaram crescimento profissional. Passamos por muitos momentos difíceis, foram inúmeros trabalhos; mas também tivemos muitos momentos de descontração, várias conversas, passeios e compras!!! Tudo foi necessário para nosso crescimento. Acredite valeu muito apena!!!

Ao meu amigo e Professor Dr. Fernando Vaz, pelos valiosos momentos de aprendizagem e debates; por seu apoio, colaboração e importantes sugestões ao longo deste trabalho que o tornou mais completo.

A minha querida amiga e Mestre Mychely Melo, que mesmo sendo famosa nacionalmente nunca esqueceu seus amigos e continuou com sua simplicidade nos dando a honra de sua presença. Brincadeiras a parte, quero te agradecer Xely pelos momentos incríveis que passamos juntas durante a graduação (projetos de iniciação científica), apoio incondicional, companherismo, paciência, momentos de felicidade e também de tristezas. Sua tranquilidade me inspirou muitas vezes e me ajudou a superar fases difíceis. Nosso laço de amizade sem dúvida alguma é um dos melhores momentos desta jornada!!! Obrigada por estar ao meu lado sempre.

A minha querida amiga e Doutora Ana Cristina Ferraz (Cris), porque sei que sem você este trabalho não teria sido concluído. A sua amizade generosa e sua competência profissional foram imprescindíveis para a consolidação da minha dissertação, salvando-me de procedimentos técnicos que teriam dificultado muito meu trabalho, além de me poupar um tempo precioso. Mais ainda, como minha amiga, que me ouviu tantas vezes quantas foram necessárias para me acalmar e diminuir a natural ansiedade de quem tem de dar conta de uma grande responsabilidade em um tempo limitado. E, por tudo isso, eu só tenho a agradecer.

Aos meus amigos queridos e amados da graduação Edvaldo (Ed), Janaína (Jana), Jussyêgles (Ju), Manuela (Manu), Michele (Mi), Noêmia, Bárbara (Babi), Carinna (Ca), Erica (Kika), Igor (Iguito), Mirela (Mimi), Naishe (Fofa), Raphael (Ph), Renata, Rodrigo; pelo apoio,

paciência, carinho. Enfim pela nossa amizade verdadeira que se manteve apesar da distância que se apresentou à nós ao final da nossa graduação. Lembrem-se à distância e o tempo nunca irão nos separar, vocês fazem parte do meu coração.

Aos amigos de laboratório do Departamento de Bioquímica Anna Paula, Amanda Alves, Amanda Lucena, Carlos, Cássia, Clóvis, Cynarha, Danielle, Dewson, Douglas, Elba, Evellyne, Fernanda, Fernando, Gisely, Isabel, Lidiane, Luís, Mariana, Marina, Marthyna, Mary, Mychely, Paulo, Priscilla Sales, Renata, Robson, Rodrigo, Romero, Rosy, Thiago Cahú, Werlayne. Coloquei em ordem pra não dizerem que amo mais um do que o outro!! Tenho que agradecer por vocês fazerem parte do meu cotidiano durante estes últimos 6 anos (espero que continue nos próximos anos também!!) , por me ajudarem nas dúvidas que vez por vezes me surgiam, por me apoiar nos momentos difíceis e, até mesmo, por estarem presentes nos momentos mais descontraídos, além de me ajudarem a concretizar meu aprendizado em bioquímica. Com vocês aprendi a trabalhar coletivamente e a tomar gosto pela pesquisa. A todos vocês os meus mais sinceros agradecimentos.

Estendo meus agradecimentos aos meus amigos Augusto, Ana Carvalho, Carlos, Denize, Dione, Flávia, Marjolly, Rafael, Ricardo, Roseane, Vanessa e Viviane do Laboratório UEMP –UFRJ por me receberem de maneira tão acolhedora e principalmente pelos valorosos ensinamentos que aprendi.

Aos meus queridos amigos Neide (Neidinha) e Miron, pelo carinho imenso que vocês têm por mim, por estarem sempre dispostos a me ouvir, sempre me apoiando, me ajudando da maneira que podem.

A João e Helena, pela disposição constante em ajudar, gentileza e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio científico e financeiro.

No final, quero dizer que agradeço a Deus. **No final porque, para mim, Ele resume tudo e é o motivo de tudo.**

Mais uma etapa foi vencida!!! Sei que ainda é só o começo...

Muito obrigada. Grande beijo!!!

*“De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”*

Fernando Pessoa

RESUMO

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, capazes de interagir de forma reversível com carboidratos através de pelo menos um sítio de ligação, bem como aglutinar células através de dois ou mais sítios de ligação, aglutinam células vegetais e/ou animais e precipitam glicoconjugados. Essa propriedade promoveu a inserção das lectinas em diversas aplicações na área biomédica. Na atualidade, a dengue constitui um dos problemas mais graves de saúde pública, sendo mais prevalente em pessoas da região tropical. Neste trabalho foi investigada a utilização da lectina Cramoll 1,4 imobilizadas em suporte de afinidade para o isolamento de glicoproteínas de soro de indivíduos sadios (IS) e de pacientes com dengue clássica (DC) e dengue hemorrágica (DH), bem, como análises proteômica das amostras. As lectinas da semente de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4, específicas para D-glicose) foram, previamente, imobilizadas em suporte de sepharose CL-4B. Os soros IS, DC e DH foram aplicados a uma coluna de cromatografia contendo Cibacron Blue F3GA para a depleção eficaz de albumina de soro humano. Após a depleção, a fração não adsorvida do soro foi aplicada em uma coluna contendo Cramoll 1,4-Sepharose e equilibrada com NaCl 0,15 M, em seguida a coluna foi eluída com uma solução de D-glicose bioespecífica a 0,3 M em NaCl a 0,15 M. As frações foram recolhidas e avaliadas quanto à concentração de proteína e do perfil electroforético e análise proteômica. Foram identificadas aproximadamente 320 proteínas, sendo que 91 dessas proteínas foram comuns aos três grupos de estudo e também foram detectadas proteínas exclusivas para cada condição: 62 para IS, 31 para DC e 49 para DH. Cramoll 1,4 imobilizada mostrou-se eficiente para purificação de glicoproteínas nos diferentes soros de pacientes com dengue, apresentando um perfil de seletividade característico para os diferentes soros de IS, DC e DH. As lectinas imobilizadas podem ser consideradas como uma potencial ferramenta para o isolamento de moléculas com interesse biotecnológico.

Palavras-chave: Dengue. Proteômica. Lectina imobilizada.

ABSTRACT

The lectins are proteins or glycoproteins non-immune origin able to interact reversibly with carbohydrates through at least one binding site, as well as clumping cells through two or more binding sites, agglutinate plant cells and/or animals and precipitate glycoconjugates. This property has promoted the insertion of the lectins in various applications in the biomedical area. Nowadays, dengue is one of the most serious public health problems, being most prevalent in people of the tropical region. In this work, we investigated the use of Cramoll 1.4 lectin immobilized in support of affinity for the isolation of serum glycoproteins of healthy individuals (HI) and patients with dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF) as well as proteomics analyses of the samples. The lectins of the seed of *Cratylia mollis* (Cramoll 1.4, specific to D-glucose) were previously immobilized in sepharose CL-4B support. Serum of IS, DC and DH have been applied to a column chromatography of Cibacron Blue F3GA for the effective depletion of human serum albumin. After depletion, not adsorbed serum fraction was applied to a column containing Cramoll 1.4 -Sephrose and balanced with 0.15 M NaCl, and then the column was eluted with a solution of D-glucose to 0.3 M in 0.15 M NaCl. The fractions were collected and evaluated for protein concentration, electrophoretic profile and proteomic analysis. Approximately 320 proteins were identified, being that 91 of these proteins were common to the three study groups and also were detected unique proteins for each condition: 62 to HI, 31 for DF and 49 for DHF. Cramoll 1.4 immobilized proved efficient for purification of glycoproteins in different serum from patients with dengue, showing a characteristic selectivity for different sera from HI, DF and DHF. The immobilized lectins can be considered as a potential tool for the isolation of molecules with biotechnological interest.

Keywords: Dengue. Proteomics. Lectin immobilized.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do Brasil mostrando a circulação dos sorotipos de vírus da dengue por macro região em 2008.	8
Figura 2: Incidência de Dengue por Município de Residência, Brasil.	9
Figura 3: <i>Aedes aegypti</i> e <i>A. albopictus</i> .	10
Figura 4: Genoma do vírus da dengue , proteínas virais e as suas funções.	12
Figura 5: Ciclo de replicação do vírus da dengue.	16
Figura 6: Atuação dos Linfócitos T CD4, T CD8.	17
Figura 7: Papel do anticorpo durante infecção secundária.	18
Figura 8: Mecanismo principal associado à permeabilidade vascular e trombocitopenia.	20
Figura 9: Princípio da técnica ELISA.	22
Figura 10: Rede de hemaglutinação mediada por lectinas.	25
Figura 11: <i>Cratylia mollis</i> . Arbusto (à esquerda) e sementes (à direita).	31
Figura 12: Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia.	34
Figura 13: Cromatografia de afinidade.	35
Figura 14: Estrutura química do pigmento sintético Cibacron Blue F3GA.	36
Figura 15: Espectrômetro de massas.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das lectinas quanto aos aspectos estruturais.	27
Tabela 2. Classificação das lectinas quanto às famílias evolutivas.	29

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Atividade hemaglutinante
AHE	Atividade hemaglutinante específica
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CB	Cibacron Blue
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i> - Grupamento de diferenciação 4
CG	Cromatografia gasosa
CGAR	Cromatografia gasosa de alta resolução
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLC	Cromatografia líquida clássica
Con A	Concanavalina A
CSC	Cromatografia de fluido supercrítico
DC	Dengue clássica
DENV	Vírus da dengue
DH	Dengue hemorrágica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	Ionização por eletronebulização
EUA	Estados Unidos da América
FHD	Febre hemorrágica por dengue
GlcNAc	N-acetilglicosamina
HLA	<i>Human leukocyte antigen system</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IS	Indivíduo sadio
IT	Armadilha de íons
MALDI	Dessorção/ionização com laser auxiliado por matriz
MS	<i>Mass Spectrometry</i> -
Neu5Ac	Ácido siálico

NS1	<i>Nonstructural Protein 1</i> (proteína não estrutural 1)
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Q	Quadrupolo
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucléico
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia de polimerase
SCD	Síndrome de choque por dengue
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TAP	Tempo de atividade de protrombina
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TOF	Tempo de voo
TRIS	<i>Hydroxymethyl aminomethane</i>
VSH	Velocidade de hemossedimentação
WBL	<i>Phosphocarpus tetragonolobus</i>
WGA	Lectina de gérmen de trigo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 Dengue	18
2.1.1 Definição	18
2.1.2 Histórico	18
2.1.2.1 <i>Fatores responsáveis pela disseminação</i>	19
2.1.2.2 <i>Sudeste da Ásia</i>	20
2.1.2.3 <i>Na África</i>	20
2.1.2.4 <i>Nas Américas</i>	20
2.1.2.5 <i>No Brasil</i>	21
2.1.2.6 <i>Vírus da dengue nas Américas e Brasil</i>	21
2.1.3 Vetor	25
2.1.4 Agente etiológico	27
2.1.5 Quadro clínico e epidemiológico	28
2.1.6 Perfil imunológico	29
2.1.7 Diagnóstico	36
2.1.8 Tratamento	38
2.2 Lectina	39
2.3 Lectina de <i>Cratylia mollis</i>, cramoll 1,4	46
2.4 Processos de recuperação e purificação de biomoléculas	47
2.4.1 Processos cromatográficos	48
2.4.1.1 <i>Tipos de cromatografia</i>	48
2.4.1.1.1 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	49
2.4.1.1.2 LIGANTE DE AFINIDADE	51
2.4.1.1.2.1 <i>Cibacron Blue</i>	51

2.4.1.1.2.2 Lectinas imobilizadas	52
2.5 Tecido sanguíneo: proteínas séricas	53
2.5.1 Preparação de amostras de soro sanguíneo para análise por espectrometria de massas	54
2.6 Abordagem proteômica	54
2.6.1 Espectrometria de massas em análises proteômicas	55
3 OBJETIVOS	59
3.1 Geral	59
3.2 Específicos	59
CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A	76

1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica derivadas de plantas, animais ou microorganismos que reconhecem estruturas de carboidratos seletivamente. A principal característica dessa classe de proteínas é a sua habilidade de interagir com carboidratos e dessa forma poder se combinar a glicoconjugados presentes na superfície celular e de tecidos; quando imobilizadas em suportes inertes são utilizadas como matrizes de afinidade para isolamento de compostos como glicoproteínas e glicolípídeos.

Cratylia mollis (feijão camaratu) é uma planta nativa da Região Semi-Árida do Estado de Pernambuco, Brasil. Das sementes de *C. mollis* foram isoladas e purificadas diferentes formas moleculares de lectinas denominadas Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3, Cramoll 4 e Cramoll 1,4.

A dengue é uma doença infecciosa não contagiosa, transmitida através do mosquito *Aedes aegypti*, que na atualidade constitui um dos problemas mais graves de saúde pública, sendo mais prevalente nas pessoas da região tropical. Causada pelo vírus da dengue, o qual compreende quatro sorotipos virais (DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4) é classificada como uma arbovirose, pertencente à Família Flaviviridae e ao gênero Flavivirus. As manifestações clínicas desta doença podem variar desde a forma mais comum, dengue clássica (DC), até as mais graves com hemorragias e/ou choque caracterizando a dengue hemorrágica (DH). Uma das técnicas utilizadas para o diagnóstico da doença é o isolamento viral feito com o teste imunoenzimático que captura de anticorpos da classe IgM que pesquisa o antígeno NS-1 presente no capsídeo do vírus que demora cerca 15 dias para informar o resultado. Essa técnica é de pouca valia para o manejo clínico de pacientes graves.

Proteínas séricas muitas vezes servem como indicadores da doença e são uma fonte rica para descoberta de biomarcadores. No entanto, ocorre uma grande diferença na quantidade de proteínas no soro, o que torna a análise muito desafiadora à medida que proteínas em quantidades abundantes tendem a mascarar e dificultar a identificação de possíveis biomarcadores proteicos encontrados em menor quantidade. Por exemplo, a albumina, que compreende 56-63% das proteínas totais no soro humano normal, é particularmente preocupante para análise proteômica. Quando grandes quantidades de proteína são carregadas para facilitar a detecção de formas menos abundantes em eletroforese em gel SDS-PAGE, a resolução pode ser diminuída, devido às manchas de albumina que se sobrepõem as proteínas de menor abundância, mascarando a sua presença e produzindo manchas e precipitados. Assim, as depleções de proteínas séricas ajudam na descoberta e detecção de proteínas menos

abundantes que podem revelar-se marcadores de doença. No caso da albumina, a depleção pode ser feita pelo uso de matrizes de corante sintéticos como Cibacron Blue que é capaz de ligar albumina, interferon e várias enzimas. Uma resina de afinidade como o Cibacron para a remoção de albumina tem a vantagem da capacidade de ligação elevada em comparação a um sistema baseado em anticorpos, mas mostrou-se com falta de especificidade. Cibacron Blue F3GA (CB) é um corante que apresenta um anel triazínico e contém três grupos sulfonato ácido e quatro primários e aminoácidos secundários de grupos básicos. Após a fixação a suportes insolúveis adequados CB tem sido usado como ligante em cromatografia de afinidade para isolar e remover a albumina a partir do soro humano.

Sendo o preparo de amostras uma etapa imprescindível para a obtenção de géis de eletroforese com alta resolução. No caso das amostras de soro sanguíneo humano, a remoção das proteínas majoritárias, principalmente da albumina é essencial para evitar interferência na resolução do gel. Possibilitando a detecção de proteínas menos abundantes, que podem indicar alterações no proteoma e serem potenciais biomarcadores.

A espectrometria de massa (*Mass Spectrometry* - MS) é uma técnica micro analítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra a ser analisada. A espectrometria de massa é uma das mais importantes ferramentas analíticas disponíveis, já que é capaz de fornecer informação sobre a composição elementar de amostras, a estrutura molecular, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras.

Diante do exposto, pode-se afirmar que a utilização matriz de depleção de albumina e de lectinas imobilizadas como suporte de afinidade para o isolamento e a identificação por espectrometria de massas das glicoproteínas de soro de pacientes com dengue, poderá ser um instrumento adicional para a elucidação de proteínas do soro que estejam em quantidades menores. Caracterizando um possível marcador diferencial desta doença.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Dengue

2.1.1 Definição

Dengue é uma doença infecciosa aguda causada por um arbovírus da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, com quatro sorotipos virais (DENV- 1, DENV- 2, DENV- 3 e DENV- 4). O vírus é transmitido por mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* encontrados em áreas tropicais e subtropicais. A doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas: formas assintomáticas, oligossintomáticas, febre de dengue (ou dengue clássica), dengue hemorrágica e a síndrome de choque de dengue. A incidência de casos de dengue aumentou nos últimos anos e se estendeu para regiões geográficas aonde anteriormente não se encontrava. Constituindo assim, um grave problema de saúde pública de interesse internacional com implicações para a segurança sanitária, devido à necessidade de interromper a infecção e a rápida propagação da epidemia além das fronteiras nacionais (WHO, 2010). Informações da história natural da dengue e de seus vetores, com base nos dados históricos disponíveis, permitem avaliar os fatores envolvidos na sua expansão nas áreas tropicais do mundo.

2.1.2 Histórico

A palavra dengue pode ser originária da Espanha, onde a doença foi assim denominada em torno de 1800 em referência ao estado de moleza e prostração, ou pode ter origem africana, onde recebeu o nome de Ki Dengs Pepo, ou Denga, em 1823 (GLUBER, 1997).

Embora a primeira notificação de epidemia da doença que abrangeu os três continentes (Ásia, África e América do Norte) tenha acontecido no final do século XVIII. Os primeiros relatos sobre a doença foram publicados na enciclopédia chinesa durante a dinastia Chin (265 a 420 d.C.), formalmente editada em 610 d.C. na dinastia Tang e em 992 d.C. na dinastia Sung do Norte. A doença foi chamada de veneno da água pelos chineses, que entenderam que o quadro, de alguma maneira, estava correlacionado com insetos voadores e água (GLUBER, 1997).

A infecção deve ter se originado na Ásia, onde o vírus da dengue circulava de forma endêmica com baixa patogenicidade em ciclos silvestres na península da Malásia. O *Aedes*

albopictus é ainda um importante vetor desses ciclos naturais na Ásia que apresenta participação de primatas e, ocasionalmente do homem (RUDNICK & LIM, 1986, CORNET, 1993).

Todos os quatro sorotipos da dengue foram identificados em ciclos silvestres na Ásia e apenas o sorotipo 2 na África, o que reforça o conceito da origem asiática do vírus. Esse conceito é confirmado na década de 1950, quando foram identificados anticorpos para dengue presentes em populações rurais e primatas não-humanos da Malásia (RUDNICK & LIM, 1986, CORNET, 1993). O vírus foi inicialmente isolado no Japão por meio de incubação de material clínico em camundongos (KIMURA, 1944). Na mesma época isolou-se o vírus da dengue pela mesma metodologia em soldados na Índia, em Nova Guiné e no Haváí (SABIN & SCHLESINGER, 1945). Esses isolados do vírus da dengue (DEN) foram classificados como DEN-1 porque foram os primeiros a serem identificados. O sorotipo DEN-2 foi isolado na Nova Guiné, e os sorotipos DEN-3 e DEN-4 a partir de pacientes com quadros hemorrágicos em 1956 nas Filipinas (HAMMON *et al.*, 1960). Desde o principio várias amostras têm sido isoladas, porém todas pertencem a um dos quatro sorotipos descritos na literatura.

2.1.2.1 Fatores responsáveis pela disseminação

O mosquito *Aedes aegypti*, de origem africana, é o vetor mais importante da dengue no mundo. O fato dele adaptar-se ao modo de vida do homem moderno em regiões áridas, utilizando reservatórios de água junto às moradias para postura e o homem como sua fonte de repasto sanguíneo, contribuiu para a disseminação da doença (SCHATZMAYR, 2008).

Nessa acomodação o mosquito também passou a acompanhar as migrações humanas, motivo pelo qual ocorreu uma grande expansão desse vetor para Ásia e as Américas. O comércio de escravos contribuiu para a vinda do vetor para as Américas, espalhando-se a partir dos portos, instalando-se e propagando-se nas cidades com baixo nível de saneamento (SCHATZMAYR, 2008).

A grande quantidade do vetor, presente em lugares próximo ao homem, iniciou uma infestação rapidez os quatro tipos de dengue na Ásia, e a partir do século XVIII surgiram episódios importantes de infecção pela dengue, como em Jacarta, em 1779; Calcutá, 1824; Índia, 1909 e Taiwan, 1916 (GLUBER, 1997).

2.1.2.2 Sudeste da Ásia

Uma Pandemia mundial de dengue iniciou no sudeste asiático durante a Segunda Guerra Mundial, e intensificou-se durante os quinze anos seguintes. Essa epidemia teve como causa o deslocamento de contingentes de refugiados, destruição de cidades e mudança de ecossistemas, com a criação de criadouros artificiais, como pneus e instrumentação de guerra abandonados, a infestação pelo *A. aegypti* e outras espécies de *Aedes* aumentou fortemente favorecendo a pandemia. No pós-guerra, a urbanização desordenada na região asiática, com a formação de núcleos urbanos sem qualquer infraestrutura, criou igualmente condições para a expansão desses vetores (GLUBER, 1997).

Essa situação levou à formação de infecções sucessivas por dengue em vários segmentos populacionais e o surgimento de uma nova forma clínica de dengue, a febre hemorrágica de dengue/ síndrome de choque de dengue (FHD/SCD). A primeira epidemia de dengue do tipo hemorrágico na Ásia ocorreu em Manila, Filipinas, em meados do século XX. Embora se admita a existência da síndrome anteriormente, a FHD/SCD espalhou-se de forma cruel na década de 1980 para Índia, Paquistão, Sri Lanka, China e Ilhas do Pacífico (GLUBER, 1997). Nessa última região, a dengue implantou-se fortemente como um sério problema de saúde pública em muitos arquipélagos, como Polinésia Francesa (Taiti e Marquesas), Nova Caledônia, Ilhas Fiji, Samoa e vários outros. A dengue foi igualmente relatada no norte da Austrália no final do século XX (PHILLIPS & AASKOV, 1990).

2.1.2.3 Na África

Os dados são muito escassos em relação a episódios de dengue no passado. O único relato é uma epidemia em Durban, África do Sul, em 1927 a 1928. Epidemias surgiram em alguns países, como Ilhas Seychelles, 1977; Quênia, 1982; Moçambique e Sudão, 1985; Somália, 1982; Angola e Senegal, em 1986 e 1990; e Arábia Saudita em 1994. É importante ressaltar que formas clínicas graves como FHD/SCD na África são apontadas apenas de forma esporádica, mas não epidêmica (SCHATZMAYR, 2008).

2.1.2.4 Nas Américas

Foi relatada na forma de epidemias desde o século XVII, especialmente em regiões costeiras e associadas ao tráfego negreiro marítimo, pelo qual foram introduzidos mosquitos infectados de outras regiões (SCHATZMAYR, 2008).

Assim, prováveis casos de dengue foram relatados em 1695 em ilhas francesas do Caribe e no Panamá, em 1699. Em 1780 um surto de dengue foi descrito na Filadélfia,

associado provavelmente à entrada do vírus pelo porto, sendo essa a descrição clínica mais segura de casos de dengue nas Américas até então (SCHATZMAYR, 2008).

Em 1844 a 1849, um quadro clínico semelhante foi relatado em várias partes das Américas, pela primeira vez e, posteriormente, em 1918 quadros semelhantes foram descritos no Peru, e em 1926 a 1928, no Caribe, sul dos Estados Unidos da América (EUA), Colômbia e México (SCHATZMAYR, 2008).

2.1.2.5 No Brasil

No Brasil, em 1923, foi relatado o primeiro caso de dengue, em Niterói estado do Rio de Janeiro, com grande riqueza de detalhes clínicos (PEDRO, 1923). Sucessivos surtos e epidemias foram assinalados ao longo dos anos, nos séculos XIX e XX. Entanto, as epidemias tornaram-se raras, e de 1946 a 1963 o Brasil e mais 17 países das Américas conseguiram eliminá-la de seus territórios. Esse fato ocorreu porque nesse período a luta contra o mosquito foi intensa, particularmente com a finalidade de eliminar a forma urbana da febre amarela, também transmitida por este inseto. A estratégia utilizada foi a de uma campanha nacional, centralizada, com estruturação militar, onde a disciplina e a hierarquia eram características marcantes. Infelizmente, o programa foi suspenso e aos poucos o mosquito foi sendo reintroduzido a partir das áreas onde não havia sido erradicado (TAUIL, 2002).

No Brasil o *A. aegypti* foi reencontrado em 1975 na Bahia e em 1977 no Rio de Janeiro. Hoje esse vetor encontra-se na maioria dos municípios brasileiros. O *A. albopictus* surgiu na década de 1980 em regiões próximas do Rio de Janeiro, porém comprovou-se que o vetor se encontrava amplamente disseminado no Estado do Espírito Santo na ocasião, sugerindo a entrada no país por aquele Estado através do intenso tráfego marítimo com a Ásia (SCHATZMAYR, 2008).

2.1.2.6 Vírus da dengue nas Américas e Brasil

O DENV-1 foi reintroduzido em 1977, com epidemias ocorrendo na Jamaica e em Cuba, e em Porto Rico e na Venezuela, em 1978. Nos anos seguintes esse sorotipo espalhou-se pelo Caribe, México, EUA, América Central e norte da América do Sul, causando epidemias de variadas extensões, porém sempre com características clínicas de dengue clássica (SCHATZMAYR, 1986).

A epidemia de DENV-1 na América do Sul começou em 1978, atingindo inicialmente a Venezuela, Colômbia e as Guianas. Essa mesma amostra de DENV-1 espalhou-se, chegando ao Brasil por Roraima em 1981 a 1982 e ao Rio de Janeiro em 1986. Casos de

dengue hemorrágica surgiram, quando da entrada posterior do DENV-2 em países como Bolívia, Paraguai, Equador, Peru, e Argentina e, em 1990, no Brasil. Em 1981 ocorreu a primeira epidemia de dengue hemorrágica das Américas. Sendo essa epidemia causada pela entrada em Cuba do DENV-2, amostra de origem asiática, após a grande epidemia de DENV-1 ocorrida quatro anos antes, confirmando a teoria de que infecções sucessivas por dengue agravam o risco do aparecimento de formas hemorrágicas da doença (SCHATZMAYR *et al.*, 1986).

Igualmente, em 1981, o DENV-4 foi introduzido no Caribe Oriental. Da mesma maneira que o DENV-1, esse sorotipo espalhou-se rapidamente para outras ilhas do Caribe, México, América Central e norte da América do Sul, causando epidemias nos mesmos países que haviam sofrido as epidemias de DENV-1. Algumas dessas epidemias foram associadas ao surgimento de casos esporádicos de dengue do tipo hemorrágico, reconfirmando a teoria de que uma segunda infecção de dengue no mesmo paciente apresenta uma tendência ao desenvolvimento de formas mais graves da doença. (NOGUEIRA *et al.*, 1990).

No Brasil, o DENV-2, a exemplo do DENV-1 em 1986, entrou pelo Rio de Janeiro em 1990, quando começaram a surgir os casos hemorrágicos associados a infecções secundárias de dengue (NOGUEIRA *et al.*, 1990).

Em 1994 uma amostra de DENV-3 foi reintroduzida nas Américas, causando uma epidemia extensa na Nicarágua, que se propagou para outros países da América Central e Caribe. Essa amostra de DENV-3 que aparenta ser uma reintrodução recente a partir da Ásia, surgiu no Brasil no final de 2000 e causou, no verão de 2002, grave epidemia no Rio de Janeiro, espalhando-se rapidamente pelo país (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Já o DENV-4 foi relatado como causador da dengue na cidade de Manaus, no norte do país (FIGURA 1) (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).



FIGURA 1: Mapa do Brasil mostrando a circulação dos sorotipos de vírus da dengue por macrorregião em 2008. Fonte: FIGUEIREDO, 2010.

No Brasil, a região Sudeste é a que registra o maior número de casos de dengue por ano, as demais regiões, por ordem de incidência de casos de dengue são Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Norte. Segundo o Ministério da Saúde, em 2006 foram registrados quase 280 mil casos de dengue no Brasil, o equivalente a 1 caso não fatal a cada 30 km², indicando um crescimento de 26,3% em relação a 2005. Em 2008, houve um aumento da incidência de dengue no Brasil comparado há outros anos (FIGURA 2), principalmente porque o estado do Rio de Janeiro passou por um grave surto de dengue dos tipos 1 e 2. Em 2009, a maioria dos casos localizou-se na Bahia. O ano de 2009, em comparação ao de 2008, teve uma redução de 50% nos casos de dengue no país (SVS, 2009).

No começo do ano de 2011, o Brasil já registrava mais de 155 mil casos de dengue, sendo que a maior parte dos casos se concentrou na região Norte (31,6%) e Sudeste (27%). A maior parte dos casos (53%) foi notificada em cinco estados: Amazonas, Acre, Paraná, Rio de Janeiro e Minas Gerais.

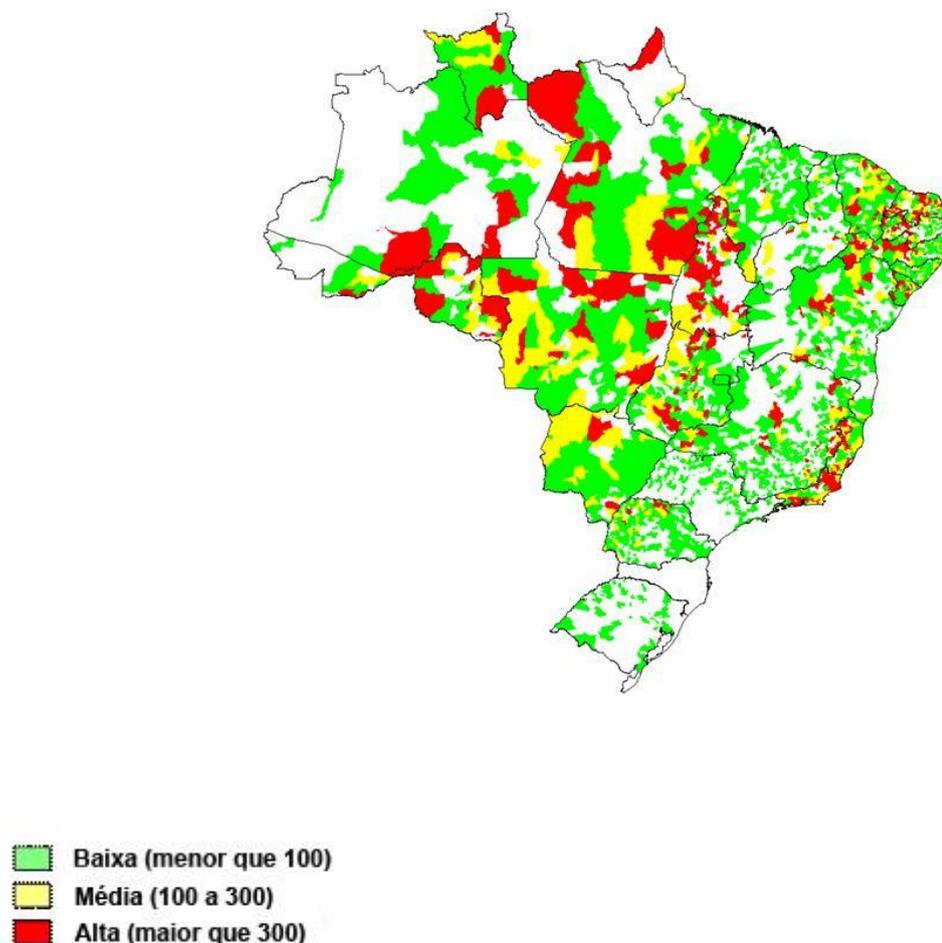


FIGURA 2: Incidência de Dengue por Município de Residência, Brasil. Fonte: SVS, 2008

Dados do Ministério da Saúde medidos entre Janeiro a Abril de 2012 mostraram que foram confirmados 1083 casos graves da doença, uma redução de 87% com relação ao mesmo período de 2011. Além disso, foram confirmados 74 óbitos por dengue, 80% a menos que em 2012. O estado com maior incidência de dengue foi o Rio de Janeiro, com mais de 80 mil casos confirmados. Os outros estados com alta incidência foram Bahia (28.154 casos), Pernambuco (27.393 casos), São Paulo (19.670 casos) e Ceará (17.205 casos).

O primeiro caso de dengue de 2013 foi identificado na cidade de Boituva, no interior do estado de São Paulo. Segundo o Ministério da Saúde, pelo menos 77 municípios brasileiros estão em situação de risco para a dengue (MALTA DE SÁ, 2013).

2.1.3 Vetor

A dengue é uma doença transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *A. aegypti* o principal vetor no mundo e o *A. albopictus* o vetor secundário na Ásia (FIGURA 3). Tendo feito o repasto do sangue infectado, o mosquito está apto a transmitir o vírus após doze dias de incubação extrínseca. A transmissão mecânica também é possível quando o repasto é interrompido e o mosquito, imediatamente, se alimenta em um hospedeiro suscetível próximo. Não há transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções com pessoa sadia, nem por intermédio de água ou alimento. O período de incubação varia de três a quinze dias, sendo em média seis dias (SILVA-JÚNIOR & PIMENTA-JÚNIOR, 2008).



FIGURA 3: *Aedes aegypti* e *A. albopictus*

Entre os fatores de transmissão mais importantes incluem-se as áreas geográficas em que o vetor se desenvolve e os contatos com a população hospedeira, assim como a altitude é um fator limitante para o desenvolvimento do vetor e do vírus. Em pequenas altitudes, a temperatura, a umidade e a precipitação média anual afetam a sobrevivência e a reprodução do vetor, da mesma maneira que a temperatura afeta a replicação do vírus no vetor (SILVA-JÚNIOR & PIMENTA-JÚNIOR, 2008).

Vários determinantes sociais da transmissão também são identificados, como altas densidades populacionais, urbanização não planejada e alta densidade habitacional. A disponibilidade de serviços públicos, como o abastecimento contínuo e regular de água assim como a coleta e a disposição final adequada de resíduos sólidos, também influencia na densidade do vetor e no risco de transmissão (OPS, 1995).

É fundamental destacar como fatores de risco de transmissão da doença: o hospedeiro, o vetor e o agente. Os fatores ligados ao hospedeiro incluem sexo, idade, condições imunológicas e profissão. Todos os seres humanos são igualmente suscetíveis à infecção, mas mesmo com as transformações do mundo moderno, as mulheres e as crianças podem estar em maior risco, em razão das suas atividades no ambiente domiciliar. Um fator associado ao agente da doença que influencia a transmissão da dengue é o nível de viremia. As pessoas com nível virêmico mais alto fornecem maiores quantidades de vírus ao mosquito. Entre os mais importantes fatores de risco associados ao vetor destacam-se as densidades das fêmeas adultas, sua idade, frequência de alimentação, a disponibilidade de hospedeiros, suscetibilidade à infecção, abundância e tipos de criadouros (SILVA-JÚNIOR & PIMENTA-JÚNIOR, 2008).

O *A. aegypti* é uma espécie das regiões tropicais e subtropicais do mundo que provavelmente é originário da África, onde se encontram três formas dessa espécie: o *A. aegypti*, na forma típica, o *Aedes queenslandensis* e o *Aedes formosus*, um mosquito silvestre mais escuro. Apenas as duas primeiras formas são encontradas no continente americano, presume-se que foram transportados por tambores de água dos barcos durante as primeiras explorações e colonizações européias. Esse mosquito é essencialmente urbano, que se encontra em maior abundância em povoados e cidades, apesar de alguns registros de infestações rurais, provavelmente introduzidas em forma de ovo ou larva, em recipientes que são transportados para habitações rurais, principalmente para o armazenamento de água (NELSON, 1986).

O ciclo de vida do *A. aegypti* compreende o ovo, quatro estágios larvais, um estágio de pupa e a fase adulta. A oviposição ocorre, em geral, em recipientes escuros ou sombreados, com superfícies ásperas, preferindo água limpa, cristalina e sem cor, ao invés de água turba ou muito poluída com matéria orgânica. É comum, a fêmea distribuir cada postura em recipientes diferentes. Após o desenvolvimento embrionário ser concluído, os ovos podem suportar longos períodos de dessecação, algumas vezes até por mais de um ano. Quando em contato com a água novamente, a maioria dos ovos eclode rapidamente, embora alguns precisem ser molhados várias vezes. A capacidade dos ovos suportarem a dessecação é um dos maiores obstáculos à erradicação desse vetor. Além disso, os ovos podem ser transportados por longas distâncias em recipientes secos. A eliminação dos mosquitos adultos, em uma localidade, durante muitos meses, não impede a reinfestação, pois os ovos dessecados, existentes em recipientes secos, se molhados novamente, viabilizam a

recomposição do mosquito. O *A. aegypti* vive relativamente pouco tempo, de dez a quarenta e dois dias, o suficiente para transmitir o vírus da dengue (OPS, 1995).

2.1.4 Agente etiológico

O agente etiológico da dengue é um arbovírus (vírus que pode ser transmitido ao homem por vetores artrópodes). Pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que inclui aproximadamente setenta vírus, sendo que cerca de trinta causam doença ao homem (GIBBONS & VAUGHN, 2002). Alguns exemplos desta família incluem os vírus da febre amarela, encefalite oeste do Nilo, encefalite Japonesa e encefalite St. Louis (SUCEN, 2008). Os *Flavivirus* são vírus de 40 a 60 nm de diâmetro, cujas partículas virais são esféricas e contém várias cópias de três proteínas estruturais, envelope lipoprotéico de membrana dupla derivadas de uma única cópia de RNA cadeia simples de polaridade positiva que faz replicação intracelular e intracitoplasmática. O genoma do vírus é organizado em três proteínas estruturais (capsídeo, pré- M e envelope) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). Entre as proteínas virais, a proteína do envelope é uma das mais antigênicas e a proteína NS1 está relacionada com a lise de células infectadas, mediada pelo sistema complemento (FIGURA 4) (OPS, 2010).

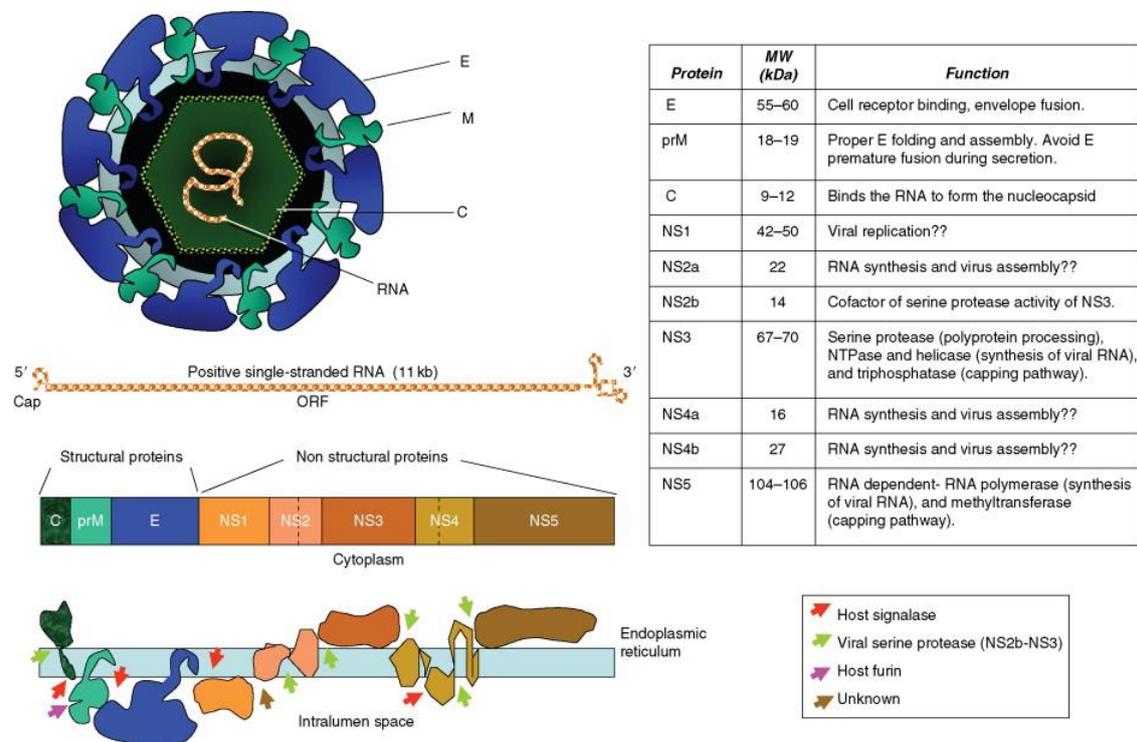


FIGURA 4: Genoma do vírus da dengue, proteínas virais e as suas funções. Fonte: GUZMAN, 2008.

2.1.5 Quadro clínico e epidemiológico

Atualmente a dengue é a arbovirose mais importante do mundo. Aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas encontram-se sobre o risco de infecção, principalmente em países tropicais, nos quais a temperatura e a umidade favorecem a proliferação do vetor. Entre as doenças reemergentes é a que constitui mais grave problema de saúde pública (WHO, 2010).

A dengue pode apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo desde quadros assintomáticos, podendo mostrar-se com sintomas clássicos, até formas hemorrágicas e de choque. Toda essa variedade de manifestações que a dengue assume proporciona uma dificuldade no processo de diagnóstico e, Consequentemente, na escolha da terapêutica adequada (CUNHA, 1998).

Na forma assintomática, a mais comum, os indivíduos que podem ter sido infectados pelo vírus da dengue e não apresentaram sintomas, em razão das características de baixa virulência do vírus ou do aporte imunológico do indivíduo (CUNHA, 1998).

Na forma oligossintomática não se pode diferenciar clinicamente a dengue das outras viroses. Apresenta-se como febre indiferenciada, assemelhando-se à síndrome gripal (CUNHA, 1998).

Na dengue clássica (DC), o quadro clínico inicia-se com febre alta, seguida de cefaléia intensa, dor retro-orbital e/ou holocraniana, e acompanhada de mialgias, artralguas, astenia e prostração. Ocorrem sintomas inespecíficos, como náuseas, vômitos, anorexia, dor de garganta. As manifestações cutâneas surgem no terceiro ou quarto dia de doença, na forma de exantema maculopaular, centrífugo, iniciado no tronco, que poupa regiões palmoplantares. O prurido cutâneo intenso, caracteristicamente, surge durante a fase de remissão do exantema. A febre desaparece até o sexto dia, e em alguns pacientes inicia-se a fase de convalescença, persistindo astenia, adinamia, depressão e prurido (PERIAGO & GUZMÁN, 2007).

Na FHD os sintomas iniciais são os mesmos da DC, com febre intensa, persistindo por até sete dias, evoluindo abruptamente para as manifestações hemorrágicas espontâneas, com prova do laço positiva. Esses fenômenos iniciam-se em torno do segundo ou terceiro dia da doença na forma de petéquias na face, palato, epistaxe, gengivorragia, equimoses ou até quadros mais intensos, como sangramento gastrointestinal, hematúria. O fator determinante da FDH é o extravasamento plasmático por disfunção endotelial, que pode se expresso por meio de hemoconcentração, hipoalbuminemia e/ou derrames cavitários (PERIAGO & GUZMÁN, 2007).

Na SCD os sinais clínicos são a presença de alterações neurológicas, pele fria, sudorese, insuficiência circulatória caracterizada por pulso fraco, aumento da frequência cardíaca, diminuição da pressão arterial, associado a um aumento do extravasamento plasmático para o terceiro espaço, levando a um colapso circulatório com choque por hipovolemia, que representa o extremo da gravidade da doença, podendo levar ao óbito (PERIAGO & GUZMÁN, 2007).

A dengue representa um problema grave de saúde pública, com perspectiva de enfrentar condições piores em razão da presença dos três sorotipos circulando no país, que está se consolidando em todo o território nacional, atingindo municípios e bairros, mantendo endêmicos locais que sofrem deficiências em saneamento básico e com déficits habitacionais. Isso sem considerar a entrada do sorotipo quatro no país, o que certamente irá acontecer, favorecendo uma situação preocupante de calamidade pública (OPS, 2010).

O Brasil apresenta condições climáticas e ambientais muito favoráveis ao mosquito vetor da dengue. Além disso, o país sofreu, nas últimas décadas, algumas modificações demográficas e sociais importantes que facilitaram o surgimento de epidemias de dengue, como o processo acelerado de urbanizações, que alterou radicalmente a proporção de moradores urbanos e rurais (TEXEIRA *et al.*, 1999).

Esse crescimento acelerado produziu falhas significativas na infra-estrutura das cidades, como a insuficiência de acesso permanente ao abastecimento de água e aos serviços de limpeza urbana. Além disso, tem-se notado o crescimento do uso de depósitos e materiais não-biodegradáveis na vida cotidiana, o que também contribui para a criação de um ambiente muito favorável para a própria adaptação do mosquito *A. aegypti* (TAUIL, 2002).

Não existem condições técnicas para erradicar a dengue, devido à persistência do vetor da doença no meio urbano. A única maneira de tentar eliminar essa doença é através de ações de combate ao *A. aegypti*, único elo vulnerável da cadeia epidemiológica da dengue. Medidas de controle como: saneamento do meio ambiente; ações de informação; educação e comunicação em saúde e o combate direto ao vetor, são extremamente necessárias para prevenir e combater o vetor tentando assim, reduzir o risco de transmissão da dengue (OPS, 2010).

2.1.6 Perfil imunológico

O sistema imunológico dos seres humanos responde a presença de vírus em seu interior por meio de dois mecanismos: a resposta humoral e a resposta celular. A resposta

humoral se caracteriza, de maneira predominante, pela mediação de moléculas específicas denominadas genericamente de anticorpos, enquanto a resposta celular envolve principalmente a atuação de células componentes do sistema imunológico humano (ABBAS *et al.*, 2012).

Os principais componentes do sistema de defesa imunológicos são os linfócitos, que se dividem em dois tipos celulares diferentes. Os linfócitos produzidos e diferenciados na medula óssea, designados linfócitos B, são os responsáveis pela produção de anticorpos. Os linfócitos que se diferenciam no timo são designados linfócitos T e estão relacionados com a imunidade celular (ABBAS *et al.*, 2012).

Esses dois mecanismos atuam de forma interligada, já que diferentes subtipos de linfócitos T podem atuar estimulando ou inibindo a maturação dos linfócitos B em plasmócitos, que são produtores de anticorpos (ABBAS *et al.*, 2012).

Os linfócitos T CD4 e os linfócitos T CD8 são duas subpopulações de linfócitos T de particular importância para se entender a teoria da infecção sequencial da dengue hemorrágica (FIGUEIREDO, 1998).

As células T CD4 apresentam funções auxiliadoras e indutoras dos linfócitos T sobre outros linfócitos T; dos linfócitos T sobre linfócitos B e dos linfócitos T sobre os macrófagos, exclusivamente quando mediadas por antígenos da classe II do sistema de histocompatibilidade principal. Além disso, diferentes subtipos de linfócitos T CD4 podem ter funções contraditórias no sistema de defesa. Os linfócitos T CD4 (JR4+) induzem os linfócitos T CD8 a inibir os plasmócitos na sua produção de imunoglobulinas, enquanto, por outro lado, o subtipo de linfócitos T CD4 (JR4-) pode induzir a produção de imunoglobulinas pela maior diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos (PIUVEZAM & PERALTA, 1998).

Os linfócitos T CD8, que representam trinta por cento dos linfócitos periféricos, estão relacionados com a supressão da resposta imune e com a mediação da citotoxicidade para aloantígenos. Sua ação está relacionada com os antígenos classe I do sistema de histocompatibilidade principal (PIUVEZAM & PERALTA, 1998).

Na infecção da DC, ou primoinfecção, prevalece a resposta humoral do sistema imunológico. Os vírus infectam, inicialmente, os histiócitos da pele e, posteriormente, fazem sua primeira replicação viral nos linfonodos locais, nas células lisas e estriadas e nos fibroblastos causando assim as mialgias devido à multiplicação viral ocorrer no próprio tecido muscular (FIGURA 5). Após essa multiplicação inicial, produz-se uma viremia livre no

plasma ou no interior dos monócitos/macrófagos. Os anticorpos ligam-se aos epítomos da proteína E do envelope viral por fixação do complemento ou pelo bloqueio dos receptores para Fc das IgG, facilitando a ação citotóxica dos linfócitos tipo T CD8 sobre as células fagocitárias infectadas (FIGUEIREDO, 1998).

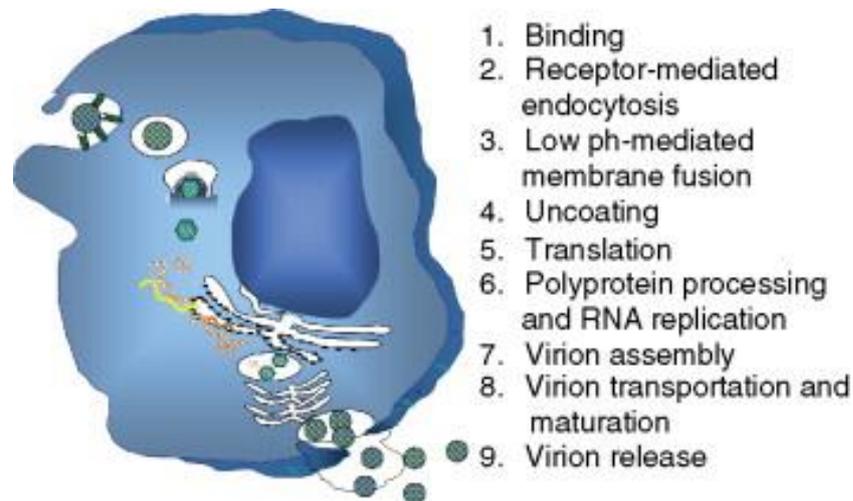


FIGURA 5: Ciclo de replicação do vírus da dengue. Fonte: GUZMAN, 2008.

As proteínas NS1, NS3 e E são proteínas do vírus que estimulam a ação citotóxica dos linfócitos, restando, após a primoinfecção, uma quantidade decrescente de anticorpos subneutralizantes e a presença das células de memória sensibilizadas especificamente para o vírus da dengue (FIGUEIREDO, 1998).

A atividade dos linfócitos CD4⁺ lisando células infectadas e portando receptores tipo HLA-2, e dos linfócitos CD8 sobre células infectadas portando receptores tipo HLA-1, produziriam níveis elevados de citocinas séricas, como o interferon gama, interleucina 2, fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6 (FIGURA 6) (FIGUEIREDO, 1998).

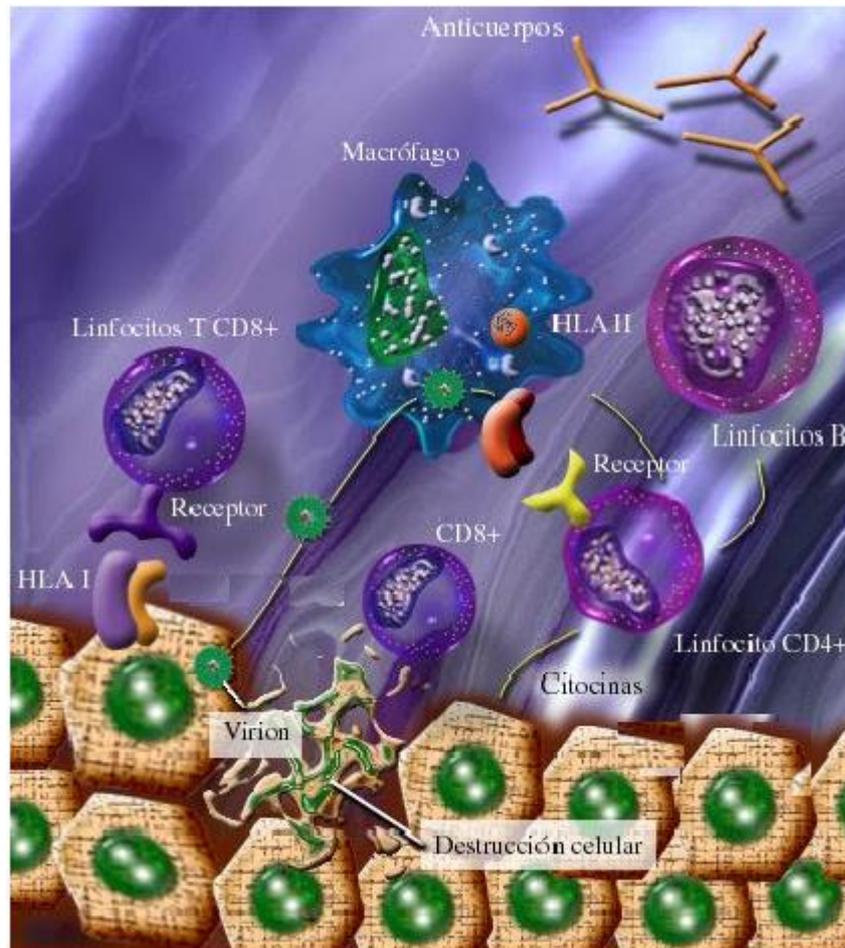


FIGURA 6: Atuação dos Linfócitos T CD4, T CD8.

Fonte: <http://fundacionannavazquez.files.wordpress.com/2008/03/linfocitos.jpg>

Embora estudos demonstrem a presença do vírus da dengue em pulmões, fígado, linfonodos, medula óssea e glomérulos renais, os estudos *in vitro* assinalam que o sistema fagocítico mononuclear representa o local específico de replicação viral. Na dengue hemorrágica foi demonstrada, por imunofluorescência, a presença do vírus na superfície do linfócito B, podendo significar que os linfócitos sejam um local de replicação viral, ou mesmo que sejam imunocomplexos ligados aos receptores Fc dos linfócitos (GUIMARÃES, 1999).

Esses mesmos estudos sugerem que a permanência de células de memória específicas para o *Flavivirus* da dengue e que a presença de imunoglobulinas do tipo IgG, também específicas para o *Flavivirus* da dengue, no soro de pacientes previamente sensibilizados, viabilizaram a penetração do vírus e sua replicação no interior das células do sistema fagocitário mononuclear (GUIMARÃES, 1999).

Nos casos de dengue hemorrágica, a penetração maciça do vírus no sistema fagocitário mononuclear provocaria a liberação de mediadores químicos que estimulariam os basófilos a

secretar grandes quantidades de histamina, ativariam o sistema de complemento e dos mecanismos de coagulação representariam, respectivamente, o início das alterações da permeabilidade vascular e dos distúrbios hemorrágicos da DHF/SCD (GUIMARÃES, 1999).

A recuperação de uma infecção primária deixa uma imunidade sólida com caráter permanente para o sorotipo homólogo. Após a primoinfecção, alguns anticorpos não-soro-específicos permanecem circulando em quantidade subneutralizante e há permanência de linfócitos de memória, que sintetizam os anticorpos do tipo IgG em quantidade muito maior do que na primeira infecção. Quando em uma pessoa os dois tipos de anticorpos estão presentes, se os anticorpos neutralizantes encontram-se em concentrações adequadas, o efeito biológico será a neutralização do vírus infectante independentemente da concentração de anticorpos inibidores da hemaglutinação. No entanto, ao serem diminuídas as concentrações neutralizantes, os anticorpos inibidores da hemaglutinação cumprem a função biologicamente inapropriada de aumentar a infecção (FIGURA 7) (FONSECA & FIGUEREDO, 2005).

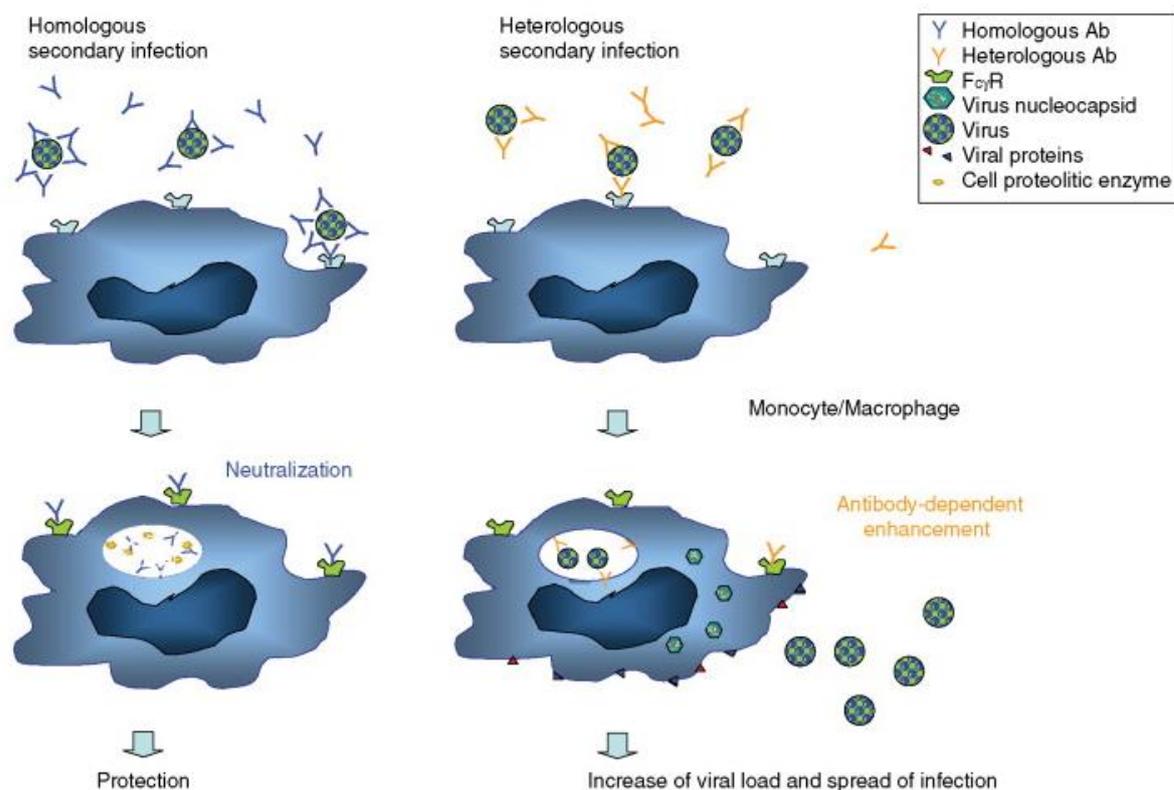


FIGURA 7: Papel do anticorpo durante infecção secundária. Fonte: GUZMAN, 2008.

Esses anticorpos são reconhecidos pelos receptores de membrana tipo Fcγ, facilitando a penetração dos vírus nos macrófagos. Os linfócitos tipo T CD4 também aumentam a

exposição pelos macrófagos, tornando os receptores tipo Fc γ da membrana dos macrófagos mais permissíveis a entrada do vírus. Esse mecanismo estimula a fagocitose do vírus pelos macrófagos, além de aumentar a população de macrófagos. Esse processo resultaria em uma superpopulação de monócitos hiperinfectados, a qual possui antígenos de histocompatibilidade, denominados HLA-1, que facilitariam o seu reconhecimento pelos linfócitos tipo T CD8, com sua atividade citotóxica e liberação de linfocinas (FONSECA & FIGUEREDO, 2005).

Esses mesmos monócitos hiperinfectados possuem também antígenos de histocompatibilidade, denominados HLA-2, que estimulariam a atuação dos linfócitos tipo T-Help, os quais, por sua vez, ativam os linfócitos tipo B a produzirem anticorpos específicos antivírus da dengue. Os mesmos linfócitos T-*Help* estimulam os linfócitos tipo T CD4 a reconhecerem os antígenos de histocompatibilidade HLA-2, intensificando sua atividade destruidora sobre os macrófagos infectados. Os linfócitos T CD4, previamente sensibilizados, ao terem um segundo contato com vírus da dengue produzem Interferon gama, os quais atuam sobre os receptores Fc γ , tornando os vírus mais facilmente aderentes aos macrófagos, potencializando assim, a atividade citotóxica dos linfócitos tipo T CD8 contra células infectadas. O mesmo Interferon gama provoca aumento na concentração de antígenos de histocompatibilidade viral HLA-1 e HLA-2 nos macrófagos, facilitando o reconhecimento dos epítomos virais pelos linfócitos T CD8 e T CD4 e, conseqüentemente, aumentando a liberação de linfocinas (FONSECA & FIGUEREDO, 2005).

Os macrófagos infectados, ao serem lisados pelos linfócitos T CD4 e T CD8, liberam: tromboplastina que inicia os fenômenos da coagulação; proteases ativadoras do complemento que provocam lise celular e choque; fator de necrose tumoral alfa que atua sobre as células inflamatórias e endoteliais, levando à trombocitopenia e induz também a interleucina 8 atuar sobre os basófilos, provocando a liberação de histamina, responsável pelo aumento da permeabilidade vascular (FIGURA 8) (FONSECA & FIGUEREDO, 2005).

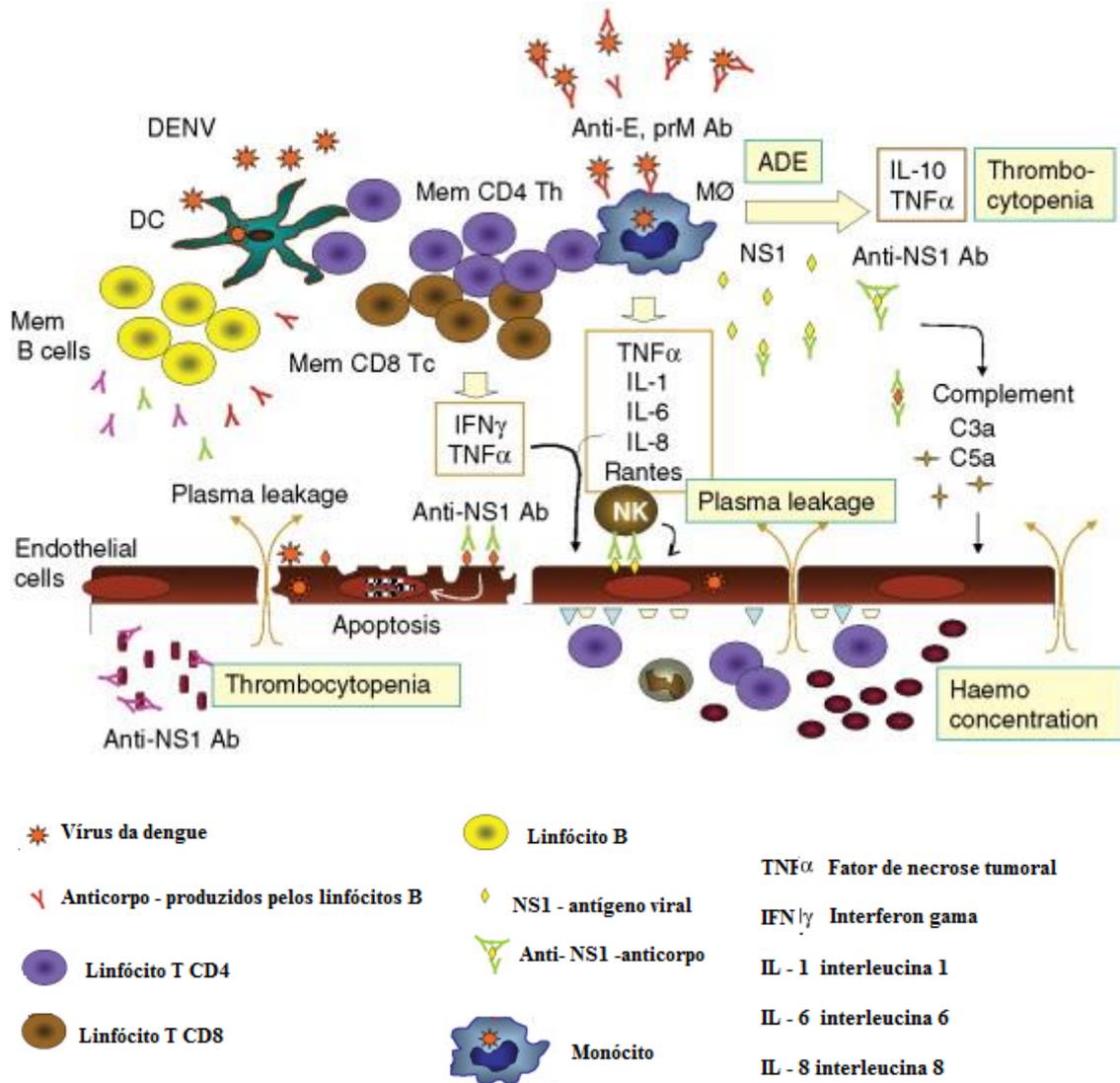


FIGURA 8: Mecanismo principal associado à permeabilidade vascular e trombocitopenia. Fonte: GUZMAN, 2008.

A trombocitopenia e o aumento da permeabilidade vascular são responsáveis, respectivamente, pelos fenômenos hemorrágicos e pelo extravasamento de líquidos e células, sais e proteínas para o exterior dos vasos sanguíneos (GUIMARÃES, 1999).

As plaquetas possuem alguns receptores de membranas semelhantes aos receptores de Fc da membrana dos macrófagos. É possível que fatores imunológicos que levam ao choque sejam os mesmos capazes de lisar as plaquetas. Além disso, tem sido demonstrado que as plaquetas podem liberar aminas vasoativas que aumentam a permeabilidade vascular (GUIMARÃES, 1999).

2.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da dengue é importante, tendo em vista que outras patologias podem apresentar um quadro clínico semelhante. Quanto mais cedo à doença for reconhecida maior será a chance de impedir a cascata de eventos inflamatórios que influencia diretamente na gravidade do quadro clínico, acarretando em efeitos danosos ao organismo.

Os exames laboratoriais necessários para investigação da dengue são divididos em dois grupos: os inespecíficos que auxiliam no diagnóstico diferencial em relação a outras doenças infecciosas e os específicos que comprovam a presença da infecção viral e auxiliam no melhor conhecimento da epidemiologia da doença e suas apresentações clínicas e assim, contribuindo para redução da ocorrência de dengue por meio da intensificação de medidas de controle do vetor.

A coleta da amostra para os testes inespecíficos é feita em um tubo estéril com dois a cinco mililitros de sangue venoso. Já para os testes específicos, a primeira coleta é feita apenas a partir do quinto dia do início dos sintomas, na fase aguda da doença. A segunda coleta é feita no período de convalescência que vai de sete a vinte e um dias depois da primeira coleta. A quantidade de material colhido é a mesma dos testes inespecíficos devendo somente evitar o congelamento da amostra (SILVA *et al.*, 2008).

O hemograma é um exame inespecífico utilizado no diagnóstico e que se apresenta usualmente com leucopenia, embora possa ocorrer leucocitose. Pode estar presente linfocitose com atipia linfocitária. Destacando-se o aumento da concentração do hematócrito e trombocitopenia (SERUFO *et al.*, 2000).

Outro parâmetro usado é a velocidade de hemossedimentação (VSH) que se relaciona com a hemoconcentração e perda de plasma para o interstício. Tendo como resultado valores muitos baixos em relação à faixa de normalidade (SERUFO *et al.*, 2000).

Distúrbios da coagulação e fibrinólise ocorrem com frequência razoável nos pacientes com as formas mais graves da doença. As provas de coagulação sanguínea apresentam alterações no tempo de atividade de protrombina (TAP), do tempo parcial de tromboplastina ativada (TTPa) e baixos níveis de fibrinogênio refletem o consumo de fatores de coagulação e estímulo do sistema fibrinolítico (THIGS, *et al.*, 1996).

Nos casos de hepatite, que pode ocorrer durante a primeira viremia pelo vírus da dengue, há um aumento das enzimas hepáticas, sendo primeiramente detectada a alteração na

aspartato aminotransferase (AST) seguido de posterior elevação da alanina aminotransferase (ALT) (SERUFO *et al.*, 2000).

Também é feita a dosagem de sódio e potássio que pode mostrar-se alterada se houver extravasamento de plasma para os tecidos. Na dosagem da albumina sérica é detectada uma redução que ocorre em razão da hemoconcentração, com subsequente transferências de fluidos para o interstício (SERUFO *et al.*, 2000).

Vários testes específicos são feitos para comprovar a infecção com o vírus da dengue e caracterizar as cepas e os sorotipos circulantes.

A obtenção das amostras para os testes específicos de isolamento viral, pesquisa de antígenos NS1 e reação em cadeia de polimerase (PCR) é realizada na fase aguda com a coleta do sangue e devida separação do soro devendo ser mantidos em tubos fechados e acondicionados na temperatura ideal de armazenamento que é de -70°C . Já para os testes específicos de inibição da hemaglutinação e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) a coleta de amostras deve ser feita na fase de convalescência e armazenados da mesma maneira que as amostras coletadas na fase aguda (SILVA *et al.*, 2008).

O isolamento viral é feito a partir da inoculação do soro na primeira semana da doença em linhagens de células obtidas de mosquitos. A confirmação da presença do vírus se dá pela técnica de imunofluorescência indireta com a utilização de soros hiperimunes ou, ainda, empregando-se conjugados policlonais anti-dengue. Para identificação do sorotipo realiza-se a reação de imunofluorescência indireta utilizando-se anticorpos monoclonais (GUZMAN *et al.*, 2008).

A detecção dos vírus da dengue pela metodologia de amplificação genômica utilizando transcrição reversa seguida da reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) é mais sensível do que o isolamento em cultivo de células. Essa técnica é bastante empregada em situações em que o material disponível não é adequado para o isolamento viral (WHO, 2010).

A técnica ELISA é o teste imunoenzimático mais utilizado na confirmação de casos suspeitos de dengue, pois nesse teste é feita a captura de anticorpos da classe IgM (FIGURA 9). É uma técnica de fácil execução, podendo ser processado um número elevado de amostra (WHO, 2010).

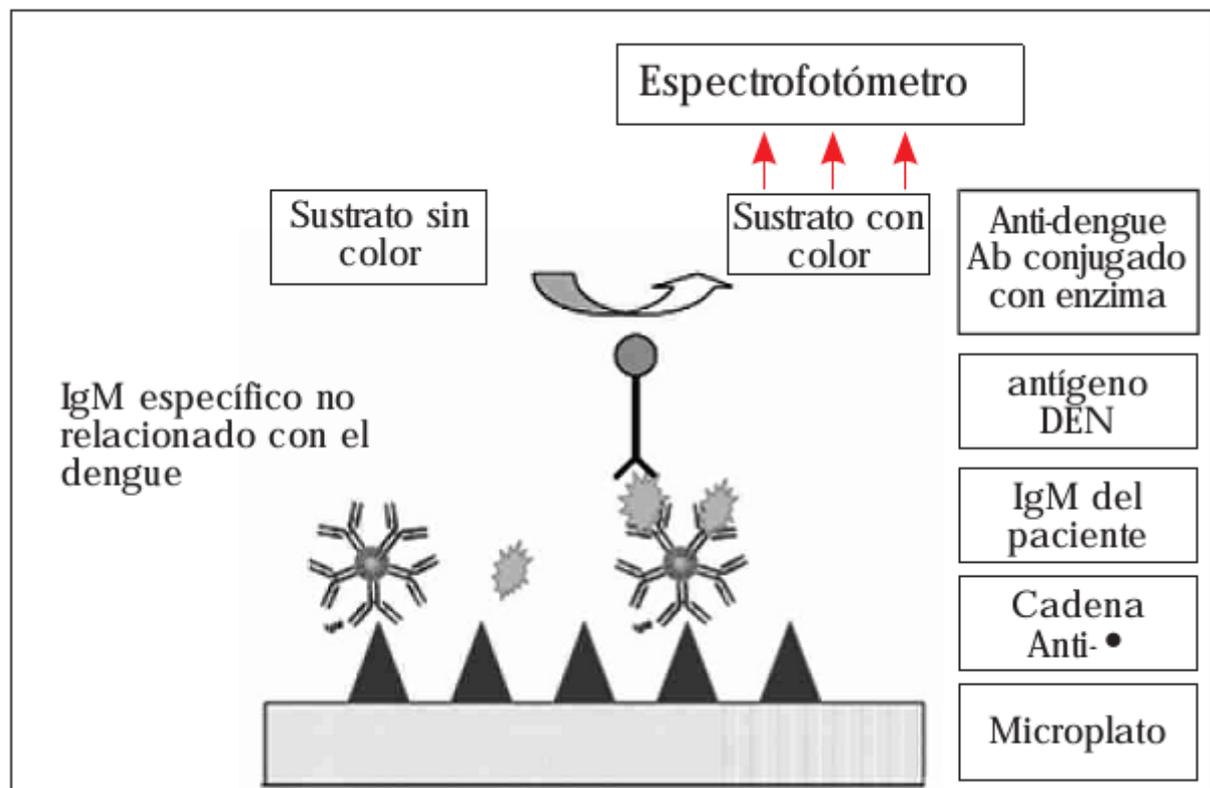


FIGURA 9: Princípio da técnica ELISA.

O teste de pesquisa do antígeno NS-1 utiliza anticorpos monoclonais de camundongos para a captura e revelação do antígeno NS-1 do vírus da dengue, no soro do paciente. Tem como característica principal a realização de um diagnóstico precoce, isto é, entre o primeiro e o quarto dia de doença (VORNDAM & KUNO, 1997).

2.1.8 Tratamento

O uso de antitérmicos é recomendado para todo paciente com febre, principalmente para crianças com menos de dois anos de idade com risco de convulsões. É importante enfatizar a proibição do uso de salicilatos nos paciente com suspeita ou com a confirmação do diagnóstico de dengue, visto o maior risco de sangramento. Deve-se reforçar a significância da hidratação oral e/ou hidratação parenteral nos casos de instabilidade hemodinâmica. E em alguns casos é necessária a transfusão de concentrado de plaquetas (SOUZA *et al.*, 2008).

Não há tratamento específico para dengue, o que torna eminentemente sintomático ou preventivo das possíveis complicações. O cuidado adequado com os pacientes depende do reconhecimento precoce dos sinais de alerta, do monitoramento contínuo e da pronta reposição hídrica (SOUZA *et al.*, 2008).

2.2 Lectinas

A ocorrência na natureza de proteínas capazes de aglutinar eritrócitos é conhecida desde meados do fim do século XIX. Tais proteínas foram então denominadas hemaglutininas, ou fitohemaglutininas, devido ao fato de serem originalmente encontradas em extratos vegetais. O primeiro registro científico é creditado a Peter Hermann Stillmark, em 1888, quando constatou que a toxina presente nas sementes de *Ricinus communis* era uma proteína e a denominou de ricina. Por um breve tempo sua toxicidade foi atribuída diretamente à sua capacidade hemaglutinante. Posteriormente Hellin, também trabalhando no mesmo grupo de pesquisa de Stillmark, fez descobertas similares com sementes de *Abrus precatorius*. A partir desta época, várias dessas proteínas foram isoladas e caracterizadas com relação à sua estrutura molecular, especificidade por carboidratos e propriedades bioquímicas (SHARON & LIS, 2004).

Landsteiner & Raubitschek, em 1908, discutiram pela primeira vez a especificidade das lectinas e observaram que vários extratos de sementes de leguminosas apresentavam diferentes propriedades de hemaglutinação quando analisados com eritrócitos de diferentes espécies de animais, provavelmente porque as lectinas de diferentes espécies vegetais, frequentemente diferem na sua estrutura molecular e na sua especificidade.

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica capazes de interagir especificamente com carboidratos, aglutinar células animais e/ou vegetais e precipitar polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos (CAVADA *et al.*, 2001).

Esta definição implica que diferentes glicoconjugados, idênticos ou estruturalmente similares, podem agir como receptores para a mesma lectina e que a presença de no mínimo um domínio não catalítico, o qual se liga reversivelmente a um carboidrato específico, é o único pré-requisito para uma proteína ser considerada uma lectina (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). Os sítios de ligação a carboidratos, presentes na molécula de lectina interagem como carboidrato específico através do mecanismo do tipo chave-fechadura, envolvendo pontes de hidrogênio, ligação metálica, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas (KENNEDY *et al.*, 1995).

A especificidade das lectinas é determinada pela conformação exata dos sítios de ligação e da natureza dos resíduos de aminoácidos para os quais o carboidrato é ligado. Dessa forma, pequenas alterações na estrutura dos sítios de ligação, como por exemplo, a substituição de apenas um ou dois resíduos de aminoácidos, podem resultar em alterações

significativas na especificidade da lectina sem, no entanto, afetar sua estrutura tridimensional (SHARON & LIS, 1995).

As lectinas apresentam uma distribuição ubíqua na natureza, sendo encontradas tanto em organismos procariotos como em eucariotos (WANG & NG, 2003). A maioria das lectinas conhecidas foram isoladas de sementes, folhas, cascas, frutos, raízes, bulbos e tubérculos (RUDIGER *et al.*, 2000). Sendo essas proteínas extraídas principalmente de sementes de leguminosas (SHARON & LIS 1995). Em 1993, YAMAGUCHI e colaboradores encontraram quantidades consideráveis de inibidores de tripsina/quimotripsina e α -amilase e elevada atividade de lectinas em cinco cultivares de feijões (*Phaseolus vulgaris*) frescos e estocados por cinco anos. Entre as lectinas de plantas mais estudadas e caracterizadas estão incluídos: *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Canavalia ensiformis* (con A), *Phosphocarpus tetragonolobus* (WBL), *Triticum vulgare* (WGA) e *Lycopersicon esculentum* (lectina do tomate) (KOMPELLA & LEE, 2001).

Cada molécula de lectina contém dois ou mais sítios de ligação para carboidratos; di ou polivalentes. As lectinas podem interagir com os açúcares da superfície das células podendo originar uma ligação cruzada levando a precipitação (de polissacarídeos, glicoproteínas, peptidoglicanos, ácido teicóico, glicofosfolipídios, etc.), fenômeno este denominado aglutinação celular (CORREIA & COELHO, 1995). A capacidade de aglutinar células (FIGURA 10) distingue lectinas de outras macromoléculas ligantes de açúcares como as glicosidases e glicotransferases (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

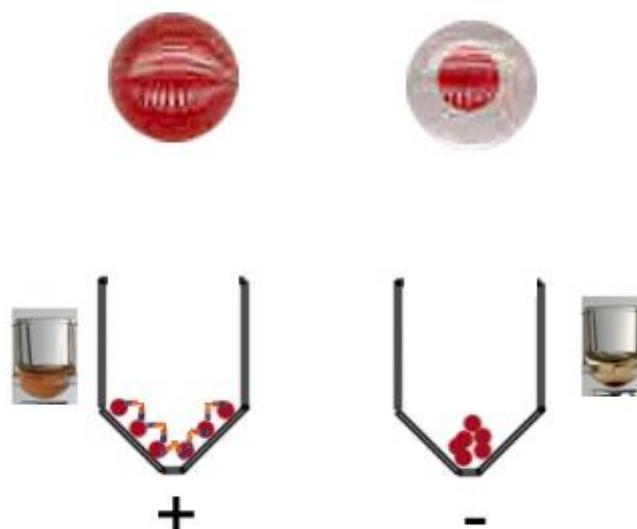


FIGURA 10: Rede de hemaglutinação mediada por lectinas

As lectinas são consideradas moléculas que reconhecem e decifram as informações contidas nos oligossacarídeos da superfície celular (RINI, 1995). A especificidade das lectinas é definida pelo monossacarídeo ou oligossacarídeo que inibe as reações de precipitação ou aglutinação induzidas por lectinas (KOMPELLA & LEE, 2001). Esta interação fraca entre a lectina e o carboidrato aumenta tanto a afinidade quanto a especificidade através de subsítios e subunidades. Esta ligação ao carboidrato é diretamente responsável pela atividade biológica (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Em 2003, SHARON & LIS denominaram algumas lectinas de isolectinas porque existem plantas que possuem duas ou mais lectinas que diferem na especificidade por carboidratos.

As isolectinas são definidas como um grupo de proteínas intimamente relacionadas, resultantes da expressão de diferentes genes, com estruturas semelhantes em uma mesma espécie, e apresentam formas moleculares com mobilidade eletroforética diferente. O termo isoforma foi proposto para lectinas pertencentes à mesma espécie, cuja heterogeneidade de origem genética não foi bem definida (PAIVA & COELHO, 1992). Apesar de muitas plantas possuírem uma lectina com especificidade para um único carboidrato, são conhecidas plantas que contêm duas ou mais lectinas com especificidade para açúcares diferentes, por exemplo:

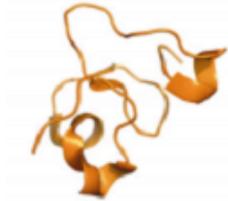
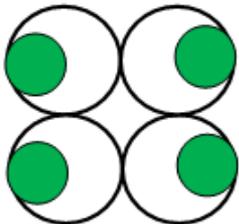
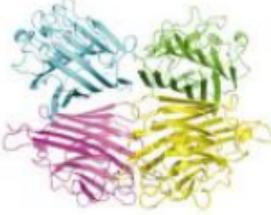
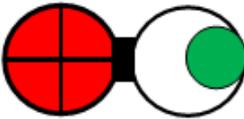
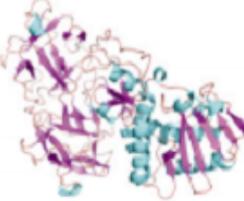
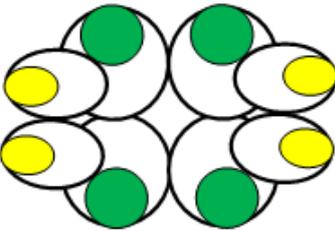
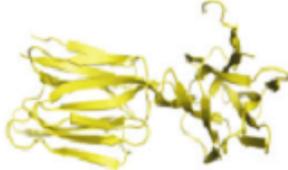
Ulex europaeus, *Bandeiraea simplicifolia*, *Dioclea lehmani* e *Sambucus nigra* (VAN DAMME *et al.*, 1998; PEREZ, 1998).

A caracterização físico-química de lectinas é importante na elucidação de seu comportamento em diferentes sistemas biológicos (SOUZA *et al.*, 2001). A estabilidade e integridade estrutural de proteínas oligoméricas são determinadas por suas interações inter e intracadeias. Lectinas de leguminosas são similares nas suas estruturas primária, secundária e terciária (SRINIVAS *et al.*, 2001) e por esta razão tornam-se um excelente modelo para estudos de desdobramento de proteínas diméricas e tetraméricas, e da oligomerização na estabilidade e integridade estrutural. Além disso, estas glicoproteínas têm sido consideradas uma importante ferramenta em pesquisas biomédicas (RUDIGER, 1998).

As lectinas podem ser subdivididas em quatro tipos principais, de acordo com aspectos estruturais e a habilidade de reconhecer e ligar carboidratos (TABELA 1): **merolectinas** - lectinas com apenas um domínio de ligação a carboidratos, que são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células; **hololectinas** - lectinas que possuem no mínimo dois ou mais domínios homólogos de ligação a carboidratos; **quimerolectinas** -

proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não relacionado que possui uma atividade biológica distinta e independente; e **superlectinas** - incluem as lectinas que possuem dois domínios de ligação a carboidratos estrutural e funcionalmente distintos (VAN DAMME, 1998).

TABELA 1. Classificação das lectinas quanto aos aspectos estruturais. Fonte: Adaptado de MORENO, 2008.

Representação Esquemática	Exemplo
<p>Merolectina</p> <p>Proteína monomérica com um único sítio ativo.</p> 	 <p>Lectina de <i>Hevea brasiliensis</i> ANDERSEN <i>et al.</i>, 1993</p>
<p>Hololectina</p> <p>Proteína tetramérica com quatro sítios ativos homólogos.</p> 	 <p>Lectina de <i>Arachis Hypogaea</i> RAVISHANKAR <i>et al.</i>, 2001</p>
<p>Quimerolectina</p> <p>Proteína com um sítio de ligação a carboidrato e um outro domínio que possui uma função não lectínica.</p> 	 <p>Lectina de <i>Ricinus communis</i> RUTEMBER <i>et al.</i>, 1991</p>
<p>Superlectina</p> <p>Proteína com dois domínios diferentes com afinidade por carboidratos distintos.</p> 	 <p>Lectina de <i>Musa acuminata</i> MEAGHER <i>et al.</i>, 2005</p>

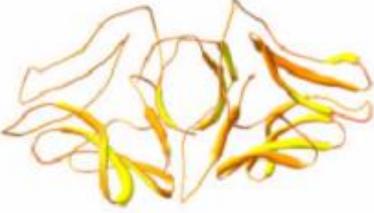
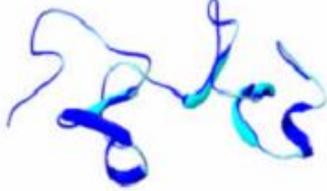
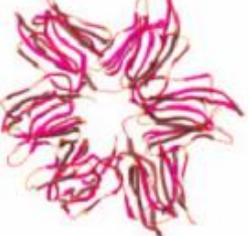
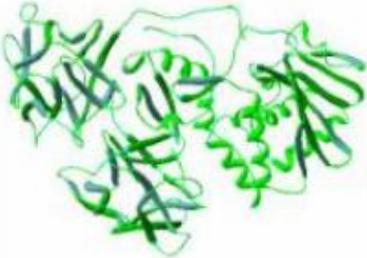
As estruturas das lectinas foram descritas como protômeros, sendo que um protômero é definido como uma subunidade madura ou a soma de subunidades maduras derivadas de produtos primários de tradução do RNA mensageiro que codifica as lectinas. Dependendo do número de protômeros, uma lectina é chamada de monômero, dímero, trímero, tetrâmero e assim sucessivamente (PEUMANS *et al.*, 2001).

Geralmente as lectinas são degradadas durante o processamento do alimento, devido à perda da sua estrutura quaternária e terciária, resultando na produção de dímeros ou monômeros, que podem possuir sítio de ligação para carboidratos, mas são incapazes de aglutinar membranas celulares (LORIS *et al.*, 1998).

A família de lectinas vegetais é muito heterogênea com relação à especificidade de ligação a carboidratos e, de acordo com o tipo de carboidrato ligante, estas proteínas podem ser classificadas em oito grupos: manose/glicose; galactose/N-acetilgalactosamina; fucose; ácido siálico; complexo oligossacarídico; lectinas ligantes de manose e galactose relacionadas à jacalina e lectinas da superfamília de monocotiledôneas ligantes de manose (RÜDIGER, 1997).

A maioria das lectinas de vegetais ainda pode ser classificada em sete famílias, considerando as afinidades estruturais e evolutivas: a família amarantina, lectinas ligantes de quitina compostas por domínios heveína (TABELA 2), lectinas isoladas de floemas de curcubitáceas, lectinas relacionadas à jacalina, lectinas de legume, lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose e proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2 (PEUMANS *et al.*, 2001).

TABELA 2. Classificação das lectinas quanto às famílias evolutivas. Fonte: Adaptado de MORENO, 2008.

Classificação	Referências
<p data-bbox="300 331 868 365">Lectinas de monocotiledôneas do tipo manose</p>  <p data-bbox="419 622 746 656">Lectina de <i>Scilla campanulata</i></p>	<p data-bbox="1066 409 1305 443">WRIGHT <i>et al.</i>, 2000</p>
<p data-bbox="252 689 916 723">Lectinas específicas a quitina e homólogas a heveína</p>  <p data-bbox="403 958 762 992">Lectina de <i>Phytolacca americana</i></p>	<p data-bbox="1090 813 1281 846">FUJII <i>et al.</i>, 2004</p>
<p data-bbox="395 1025 772 1059">Lectinas homólogas a jacalina</p>  <p data-bbox="419 1350 754 1384">Lectina de <i>Parkia platicephala</i></p>	<p data-bbox="1002 1149 1377 1182">GALLEGO DEL SOL <i>et al.</i>, 2005</p>
<p data-bbox="371 1417 796 1451">Lectinas homólogas ao tipo RIP-2</p>  <p data-bbox="427 1753 738 1787">Lectina de <i>Sambucus ebulus</i></p>	<p data-bbox="1066 1574 1305 1608">PASCAL <i>et al.</i>, 2001</p>

Lectinas ligantes de manose e específicas para manose/glicose só tem sido encontradas exclusivamente na família das lectinas de legumes. Convém ressaltar que a maioria das lectinas que são específicas para carboidratos complexos pertence à família das lectinas de leguminosas (KUBANEK *et al.*, 1982).

As lectinas de gramíneas mostram ampla especificidade para açúcares e glicoconjugados. Por exemplo, a lectina de gérmen de trigo (WGA) e a lectina de centeio reconhecem e interagem, preferencialmente, com N-acetilglicosamina (GlcNAc) e glicoconjugados contendo ácido siálico (Neu5Ac). O arroz apresenta lectinas específicas para GlcNAc e resíduos de manose (MARTÍNEZ-CRUZ *et al.*, 2001).

Apesar da diversidade observada em diferentes famílias de lectinas de vegetais e, independente de sua organização tridimensional, a estrutura de folhas β ocorre predominantemente em todas as proteínas caracterizadas como lectinas, sendo necessária para a atividade ligante de açúcar destas proteínas (BARRE *et al.*, 2001).

A ampla ocorrência das lectinas vegetais e, a variedade de especificidade por carboidratos, despertou o interesse para investigações das funções destas proteínas que resultou nas seguintes atividades (SHARON & LIS, 2004): renovação de glicoproteínas do soro e defesa contra patógenos (CHANG & ZHU, 2002); proteínas de estocagem e adsorção viral e resposta imunológica (CHEN *et al.*, 2005); transporte de carboidratos (KAMIYA *et al.*, 2005); mediação da interação célula-célula e patógeno-hospedeiro (SAOUROS *et al.*, 2005). Porém uma das grandes importâncias fisiológicas da lectinas está associada a sua utilização como reagentes policlonais para investigar as bases moleculares no controle da ativação e proliferação de linfócitos; para identificar e fracionar células do sistema imune e como drogas (SINGH *et al.*, 2005).

Lectinas vegetais vêm recebendo atenção particular devido a sua potencial aplicação em análises laboratoriais, já que possuem especificidade por carboidratos diferentes, sendo rapidamente imobilizadas em suportes inertes (BASZKLIN *et al.*, 2000). As matrizes comerciais de afinidade contendo lectinas são amplamente utilizadas na purificação de glicoproteínas de membrana ou glicolípídeos e em estudos de caracterização de enzimas e receptores (LIMA *et al.*, 1997).

As lectinas de leguminosas são as proteínas vegetais mais estudadas, pois correspondem de dois a dez por cento das proteínas solúveis de sementes maduras e centenas destas proteínas já foram isoladas e caracterizadas de acordo com suas propriedades químicas, físico-químicas, estruturais e biológicas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Em algumas sementes de leguminosas, a localização das lectinas está bem caracterizada. A maioria dos estudos indica que as lectinas estão localizadas no parênquima celular, em vacúolos especializados denominados corpos proteicos (MELGAREJO & PÉREZ

et al., 1997). Outros pesquisadores relatam que as lectinas estão presentes no citoplasma e associadas à parede celular (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991). Parte das leguminosas e sementes contém isoelectinas, que são formas moleculares múltiplas da lectina que exibem diferenças nas propriedades biológicas e estruturais: especificidade de carboidratos, mudanças na sequência de aminoácidos (LIS & SHARON, 1990).

A massa molecular das subunidades da lectina de leguminosas está em torno de 30 kDa, com a lectina completamente ativa, formando dímeros ou tetrâmeros com múltiplos sítios de ligação para carboidratos. A associação das subunidades da lectina pode ser estabelecida através de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto (RÜDIGER, 1998).

2.3 Lectina de *Cratylia mollis*, Cramoll 1,4

Cratylia mollis (FIGURA 11), popularmente conhecida como feijão camaratu é uma leguminosa nativa da Região Semi-Árida do Estado Pernambuco e é altamente resistente à dessecação. As sementes têm sido uma fonte de alimentação alternativa na alimentação animal, contribuindo para o desenvolvimento regional e uma melhor qualidade de vida para os habitantes locais (PAIVA *et al.*, 2005). Esta planta pertence à família *Fabaceae*, grupo *Phaseoleae*, subgrupo *Dioclinae*, que contém o gênero *Canavalia*, botanicamente relacionada com a *Cratylia* (CORREIA & COELHO, 1995).



FIGURA 11. *Cratylia mollis*. Arbusto (à esquerda) e sementes (à direita).

Das sementes da *C. mollis* foram purificadas proteínas pertencentes à classe das lectinas que se ligam à glicose/manose. A partir de várias pesquisas foram encontradas similaridades com a Concanavalina A (Con A), uma lectina extraída de sementes de *Canavalia ensiformis*, sendo uma das mais estudadas, constituindo um padrão de comparação por excelência para lectinas glicose/manose (HONG *et al.*, 2001).

A Cramoll-1,4 apresenta-se estável até 80° C, com ponto isoelétrico em torno de 8,6 e caráter básico. Possui uma banda principal de 31 kDa e dois fragmentos da banda principal de 16 e 14 kDa (CORREIA & COELHO, 1995). O melhor potencial eletroquímico para *C. mollis* livre ou imobilizada foi obtido utilizando-se 1,0 mg/ml, a 5 e 10° C, 87 e 102 mV, respectivamente. O desenvolvimento de técnicas para definir a interface de parâmetros elétricos poderá dar informações sobre a adsorbância de grupos carregados na superfície da membrana celular, revelando interações em sistemas biológicos (SOUZA *et al.*, 2003).

Formas moleculares múltiplas foram obtidas das sementes de *C. mollis*. Elas podem ser chamadas de isoformas ou isolectinas e têm sido estudadas para avaliar as suas diversas funções na natureza. Foram denominadas Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4 e apresentam diferentes atividades monossacarídicas. Cramoll 1, Cramoll 2, e Cramoll 4 pertencem ao grupo de especificidade glicose/manose, enquanto Cramoll 3 reconhece com maior afinidade galactose (PAIVA & COELHO, 1992; CORREIA & COELHO, 1995). Uma combinação contendo as formas 1 e 4 associadas denominada Cramoll 1,4 têm sido estudada em suas características físico-químicas e em diferentes aplicações biológicas (TAVARES *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 1997).

Estudos têm demonstrado o perfil imunomodulatório de Cramoll 1,4 (MELO *et al.*, 2010a; MELO *et al.*, 2010b), como caracterização de tecidos cancerígenos humanos (BELTRÃO *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2010), atividade mitogênica em linfócitos humanos (MACIEL *et al.*, 2004), atividade antitumoral (ANDRADE *et al.*, 2004). Recentemente, uma lectina Cramoll recombinante e funcional (rCramoll) foi obtida e purificada pelo nosso grupo de pesquisa. rCramoll apresenta a mesma especificidade (glicose/manose) observada para a lectina nativa da planta (pCramoll), aglutina eritrócitos de coelho e células epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (VAREJÃO *et al.*, 2010), bem como, apresenta sensibilidade eletroquímica (SOUZA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2008), atividade anti-inflamatória, anti-helmíntica (FERNANDES, 2010; MELO *et al.*, 2010c).

2.4 Processos de recuperação e purificação de biomoléculas

Biomoléculas provêm de diversas fontes: tecidos animais e humanos, fluidos corpóreos, plantas, fermentações microbianas, culturas de células eucarióticas e meios reacionais de biorreatores enzimáticos. Independentemente da fonte, todos esses produtos submetem-se, invariavelmente, a etapas de separação e purificação para recuperar a biomolécula de interesse em concentração e pureza desejadas (CHISTI, 1998).

O desenvolvimento de um complexo processo de recuperação para proteínas é orientado de acordo com seu perfil de aplicação. Produtos destinados a terapias e diagnósticos *in vivo* requerem pureza mais elevada do que aqueles que se destinam a diagnósticos *in vitro* (WALTER, 1998).

A estratégia geralmente recomendada para a purificação de bioprodutos baseia-se em três fases: captura, purificação intermediária e polimento. Na fase de captura o objetivo é isolar, concentrar e estabilizar a proteína. Na fase intermediária, remove-se a maioria das impurezas como outras proteínas, ácidos nucleicos e vírus. Finalmente, na fase de polimento atinge-se a pureza desejada devido à remoção de traços de impurezas (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002).

2.4.1 Processos cromatográficos

A cromatografia é um método físico-químico de separação onde os componentes de uma mistura são separados de acordo com o fluxo o qual são transportados através de uma fase estacionária por uma fase móvel, que pode ser um líquido ou um gás. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (ZUÑIGA *et al.*, 2003).

A cromatografia foi inicialmente desenvolvida para a separação de pigmentos. Este é provavelmente o motivo pelo qual a técnica é conhecida como cromatografia (chrom = cor e graphie = escrita), podendo levar à errônea idéia de que o processo seja dependente da cor. Ao longo do tempo, tornou-se aparente que a cromatografia líquida era uma ferramenta muito útil para a purificação em larga escala de enzimas e outras proteínas, cujo sucesso depende do entendimento da natureza e química das proteínas a serem separadas (KUMPALUME & GHOSE, 2003).

2.4.1.1 Tipos de cromatografia

As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas considerando-se diversos critérios (FIGURA 12) (ZUÑIGA *et al.*, 2003): De acordo com a **forma física** do sistema cromatográfico pode ser planar ou em coluna - a cromatografia planar inclui cromatografia em camada delgada e eletroforese, e a cromatografia em coluna inclui a cromatografia líquida, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa; De acordo com a escolha da **fase móvel** - a cromatografia pode ser classificada como gasosa, líquida ou de fluido supercrítico (CSC), usando-se na última um vapor pressurizado, acima de sua temperatura crítica. A cromatografia líquida apresenta uma importante

subdivisão: a cromatografia líquida clássica (CLC), na qual a fase móvel é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade, e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual se utilizam fases estacionárias de partículas menores, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel. No caso de fases móveis gasosas, separações podem ser obtidas por cromatografia gasosa (CG) e por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR). A diferença entre os dois tipos está na coluna. Enquanto na CGAR são utilizadas colunas capilares, nas quais a fase estacionária é um filme depositado na mesma, a CG utiliza colunas de maior diâmetro empacotadas com a fase estacionária; Já na classificação pela utilização da **fase estacionária** - distingue-se entre fases estacionárias sólidas, líquidas e quimicamente ligadas. No caso da fase estacionária ser constituída por um líquido, este pode estar simplesmente adsorvido sobre um suporte sólido ou imobilizado sobre ele. Suportes modificados são considerados separadamente, como fases quimicamente ligadas, por normalmente diferirem dos outros dois em seus mecanismos de separação; Na classificação pelo **modo de separação** - as separações cromatográficas se devem à adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou misturas desses mecanismos.

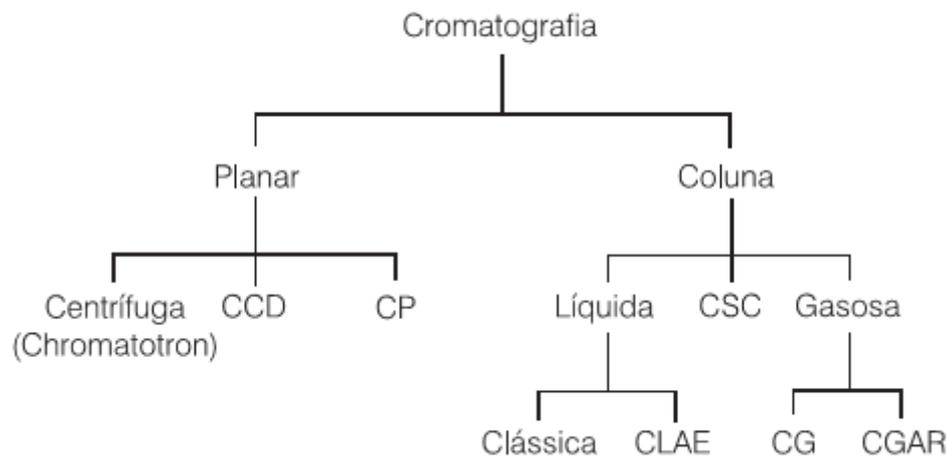


FIGURA 12: Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia. Fonte: DEGANI, 1998.

2.4.1.1.1. CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE

A forma mais comum de efetuar separações bioseletivas é a cromatografia por afinidade ou adsorção. Dados na literatura revelam que dentre os métodos cromatográficos existentes, a cromatografia por afinidade (FIGURA 13) é uma técnica comum usada na purificação. Trata-se de um método singular, pois é o único que permite a purificação da

proteína baseado em sua função biológica ao invés de propriedades físicas e químicas (ZOU *et al.*, 2001).

Nessa técnica, os compostos (com afinidade pelo ligante) são imobilizados em matriz cromatográfica mediante ligação seletiva reversível do ligante com a molécula de interesse (NIVEN, 1995). É ideal para a captura ou purificação intermediária de biomoléculas, podendo ser usada sempre que houver ligante adequado para a proteína de interesse (PHARMACIA BIOTECH, 1999). Como exemplos de aplicação de cromatografia por afinidade podem citar as lectinas, proteínas amplamente utilizadas na purificação de glicoproteínas, devido à sua afinidade por açúcares (SILVA *et al.*, 2010).

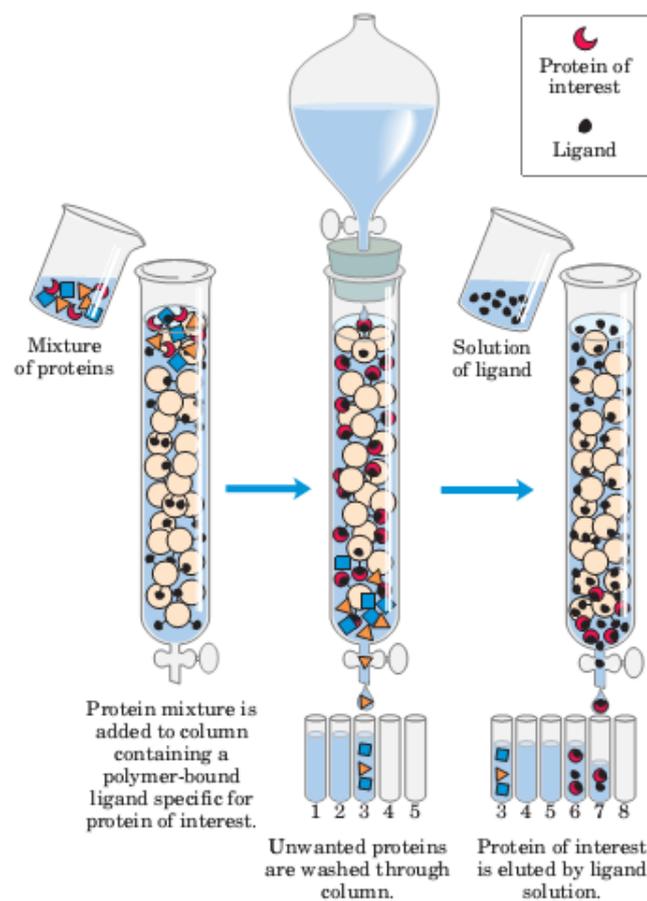


FIGURA 13: Cromatografia de afinidade. Fonte: Princípios de Bioquímica Lehninger

2.4.1.1.2 LIGANTE DE AFINIDADE

2.4.1.1.2.1 Cibacron Blue

Vários pigmentos são capazes de interagir com proteínas, principalmente enzimas e em alguns casos de maneira muito específica. Apesar de sua natureza sintética, os pigmentos são classificados como ligantes de afinidade por mimetizarem a estrutura de coenzimas e cofatores enzimáticos e interagirem com o sítio ativo de enzimas (DENIZLI & PISKIN, 2001).

Apesar da interação específica com algumas enzimas, a maioria das proteínas é capaz de adsorver-se não especificamente a pigmentos através de uma combinação de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (DENIZLI & PISKIN, 2001).

A maioria dos pigmentos reativos usados como ligantes de afinidade consiste em um cromóforo (como antraquinona) ligado a um grupo reativo como um anel triazínico. Eles também possuem ácidos sulfônicos em sua estrutura a fim de aumentar a solubilidade em meios aquosos. A figura 14 ilustra a estrutura química do pigmento Cibacron Blue F3GA. O pigmento Cibacron Blue, que possui anéis aromáticos sulfonados na porção antraquinona, tende a ligar-se preferencialmente aos sítios ativos de várias enzimas, uma vez que se assemelha à estrutura de coenzimas como NADH e FAD, sendo amplamente utilizado na purificação de hidrogenases e quinases (GARG *et al.*, 1996).

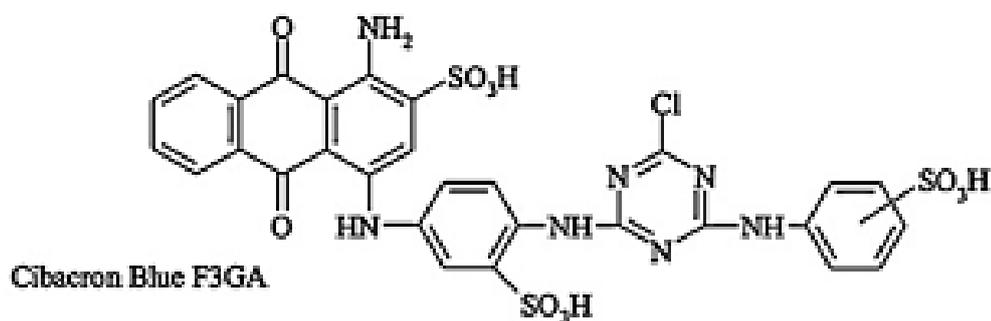


FIGURA 14: Estrutura química do pigmento sintético Cibacron Blue F3GA. Fonte: SIGMA, 2011)

KOCH e colaboradores em 1988 estudaram a cromatografia de afinidade para a purificação de proteases usando Cibacron F3GA imobilizado em Sepharose® 4B, nome comercial da matriz Amersham Biosciences (Suécia), e mostraram que proteases como fator II, fator IX e tripsina se adsorvem a matriz. Além de inúmeras aplicações na purificação de enzimas, o Cibacron Blue (CB) já foi testado com sucesso na purificação de outras proteínas como albumina (TRAVIS *et al.*, 1976) e eritropoetina (KRYSTAL *et al.*, 1986).

A adsorção de albumina, tanto humana quanto bovina, à molécula de CB já foi exaustivamente estudada, usando matrizes de agarose (LEATHERBARROW, 1980), poliamida (MULLER-SCHULTE *et al.*, 1991), poliestireno (TUNCEL *et al.*, 1993), poli(estireno-co-divinil-benzeno) (ÇAMLI *et al.*, 1999), poli(glicidil-triali-isocinaurato-divinilbenzeno) (YU *et al.*, 2001) e poli(metilmetacrilato) (YAVUZ *et al.*, 2003).

Apesar da albumina ser a proteína mais estudada, encontram-se outras aplicações para o pigmento CB. FISICHELLA e colaboradores (2002) usaram uma coluna de Sepharose®-CB para separar subunidades de alta massa molar da glutenina, proteína polimérica do trigo. Já que a variação na estrutura das subunidades de glutenina está associada à qualidade da farinha, o entendimento de sua estrutura e composição é de suma importância. Estudando a purificação de fosfatase alcalina, GUO *et al.*, (1994) obtiveram uma recuperação de 60% e um fator de purificação de 40 vezes utilizando CB imobilizado à membrana de celulose.

2.4.1.1.2.2 Lectinas imobilizadas

O uso de cromatografia de afinidade com lectina como ligante tem sido muito utilizado para separar e caracterizar tanto oligossacarídeos e seus conjugados (OHLSON *et al.*, 1998), como glicoproteínas (YOSHIDA *et al.*, 1997; SATISH & SUROLIA, 2001; GHOSH *et al.*, 2004).

Em 1997, YOSHIDA e colaboradores usaram duas colunas de afinidade em série (Sepharose®-Concanavalina A e agarose-WGA) para purificar a fosfatase de ácido prostático (PAP) a partir de dois tecidos distintos: hiperplasia prostática benigna (BPH) e carcinoma prostático (PCA). As frações eluídas das colunas foram analisadas quanto à atividade de PAP e percebeu-se que seu valor na fração eluída de Sepharose®-Concanavalina A foi muito superior no caso de BPH que de PCA, ao passo que o eluído de agarose-WGA originado de PCA apresentou maior atividade do que o de BPH. Este estudo prova claramente que a estrutura das cadeias glicídicas é alterada durante a oncogênese na próstata.

Colunas de Sepharose®-Concanavalina A e agarose-WGA também já foram utilizadas na análise e identificação de glicoproteínas de membrana celular (GHOSH et al., 2004). O sobrenadante de cultivo de células K562 foi aplicado em Sepharose®-Concanavalina A para capturar oligomanosídeos e em agarose-WGA para reter sacarídeos contendo ácido siálico, GlcNAc e N-acetil galactosamina (GalNAc). As colunas capturaram apenas uma pequena fração do total de proteínas (0,4 e 0,6%), mas correspondeu a um enriquecimento de 150-200 vezes em relação ao sobrenadante aplicado. A análise proteômica dos eluídos demonstrou que 30% das proteínas isoladas estão presentes nas membranas celulares. Com o objetivo de identificar outras proteínas do plasma humano que interagem com a jacalina, PILATTE *et al.*, (1995) aplicaram amostra de plasma, previamente tratado, em coluna de agarose-jacalina. Os autores conseguiram identificar mais duas proteínas do plasma que se ligam à jacalina. A primeira foi hemopexina, que reforça a teoria de que a jacalina é capaz de se ligar a cadeias O-glicosiladas, uma vez que a hemopexina possui apenas uma cadeia de sacarídeos O-glicosilados.

Lectinas não comerciais foram imobilizadas em sepharose e também foram capazes de reter glicoproteínas. Por exemplo, a Cramoll 1,4 imobilizada em Sepharose 4B foi capaz de isolar a enzima lecitina colesterol aciltransferase, como também glicoproteínas do plasma humano (Lima et al., 1997). Recentemente, uma proteína da soja com atividade anticoagulante e antiagregação plaquetária foi purificada utilizando uma matriz imobilizada com Cramoll 1,4 sendo assim de grade relevância no tratamento de doenças trombolíticas (SILVA et al., 2010).

2.5 Tecidos sanguíneo: proteínas séricas

O sangue é um tecido conjuntivo líquido formado pelos elementos figurados do sangue - que circula em suspensão em meio fluido, o plasma. A diferença entre soro e plasma é que soro é o plasma sanguíneo sem fibrinogênio, liberado após a coagulação do sangue. O plasma é constituído por 90% de água e 10% de soluto. Sendo que, 20% desse soluto são compostos por metabólitos orgânicos e produtos de excreção como: uréia, glicose e ácido úrico; 10% constituem de componentes inorgânicos, tais como: cloreto de potássio, cloreto de sódio, cloreto de magnésio e cloreto de cálcio; e as proteínas do plasma constituem 70% do soluto do soro (LEHNINGER, 2011).

Entre as proteínas do plasma sanguíneo citam-se a albumina que representa 60% das proteínas totais, muitas espécies de imunoglobulinas, apolipoproteínas que são responsáveis

pelo transporte de lipídios como HDL e LDL, transferrina, entre outros. A concentração de proteína total no soro varia entre 6 a 7,8 g/dL para cada indivíduo (MOTTA, 2003).

O soro humano é um fluido corpóreo que pode ser utilizado para monitorar a direção das doenças. Informações sobre a magnitude de mudanças em certas proteínas identificadas a certas doenças específicas podem ser diagnósticas, prognósticadas ou de significância terapêutica (MOTTA, 2003).

2.5.1 Preparo de amostras de soro sanguíneo prévio à análise no espectrômetro de massas

O preparo de amostras é uma etapa imprescindível para a obtenção de géis de eletroforese com alta resolução. No caso das amostras de soro sanguíneo humano, a remoção das proteínas majoritárias, principalmente albumina, é essencial para evitar interferência na resolução do gel, possibilitando, assim, a detecção de proteínas menos abundantes, que podem indicar alterações no proteoma e serem potenciais biomarcadores (ADKINS *et al.*, 2002).

2.6 Abordagem proteômica

Na análise global das proteínas expressas pelo genoma de um organismo ou tecido específico, num tempo específico, vêm sendo aplicadas técnicas de proteômica, que têm como objetivo isolar e identificar proteínas, estudar suas propriedades, seus níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK *et al.*, 1999). Uma descrição completa do proteoma de um organismo fornece, não apenas um catálogo do conjunto de proteínas, mas uma imagem dinâmica com dados da expressão de proteínas sob condições definidas e sua distribuição na célula (CASH, 1998). Os complexos de proteínas são o primeiro nível de organização do proteoma celular (KÜHNER *et al.*, 2009). A proteômica fornece uma ligação entre proteínas e seus genes codificadores e, portanto, uma ligação entre a fisiologia celular e a genética. Isso se mostra relevante, já que inúmeros projetos genoma, que vêm sequenciando genes de organismos inteiros, geram uma grande quantidade de informações que, independentemente, não traduzem o funcionamento real das complexas redes reguladoras e o metabolismo da célula em estado normal ou patológico (SANTOS *et al.*, 2004).

As técnicas proteômicas estão inseridas em diversas áreas da biologia, bioquímica, toxicologia. São comumente aplicadas em estudos de proteoma de organismos, na análise de sua patogenicidade e adaptação ao hospedeiro. Além disso, são aplicadas na análise de diversas doenças como as cardiovasculares, neurológicas, diabetes e obesidade, parasitárias e infectocontagiosas, rejeição em transplantes e na oncologia. A proteômica se aplica, ainda, na

busca de biomarcadores e alvos terapêuticos que auxiliem no diagnóstico e tratamento de doenças e busca por novos fármacos mais específicos e com menos efeitos colaterais (KÜHNER *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2004).

2.6.1 Espectrometria de massas em análises proteômicas

A espectrometria de massas é uma ferramenta essencial para a análise de proteínas, devido não apenas à sua sensibilidade, mas, também, ao conteúdo total de informações que pode ser obtido. Os espectrômetros de massas podem ser utilizados para uma simples determinação da massa molar de um polipeptídeo, determinação da sequência de aminoácidos, identificação de novos biomarcadores, interações proteína-proteína e caracterização de modificações pós-traducionais. No primeiro caso, os espectrômetros são empregados para análise em um único estágio e, nos últimos casos, íons específicos são selecionados e submetidos à fragmentação, e, então, um segundo espectro é obtido. Este procedimento é denominado espectrometria de massas em sequência (MS/MS) (DOMON & AEBERSOLD, 2006).

A primeira etapa nos experimentos de identificação de proteínas por espectrometria de massas consiste em dividir a proteína de interesse em uma série representativa de peptídeos, de modo que estes apresentem massas moleculares dentro da faixa de massas detectáveis pelos espectrômetros. O método mais comum para produzir peptídeos visando à análise posterior por espectrometria de massas é a digestão de proteínas com enzimas proteolíticas, em geral, a tripsina. A tripsina cliva as ligações peptídicas de proteínas após os grupos carboxílicos dos resíduos de lisina (K) e arginina (R), exceto quando estas ligações são com resíduos de prolina (P), ou seja, ligações K-P ou R-P, produzindo peptídeos pequenos na faixa de 600 a 2500 Da (KINTER & SHERMAN, 2000).

Os espectrômetros de massas (FIGURA 15) consistem em uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector de íons e uma unidade de aquisição de dados. As técnicas de ionização mais empregadas em análise de proteínas são a MALDI (dessorção/ionização com laser auxiliado por matriz) e a ESI (ionização por eletronebulização) e os tipos básicos de analisadores de massas são o *ion trap* (IT), o quadrupolo (Q) e o tempo de voo (TOF).

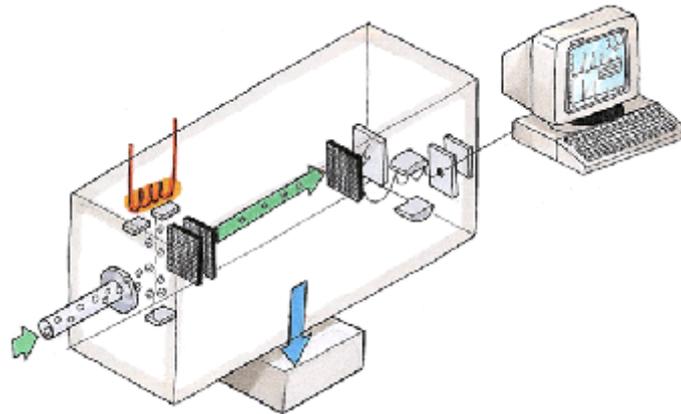


FIGURA 15: Espectrômetro de massas. Fonte: The Linde Group http://hiq.linde-gas.com.br/international/web/lg/br/like35lgspgbr.nsf/docbyalias/appl_mass

Os princípios da técnica podem ser contemplados pelas quatro etapas de um espectrômetro de massas: ionização, onde a molécula de interesse é carregada, resultando na formação de um íon positivo ou negativo em fase gasosa; separação dos íons de acordo com suas razões massa/carga (m/z); medida de massa, de acordo com algum parâmetro físico; e medida de abundância, baseada na altura ou área do pico obtido (KINTER & SHERMAN, 2000).

O Q-TOF é um espectrômetro de massa que apresenta quadrupolo híbrido com capacidade MS / MS. O quadrupolo é operado como um guia de íons no modo MS e como mecanismo de seleção em massa no modo MS / MS. A reflexão do analisador de tempo-de-voo (TOF) é colocada perpendicularmente ao quadrupolo e serve como um dispositivo de resolução de massa para os modos MS e MS / MS. Uma célula de colisão está localizada entre o quadrupolo e o analisador TOF para induzir a fragmentação MS / MS dos experimentos. O detector final é uma placa de microcanais com alta sensibilidade. O instrumento é controlado a partir de um computador usando o software MassLynx (KRISTENSEN *et al.*, 2000).

A interface ESI consiste numa sonda eletronspray e uma fonte Z-spray. A introdução da amostra se dá através de uma bomba de infusão, injeção em ciclo ou a partir de uma coluna de HPLC. Uma interface de nano fluxo de eletronspray também está disponível para análise de quantidades muito pequenas de amostra. Um capilar LC acoplado à fonte de nano fluxo eletronspray é uma opção para a análise de amostras muito complexas e de pequena dimensão, como uma digestão em gel trípica de uma proteína a partir de um gel de SDS-PAGE corado (KRISTENSEN *et al.*, 2000).

O Q-Tof tem uma alta sensibilidade, resolução e precisão para a determinação da massa de peptídeos. O alto poder de resolução permite melhorar a precisão da medição de massa para peptídeos, identificação de responsáveis estados carregados, de íons multi carregados e uma maior diferenciação de espécies isobáricas. A elevada precisão da medição de massa permite revelar a massa exata de pequenas moléculas e sequenciamento de *novo* de peptídeos a partir de espectros de MS-MS. Quando equipado com uma fonte de nanospray, o Q-Tof pode analisar amostras de pequenas quantidades e identificar proteínas através de semi ou completo sequenciamento. Peptídeos derivados da digestão triptica da proteína são particularmente adequados para o sequenciamento pelo Q-TOF, em grande parte, devido ao tamanho de tais peptídeos (geralmente entre 800 e 2500 Da) e também porque estes peptídeos contêm os aminoácidos básicos de lisina ou arginina em seu C- Terminal. No entanto, os aminoácidos isobáricos como leucina e isoleucina não podem ser distinguidos por este método de sequenciamento de peptídeos (SLENO & VOLMER, 2004).

Para a identificação de proteínas, as massas dos peptídeos são utilizadas para pesquisa nas bases de dados genômicos públicos. Caso uma proteína não possa ser identificada, desta forma, a sequência de um ou mais destes peptídeos, determinada pela espectrometria de massa Q-TOF, poderá ser utilizado para pesquisa em bancos de dados genômicos para uma correspondência exata. No caso de uma nova proteína, que não está contido dentro destas bases de dados, a nova sequência peptídica pode ser utilizada para pesquisa no BLAST (Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Básico Local). Isto pode identificar uma proteína semelhante a partir de outra espécie, cuja sequência pode ser encontrada na base de dados. Em alternativa, o novo sequenciamento pode ser usado para experiências de clonagem, no desenho de primers de PCR para pesquisa bibliotecas de cDNA, para clones que contenham o gene novo (KUMARATHASAN *et al.*, 2005).

Aplicações típicas para o espectrômetro de massa Q-Tof são: sequenciamento de peptídeo (PM = <~ 2500 Da), estudos de proteínas com modificações pós-translacionais, mapeamento de glicopeptídeo ou mapeamento de fosfopeptídeo, determinação da massa exata de compostos orgânicos (PM = <~ 2000 Da), sequenciamento de oligonucleótido, sequenciamento de oligossacarídeo, estudo de dobramento de proteínas (WILKINS *et al.*, 2006).

As vantagens das técnicas de MS incluem sensibilidade, rapidez e aplicação a misturas complexas. Nos últimos anos, com os avanços tecnológicos, a MS tem sido destacada não apenas para estudos de estruturas primárias de proteínas, mas também como a tecnologia

central no campo de proteômica. As análises proteômicas são hoje uma ferramenta valiosa na determinação da presença de biomarcadores ou no mapeamento do perfil protéico dentro de grupos de amostras diferentes. A determinação da variação na concentração relativa e absoluta de peptídeos é fundamental para a descoberta de marcadores eficientes (WILKINS *et al.*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar o perfil de glicoproteínas presentes em soro de indivíduos sadios e pacientes com dengue clássica e hemorrágica utilizando a lectina de semente de *C. mollis* (Cramoll 1,4) imobilizadas em Sepharose CL-4B.

3.2 Específicos

- ✓ Obter a lectina Cramoll 1,4;
- ✓ Imobilizar Cramoll 1,4 em Sepharose CL-4B para obtenção de Cramoll 1,4-Sepharose;
- ✓ Cromatografar amostras de soro de indivíduos sadios (IS) e pacientes com dengue clássica (DC) e dengue hemorrágica (DH) por afinidade em Cramoll 1,4-Sepharose;
- ✓ Avaliar o perfil das amostras glicoprotéicas provenientes do soro obtidas das cromatografias de afinidade através de eletroforese SDS-PAGE e espectrometria de massas (Q- TOF).

CONCLUSÃO

Os nossos estudos mostraram a presença de 22 proteínas em ambos os grupos de pacientes com dengue. Embora as quantidades produzidas dessas moléculas sejam diferentes, estes resultados corroboram a literatura, que faz referência a presença de citocinas e quimiocinas nas duas condições de doença. Não encontramos dados na literatura que pudessem fazer correlações com as proteínas identificadas apenas em uma das condições. Eles poderiam estar relacionados à disfunção plaquetária e células endoteliais. Estes resultados sugerem uma nova maneira de pesquisar como é o mecanismo da trombocitopenia e extravasamento de plasma. As 162 proteínas identificadas em cada condição não foram ainda estudadas. Nossos achados confirmam que Cramoll imobilizada é uma grande ferramenta para a caracterização parcial e enriquecimento de glicoproteínas que podem ser possíveis biomarcadores para diagnóstico e prognóstico para a dengue.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A., POBER, J.S. Propriedades gerais das respostas imunológicas. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora ELSEVIER, cap. 1, p. 6. 2012.

ADKINS JN, VARNUM SM, AUBERRY KJ, MOORE RJ, ANGELL NH, SMITH RD, SPRINGER DL, POUNDS JG. Toward a human blood serum proteome: Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 12, p. 947-955. 2002.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, v. 422, p. 198–207. 2003.

AMERSHAM BIOSCIENCES. Affinity Chromatography - Principles and Analysis and Purification of Proteins”, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, and protein drugs: design considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 46, p. 211-245. 2001.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. Protein purification handbook. Sweden: Edition AC, p. 97. 1999.

ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS MAGALHÃES, N. S. A. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 435-445. 2004.

BARRE, A.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; ROUGÉ, P. Mannose-binding plant lectins: Different structural scaffolds for a common sugar-recognition process. *Biochimie*, v. 83, p. 645-651. 2001.

BASZKLIN, A.; BOISSONNADE, M. M.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; CARVALHO-JÚNIOR, L B.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. *Cratylia mollis* lectin at the air-aqueous solution interface: adsorption and lectin-lipid interactions. *Colloides and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 17, p. 191-201. 2000.

BELTRÃO, E.I.C.; CORREIA, M.T.S.; FIGUEREDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 74, p. 125-134. 1998.

BLACKSTOCK, W.P., WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol. Proteomics*, v. 1, p. 841–855. 1998.

CASH, P. Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, v. 372, p. 121-145. 1998.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting *proteus*: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of Diocleinae Subtribe lectins. *Current Protein and Peptide Science*, v. 2, p. 123-135. 2001.

CHISTI, Y. Strategies in Downstream Processing. In: SUBRAMANIAN, G. *Bioseparation and Bioprocessing: a Handbook Vol. II*, capítulo 11, 1ª edição. Weinheim, Wiley-VCH. 1998.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectins genes and their role in plant defense. *Plant Cell*, v. 3, p. 1-9. 1991.

CORNET, M. Dengue in Africa. In: *Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever*. OMS, v. 22, p. 39-47. 1993.

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*, v. 55, p. 261-273. 1995.

CUMMINGS, R. D.; KORNFELD, S. Characterization of the structural determinants Required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 257 (19), p. 11230-11234. 1982.

CUNHA, R. V. Aspectos clínicos e epidemiológicos da infecção pelo vírus da dengue em áreas endêmicas do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31 (4), p. 409-410. 1998.

DENIZLI, A., PISKIN, E. Dye-ligand Affinity Systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49 (1-3), p. 391-416. 2001.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, v. 312, p. 212–217. 2006.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil during 1999–2009: A review. *Dengue Bulletin*, v. 34, p. 6-12, 2010.

FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus dengue. *Virology*, v.32, p.15-20. 1998.

FIGUEIREDO, R.M.P.; NAVECA, F.G.; BASTOS, M.S.; MELO, M.N.; VIANA, S.S.; MOURÃO, M.P.G.; COSTA, C.A. Dengue Virus Type 4, Manaus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.1, p. 667-9. 2008.

FISICHELLA, S.; ALBERGHINA, G.; AMATO, M. FICHERA, M.; PALERMO, A.; FONSECA, B. A. L.; FIGUEREDO, L. T. M. Dengue. In: FOCACCIA, R.; VERONESI, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu, cap. 13, p. 343-356. 2005.

FRANCO-FRAGUAS, L.; PLÁ, A.; FERREIRA, F.; MASSALDI, H.; SUÁREZ, N.; VIERA, F. B. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *Journal of Chromatography*, v. 790, p. 365-372. 2003.

GARG, N.; GALAEV, I.; MATTIASSON, B. Dye-affinity techniques for bioprocessing: Recent developments. *Journal of Molecular Recognition*, v. 9, p. 259–274. 1996.

GHOSH, R. Protein Separation Using Membrane Chromatography: Opportunities and Challenge. *Journal of Chromatography A*, v. 952 (1-2), p. 13-27. 2002.

GIBBONS, R. V.; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. *British Medical Journal*, v. 324, p. 1563- 1566. 2002.

GLUBER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GLUBER, D. J.; KUNO, G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Editora CAB Internacional, p. 1-22. 1997.

GLUBER, D. J.; KUNO, G.; SATHER, G. E.; VELEZ, M.; OLIVER, A. Use of mosquito cells cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 33, p. 158-165. 1984.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? *Nature*, v. 285(5760), p. 66. 1980.

GUIMARÃES, R. Princípios de imunopatogenia da dengue hemorrágica. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 77 (1), p. 3. 1999.

GUO, W.; SHANG, Z.; YU, Y.; ZHOU, L. Membrane Affinity Chromatography of Alkaline Phosphatase. *Journal of Chromatography*, v. 685 (2), p. 344-348. 1994.

GUZMAN, M.G.; PEREZ, A.B.; FUENTES, O.; KOURI, G. Dengue, Dengue Hemorrhagic Fever. *International Encyclopedia of Public Health*, v. 6, p. 98–119. 2008.

HAMMON, W. M. C. D.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. New hemorrhagic fevers of children in the Phillipines and Thailand. *Association American Physicians*. v. 73, p. 140-155. 1960.

HECKER, M.; HUBER, L.A.; LANGEN, H.; LINK, A.J.; PAIK, Y.K.; PATTERSON, A.; HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3 (4), p. 376-396. 1990.

HONG, M.; CASSELY, A.; MECHREF, Y.; MILOS, V. N. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, v. 752, p. 207-216. 2001.

HOWE, G. M. A world geography of human diseases. Nova York: Academic Press, p. 302-317. 1977.

KENNEDY, J. F.; 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*, v. 26, p. 219-30. 1995.

KIEWISZ, J.; MELO DE SOUSA, N.; BECKERS, J. F.; PANASIEWICZ, G.; GIZEJEWSKI, Z.; SZAFRANSKA, B. Identification of multiple pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) purified from the European bison (*Bison bonasus* L.) placentas. *Animal Reproduction Science*, v. 112, p. 229–250. 2009.

KIMURA, R.; HOTTA, S. Studies on dengue virus. In: The inoculation of dengue virus into mice. *Nippon Igaru*, v. 3379, p. 629-633. 1944.

KOMPELLA, U. B.; LEE, V. H. L. Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 46(1-3) p. 211–245. 2001.

KRYSTAL, G.; PANKRATZ, H. R. C.; FARBER, N. M.; SMART, J. E. Purification of Human Erythropoietin to Homogeneity by a Rapid Five-step Procedure. *Blood*, v. 67, n. 1, p. 71-79. 1986.

KUBANEK, J.; ENTLICHER, G.; KOCOUREK, J. Studies on lectins. Isolation and characterization of the lectin from rye germ (*Secale cereale* L.). *Acta Biologica et Medica Germanica*, v. 41, p. 771-780. 1982.

KUMARATHASAN, P.; MOHOTTALAGE, S.; GOEGAN, P.; VINCENT, R. An optimized protein in-gel digest method for reliable proteome characterization by MALDI-TOF-MS analysis. *Anal Biochem.*, v. 346 (1), p. 85-89. 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685. 1970.

LANDSTEINER, K.; RAUBISTSCHKEK, H. Beobachtungen über heamolyse und Hämagglutination. Zentralbl. Bakteriol., v. 45, p. 660. 1908.

LEATHERBARROW, R.; DEAN, P., Studies on the Mechanism of Binding of lectin in splenocytes of inoculated mice. Scandinavian Journal Immunology, v. 73, p. 112– 121 . 2010.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. Princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier, v. 4, p. 99-117. 2008.

LIMA, A. L. R.; CAVALCANTI, C. L. B.; SILVA, M. C. C.; PAIVA, J.; COELHO, L. C. B. B.; BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. Journal of Biomedicine and Biotechnology. (aceito para publicação, *in press*). 2010.

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 potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. Carbohydrates Polymers, v. 33, p. 27-32. 1997.

LIS, H.; SHARON, N. Legume lectins – a large family of homologous proteins. FASEB Journal, v. 4, p. 3198-3208. 1990.

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

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal Biological Chemistry, v. 193, p. 265-75. 1951.

MACIEL, E. V. M.; ARAUJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y. M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. Biologicals, v. 32, p. 57-60. 2004.

MALTA DE SÁ, M. Estatísticas Dengue. Disponível em:< <http://www.criasaude.com.br/N3601/doencas/dengue/estatisticas-dengue.html> >. Acesso em: 27 de janeiro de 2013.

MARTÍNEZ-CRUZ, M.; ZENTENO, E.; CÓRDOBA, F. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptile. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1568, p. 37-44. 2001.

MELGAREJO, L. M.; PÉREZ, G. Immunolocalization of the lectins P2 e P4 from *Dioclea lehmanni* seeds. *Plant Cell Physiology*, v. 38, p. 480-483. 1997.

MELO, C. M. L.; CASTRO, M. C. A. B.; OLIVEIRA, A. P.; GOMES, F. O. S.; PEREIRA, V. R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. *Phytotherapy Research*, v. 24, p. 000–10. 2010a.

MELO, C. M.; PAIM, B. A.; ZECCHIN, K. G.; MORARI, J.; CHIARATTI, M. R.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 342 (1-2), p. 163-169. 2010b.

MELO, C.M.; MELO, H.; CORREIA, M. T.; COELHO, L. C. B.; DA SILVA, M. B.; PEREIRA, V. R. Mitogenic response and cytokine production induced by cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. *Scand J Immunol.*, v. 73 (2), p. 112-21. 2011.

MIAGOSTOVICH, M. P.; SANTOS, F. B.; ARAÚJO, E. S. M. *et al.* Diagnosis of dengue using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 5, p. 595-600. 1997.

MORENO, F. B. M. B. Estudos estruturais de uma lectina presente em sementes de *Lotus Tetragonolobus*. Tese (doutorado) –Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, p. 119. 2008.

MOTTA, Valter T. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*. 4ªed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe editorial, EDUCS – Caxias do Sul, 2003.

MÜLLER, E.; KLEIN, E. Membranes Modified for Biochromatography. In: Bioseparation and Bioprocessing: Biochromatography, Membrane Separations, Modeling, Validation, p. 305 – 326. 2008.

NELSON, M. J. *Aedes Aegypti*: biologia y ecologia. OPS. Washington, DC. 1986.

NICOUD, R. M. Simulated moving bed (SMB): some possible application for biotechnology. In: Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook, Vol. 1 (Subramanian G, ed.). Wiley-VCH, Weinheim, p. 3-39. 1998.

NIVEN, G.W. Separation processes for biotechnology in the food industry. In: Gaonkar, A. G. (Ed) Food processing: Recent Developments. Elsevier Science, p. 143-184. 1995.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; FILIPPIS, A. M. B. *et al.* Dengue vírus type 3 in Rio de Janeiro. Memorial do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, p. 799-800. 2001.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E. *et al.* Isolation of dengue vírus type 2 in Rio de Janeiro. Memorial do Instituto Oswaldo Cruz, v. 85, p. 253. 1990.

OHLSON, S., BERGSTRÖM, M., LEICKT, L., ZOPF, D., “Weak Affinity Chromatography of Small Saccharides with Immobilised Wheat Germ Agglutinin and its Application to Monitoring of Carbohydrate Transferase Activity”, Bioseparation, v. 7 (2), p. 101-105. 1998.

OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; DINIZ, F. B. Electrochemical evaluation of lectin–sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 66, p. 13-19. 2008.

OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; DINIZ, F. B. Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential Dengue electrochemical biosensor. Biosensors and Bioelectronics, v. 25, n. 4, p. 728-732. 2009.

OLVER, C.; VIDAL, M. Proteomic analysis of secreted exosomes. *Subcellular Biochemistry*, v. 43, p. 99-131. 2007.

OPS (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD). Dengue y dengue hemorrágico em las Américas: guías para su prevención y control. Washington: Publicação Científica n. 548. 1995.

OPS (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD). Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Bolivia: Publicação Científica n. 588. 2010.

PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 36, p. 113-8. 1992.

PAIVA, P.M.G.; OLIVA, M.L.V.; FRITZ, H.; COELHO, L.C.B.B.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and primary structure determination of two Bowman–Birk type trypsin iso inhibitors from *Cratylia mollis* seeds. *Phytochemistry*, v. 67, p. 545-552. 2006.

PANCHOLI, V. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 58, p. 902-920. 2001.

PEDRO, A. O dengue em Nictheroy. *Brazil Médico*, v. 37, p. 173-177. 1923.

PEREZ, G. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmani* (fabaceae) seeds. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 30 (7), p. 843-853. 1998.

PERIAGO, M. R. and GUZMÁN M. G. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas. *Revista Panamericana de Salud Publica*, v. 21, p. 187 – 191. 2007

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 15, p. 199-228. 1998.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structurally an evolutionary related proteins. *Molecular Immunology of Complex Carbohydrates*, p. 27-54. 2001.

PHILLIPS, D.; AASKOV, J. A. A recent outbreak of dengue fever in north Queensland. *Communicable disease intelligence*, v. 90, p. 12-13. 1990.

PUSZTAI, A. *Plant Lectin*. Cambridge University Press, p. 263. 1991.

QIU, R.; ZHANG, X.; REGNIER, F. E. A method for the identification of glycoproteins from human serum by a combination of lectin affinity chromatography along with anion exchange and Cu-IMAC selection of tryptic peptides. *Journal of Chromatography B*, v. 845, p. 143-150. 2007.

RINI, J. M. Lectin Estruture. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Struture*, v. 24 (1), p. 551-577. 1995.

ROSENFELD, R.; BANGIO, H.; GERWIG, G. J. ; ROSENBERG, R.; ALONI, R.; COHEN, Y.; AMOR, Y.; PLASCHKES, I.; KAMERLING, J. P.; MAYA, R. B. Y. A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 70 (3), p. 415-426. 2007.

RÜDIGER, H. Plant lectins – more thanjust tools for glycoscientlists: occurrence, structure and possible functions of plant lectin. *Acta Anatomy*, v. 161, p. 130-52. 1998.

RÜDIGER, H. Structure and function of plant lectins. *Glycosciences: Status and perspectives*, p. 415-438. 1997.

RUDNICK, A.; LIM, T. W. Dengue fever studies in Malaysia. *Medical Malaysia*, v. 23, p. 1-24. 1986.

SABIN, A. B.; SCHLESINGER, M. C. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science*, v. 101, p. 640-642. 1945.

SCHATZMAYR, H. G. Aspectos históricos da dengue e seus vetores. In: Dengue – diagnóstico, prevenção e tratamento. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Rubio, cap 1, p. 1-8. 2008.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. An outbreak of dengue virus type 1 in Rio de Janeiro. Memorial do Instituto Oswaldo Cruz, v. 81, p. 245-246. 1986.

SCHWEITZER, K.; DECKER, E.; ZHU, L.; MILLER, R. E.; MIRRA, S. S.; SPINA, S.; GHETTI, B.; WANG, M.; MURRELL, J. Aberrantly regulated proteins in frontotemporal dementia. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 348, p. 465–472. 2006.

SERUFO, J.C. *et al.* Dengue: uma nova abordagem. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 33, n. 5, p. 450-455. 2000.

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

SHARON, N.; LIS, H. Lectins - proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. Essays Biochemistry, v. 30, p. 59-75. 1995.

SILVA, C. M. B.; SILVA, R. B. B.; GOMES, M. A. E. Diagnóstico laboratorial da dengue. In: Dengue – diagnóstico, prevenção e tratamento. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Rubio, cap 7, p. 89-96. 2008.

SILVA-JÚNIOR, J. B.; PIMENTA-JÚNIOR, F. G. Epidemiologia da dengue In: Dengue – diagnóstico, prevenção e tratamento. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Rubio, cap 2, p. 11-32. 2008.

SLENO, L.; VOLMER, D. A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. Journal of mass spectrometry, v. 39 (10), p. 1091–112. 2004.

SOUZA, G. A.; OLIVEIRA, P. S. L.; TRAPANI, S.; SANTOS, A. C. O.; ROSA, J. C.; LAURE, H. J.; FAÇA, V. M.; CORREIA, M. T. S.; TAVARES, G. A.; OLIVA, G.;

COELHO, L. C.B.B.; GREENE, L. J. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiology*, v. 13 (12), p. 961-972. 2003.

SOUZA, L. J.; ZAGNE, S. M. O.; ROCHA, N. S. M.; *et al.* Tratamento da dengue. In: *Dengue – diagnóstico, prevenção e tratamento*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Rubio, cap 10, p. 115-123. 2008.

SOUZA, S. R.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, M. A. M.; KENNEDY, J. F.; LIMA-FILHO, J. L.; COELHO, L. C. B. B. A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu beans) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. *Carbohydrate polymers*, v. 46, p. 191-193. 2002.

SUCEN. Dengue: Informações profissionais da saúde. Disponível em: <<http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/index.htm>>. Acesso em: 20 de maio de 2008.

SRINIVAS, V. R.; BHANUPRAKASH REDDY, G.; AHMAD, N.; SWAMINATHAN, C. P.; MITRA, N.; SUROLIA, A. Legume lectin family, the ‘natural mutants of the quaternary state’, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization, In *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1527 (3), p. 102-111. 2001.

SVS- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, Dengue no Brasil Informe epidemiológico 17/2009. Disponível em:< http://www.dengue.org.br/boletimEpidemiologico_n026.pdf >. Acesso em: 27 de janeiro de 2013.

TAMMEN, H.; SCHULTE, I.; HESS, R.; MENZEL, C.; KELLMANN, M.; MOHRING, T.; SCHULZ-KNAPPE, P. Peptidomic analysis of human blood specimens: comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display. *Proteomics*, v. 5, n. 13, p. 3414-3422. 2005.

TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.18, n.3, p. 867-871. 2002.

TAVARES, G. A. Estrutura e propriedades físico-químicas da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa* Willd. (Cassia). Tese de Mestrado em Bioquímica, UFPR. 1996. Technique

for Protein Separation”. In: HATTI-KAUL, R., MATTIASSON, B. (eds), tetragonolobus. Tese de doutorado em Biofísica Molecular. Universidade Estadual Paulista,

TEXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. Informe Epidemiológico do SUS, Brasília, v. 8, n. 4, p. 5-33. 1999.

THIGS, L. G. *et al.* Coagulation disorders in septic shock. Intensive Care Medicine, v. 19, p. 8-15. 1996.

TONI, M.; ALIBARDI, L. Characterization of beta-keratins in lizard epidermis: Electrophoresis, immunocytochemical and in situ-hybridization study. Tissue and Cell, v. 39, p. 1-11. 2007.

TRAVIS, J.; BOWEN, J.; TEWKSBURY, D.; JOHNSON D.; PANNELL, R. Isolation of Albumin from Whole Human Plasma and Fractionation of Albumin-depleted Plasma, Biochemical Journal, v. 157 (2) p. 301-306. 1976.

TUNCEL, A., DENIZLI, A., PURVIS, D., LOWE, C., “Cibacron Blue F3GA-attached Monosize Poly(vinylalcohol) Coated Polystyrene Microspheres for Specific Albumin Adsorption”, Journal of Chromatography, v. 634, n. 2 (Mar), pp. 161-168. 1993.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectin: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological role. Critical Reviews in Plant Sciences, v. 17, p. 575-692. 1998.

VAREJÃO, N.; ALMEIDA, M. S.; DE CICCO, N. N.T.; ATELLA, G. C.; GEÓRGIA C.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; FOGUEL, D. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (Cramoll 1), Biochimica et Biophysica Acta, v. 1804 (9), p. 1917-24. 2010.

VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue vírus infections. In: GLUBER, D. J.; KUNO, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Editora CAB Internacional, p. 313-333. 1997.

WALTER, J. K. Strategies and Considerations for Advanced Economy in Downstream Processing of Biopharmaceutical Proteins In: SUBRAMANIAN, G. (ed), *Bioseparation and Bioprocessing*, capítulo 15, 1ª edição, Weinheim, Wiley-VCH. 1998.

WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. *Protein Expression and Purification*, v. 32 (1), p. 44-51. 2003.

WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; VAN EYK, J. E.; CHUNG, M. C.; GÖRG, A.; HECKER, M.; HUBER, L.A.; LANGEN, H.; LINK, A.J.; PAIK, Y. K.; PATTERSON, S. D.; PENNINGTON, S. R.; RABILLOUD, T.; SIMPSON, R. J.; WEISS, W.; DUNN, M, J. Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics*, v. 6 (1), p. 4-8. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Dengue hemorrhagic fever, diagnosis, treatment and control*. Geneva. 2010.

YAMAGUCHI, O.; KIMURA, M.; ARAKI, M.; YAMASAKI, N.; KIMURA, Y.; NAKAJIMA, S.; TAKAGI S. NAKAJIMA, S.; TAKAGI, S. Chemical structures of two subunits, A-subunit and B-subunit, of galactose-specific isolectins from *Erythrina variegata* seeds. *Journal of Biochemistry*, v. 114 (4) p. 560-566. 1993.

YAVUZ, H.; DURU, E.; GENÇ, O.; DENIZLI, A. Cibacron Blue F3GA Incorporated Poly (methylmethacrylate) Beads for Albumin Adsorption in Batch System. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, v. 223 (1-3) p. 185-193. 2003.

YU, YH.; XUE, B.; SUN, Y. Dye-ligand poly (GMA–TAIC–DVB) affinity adsorbent for protein adsorption. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 24 (1), p. 25-31. 2001.

ZUÑIGA, A. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R. Revisão: Técnicas Usadas No Processo De Purificação De Biomoléculas. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 21. 2003.

APÊNDICE A

Artigo a ser submetido ao periódico Process Biochemistry

**Immobilized Cramoll (1,4) lectin for a Proteomic study of glycoproteins from
serum of patients with dengue fever**

Raiana Apolinário de Paula¹, Ana Cristina Ferraz Nogueira², Viviane Guimarães Gomes², Ana Lúcia Oliveira Carvalho², Luana C. B. B. Coelho¹, Maria T. S. Correia¹, Russolina B. Zingali².

¹ Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife, PE, Brazil. ² Laboratório de Hemostase e Venenos (LabHemoVen), Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

**Immobilized Cramoll (1,4) lectin for a Proteomic study of glycoproteins from
serum of patients with dengue fever**

Raiana Apolinário de Paula¹, Ana Cristina Ferraz Nogueira², Viviane Guimarães Gomes², Augusto², Ana Lúcia Oliveira Carvalho², Luana C. B. B. Coelho¹, Maria T. S. Correia¹, Russolina B. Zingali².

¹ Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife, PE, Brazil. ² Laboratório de Hemostase e Venenos (LabHemoVen), Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Corresponding author.

E-mail address: lzingali@bioqmed.ufrj.br (R.B. Zingali)

Abstract

Immobilized lectins on inert support such as affinity matrices can be used as an efficient technique for purification compounds for biomedical applications. Knowing that dengue is one of the most serious problems of public health and is more prevalent in people from tropical regions. The aim of present research is investigated the use of immobilized lectin as affinity support for the isolation of glycoproteins from serum of healthy subjects (HS) and from patients with dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF). The seed lectins *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4, specific for D-glucose), were immobilized on sepharose CL-4B. The Serums HS, DF and DHF were applied to a chromatography column containing Cibacron Blue F3GA to efficient depletion of albumin from human serum. After the depletion, the fraction not adsorbed serum was applied into a column containing Cramoll 1,4-Sepharose and, 0.15 M NaCl the column was eluted with biospecific D-glucose solution of 0.3 M in NaCl 0.15 M. The adsorbed fractions were collected and assessed for protein concentration, electrophoretic profile and proteomic analysis. Given the above, it is elucidated that the supports containing the immobilized lectins were able to retain glycoproteins of the different serums used, presenting itself as a potential tool for isolation of molecule with biotechnological interest.

Keywords: Dengue, Proteomics, Lectin immobilized.

Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins that recognize non-immunologic source carbohydrate structures selectively. The main feature of this class of proteins is interact with carbohydrates and therefore may combine with glycoconjugates from cell and tissue surface; when immobilized inert carrier are used as affinity matrices for isolation of compounds like glycoproteins and glycolipids. [1] *Cratylia mollis* (camaratu bean) is a plant native to semi-arid Region in the state of Pernambuco, Brazil. From the seeds of *C. mollis* were isolated and purified molecular shapes of different lectins called Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3, Cramoll 4 and Cramoll 1,4. [2]

Dengue fever is a non-contagious, infectious disease transmitted through the *Aedes aegypti* mosquitoes, which today is one of the most serious public health problems, being most prevalent in people of the tropical region. Caused by dengue virus, is classified as an arbovirose, belonging to the Flaviviridae family and the genus Flavivirus. The clinical manifestations of this disease can range from the most common form, dengue fever (DF), to the more serious bleeding and/or shock featuring dengue hemorrhagic fever (DHF). [3]

Human serum is the liquid portion of blood after removal of the corpuscles and fibrin and it is a complex medium containing thousands of different types of proteins/peptides, originating throughout the body. These may be potential biomarkers for the clinical diagnosis of various fatal diseases. Identification of the proteins/peptides in human serum can provide valuable information regarding how the body reacts to changes, particularly in diseases. [4]

However, a big difference in the amount of protein in serum proteomics analysis makes it very challenging, because proteins in abundant quantity tend to mask those of a lesser amount. As the case of albumin, this comprises 60% of total protein in human serum. The depletion of serum proteins helps in discovery and detection of less abundant proteins that may be possible markers of disease. [5]

Cibacron Blue F3GA (CB) is a synthetic dye matrix that presents considerable specificity and affinity nucleotide dependent and to a significant number of other proteins. After fixing the appropriate CB insoluble supports has been used as ligand affinity chromatography to isolate and remove from the human serum albumin. [6]

Mass spectrometry (MS) is a micro analytical technique used for information of molecular weight and structural characteristics of the sample to be analyzed. Mass spectrometry is one of the most important analytical tools available, since it is capable of delivering information on elemental composition, molecular structure, qualitative and quantitative composition of complex mixtures, structure and composition of solid surfaces and the isotopic ratios of atoms in samples.[7]

In this research paper, it has been demonstrated that removal of albumin out of human serum of patients with dengue fever and further purification of glycoproteins from depleted serum with immobilized of Cramoll 1,4 lectin facilitated the analysis of low-abundant proteins in proteomic research.

2. Experimental

2.1. Materials

Sephadex® G-75 affinity chromatography resin; Cibacron Blue 3GA Agarose Type 3000-CL affinity chromatography resin, Cyanogen bromide-activated-Sepharose® 4B were purchased from Sigma (Saint Louis, USA).

2.2. Serum sample preparation

Blood samples of 18 volunteers were obtained from the Center of Diagnosis (LACEN-PE) of the Secretary of Health from Pernambuco, Brazil. Samples with haemolysis, lipemic or icteric were refused. The control blood samples were obtained from 6 volunteers without

obvious signs of disease, while 6 blood samples were obtained from patients with dengue fever and other 6 blood samples were obtained from patients with dengue hemorrhagic fever, both diagnosed through various clinical pathways. Once the blood samples were collected from the volunteers, each sample was immediately to form clotting for 30 min at 4°C and centrifuged for 10 min at 3500× G. The supernatant fluid, the serum, was isolated and stored at room temperature for 2 h, then frozen at -70° C. In order to avoid discrepancy of protein/peptide types among these volunteer sera, samples were pooled in 3 groups healthy individual (HI), dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF); before separation in the gel column.

2.3 Isolation of Cramoll 1,4 lectin

Cramoll 1,4 lectin was purified from 10% (w/v) *C. mollis* seed extract following the previously established protocol. [7] Proteins of extract were precipitated using 40–60% ammonium sulphate saturation and the obtained fraction was applied on Sephadex G-75 column (70.0×1.9cm) equilibrated with 0.15M NaCl. After the wash step, the elution was performed with 0.3M D(+)-glucose in 0.15M NaCl. Absorbance at 280nm was used to determine the relative concentration of eluted fractions. The isolated Cramoll 1,4 was dialyzed in distilled water and 0.15M NaCl, for 6h at 4°C.

2.4. Lectin immobilization

Cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (1g) was washed with 1.0mM HCl, followed by 0.1M NaHCO₃ buffer, pH 8.3 containing 0.5M NaCl and 1.0mM HCl. The coupling reaction was completed by mixing Cramoll 1,4 lectin (30mg of protein) and the resin for 2h at 24°C. The non-coupled lectin was removed by filtration on a sintered glass filter. The gel was transferred to 1.0 M ethanolamine, pH 8.0 during 2 h at 24 °C for blocking any

remaining active groups of the Sepharose. Finally, the Cramoll 1,4-Sepharose was washed with 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.0 containing 0.5M NaCl, followed by 0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.5M NaCl, 0.1M sodium acetate buffer, pH 4.0 containing 0.5M NaCl and 0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.5M NaCl. The amount of immobilized protein was calculated by the difference between the offered protein amount and that found in the filtrates; measurements were performed according to Lowry *et al.* (1951) [8] using bovine serum albumin as standard, at a range of 0–500 µg/mL. The support Cramoll 1,4-Sepharose was kept in 0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 0.5M NaCl at 4°C until use.

2.5. Serum proteins fractionation with Cibacron Blue 3GA Agarose

Each group of serum pool (0.25mL) was diluted with 0.75mL of 0.01M Tris-HCl pH 7.5, resulting in concentration 22 mg of protein, that was applied on a column (4.0 ×. 0.5cm) the Cibacron Blue F3-GA (1 mL of resin) and circulated through four times. The resin was washed with equilibrating buffer (0.01M Tris-HCl pH 7.5) and collected fractions of non-adsorbed material. The elution was performed with 0.01M Tris-HCl pH 7.5 + 1.5M NaCl and of the albumin adsorbed was collected. All fractions gathered were monitoring the decrease of protein concentration the solutions by UV absorbance at 280 nm using UV spectrophotometer. Protein assays were carried out, according to the Smith *et al.* [9] using bovine serum albumin as standard, in a transparent 96- well plate since the plate based method requires less sample than the cuvette based assay and it enables the simultaneous reading of all the samples and standards.

2.5 Cramoll 1,4 Sepharose affinity chromatography with depleted pool sample

Previously, 1 mL of matrix the Cramoll 1,4 Sepharose column (4.0 × 0.5cm) was equilibrated with 0.15 M NaCl. The non adsorbed fractions (HI, DF and DHF) of four depleted of serum samples were gathered with the largest concentrations and concentrated using Rotational-Vacuum-Concentrator (RVC). Were applied into columns 1 mL of each depleted samples from these groups HI, DF, DHF. Aliquots of samples were circulated through the column (eight times). After removal unbound proteins with 0.15 M NaCl, the adsorbed material was biospecifically eluted with 0.3 M D-Glucose in NaCl 0.15 M. Proteins in the adsorbed fractions were pooled, dialyzed against 5mM Tris-HCl pH 7.5 buffer at 4°C and concentrated in RVC. The treated samples were kept at -20°C for subsequent analysis by SDS-PAGE and MS.

2.6. SDS-PAGE

Electrophoresis under denaturing, reducing conditions in the presence of reducing agent (beta-mercaptoethanol) was done according to Laemmli [10], using a 5% (w/v) stacking gel and a 12% (w/v) separating gel. The gels of cibacron and Cramoll 1,4 columns were stained overnight with 2% (w/w) Coomassie G-250 prepared in distilled water. The standard molecular weight markers were phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), albumin from chicken (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactalbumin (14.2 kDa).

2.7. Gel digestion

Each 1D gel section was excised and further cut into smaller pieces. Gel pieces were washed with 25 mM ammonium bicarbonate in 50% acetonitrile overnight, at room temperature, to distain the proteins. Protein disulfide bonds were reduced with 10 mM DTT in 25 mM ammonium bicarbonate at 56 °C for 1 h followed by alkylation with 55 mM

iodoacetamide for 45 min at room temperature in the dark. Gel slices were then washed to remove the excess of reagent with 25 mM ammonium bicarbonate for 10 min at room temperature. Finally, they were dehydrated with 100% acetonitrile for 10 min and dried completely using a speedvac unit. The samples were allowed to reswell in an approximate volume of 10 μL of the digestion buffer containing trypsin at a final concentration of 10 ng/ μL in 25 mM ammonium bicarbonate, for 20 h, at 37 °C. Following incubation, the liquid from each gel piece was transferred to a clean 500- μL eppendorf tube. The peptides were extracted from the gel pieces twice by incubating with 50 μL of 50% acetonitrile in 5% trifluoroacetic acid; the first incubation during 15 min and the second one with sonication for 15 min. This solution was transferred and pooled together with the first extraction and finally concentrated to near dryness in a Speed-Vac system. Each sample was then solubilized in 15 μL of deionized water in 3% Acetonitrile and 0.1% formic acid.

2.8. Analysis of tryptic peptides by LC-MS/MS (nano-HPLC ESI-Q-TOF)

Reverse phase (C18) liquid chromatographic MS/MS analyses of proteolytic peptides were performed on a Waters® nano ACQUITY UPLC® System with a Waters Opti-Pak C18 trap column coupled to Q-Tof Micro® (Waters). Sample 7.5 μL was injected on a nanoEase C18 150 mm \times 100 μm column (Waters, Milford, MA), and to elute peptides from the column, mobile phases A, 94.9 % H₂O/5% acetonitrile/0.1% formic acid (v/v) and B, 94.9 % acetonitrile /5% H₂O / 0.1% formic acid (v/v) were used with the following gradient: 5% to 15% (0-1min); 15 % to 45 % (1-40 min); 45 % to 60 % (40 -45 min) ; 60 % to 5 % (45-55 min) of the mobile phases B at a flow rate of 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$. The ESI capillary voltage was maintained at 3.5 kV, the source temperature was 80 °C and the cone voltage was 35 V. MS/MS spectra were acquired using an instrument control MassLynx data system (Version 4.1, Waters), and the present experiments were performed by scanning from a mass-to-charge

ratio (m/z) of 300-1700 for MS and 50-1700 for MS/MS, applying a scan time of 1 s over the duration of the chromatographic process. Any of these peptides had a multiply-charged state and the 3 most intense ions were selected for MS/MS from a single MS survey. For the collision-induced dissociation (CID) MS/MS spectra, argon was used as the collision gas at a pressure of 13 psi and the collision voltage was varied between 15 and 80 V, depending on the mass of the precursor. Then, raw data sets were processed and converted into pkl format using the ProteinLynx Global server (version 2.0, Waters). The processing consisted of automatically lock mass correcting the m/z scale of both the MS and MS/MS data utilizing the lock spray reference ion. The MS/MS data were also charge-state deconvoluted and deisotoped with a maximum entropy algorithm (MaxEnt 3, Waters).

After the LC-MS/MS experiment, the measured peptides were screened computationally using Mascot server (<http://www.mascot-server.com.br/mascot/>) to search against a NCBI database of proteins. In general, searches were performed with the following parameters: MS/MS ion search, specificity for tryptic fragments and possibly one missed cleavage per peptide. Peptide and fragment mass tolerance of ± 0.1 Da were acceptable as well as fixed modifications, carbamidomethylation of cysteine.

3. Results and discussion

3.1. Isolation and Immobilization of Cramoll 1,4 lectin

Purification of Cramoll 1.4 was reproductive; electrophoresis by SDS-PAGE for native basic proteins showed that the lectin was purified efficiently with a pattern similar to others publications[11]. The result of the determination of the concentration of proteins present in the sample Cramoll 1.4 was 5.4 mg/ml. Immobilization of Cramoll 1.4 on Sepharose CL-4B was reproductive, showing a 100% yield, excellent value for the grounding of a protein. When immobilized proteins have several or different immobilization yields,

however the first protocol that reported the detention of Cramoll 1.4 into the Sepharose 4B with a yield of 95% [12], similar to that achieved in this work. Other type lectin of soybean agglutinin in the CDAP-Sepharose activated had a yield around 77% [13]. Recently it has been shown that immobilization of Cramoll had a yield equal to that achieved in this work [1].

3.2. Cibacron Blue 3GA as matrix of affinity for serum albumin depletion

Even though the goal of our study is to purify human serum glycoproteins using immobilized a lectin it was necessary in this work to deplete albumin due to two reasons: first, although albumin is not a glycoprotein it can binds to other glycoproteins and could be for that reason captured by a lectin column; second, albumin is the most abundant protein in serum and tend to mask the presence of those that are less abundant in the proteomics analysis of the serum. [15]. In our study we depleted the albumin using Cibacron Blue 3GA Agarose 3000 affinity column.

The affinity chromatography using control, DF, DHF pools of serum showed similarities in elution of Cibacron Blue column: a peak of not adsorbed proteins and a protein peak eluted with 0.01M Tris-HCl, pH 7.5, in 1.5M NaCl (Figure 1): Healthy individuals serum (Figure 1A), dengue fever serum (Figure 1B) and dengue hemorrhagic fever serum (Figure 1 C).

An electrophoresis of healthy individuals serum showed the efficiency result of albumin depletion by the Cibacron Blue resin. (Figure 2). The presence of a large band correspondent to albumin can be observed only at lane 1 that corresponds to the pooled sera and at lane 3 that corresponds to the fraction adsorbed in the column.

3.3. Affinity chromatography on immobilized Cramoll 1,4-Sepharose

One of the challenges in identifying glycoproteins is how to deal with the separation problem caused by the complexity of the attached oligosaccharides. Broad selectivity of lectins such as concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA), and jacalin are being used together to capture most glycoproteins [16]. Con A and WGA (Wheat germ agglutinin) are frequently used in affinity chromatography and find application in the isolation of polysaccharides and glycoproteins or in monitoring of glycosylation patterns of proteins [17]. Cramoll 1.4 immobilized on Sepharose 4B was able to isolate the enzyme lecithin cholesterol acyltransferase deficiency, as well as human plasma glycoproteins [18]. Recently, a soy protein with anticoagulant and anti-platelet activities has been purified using an immobilized Cramoll 1.4 grid [19]. The affinity chromatography results from pools depleted of albumin of health individuals, DF and DHF sera on Cramoll 1,4 Sepahrose are showed in figure 3. The serum groups tested showed a similar binding pattern in Cramoll column, a peak of not adsorbed proteins and a protein peak eluted with 0.3M glucose. The yield of the adsorbed proteins from each chromatography is summarized in table 1. It can be observed that a difference in protein concentration and in the amount of proteins bound to Cramoll 1,4 Sepahrose especially for serum from DHF. These bound proteins were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis under denaturing and reducing conditions stained with Coomassie Brilliant Blue.

3.4. MS analysis and identification of glycoproteins.

It could be noticed the presence of different bands for each serum (figure 4). Proteins were identified by mass spectrometry analysis after an in gel digestion of the proteins. A total of ~320 proteins where identified using this approached. Figure 5 show the Venn diagram of identified proteins in each condition: 91 proteins were common to all conditions, and 62, 31 and 49 proteins were exclusive from control, DF and DHF sera respectively. Among the

glycoproteins that were exclusively found in DF sera there are proteins related to the complement, protease inhibitor while in DHF samples for example hypothetical proteins were identified (Table 2). They could have an implication unknown, but more detailed study could obtain important information about the role of these proteins for the immune response against dengue virus infection.

The immunopathological mechanisms of dengue fever include a complex series of immune responses. Rapid increase in the levels of cytokines, especially TNF- α , and chemical mediators play a key role in inducing unique clinical manifestations of DHF such as plasma leakage, shock, and hemorrhagic manifestations. [20]

Several studies have indicated that plasma levels of various cytokines, chemokines and other mediators might be significantly higher in DHF than in DF [21]. This explains why the performance of the column with DHF patient serum and amounts of proteins identified in MS analysis are higher compared to serum from patient DF.

The cytokines elevated in patients with DHF include TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, and IFN- γ . The levels of IL-8 and MCP-1 are also elevated in DHF patients. Also, some studies demonstrated that TNF- α contributes to endothelial permeability and hemorrhage during DENV infection in animal models. However, it is not clearly understood how these cytokines are induced and how these cytokines cause malfunction of vascular endothelial cells and lead to plasma leakage [22].

Our studies showed that the presence of 22 proteins in common in both groups of patients with DF. Although the amounts produced of these molecules differ, these results corroborate the literature that relate the presence of cytokines and chemokines in the two disease conditions.

At this point we found no data in the literature that could correlate the identified proteins with the evolution of the disease. Nevertheless, some of them could be related in

platelet dysfunction and endothelial cell since the levels of apoptosis antiplatelet and antiendothelial cell antibodies are higher in the sera of DHF patients than in that of DF patients.

These results suggest a new way to research how is the mechanism of thrombocytopenia and plasma leakage. Our study is a start point to analyze the importance of the proteins found in the DF and DHF conditions (Table 2). These findings confirm that the immobilized Cramoll is an important tool for partial characterization and enrichment of glycoproteins which can be possible biomarkers for diagnosis and prognosis for dengue fever.

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) in the PROCAD project. We are grateful to Ana Lucia Oliveira Carvalho, Augusto Vieira and Viviane Guimarães for their technical assistance.

References

- [1] Sharon N, Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004; 14 (11) 53R–62R.
- [2] Paiva PMG, Coelho LCBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1992; 36: 113-8.
- [3] OPS (Organización Panamericana De La Salud). Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2010; 588.
- [4] Motta, VT. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*. Robe editorial, 2003; 4: 66.

- [5] Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD, Springer DL, Pounds JG. Toward a human blood serum proteome: Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics* 2002; (12):947-955.
- [6] Denizli A, Pişkin E. Dye-ligand affinity systems. *J Biochem Biophys Methods*. 2001; 49(1-3): 391–416.
- [7] Correia MTS, Coelho LCBB. Purification of a glucose/ mannose specific, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotech.* 1995; 55, 261-273.
- [8] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* 1951; 193: 265-75.
- [9] Smith,PK, Krohn RI, Hermanson,GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ. Klenk DC.). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985; 150 (1): 76–85.
- [10] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–5.
- [11] Melo CM, Brelaze MCA, Oliveira APF, Gomes FOS, Pereira VRA, Correia MTS, Coelho LCBB, Paiva PMG. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. *Phytotherapy Research*. 2010; 24: 1631–1636.
- [12] Lima VLM, Correia MTS, Cechinel YMN, Sampaio CAM, Owen JS, Coelho LCBB. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydr Polym.* 1997; 33: 27-32.
- [13] Franco-Fraguas L, Plá A, Ferreir, F, Massaldi H, Suárez N, Viera F.B. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *Journal of Chromatography* 2006; 790:365–72.
- [14] Silva MCC, Santana LA, Silva-Lucca RA, Lima ALR, Ferreira JG, Paiva PMG,

Coelho LCBB, Oliva MLV, Zingali RB, Correia MTS. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. *Process Biochemistry* 2010; 46: 74–80.

[15] Fang XM, Zhang WW. Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. *J Proteome Res.* 2008; 71: 284–303.

[16] Qiu R, Zhang X, Regnier FE. A method for the identification of glycoproteins from human serum by a combination of lectin affinity chromatography along with anion exchange and Cu-IMAC selection of tryptic peptides. *Journal of Chromatography B* 2007; 845: 143–150.

[17] Rosenfeld R, Bangio H, Gerwig GJ, Rosenberg R, Aloni R, Cohen Y, Amor Y, Plaschkes I, Kamerling JP, Maya RBY. A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2007; 70 (3): 415–426.

[18] Lima VLM.; Correia MTS, Cechinel YMN, Sampaio CAM, Owen JS, Coelho LCBB. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydr Polym* 1997; 33: 27-32.

[19] Silva MCC, Santana LA, Silva-Lucca RA, Lima ALR, Ferreira JG, Paiva PMG, Coelho LCBB, Oliva MLV, Zingali RB, Correia MTS. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. *Process Biochemistry* 2010; 46: 74–80.

[20] Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J InfectDis* 2000;181:2–9

[21] Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis* 2006;19:429–36.

[22] Kurane I, Ennis FE. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin Immunol* 1992;4:121–7.

Figure legends

Figure 1: Cibacron Blue 3GA affinity chromatography columns of healthy individuals serum (A), dengue fever serum (B) and dengue hemorrhagic fever serum (C). Pool serum samples (1 ml), have been applied to Cibacron Blue columns (1 ml). Chromatography was performed at a flow rate of 10 ml/h and 1 ml fractions were collected and absorbance at 280nm was measured. Chromatography was developed in 10mM Tris-HCl, pH 7,5 and arrows indicate the elutions with 1.5 M NaCl in the same buffer.

Figure 2: SDS-PAGE of cibacron affinity chromatography from HI serum. Total serum (1), non adsorbed fraction (2), eluted fraction with 1.5 M NaCl in TRIS-HCl (3). The isolated protein samples were applied (30 µg) into the 12% polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out in a current of 40 mA for 2 hours and 30 min at room temperature.

Figure 3: Affinity chromatography on immobilized Cramoll 1,4-Sepharose of healthy individuals serum (A), dengue fever serum (B) and dengue hemorrhagic fever serum (C). Depleted serum samples (1 ml), have been applied to Cramoll 1,4 columns (1 ml). Chromatography was performed at a flow rate of 10 ml/h and 1 ml fractions were collected and absorbance at 280nm was measured. Chromatography was developed in 0.15M NaCl and arrows indicate the elution with 1.5 M NaCl in the same buffer.

Figure 4: SDS-PAGE of glycoproteins serum samples eluted from Cramoll 1,4-Sepharose column. Molecular weight (lane 1), HI (lane 2), DF (lane 3), DHF (lane 4). The isolated protein samples were applied (50 µg) into the 12% polyacrylamide gel. Electrophoresis gel was cutted in ten parts for MS analysis.

Figure 5: Venn diagram of the proteins identified by proteomics mass spectrometry software PEAKS in each of the three sample conditions. Venn diagram illustrate the significant difference in the proteins identified. There were 62 proteins identified solely in the

healthy individuals serum, 31 proteins identified solely in the dengue fever serum and 49 found solely in Dengue hemorrhagic fever serum.

Table 1 - Yield of the adsorbed Albumin depleted serum proteins to Cramoll 1,4 Sepharose chromatography.

Serum	Applied Protein (mg)	Obtained protein (mg)	Yield (%)
Health individuals	40.3	1.5	3.72
DF patients	36.3	1.8	4.95
DHF patients	38.4	4.1	10.67

Table 2- Representative examples of proteins identified solely in the healthy individuals serum (1), dengue fever serum (2) and dengue hemorrhagic fever serum (3)

1.

Prot. ID	Acces.	Score (%)	Cov. (%)	Pept.	Unique	PTM	Mass	Description
243	P07225	84.4	4	2	2	Y	75123	Vitamin K-dependent protein S
444	P09172	61.6	2	1	1	N	69065	Dopamine beta-hydroxylase
463	H7C5R1	61.6	2	1	1	N	97713	Ceruloplasmin (Fragment)
191	Q9HCC1	98.4	37	3	1	Y	12243	Single chain Fv (Fragment)
460	D3GKD8	61.6	7	1	1	N	16170	A-gamma globin Osilo variant
292	A2J1N5	84.1	23	2	1	Y	10450	Rheumatoid factor RF-ET6 (Fragment)
169	B4DPP6	98.4	6	3	3	Y	70363	cDNA FLJ54371_ highly similar to Serum albumin
418	Q08380	61.7	2	1	1	N	65331	Galectin-3-binding protein
196	K7ERE3	98.3	7	3	0	Y	45261	Keratin_ type I cytoskeletal 13
517	E7EWC8	59.4	2	1	1	Y	39079	SUN domain-containing protein 3
370	B4DU12	61.7	4	1	1	N	42111	cDNA FLJ54060_ highly similar to Apolipoprotein-L1
175	Q6N094	98.4	8	3	1	Y	52613	Putative uncharacterized protein DKFZp686O01196
471	P25311	61.5	4	1	1	Y	34259	Zinc-alpha-2-glycoprotein
242	Q9NSD0	84.4	4	2	2	Y	72480	Protein S Homo sapiens
449	D1MGQ0	61.6	10	1	1	N	11502	Delta globin (Fragment)
415	B3KP88	61.7	3	1	1	N	54171	cDNA FLJ31415 fis_ clone NT2NE2000284_ highly similar to Galectin-3-binding protein
421	Q14520	61.7	2	1	1	Y	62672	Hyaluronan-binding protein 2

Caracterização do perfil de glicoproteínas presentes em soros ...

2.

Prot. ID	Acces.	Score (%)	Cov. (%)	Pept.	Unique	PTM	Mass	Description
2938	F8W6P5	98.9	57	4	4	Y	9670	LVV-hemorphin-7 (Fragment)
70	Q5ST57	99.1	15	7	7	Y	58789	Complement C2b fragment
2970	Q9UBW9	83.2	38	2	2	Y	6286	Antithrombin III (Fragment)
3024	B4E1H2	61.6	2	1	1	N	49757	Plasma protease C1 inhibitor
2955	P27169	98.3	11	3	3	Y	39731	Serum paraoxonase arylesterase 1
3023	P08697	61.6	2	1	1	Y	54566	Alpha-2-antiplasmin Serine cysteine proteinase inhibitor clade G member 1 splice variant 2
3018	Q5UGI6	61.6	3	1	1	N	37288	(Fragment)
3017	G3V1N2	61.6	8	1	1	Y	11948	HCG1745306_ isoform CRA_a
3054	H0YA93	46.5	1	1	1	Y	158174	NEDD4-binding protein 2 (Fragment)
178	Q6N089	98.7	11	4	0	Y	51725	Putative uncharacterized protein DKFZp686P15220

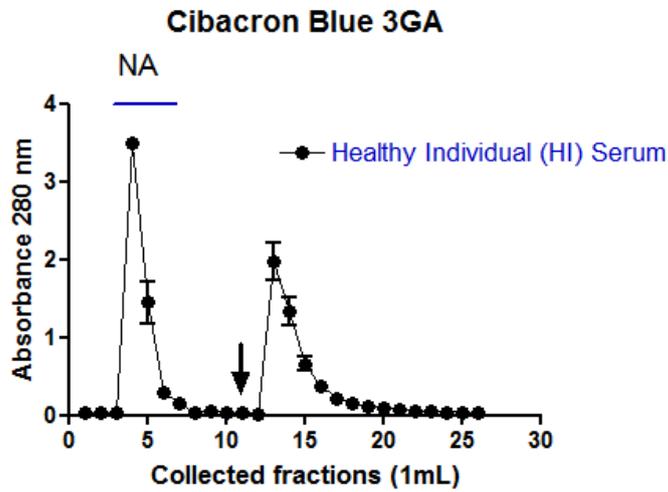
Caracterização do perfil de glicoproteínas presentes em soros ...

3.

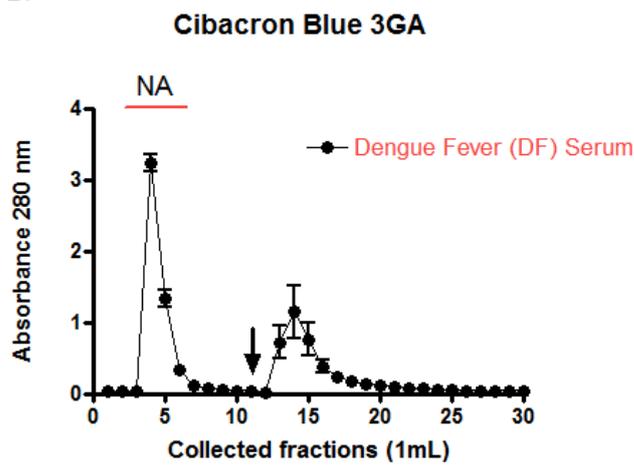
Prot. ID	Acces.	Score (%)	Cov. (%)	Pept.	Unique	PTM	Mass	Description
5846	Q9C0D5	50.5	0	1	1	N	202218	Protein TANC1
5806	P06276	98.9	10	4	4	Y	68418	Cholinesterase
142	Q8TCJ5	98.4	42	3	2	N	11266	Putative uncharacterized protein DKFZp667J0810 (Fragment)
147	Q7Z2U7	98.4	19	3	2	N	25015	Putative uncharacterized protein
24	E1A689	99.2	7	21	21	Y	489824	Mutant Apo B 100
256	P01859	98.4	11	3	1	Y	35901	Ig gamma-2 chain C region
17	F8VX64	99.2	21	33	1	Y	187715	Protein LOC100293534
20	B0UZ85	99.2	21	33	1	Y	192747	Complement component 4B (Childo blood group)
5827	P04003	84.4	4	2	2	Y	67033	C4b-binding protein alpha chain
146	Q6GMV8	98.4	19	3	2	N	24910	Putative uncharacterized protein
259	Q68CN4	98.4	8	3	1	Y	51536	Putative uncharacterized protein DKFZp686E23209
113	Q6MZV6	99.1	15	7	0	Y	51639	Putative uncharacterized protein DKFZp686L19235
5816	P06312	84.4	22	2	2	Y	13380	Ig kappa chain V-IV region (Fragment)
5807	D3DNN4	98.9	9	4	4	Y	72883	Butyrylcholinesterase_ isoform CRA_b
258	Q6N093	98.4	9	3	1	Y	46061	Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment)
115	Q6ZVX0	99.1	14	7	0	Y	52875	cDNA FLJ41981 fis_ clone SMINT2011888_ highly similar to Protein Tro alpha1 H_myeloma
21	A7E2V2	99.2	21	33	1	Y	192786	Complement component 4A (Rodgers blood group)
148	A0A5E4	98.4	19	3	2	N	24747	Putative uncharacterized protein
5837	A2N2G5	61.6	14	1	1	Y	14538	VH87-2 protein (Fragment)
265	A2NB46	61.7	17	1	1	N	11888	Cold agglutinin FS-2 L-chain (Fragment)

Figure 1

A.



B.



C.

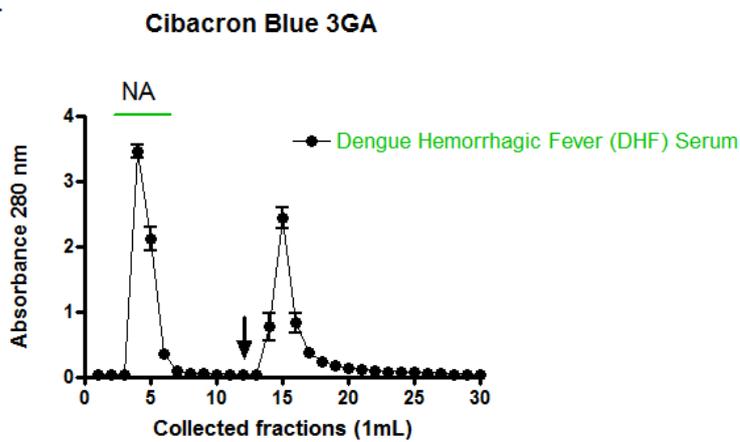


Figura 2

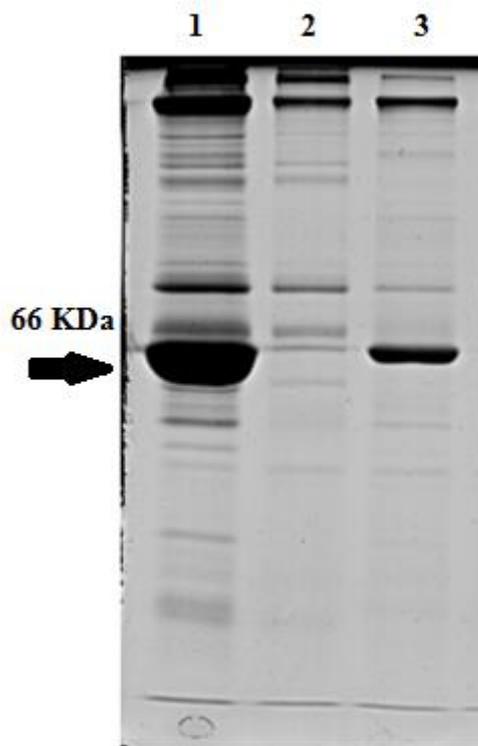


Figura 3

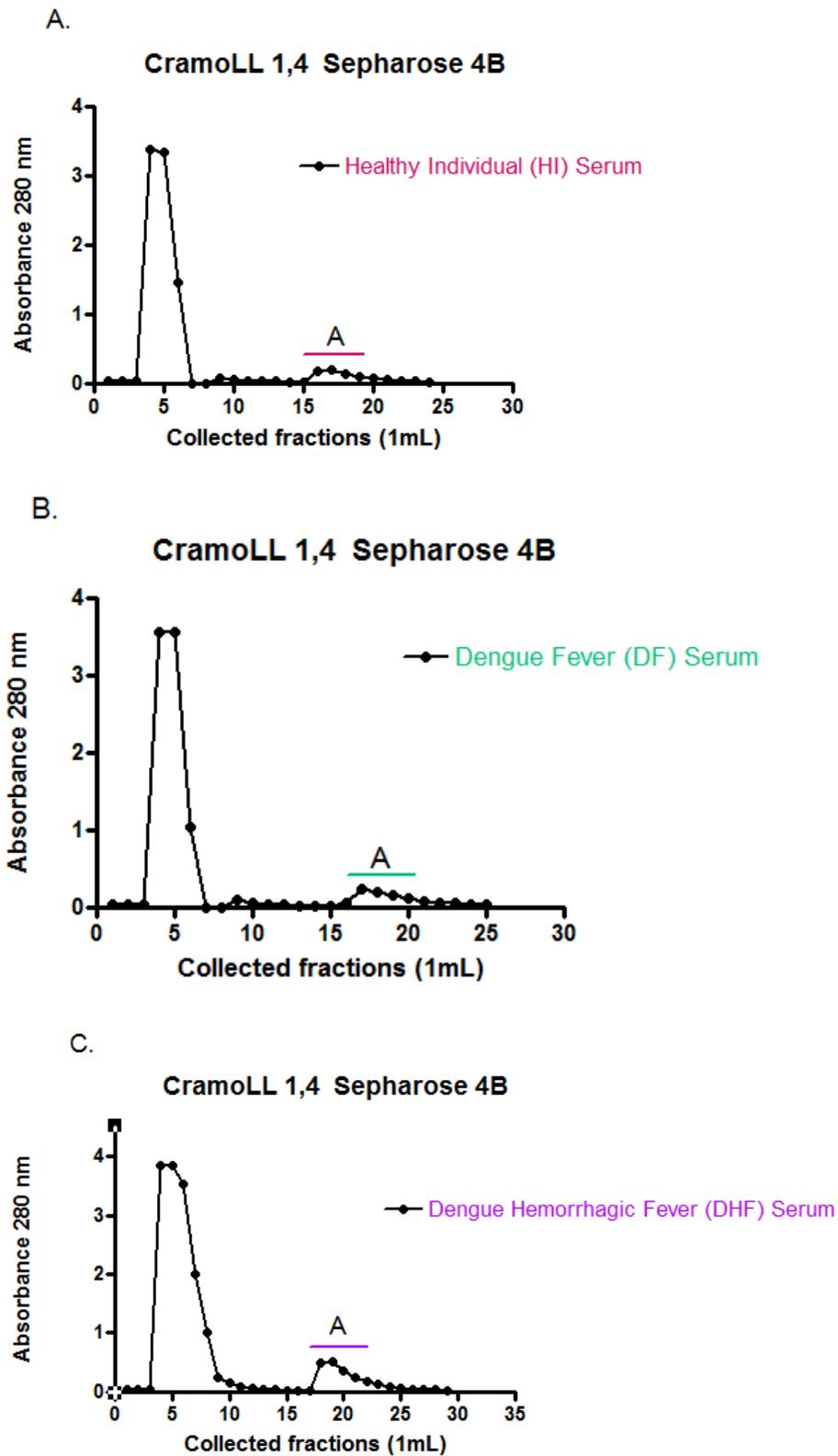


Figura 4

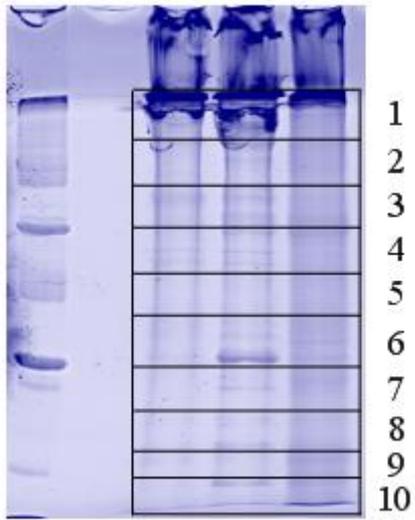


Figure 5

