



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

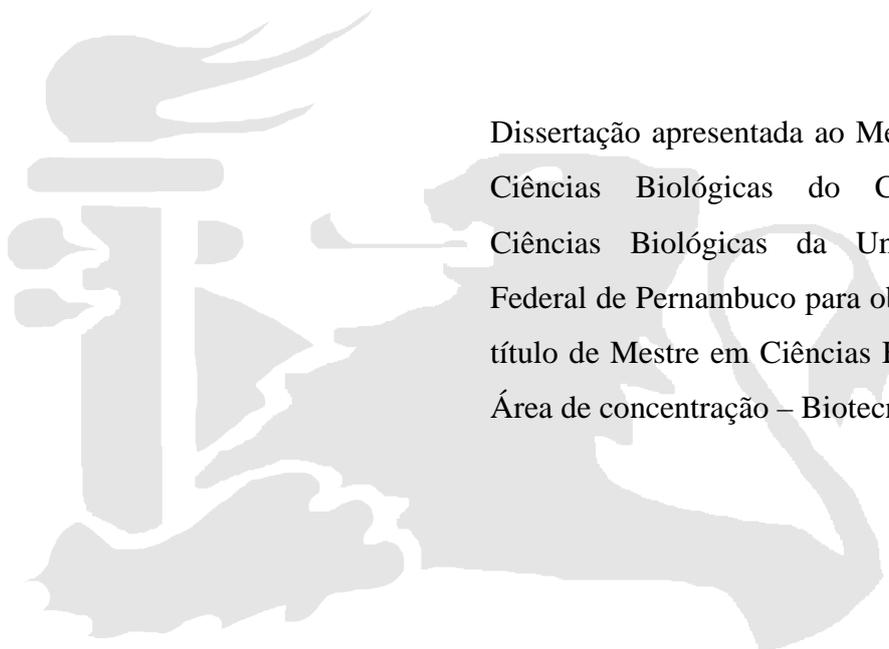
CYNARHA DAYSY CARDOSO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE CARBOIDRATOS
EM EPIDÍDIMO E FUNÍCULO ESPERMÁTICO
HUMANOS DE PACIENTES COM FILARIOSE**

RECIFE, 2006

CYNARHA DAYSY CARDOSO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE CARBOIDRATOS
EM EPIDÍDIMO E FUNÍCULO ESPERMÁTICO
HUMANOS DE PACIENTES COM FILARIOSE**



Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração – Biotecnologia.

Orientador

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-orientadores

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Prof. M.Sc. Mário Ribeiro de Melo

RECIFE, 2006

Silva, Cynara Dayse Cardoso da
Identificação histoquímica de carboidratos em epidídimo e funículo
espermático humanos de pacientes com filariose / Cynara Dayse
Cardoso da Silva . – Recife : O Autor, 2006.
59 folhas. il., fig.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Ciências Biológicas – Biotecnologia, 2006.

Inclui bibliografia.

1. Lectina 2. Epidídimo. 3.Cordão espermático. 4. Histoquímica
I. Título.

573	CDU (2.ed.)	UFPE
570	CDD (22.ed.)	CCB 060

*Dedico aos meus pais
Paulo Fernando e Iolanda Cardoso,
pela boa vontade, por acreditarem
e me ajudarem sempre que preciso,
mesmo diante das dificuldades.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
ARTIGO CIENTÍFICO	8
LISTA DE TABELAS,	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1 Filariose	12
1.2 Glicoconjugados	20
1.3 Lectinas	21
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos	27
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
5 ARTIGO CIENTÍFICO	37
5.1 Introdução	40
5.2 Materiais e Métodos	42
5.3 Resultados	44
5.4 Discussão	48
5.5 Referências Bibliográficas	51
6 CONCLUSÕES GERAIS	54
7 ANEXO	55

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, me deu força para ultrapassar mais uma etapa de vitória em minha vida.

Aos meus pais Paulo Fernando da Silva e Iolanda Cardoso Silva pelo incentivo e batalharem junto comigo na superação de mais um obstáculo.

Às minhas irmãs Handrezza Fernanda e Adriana Vasconcelos por compreenderem os momentos difíceis; e meus sobrinhos: Jéssica Priscila, João Phillype, Higor Fernando e Gabriel Henrique, por me darem alegria de serem crianças.

Ao professor Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, meu orientador, ilustre pessoa que admiro incondicionalmente por sua tranqüilidade e alegria que contagia a todos e competência. Muito obrigada por me aceitar como sua mestranda.

Prof. Dr Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, pela excelente orientação e calma, obrigada pela confiança em mim depositada, por entender as minhas falhas. Agradeço por me ajudar nos momentos em que mais precisei e por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. M.Sc. Mário Ribeiro de Melo, pela orientação, amizade e paciência. Você acreditou que eu conseguiria. Agradeço também a sua esposa, Taciana, que várias vezes me aconselhou de maneira amiga e sensata.

À Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, com sua simpatia, contribuindo com suas sugestões para finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nicodemos Telles de Pontes Filho, um grande professor por quem tenho muito carinho e que sempre estará guardado na minha lembrança por sua acolhida e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

À Carmelita de Lima Bezerra Cavalcanti pelo seu carinho, alegria, profissionalismo e bom humor marcantes. Meu muito obrigado por tudo.

À minha amiga Conceição Gomes, companheira de todas as horas, obrigada pelo incentivo, competência e apoio em inúmeros momentos de dificuldade que passei durante o curso. Sempre serei grata a você.

À amiga Andrezza Borges, pessoa que admiro pela sua competência e amiga que é sempre me ajudando com entusiasmo.

Aos grandes amigos do Setor de Patologia, Jorge Luiz, Marcos César, Luciano Mello, Vasco Patu, Reginaldo Gonçalves, Renata Kelly, Susan Vasconcelos, que sempre acreditaram que eu podia vencer mais essa etapa de minha vida, cada um de alguma forma me dando força para continuar esta batalha.

À amiga Leilyana Cristina (Leila), pela sincera amizade e por sempre está torcendo por minha realização profissional.

À amiga Daniela Viana (Dani), sempre doce e com seu carisma e tranquilidade que me tranquilizava nos momentos difíceis, e claro, por sua alegria de viver contagiante.

À amiguinha Lillyane (Lillyca), sempre muito sensata e justa, e sempre me acolheu de braços abertos.

À mais nova amiga Janielle Medeiros, cuja amizade está só começando. Sempre alegre e prestativa, e o mais importante, otimismo fora de série, obrigada por me ajudar.

Aos amigos que ganhei, da equipe do Prof. Eduardo, Amanda Lucena, Tatiana (Tati) Mattos, Ricardo Bonifácio, Moacyr Barreto, Bruno Cabral, Emmanuel Nogueira, Débora Belezza, Carolina (Carol) Patriota, Rebeca Matos, Denise Cunha, David Lemos, Elton Menezes, Leandro Felisberto. Vocês são ótimos.

Aos grandes amigos Djair e Valquiria, companheiros de mestrado e conterrâneos, me ajudaram bastante nesta etapa de minha vida. Sempre serei muito grata a vocês.

Aos funcionários do LIKA, Moisés, Sr. Otaviano, Oscar, Vera, Cleide, Felipe, Ilma, Conceição, Isabel, Paulina, Dona Celestina, Paulo e Cláudio.

A todos que contrubuíram de alguma forma para a realização desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1: Distribuição mundial da filariose bancroftiana.

FIGURA 2a: Mosquito vetor *Culex quinquefasciatus*.

FIGURA 2b: Microfilária *Wuchereria bancrofti*

FIGURA 3a: Elefantíase de membro inferior;

FIGURA 3b: Microfilária alojada na mama;

FIGURA 3c: Elefantíase de membros superiores.

FIGURA 4a: Sistema urogenital masculino

FIGURA 4b: Elefantíase escrotal

FIGURA 5 – Glicoconjugados de superfície celular.

ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURA 1: Epidídimo Humano. **A:** Verme de *W. bancrofti*, com marcação intensa pela UEA I (Amplificação x400); **B:** Sistema verme-granuloma de *W. bancrofti* intensamente marcado pela UEA I; **C:** Marcação moderada do verme e granuloma por WGA; **D:** Marcação fraca do verme por Con A; **E:** Marcação moderada dos vermes em estágio avançado de degeneração pela LTA; **F:** Ausência de marcação por LTA do epitélio de vaso linfático (Amplificação x200).

FIGURA 2: Funículo espermático. **A:** Marcação fraca do granuloma pela WGA (Amplificação x100); **B:** Marcação moderada da lectina WGA no verme; **C e D:** Marcação muito fraca pela e Con A e LTA no verme; **E:** Lectina UEA-I marcando fortemente o verme; **F:** marcação moderada pela UEA-I da porção luminal do vaso (Amplificação x200).

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Histoquímica com lectinas para biópsias de epidídimo humano.

TABELA 2. Histoquímica com lectinas para biópsias de funículo espermático.

RESUMO

Para avaliar a eficiência da histoquímica com lectinas no mapeamento do perfil de carboidratos do sistema verme-granuloma e vasos sanguíneos em epidídimo e funículo espermático de pacientes infectados com *Wuchereria bancrofti* foram utilizadas lectinas conjugadas a peroxidase (Concanavalina A, Con A; lectina de germe de trigo, WGA; *Lotus tetragonolobus* agglutinin, LTA; peanut agglutinin, PNA; *Ulex europaeus* I, UEA I). Os resultados demonstraram que as lectinas utilizadas reconheceram de forma diferenciada o verme, o granuloma e os vasos linfáticos e sanguíneos nos tecidos estudados. UEA I marcou de forma intensa o verme e o granuloma filariais bem como o epitélio dos vasos linfáticos e sanguíneos no epidídimo. No funículo espermático a UEA reconheceu apenas carboidratos no verme. A WGA apresentou, no epidídimo, uma marcação moderada dos vermes e granulomas, marcando fracamente os vasos sanguíneos ao passo que no funículo espermáticoo verme foi moderadamente marcado enquanto que o granuloma e os vasos foram fracamente marcados. Epidídimos marcados com LTA apresentaram marcação de moderada-intensa do verme e o granuloma, não reconhecendo o epitélio dos vasos sanguíneos e linfáticos. Esta mesma lectina marcou fracamente o verme no funículo espermático. Con A marcou fraca apenas o verme, tanto no epidídimo quanto no funículo espermático. Apenas o granuloma no epidídimo foi marcado fracamente pela PNA que não reconheceu nenhuma estrutura no funículo espermático. Os resultados da histoquímica com lectinas evidenciam o perfil de carboidratos do verme e estruturas histológicas do epidídimo e funículo espermático humanos de maneira diferenciada apresentado estas proteínas como sondas auxiliares específicas quanto ao diagnosticados com filariose bancroftiana.

Palavras-chave: histoquímica, *Whuchereria bancrofti*, lectina, epidímo, funículo espermático.

ABSTRACT

Lectin histochemistry was used to screen the carbohydrate profile of worm-granuloma system in epididimus and spermatic cords of patients infected with *Wuchereria bancrofti*. Concanavalina A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA), *Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA), peanut agglutinin (PNA) and *Ulex europaeus* I agglutinin, conjugated to peroxidase were used. Lectins used recognized differentially worms, granuloma and lymphatic and blood vessels. UEA I intensely stained the worm-granuloma system as well as the epithelial cells of both vessels in epididimus. In spermatic cord only worms were recognized by UEA I. WGA stained moderately worms and granulomas in epididimus while vessels were weakly stained. All structures studied were weakly stained in spermatic cord but the worm which was moderately stained by WGA. Epididimus evaluated with LTA presented a moderate-intense staining for worm-granuloma system and no-staining to epithelial cells of vessels. The same lectin stained weakly worms in spermatic cord. Con A recognized only worms in both tissues studied. Granulomas were stained by PNA in epididimus. Lectin histochemistry results evidenced the saccharide profile of worms and histologic structures in human epididimus and spermatic cord showing to be good differentially probes to bancroftian filariasis.

Key-word: histochemistry, *Wuchereria bancrofti*, lectins, epididimus, spermatic cord

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Filariose

A filariose linfática é causada por três espécies de nematódeos: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori* (DREYER & NORÕES, 2005).

A *W. bancrofti* tem a maior distribuição mundial, estimando-se cerca de 120 milhões de pessoas distribuídas em 75 países de diferentes continentes (DREYER & NORÕES, 2005; REDA et al., 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005) cerca de 2 bilhões de pessoas, que vivem em áreas tropicais (Figura 1), estão em risco de infecção, tornando-se, desta forma, a patologia mais importante do ponto de vista epidemiológico. Aproximadamente 27 milhões de homens desenvolvem doença genital, acompanhada de deformação, em função de bancroftose, ao passo que em mulheres é raro (RICHENS, 2004).

No nordeste brasileiro, a região metropolitana do Recife é historicamente reconhecida como uma área endêmica para a filariose bancroftiana, onde os municípios de Olinda e Jaboatão dos Guararapes apresentam taxas de microfilaremia variando de 2 a 15% em setores populacionais de baixos níveis econômicos (DREYER E NORÕES, 2000, CAVALCANTI et al., 1999).

Nos últimos anos a filariose linfática tem surgido como um problema crescente em saúde pública em várias partes do mundo (DREYER et al., 2005; WHO, 2005). A Organização Mundial de Saúde (World Health Organization-WHO) vem traçando estratégias para eliminação da filariose linfática com a iniciativa de elaboração de planos nacionais de administração de drogas filaricidas estabilizando a distribuição

destas em tempos regulares bem como o mapeamento do quadro de áreas endêmicas em todo o mundo (KHALFAN et al., 2006).

A debilitação física e o estigma social associado à filariose linfática têm sido considerados como a segunda causa mundial de incapacidade para exercer atividades no trabalho (WHO, 2004).

Nas áreas onde a doença é endêmica, a prevalência de infecção aumenta continuamente. Isso ocorre, principalmente pelo crescimento rápido e desordenado dos centros urbanos e pela criação de condições ideais para a multiplicação dos focos de mosquitos transmissores da doença, assim a bancroftose é observada como uma doença reemergente (DREYER et al., 2005).

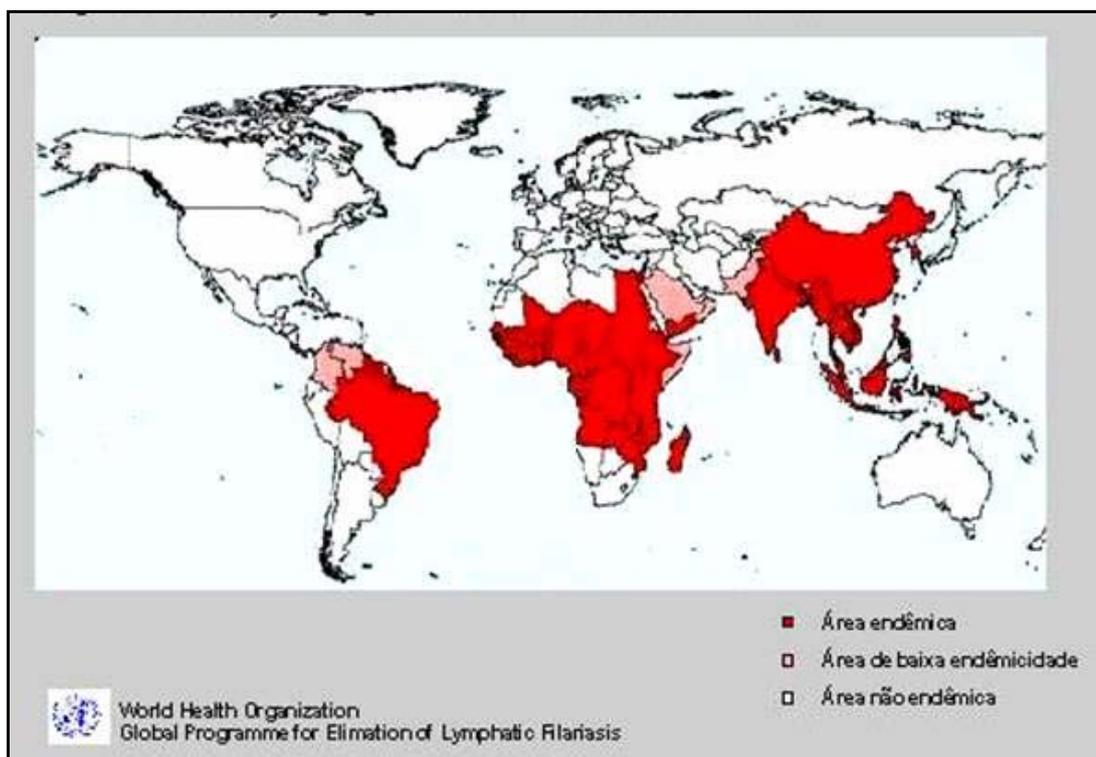


Figura 1: Distribuição mundial da filariose bancroftiana

Culex quinquefasciatus (Figura 2a) é um dos mosquitos vetores da *Wuchereria bancrofti* (Figura 2b), agente etiológico da filariose linfática em humanos (SANTOS et al., 2006). Parte do ciclo de vida das microfilárias é desenvolvida no interior destes mosquitos até o estágio de larva infectante (L3). No homem, a infecção inicia-se através da deposição das microfilárias larvas na pele, passam para os vasos linfáticos podendo se alojar no sistema linfático ou linfonodos transformam-se em vermes adultos, e após sete ou oito meses as fêmeas grávidas produzem as primeiras microfilárias, estas, ficam acessíveis aos mosquitos, quando realizam um novo repasto sanguíneo (DREYER et al., 2005).



Figura 2a: Mosquito vetor *Culex quinquefasciatus*



Figura 2b: Microfilária *Wuchereria bancrofti*

Pacientes infectados com *W. bancrofti* podem apresentar-se com manifestações exudativas, infiltrados e lesões granulomatosas (JUNGMAN et al., 1991). As microfilária presentes na pele (membros, escroto e pênis) danificam as funções linfáticas e predisõem às infecções bacterianas secundárias que são consideradas como cofator essencial no desenvolvimento do linfedema podendo progredir para elefantíase. (DREYER et al., 2000).

A bancroftose pode apresentar reações indiretamente relacionadas com o verme como à formação de microabcessos nos linfonodos, granulomas epitelióides ocasionalmente ao redor da área necrótica, resposta granulomatosa, infiltrado linfocitário difuso, eosinófilos, exudação neutrofílica. A reação diretamente relacionada com os vermes, em geral a resposta granulomatosa é dominada por macrófagos, linfócitos e eosinófilos com proliferação fibroblástica inversamente proporcional aos componentes inflamatórios celulares comumente associados com a calcificação do verme em consequência do tratamento com doses de medicamentos como Dietilcarbamazina (DEC) (JUNGMANN et al., 1991; FIGUEREDO et al., 1996).

A *filariose* ainda causa comprometimento extralinfático, ao contrário do que ocorre na doença linfática, as manifestações extralinfáticas, não são causadas pelos vermes adultos e sim pelas microfilárias. Uma dessas manifestações é a formação de granulomas microfilariais que têm sido encontrados, preferencialmente, no epidídimo, baço, funículo espermático, em outros órgãos (JUNGMANN et al., 1991).

A apresentação clínica da filariose bancroftiana é bastante diversificada, variando desde as forma assintomáticas e sintomáticas agudas até as formas crônicas. A doença pode acometer homens e mulheres, atingindo diferentes partes do organismo, como os membros inferiores (Figura 3a), as mamas (Figura 3b), membros superiores (Figura 3c), região escrotal, o pênis e raramente a vulva. No homem, o ambiente mais propício para o desenvolvimento da doença e a região do sistema urogenital. Na mulher, a elefantíase, a mais desfigurante dentre todas as manifestações crônicas, localiza-se predominantemente nos membros inferiores. (DREYER et al, 2000)

Diversos estudos têm relacionado à vulnerabilidade do sistema urogenital masculino diante da bancroftose (NORÕES et al., 2003). Deformidade da pele do

escroto pode ocorrer em homens especificamente no funículo espermático que é considerado um ambiente favorável para o desenvolvimento dos vermes adultos que ali se alojam (DREYER et al., 2000), e podem ser detectadas pelo método diagnóstico de ultrassonografia da região escrotal onde os vermes apresentam-se com movimentos peculiares nomeados de “dança filarial” em estudos realizados por AMARAL, em 1994.

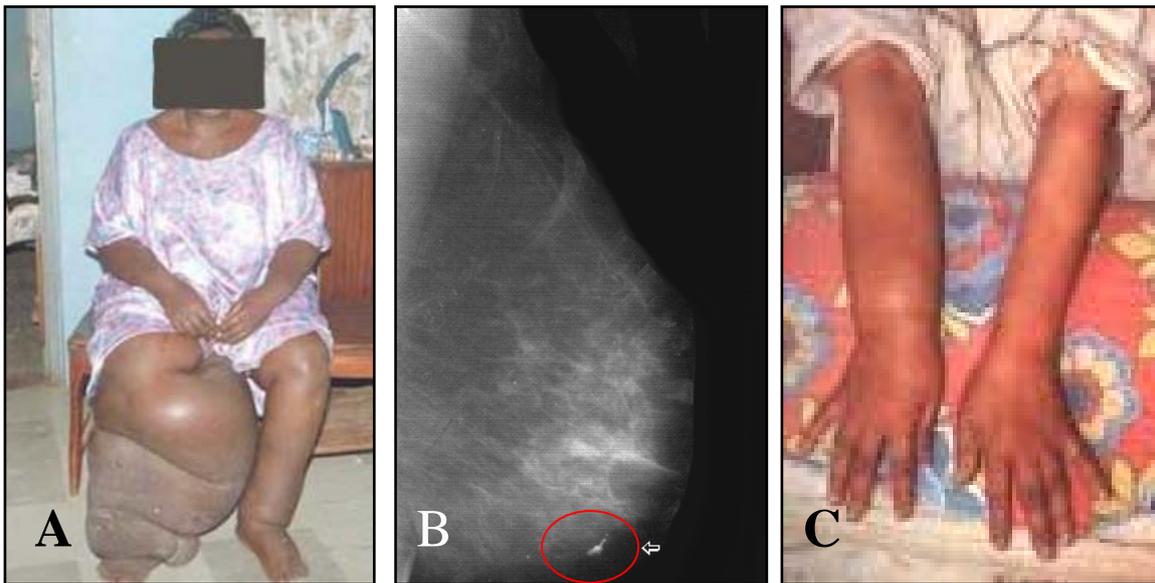


Figura 3: a: Elefantíase de membro inferior ; **b:** Microfilária alojada na mama; **c:** Elefantíase de membros superiores.

A droga antifilaricida Dietilcarbamazina (DEC) é utilizado para o tratamento da filariose linfática, com administração de 6mg/kg de peso corporal durante 12 dias que possivelmente elimina microfílarias e vermes adultos causando reação tanto local quanto sistêmica podendo reduzir o quadro de hidroceles em pacientes do sexo masculino), e no caso da eosinofilia pulmonar tropical (EPT), síndrome que pode levar o paciente a óbito em decorrência de uma intensa inflamação com predominância de eosinófilos seguido de fibrose intersticial pulmonar (BERNHARD et al., 2001).

Dreyer e colaboradores, em 1999 quando fez um estudo relativo à patogênese da hidrocele filarial, detectou a presença de nódulos intraescrotal (granuloma) que desenvolveram após o tratamento com DEC, no entanto, não encontraram vermes adultos através da ultrassonografia após o tratamento (DREYER et al., 1999; NORÕES et al., 2003). A explicação exata para esse mecanismo de falha não se é dada diante deste contexto, porém a cura parasitológica de um dado indivíduo está na dependência da sensibilidade dos vermes à droga e, desse modo não é possível antever a resposta terapêutica em cada indivíduo (DREYER et al., 2005).

Entretanto o fármaco Ivermectina, com excelente efeito microfilaricida, não tem qualquer ação diante dos vermes adultos, mesmo em altas doses (DREYER et al., 2000). Assim uma grande parte da população tratada com ambas as drogas, quer seja isoladas ou em combinação persistirá infectada ainda por tempo indeterminado, até que a morte do verme ocorra de forma natural (DREYER et al., 1997).

Outros estudos demonstraram que a Ivermectina traz resultados bastante satisfatórios para o tratamento de elefantíase escrotal e de pernas em combinação com a higienização da pele e ingestão de tetraciclina para o combate de proliferação bacteriana impedindo a progressão da doença (POGGENSEE et al., 2001).

Em humanos do sexo masculino, locais específicos como epidídimo e funículo espermático pode-se observar a presença de vermes e conseqüentemente reação inflamatória granulomatosa (FIGUEREDO-SILVA et al., 1996). O hospedeiro ideal, tanto para a infecção quanto para a doença, parece ser o homem adulto, que pode apresentar um amplo espectro de morbidades urogenitais filariais. No homem, hidrocele testicular (figura 4b) é a manifestação clínica mais comum. Até 40% dos homens em áreas endêmicas, a *W. bancrofti* são portadores deste tipo de manifestação. A pré-

disposição masculina a esta infecção e a doenças urogenitais associadas à filariose continuam sem explicação, apesar dos anos de estudo de sua patogênese (GYAPONG et al., 1988; NORÕES et al., 2003).

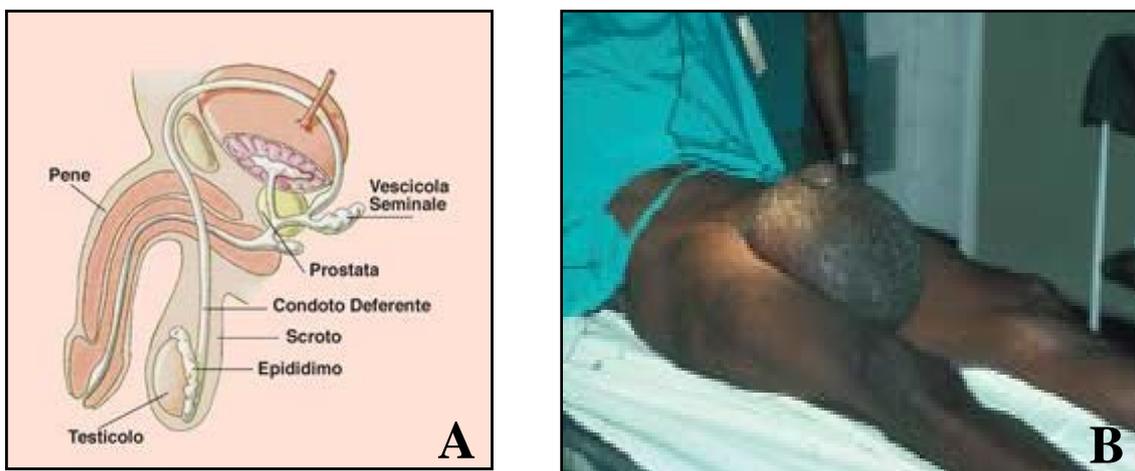


Figura 4: a: Sistema urogenital masculino; b: Elefantíase escrotal

Inflamação aguda no local do verme morto é seguida pela formação de granuloma e obstrução temporária de vasos linfáticos que drenam a túnica vaginal, testículos e epidídimo.

Dentro dos aspectos clínicos da filariose, a linfagiectasia subclínica condiciona a dilatação linfática sendo considerada uma característica universal (DREYER & NORÕES, 2000). A ausência de infiltrado inflamatório em biópsias de vasos linfáticos apresentando vermes adultos corrobora a independência da resposta imunológica desta forma evitando a obstrução linfática (FIGUEREDO et al., 1994), ou seja, com a morte espontânea do verme adulto por mecanismos naturais orgânicos ou ainda em decorrência da ação de drogas microfilaricidas que cessam a fase não-inflamatória da dilatação linfática (JUNGMANN et al., 1992).

As microfíliarias podem causar manifestações extralinfáticas que podem ser idênticas a outras patologias de origem não filarial, tornando difícil um diagnóstico seguro quanto à etiologia filarial. A artrite associada à bancroftose é caracterizada pela reação tissular ao verme localizado nas regiões circunvizinhas das articulações. O critério de diferenciação de artrite relacionado a outras etiologias é a observação dos critérios clínicos, laboratoriais e pela rápida resposta ao tratamento com drogas antifilarias (DREYER et al., 2000).

A seqüência de eventos após a infecção filarial inclui estágios como período pré-patente, microfíliarêmia assintomática e filariose clínica aguda ou crônica. Portadores de vermes adultos podem apresentar um quadro assintomático ou não apresentar manifestações clínicas, sendo constatado apenas através de testes imunológicos (DREYER & NORÕES, 2000). Um dos fatores mais importantes que levam um indivíduo do estado clínico assintomático para o estado sintomático são as reações imunológicas que podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da doença linfática crônica. Esta é imuno-mediada por células T no tecido afetado (DAVID et al., 1997).

Estudos têm esclarecido os níveis de anticorpos circulantes em indivíduos amicrofilarêmicos com linfedema crônico e indivíduos microfilarêmicos assintomáticos. Constatou-se que pacientes com linfedema apresentaram níveis específicos de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgE, predominantes em pacientes assintomáticos, já indivíduos com infecção ativa, foi observado um alto nível de IgG4 enquanto que em pacientes amicrofilarêmicos a titulação deste anticorpo foi baixa (NIELSEN et al., 2002).

Indivíduos amicrofilarêmicos ou portadores de vermes adultos vivos apresentam as mesmas manifestações clínicas que indivíduos microfilarêmicos, contudo

desenvolvem respostas imunológicas diferentes. Os primeiros apresentam resposta antiparasitária do tipo Th1, diferentemente do segundo com resposta do tipo Th2 (MAIZELS et al., 1991).

1.2 Glicoconjugados

As membranas biológicas são constituídas de proteínas e lipídeos e uma pequena quantidade de carboidratos estão presentes constituindo as glicoproteínas e glicolipídeos. As diferenças quantitativas e qualitativas entre carboidratos conjugados a estes lipídeos e proteínas contribuem para diversidade das funções biológicas (NELSON & COX, 2000).

Os carboidratos dos glicoconjugados podem possuir uma grande quantidade de informações codificadas por unidades de monômeros, diferindo no número e tipo de resíduos de açúcares, sua seqüência, tipo de ligação, presença ou ausência de ramificação, contribuindo, desta forma, para uma micro-heterogeneidade estrutural desta maneira servindo como sinais de reconhecimento (SHARON & LIS, 2004).

Galactose, glicose, fucose, manose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, e ácido siálico, são exemplos de açúcares que podem ser encontrados em glicoconjugados (SHARON & LIS, 1998).

Mudanças quantitativas e/ou qualitativas significativas nos componentes glicoprotéicos de membranas e organelas celulares podem ocorrer durante o desenvolvimento e progressão de vários processos patológicos infecciosos (ASTOUL et al., 2000; NISHIMURA et al., 2000), evidenciando modificações nos glicoconjugados das membranas celulares que são importantes na evolução de muitas doenças (TAKANO et al., 2000; YU et al., 2001).

Os sinais exibidos pelos carboidratos evidenciando estruturas codificantes são reconhecidos por lectinas divalentes ou polivalentes na superfície de contato das células através da interação ligante receptor (SPICER & SCHULTE, 1992)

1.3 Lectinas

Com a observação em 1888, por Stillmark, da capacidade de extratos de mamona, *Ricinus communis*, de aglutinar eritrócitos iniciaram-se as pesquisas, em sorologia e imunologia, das propriedades hemaglutinantes desta classe de proteínas (SHARON & LIS, 2004). Décadas depois essas proteínas encontraram aplicações na histologia e patologia (TRIANTAFYLLOU et al., 2004; WENG et al., 2006).

As Lectinas (do grego “legere” escolher, selecionar), são moléculas definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que reconhecem de forma reversível carboidratos livres ou conjugados (SHARON & LIS, 2004). Esta interação ocorre através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas em uma porção limitada da molécula protéica chamada de Domínio de Reconhecimento a carboidrato ou CDR (Carbohydrate-Recognition Domain) composto por de um domínio globular com uma alta conservação de resíduos de aminoácidos (KENNEDY et al., 2005; NISHIMURA et al., 2000).

Distribuídas de maneira ubíqua na natureza, as lectinas são encontradas desde bactérias e vírus a plantas e animais (MOREIRA et al., 1991; RÜDIGER et al., 2000; XIONG et al., 2006; WANG & NG, 2006), sendo isoladas predominantemente de sementes da plantas (RÜDIGER et al., 2000). Dentre as quais citam-se as lectinas de *Canavalia ensiformes* (Concanavalina A, Con A) específica para glicose/manose, *Triticum vulgare* (WGA) específica para N-acetil-glicosamina ou oligossacarídeos de

N-acetil-glicosamina e *Archis hypogea* (PNA) específica para galactose, fucose e N-acetil-galactosamina (SHARON & LIS, 2004).

Apesar da sua abundância, a função das lectinas é ainda discutida. Sua grande diversidade estrutural, especificidade sacarídica e ocorrência sinalizam a sua importância nos sistemas biológicos em que estão presentes (RÜDIGER et al., 2000). Estudos apontam que as lectinas da membrana estão envolvidas tanto no transporte celular como também no reconhecimento célula-célula (DUVERGE et al., 2003). Em bactérias e protozoários foi sugerido que as lectinas têm uma função importante na adesão às células-alvo e que em humanos esteja relacionada com processos de migração celular e sinalização de estados patológicos (SHARON E LIS, 2004).

A forma específica com que as lectinas interagem com carboidratos e os efeitos biológicos conseqüentes desta interação, associados à disponibilidade deste material, devido à ampla ocorrência e relativa facilidade de purificação fazem destas proteínas valiosos instrumentos com aplicações práticas em biologia e medicina. (ASTOUL et al., 2000). As lectinas também contribuíram para o avanço da imunologia, quando Nowell (1960) detectou que a lectina (PHA - phytohemagglutinin) é mitogênica estimulando a proliferação de linfócitos (Nowell, 1960).

Lectinas têm sido utilizadas como mediadoras de drogas (BIESA et al., 2004; GABOR et al., 2006), outras como marcadores taxonômicos de microrganismos diferentes sendo amplamente utilizadas na microbiologia em geral (HART et al, 1980; SLINKIF & DOYLE, 1990).

A proteína sangüínea cálcio-dependente produzida pelo fígado, lectina ligadora de manose (MBL) tem importância na resposta imunológica inata por mediar a opsonização e a fagocitose de microrganismos como vírus e bactérias (KILPATRICK et

al, 2002; GARRED et al., 2003; JACK & TURNER, 2003). Conjugadas a agentes quimioterápicos, as lectinas são úteis no tratamento de tumores induzidos em animais (HASEENABEEVI et al., 1991), na avaliação de mudanças na forma, agregação e aglutinação plaquetárias (SAMAL et al., 1998).

Estudos têm empregado lectinas como potenciais anticarcinogênicos (DE MEIJA et al., 2003) ou como uma sonda alternativa em imagens celulares e biomarcadores (WENG et al., 2006). Ainda, cromatografia de afinidade com lectinas pode ser aplicada no diagnóstico de certas doenças (SATISH & SUROLIA, 2001).

A capacidade pelas lectinas de exploração de superfícies celulares, ligando-se a porção carboidrato de glicoconjugados, tem sido utilizada em histoquímica para detectar alterações na composição desses resíduos de carboidratos que acompanham processos de desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (SARKAR et al. 1991; REMANI et al., 1994; BELTRÃO et al., 1998, 2001, 2003; KOMATH et al., 2006).

Lectinas têm sido usadas para monitorar mudanças no ambiente celular sendo utilizadas como indicadoras do tipo celular assim como de estágios de desenvolvimento ou doenças (BROOKS et al., 1996).

Em 1981 Klein e colaboradores realizaram os primeiros estudos sobre cânceres empregando histoquímica com lectinas avaliando glicoconjugados em diferentes membranas celulares e fluidos fisiológicos (DÍAZ et al., 1999; NELSON & COX, 2000; SHARON & LIS, 2004).

Nos eventos de reconhecimento celular a ligação específica de uma estrutura expressa em uma superfície celular a um receptor particular em outra célula contam com a participação de resíduos de carboidratos (RUDD et al., 2001, SHARON, 1988; GABIUS et al., 2002). Desta forma, faz-se importante compreender as bases

moleculares para a afinidade e especificidade destas interações (HELENIUS & AEBI, 2001; YAMAMOTOA et al., 2005; AMBROSI et al., 2005).

À histoquímica com lectinas é creditada em oferecer discernimentos na exposição de epítomos selecionados em cadeias de carboidratos de glicoconjugados celulares. O uso progressivo destas ferramentas converge para fornecer indícios nas alterações tipo-celular ou diferenciações-dependentes na glicosilação (GABIUS et al, 2002). Entretanto, essa utilização como ferramenta auxiliar no estudo de tumores é recente e necessita de maiores investigações, principalmente devido a pouca disponibilidade de marcadores ou de sondas específicas para alguns tipos de neoplasias (KANNAN et al., 1993; NAKANISHI et al., 1993; BROOKS et al., 1996; WANG et al., 2000).

Em histoquímica, citoquímica e citometria de fluxo as lectinas são amplamente empregadas auxiliando no mapeamento de carboidratos em glicoconjugados celulares do tecido hematopoético (VISSER & VRIES, 1990), de mama (BELTRÃO et al., 1998, 2001); de cérvix uterino (REMANI et al., 1994); de cérebro humano (BELTRÃO et al., 2003); glândulas salivares humanas (RÊGO et al., 2005), entre outros tecidos.

A caracterização de nematódeos ou ovos, através da utilização de lectinas, vem sendo usada para o estudo da biologia dos parasitas e na diferenciação das espécies dos mesmos (BERRADA-RKHAMI *et al.*, 1990; LEDUCQ et al, 1990; PALMER & MCCOMBE, 1996). Lectinas tem demonstrado, do ponto de vista taxonômico, as diferentes espécies de determinadas famílias de parasitas como tripanossomatidae (DA CUNHA, 1989). Depósitos de melanina na superfície de microfilárias forma identificados através da marcação destes com PNA, WGA e Con A conjugadas ao FITC (NAYAR, 1995).

As mudanças bioquímicas, como as variações do perfil de carboidratos expressos, que ocorrem em um ambiente celular em processos neoplásicos, tornam as lectinas ferramentas diagnósticas interessantes para a diferenciação histoquímica de glicoconjugados de superfície e intracelulares de células transformadas (Mitchell SCHUMACHER, 1999; HERLING *et al.* 2000; THIES *et al.* 2001; BELTRÃO *et al.* 1998, 2001, 2003).

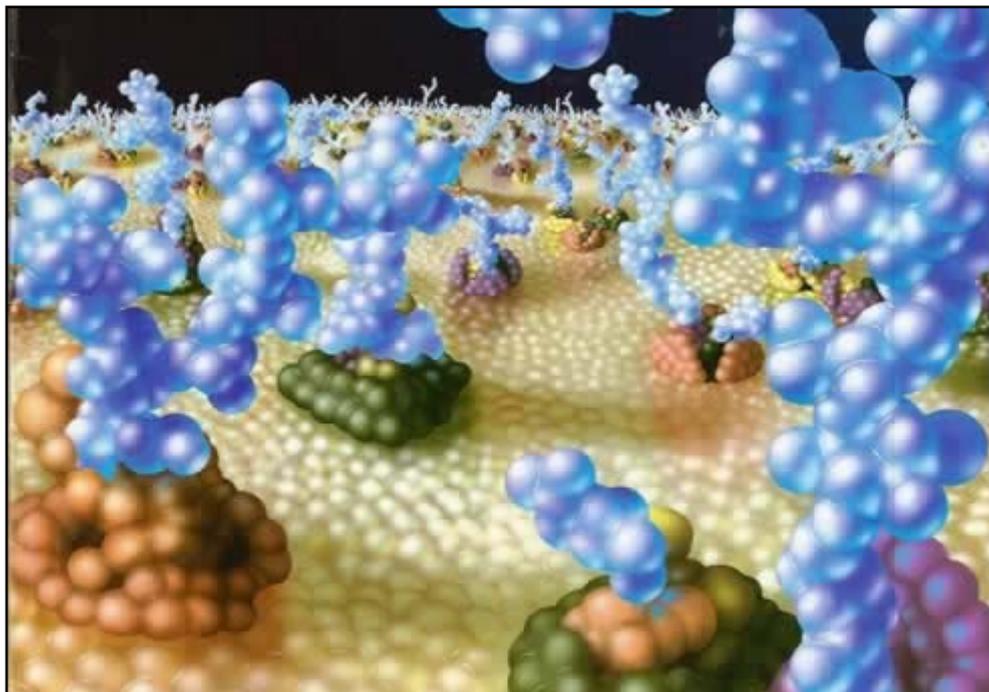


Figura 5 – Glicoconjugados de superfície celular. Fonte: Revista Science, 2001.

Quando os ligantes de lectinas envolvidos no reconhecimento celular são porções de açúcares ligados a proteínas e/ou lipídeos e quando quantidades limitadas de material são úteis, é frequentemente muito difícil elucidar as especificidades destas interações com detalhamento molecular (YAMAMOTO *et al.*, 2005; AMBROSI *et al.*, 2005). É na perspectiva a longo-prazo de projetar ligantes seletivos de alta afinidade, empregando tanto lectinas quanto outros marcadores específicos, que a citoquímica e a

histoquímica visam uma contribuição na relação estrutura-função ao nível celular, tecidual, orgânico e sistêmico de organismos (GABIUS, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a região metropolitana do Recife é uma área endêmica para a filariose bancroftiana, com taxas de microfilaremia variando de 2 a 15% em populações com baixo nível sócio-econômico. Apesar da grande importância epidemiológica da filariose bancroftiana, relativamente pouco se sabe quanto às bases patogênicas mesmo quando se compara com outras doenças parasitárias de relevância clínica. Mudanças histopatológicas foram relatadas em um número reduzido de casos e quase nenhum estudo tem relacionado o padrão de carboidratos celulares com a patogênese da filariose. Alguns trabalhos têm demonstrado a existência de antígenos glicosilados filariais, principalmente glicoproteínas, na superfície cuticular da microfilaria de *W. bancrofti* utilizando-se lectinas conjugadas a fluoróforos.

O crescente interesse na utilização da histoquímica com lectinas como ferramenta biotecnológica para avaliação de alterações patobioquímicas que ocorrem com as células durante o surgimento e desenvolvimento dos mais variados processos patológicos, bem como na interação parasita-hospedeiro nas doenças infecciosas, apresenta-se como apelo para o desenvolvimento do presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a eficiência da histoquímica com lectinas no mapeamento do perfil de carboidratos no granuloma filarial e vasos sanguíneos e linfáticos em epidídimo de pacientes infectados com *Wuchereria bancrofti*.

3.2 Específicos

- Realizar a histoquímica com lectinas utilizando Con A, WGA, LTA, UEA I e PNA, conjugadas a peroxidase, em epidídimo e funículo espermático humanos de pacientes diagnósticas com filariose bancroftiana;

- Avaliar o perfil de carboidrato correlacionado com a análise da marcação observada obtida a partir da histoquímica com lectinas.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL F, DREYER G, FIGUEREDO-SILVA J, NOROES J, CAVALCANTI A, SAMICO SC, SANTOS A, COUTINHO A. Live adult worms detected by ultrasonography in human Bancroftian filariasis. *Am J Trop Med Hyg.* Jun;50(6):753-7, 1994

AMBROSI M, CAMERON NR, DAVIS BG Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org Biomol Chem* 3(9):1593-608, 2005.

ARAUJO, A., SOUTO-PADRON, T. AND DE SOUZA, W. Cytochemical localization of carbohydrate residues in microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *J Histochem Cytochem*, 41(4), 571-578, 1993.

ARAUJO, A., SOUTO-PADRON, T. AND DE SOUZA, W. Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Cuticle of Adult *Wuchereria bancrofti* (Nematoda: Filarioidea). *Intern J Parasitology*, 25(5): 569-577, 1995.

ASTOUL, C.H., et al. Accessibility of the high-mannose glycans of glycoprotein gp120 from human immunodeficiency virus type 1 probed by in vitro interaction with mannose-binding lectins. *Biochem Biophys Res Commun*, 274(2): 455-460, 2000.

BELTRÃO, E.I.C., CORREIA, M.T.S., Figueredo-Silva, J., Coelho, L.C.B. Binding Evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* Lectin to Human Mammary Tissue. *Appl Biochem Biotech*, 74(3):125-134, 1998.

BELTRÃO, E.I.C., FIGUEREDO-SILVA, J., CARVALHO-JR, L. B. Infiltrating ductal mammary carcinoma: Lectin histochemistry study. *Anais Fac Méd Univ Fed Pernambuco*, 46(1): 32-35, 2001.

BELTRÃO, E.I.C., FIGUEREDO-SILVA, J., COELHO, L.C.B.B., Carvalho Jr, L.B. Infiltrating ductal mammary carcinoma: lectin histochemistry study. *An Fac. Med. Univ. Pernamb.*, Recife, Brazil, v.46, p. 32-5, 2001.

BELTRAO, E.I.C., MEDEIROS, PL, RODRIGUES, O,G,, FIGUEREDO-SILVA, J., VALENCA, M.M., COELHO, L.C., CARVALHO-JR, L.B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. Eur J Histochem, 47(2):139-142, 2003.

BERNHARD, L., BERNHARD, P., MAGNUSSEN, P. Management of Patients with Lymphoedema Caused by Filariasis in North-eastern Tanzania: Alternative approaches. Physiotherapy, 89(12):234-239,2001.

BERRADA-RKHAMI, O., LEDUCQ, R., GABRION, J., GABRION, C. Selective distribution of sugars on the tegumental surface of adult *Bothriocephalus gregarius* (Cestoda: pseudophyllidea). Int J Parasitol, 20:285–297, 1990.

BIESA, C., LEHRA, CM., WOODLEYB, JF Lectin-mediated drug targeting: history and applications. Advanced Drug Delivery Reviews 56 425– 435, 2004.

BROOKS SA, LEATHEM AJC, AND SCHUMACHER U. Lectin histochemistry. A concise practical handbook. Bios, Oxford,1996.

CAVALCANTI, C. L. B. Proteína eosinofílica básica principal, peroxidase eosinofílica e proteína eosinofílica catiônica, no granuloma da filariose bancroftiana. Dissertação (Mestrado) Bioquímica. CCB - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 1999.

DA CUNHA E SILVA, N.L., HASSON-VOLOCH, A., DE SOUZA, W. Isolation and characterization of a highly purified flagellar membrane fraction from trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol, 37(1):129-36, 1989.

DREYER, G. AND NORÕES, J. Dietilcarbamazina no tratamento da filariose bancroftiana. Rev Soc Bras Med Trop, 30(3):229-240, 1997.

DAVID, A.P., SILVA, M.C., FREEDMAN, D.O. T-lymphocyte from individuals with filarial inflammatory disease have increase transendothelial migration *in vivo*. Clin Immunol Immunophatol, 82(3): 216-221, 1997.

DE MEIJA EG, BRADFORD T, HASTER C. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. Nutri Rev. 61 (7): 239-46, 2003.

DÍAZ, P. H., GONZÁLEZ, O. M., VÉLEZ, Y R P. ,BÁEZ C. F. A. G. Aplicaciones de las Lectinas Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 15(2):91-5, 1999.

DREYER G. *et al.*, Proposed panel of diagnostic criteria, including the use of ultrasound, to refine the concept of 'endemic normals' in lymphatic filariasis. *Trop. Med. Int. Health.*,pp. 575–579, 1999.

DREYER, G., ADDISS, D., NORÕES, J. Does longevity of adult *Wuchereria bancrofti* increase with decreasing intensity of parasite transmission? Insights from clinical observations. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, 99:883-892, 2005.

DREYER, G., NORÕES, J., FIGUEREDO-SILVA, J., PIESENS, W.F. Pathogenesis of Lymphatic Disease in *Bancroftian Filariasis*: A Clinical Perspective. *Parasitol Today*, 16(12):344-349, 2000.

DUVERGER, E., FRISON, N., ROCHE, A. C., Monsigny, M. Carbohydrate-lectin interactions assessed by surface plasmon resonance. *Biochimie* 85: 167–179, 2003.

FIGUEREDO-SILVA, J., DREYER, G., GUIMARAES, K., BRANDT, C., MEDEIROS, Z. Bancroftian lymphadenopathy: absence of eosinophils in tissues despite peripheral blood hypereosinophilia. *J Trop Med Hyg*, 97(1):55-9, 1994.

FIGUEREDO-SILVA, J., JUNGSMANN, P., NORÕES, P., PIESENS, W.F., COUTINHO, A., ROCHA, A., DREYER, G. Histological evidence for adulticidal effect of low doses of diethylcarbamazine in bancroftian filariasis. *Trans Royal Soc Trop Med*, 90(2):192-4, 1996.

GABIUS, H.J. GLYCOHISTOCHEMISTRY: The Why and How of Detection and Localization of Endogenous Lectins . *Anat. Histol. Embryol.* 30, 3±31, 2001.

GABIUS, H.-J., ANDRE, S., KALTNER, H., SEBERT, H.-C. The sugar code: functional lectinomics. *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 165–177, 2002.

GABOR, F., BOGNER, E., WEISSENBOECK, A., WIRTH, M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 56 (4):459-80, 2002.

GAO, X., TAO, W., LU, W., ZHANG, Q., ZHANG, Y., JIANG, X., FU, S. Lectin-conjugated PEG-PLA nanoparticles: preparation and brain delivery after intranasal administration. *Biomaterials* 27(18):3482-90. 2006.

GARRED, P.; LARSEN, F.; MADSEN, H.O.; KOCH, C. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Mol. Immunol.* 40: 73–84, 2003.

GYAPONG JO, WEBBER RH, MORRIS J, BENNETT S. Prevalence of hydrocele as a rapid diagnostic index for lymphatic filariasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Jan-feb;92(1):40-3, 1998.

HART, D. A. Lectins in biological systems: applications to microbiology. *Am J Clin Nutr* 33(11 Suppl):2416-25, 1980.

HASEENABEEVI, VM; REMANI, P; ANIL, S; VIAJAYAKUMAR ,T. Plant lectins-histochemical and cytochemical applications in oncology. *Indian J Dent Res.* 2(3-4):45-53, 1991.

HELENIUS, A. AEBI, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364–2369, 2001.

HERLING M, KNOLLE J, BAHN H, GABIUS HJ, HINZE R. Glycohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis. *In vivo.* 14(4): 499-506., 2000.

JACK DL, TURNER MW. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. *Biochem Soc Trans* 31 (Pt 4): 753-7, 2003.

JUNGMANN, P., FIGUEREDO-SILVA, J., DREYER, G. Bancroftian lymphadenopathy: a histopathologic study of fifty-eight cases from northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg,* 45(3):325-31, 1991.

JUNGMANN, P., FIGUEREDO-SILVA, J., DREYER, G. Bancroftian lymphangitis in Northeastern Brazil: a histopathological study of 17 cases. *J Trop Med Hyg,* 95(2):114-118, 1992.

KANNAN S., BALARAM P., CHANDRAN GJ., PILLAI MR., MATHEW B., NAIR MK. Expression of lectin-specific cellular glycoconjugates during oral carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119(11): 689-694, 1993.

KENNEDY, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREIA, M. T. S., CAVALCANTI, M. S. M., E COELHO, L. C. B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, 26: 219-30. 1995.

KHALFAN, A.M., MOLYNEUX, D.H., ALBONICO, M., RIO, F. Progress towards eliminating lymphatic filariasis in Zanzibar: a model programme. *Trends Parasitol*, 22(7):124-130, 2006.

KILPATRICK DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim. Biophys. Acta.* 1572 (2-3):401-13, 2002.

KOMATH SS, KAVITHA M, SWAMY MJ. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Org Biomol Chem* 4(6):973-88, 2006.

LEDUCQ, R., BERRADA-RKHAMI, O., GABRION, J., GABRION, C. Lectin analysis of glycoconjugate distribution during differentiation and stabilization of *Bothriocephalus gregarius* metacestode in a paratenic host. *Int J Parasitol*, 20:645-654, 1990.

MAIZELS, R.M., KURNIAWAN, A., SELKIRK, M.E., YAZDANBAKHSH, M. Immune responses to filarial parasites. *Immunol Lett*, 30(2):249-254, 1991.

MOREIRA , R.A.; AINOZ, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADAS, B.S., Plants lectins chemical and biological aspects *Men. Inst. Oswaldo Cruz*, v.86, p.211-218, 1991.

NAKANISHI K., KAWAI T., SUZUKI M. Lectin binding and expression of blood group-related antigens in carcinoma-in-situ and invasive carcinoma of urinary bladder. *Histopathol.* 23(2):153-158, 1993.

NAYAR, J.K., MIKARTS, L.L., CHIKILIAN, M.L., KNIGHT, J.W., BRADLEY, T.J. Lectin binding to extracellularly melanized microfilariae of *Brugia malayi* from the hemocoel of *Anopheles quadrimaculatus*. *J Invertebr Pathol*, 66(3):277-286, 1995.

NELSON D I & COX M M. Lehninger. Principles of the Biochemistry. Worth publishers. 3ª Edição, New York (USA), 1145p, 2002.

NIELSEN, N.O., BLOCH, P., SIMONSEN, P.E. Lymphatic filariasis-specific immune responses in relation to lymphoedema grade and infection status. II. Humoral responses. Trans Royal Soc Trop Med Hyg, 96:453-458, 2002.

NISHIMURA, A., SAWADA, S., USHIYAMA, I., YAMAMOTO, Y., NAKAGAWA, T., TANEGASHIMA, A., NISHI, K. Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. Forensic Sci Int, 113(1-3):265-269, 2000.

NOWELL, P.C. (1960) Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. Cancer Res., 20, 462–466.

NOROES, J., ADDISS, D., CEDENHO, A., FIGUEREDO-SILVA, J., LIMA, G., DREYER, G. Pathogenesis of filarial hydrocele: risk associated with intrascrotal nodules caused by death of adult *Wuchereria bancrofti*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 97(5):561-566, 2003.

NORÕES, J., ADDISS, D., CEDENHO, A., FIGUEREDO-SILVA, J., LIMA, G., DREYER, G. Filarial hydrocoele: risk associated with intrascrotal nodules caused by death of adult *Wuchereria bancrofti*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 97, 561—566, 2003.

PALMER, D.G., McCOMBE, I.L. Lectin staining of trichostrongylid nematode eggs of sheep: rapid identification of *Haemonchus contortus* eggs with peanut agglutinin. Int J Parasitol, 26:447-450, 1996.

POGGENSEE G, KIWELU I, WEGER V, *et al.* Female genital schistosomiasis of the 2001.

REDA, M.R., RAMZ *et al.* Effect of yearly mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on bancroftian filariasis in Egypt: a comprehensive assessment. The Lancet, 367(March 25):567-571, 2006.

RÊGO, M. J.B. M., SANTOS, L.X., CARVALHO-JUNIOR, L.B., BELTRAO, E.I.C., SOBRAL, A.P.V. Lectin Histochemistry of Mucoepidermoid Carcinoma. Oral Oncology, 1(1):178-179, 2005.

REMANI, P., PILLAI, K.R., HASEENABEEVI, V.M., ANKATHIL, R., BHATTATHIRI, V.N., NAIR, M.K., VIJAYAKUMAR, T. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. *Neoplasma*, 41(1):39-42, 1994.

RICHENS, J. Genital manifestations of tropical diseases. *Tropical Medicine Series. Sex Trans Infect*, 80:12-17, 2004.

RUDD, P.M., ELLIOTT, T., CRESSWELL, P., WILSON, I.A., DWEK, R.A Glycosylation and the immune system. *Science* 291: 2370–2376, 2001.

RÜDIGER, H. Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.* 161 (1-4): 130-52, 1998.

RÜDIGER, H., SIEBERT, H-C., SOLÍS, D., BARBERO, J. J., ROMERO, A., LIETH, C. W., MAURIÑO, T. D., GABIUS H-J. Medicinal Chemistry Based on the Sugar Code: Fundamentals of Lectinology and Experimental Strategies with Lectins as Targets. *Current Medicinal Chemistry* 7: 389-416, 2000.

SAMAL, AB; TIMOSHENKO, AV; LOIKO, EN; KALTER, J; GABIUS, HJ *Biochemistry*, 63, 516, 1998.

SANTOS, J.N., LANFREDI, M., PIMENTA, P.F.P. The invasion of the midgut of the mosquito *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823 by the helminth *Litomosoides chagas* *Wlhoi* Moraes Neto, Lanfredi and De Souza, 1997. *J Inverteb Pathol*, (available on line) 2006.

SARKAR, M., MAJUMDER, G. C. E., CHATERJEE, T. Goat sperm membrane lectin binding sites of sperm surface and lectin affinity-cromatography of the mature sperm membrane antigens. *Biochemistry and Biophysical Acta*, 1070 (1): 196-204, 1991.

SATISH, P. R., SUROLIA, A. Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. *J Biochem Biophys Methods*. 49 (1-3): 625-40, 2001.

SHARON N. & LIS, H. A century of lectin research. *Trends in Biochemical Sciences*. Oxford, v. 12, p. 448-91., 1998.

SHARON, N. Lectins: from obscurity into the limelight. *Protein Sci.* 7: 2042–2048, 1998.

SHARON, N., LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiol.* 14(11):53R-62R, 2004.

SLIFKIN, M; DOYLE, R. J. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 3(3): 197-218, 1990.

SPICER SS, SCHULTE BA. Diversity of cell glycoconjugates show histochemically: A perspective. *J. Histochem. Cytochem.* 40(1): 1-38, 1992.

TAKANO, Y., TERANISHI, Y., TERASHIMA, S., MOTOKI, R., KAWAGUCHI, T. Lymph node metastasis-related carbohydrate epitopes of gastric cancer with submucosal invasion. *Surgery Today*, 30(12): 1073-1082, 2000.

THIES A, MOLL I, BERGER J, SCHUMACHER U. Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. *Brit. J. Cancer.* 84(6): 819-823, 2001.

TRIANAFYLLOU, A.; FLETCHER, D.; SCOTT, J. Glycosylations in demilunar and central acinar cells of the submandibular salivary gland of ferret investigated by lectin histochemistry. *Arch Oral Biol.*49(9):697-703, 2004.

VISSER JW, DE VRIES P. Identification and purification of murine hematopoietic stem cells by flow cytometry. *Method Cell Biol.* 33:451-468, 1990.

WANG, H.X.; NG, T.B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. *Biochem Biophys Commun.* 342 (1): 349-53, 2006.

WENG, J., SONG, X., LI, L., QIAN, H., CHEN, K., XU, X., CAO, C., REN, J. Highly luminescent CdTe quantum dots prepared in aqueous phase as an alternative fluorescent probe for cell imaging. *Talanta* ,p.1-6, 2006.

WHO. Monitoring and epidemiological assessment of the programme to eliminate lymphatic filariasis at implementation unit level. Geneva. World Health Organization, (Technical Report No HO/CDS/CPE/CEE/2005.50), 2005.

WHO. Report on the mid-term assessment of microfilaraemia reduction in sentinel sites of 13 countries of the Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis. *Wkly Epidemiol*, 79:358-365, 2004.

XIONG, C., LI, W., LIU, H., ZHANG, W., DOU, J., BAI, X., DU, Y., MA, X. Anormal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. (1):9-16, 2006.

YAMAMOTOA, K., ITOC, S., YASUKAWAC, F., KONAMIA, Y., MATSUMOTOA, N. Measurement of the carbohydrate-binding specificity of lectins by a multiplexed bead-based flow cytometric assay. *Analytical Biochemistry* 336: 28–38, 2005.

YU, L.G., MILTON, J.D., FERNIG, D.G., RHODES, J.M. Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen-Frederich antigen-binding lectins. *J Cell Physiol*, 186(2):282-87, 2001.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

IDENTIFICAÇÃO HISTOQUÍMICA DE CARBOIDRATOS EM EPIDÍDIMO E FUNÍCULO ESPERMÁTICO HUMANOS DE PACIENTES COM FILARIOSE

Cardoso-Silva C.D.¹, Cavalcanti, C.L.B.¹, Melo-Júnior, R.^{1,2}, Carvalho-JR^{1,3}, L.B Beltrão, E.I.C^{1,3}, *

¹*Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami (LIKA) – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.*

²*Associação caruaruense de Ensino Superior Universidad, Caruaru, PE, Brasil.*

³*Deptº.de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.*

*Autor de Correspondência: Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão. Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami – LIKA (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, Campus Universitário, s/n –50670-420, Recife, PE, Brasil. Tel: +5581210184862504; fax: +55 81 21268484. E-mail: ebeltrao@hotmail.com.

RESUMO

Para avaliar a eficiência da histoquímica com lectinas no mapeamento do perfil de carboidratos do granuloma filarial e vasos sanguíneos em epidídimo de pacientes infectados com *Wuchereria bancrofti* foram utilizadas lectinas conjugadas a peroxidase (Con A, WGA, LTA, PNA, UEA I). Os resultados demonstraram reconhecimentos diferenciados das lectinas utilizadas de estruturas como o verme, o granuloma e os vasos linfáticos e sanguíneos nos tecidos estudados. UEA I marcou de forma intensa as estruturas estudadas no epidídimo. No funículo espermático, a UEA reconheceu apenas carboidratos no verme. A WGA apresentou, no epidídimo, uma marcação moderada dos vermes e granulomas, marcando fracamente os vasos sanguíneos ao passo que no funículo espermático o verme foi moderadamente marcado enquanto que o granuloma e os vasos foram fracamente marcados. Epidídimos marcados com LTA apresentaram marcação de moderada-intensa do verme e o granuloma, não reconhecendo o epitélio dos vasos sanguíneos e linfáticos. A mesma lectina marcou fracamente o verme no funículo espermático. Con A marcou fraca apenas o verme, tanto no epidídimo quanto no funículo espermático. Apenas o granuloma no epidídimo foi marcado fracamente pela PNA sendo negativa no funículo espermático. Os resultados da histoquímica com lectinas evidenciam o perfil de carboidratos do verme e estruturas histológicas do epidídimo e funículo espermático humanos de maneira diferenciada apresentando podendo auxiliar em diagnósticos complementares com filariose por *W. bancrofti*.

Palavras-chave: histoquímica, *Whuchereria bancrofti*, lectina, epidímo, funículo espermático.

ABSTRACT

Lectin histochemistry was used to screen the carbohydrate profile of worm-granuloma system in epididimus and spermatic cords of patients infected with *Wuchereria bancrofti*. Concanavalina A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA), *Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA), peanut agglutinin (PNA) and *Ulex europaeus* I agglutinin, conjugated to peroxidase were used. Lectins used recognized differentially worms, granuloma and lymphatic and blood vessels. UEA I intensely stained the worm-granuloma system as well as the epithelial cells of both vessels in epididimus. In spermatic cord only worms were recognized by UEA I. WGA stained moderately worms and granulomas in epididimus while vessels were weakly stained. All structures studied were weakly stained in spermatic cord but the worm which was moderately stained by WGA. Epididimus evaluated with LTA presented a moderate-intense staining for worm-granuloma system and no-staining to epithelial cells of vessels. The same lectin stained weakly worms in spermatic cord. Con A recognized only worms in both tissues studied. Granulomas were stained by PNA in epididimus. Lectin histochemistry results evidenced the saccharide profile of worms and histologic structures in human epididimus and spermatic cord showing to be good differentially probes to bancroftian filariasis.

Keywords: histochemistry, *Wuchereria bancrofti*, lectins, epididimus, spermatic cord

5.1 Introdução

A filariose linfática é causada por três espécies de nematódeos: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Brugia timori* (Deryer et al. 2005).

A *W. bancrofti* tem a maior distribuição mundial, estimando-se cerca de 120 milhões de pessoas distribuídas em 75 países de diferentes continentes (Deryer et al. 2005; Redá & Ramzl 2006). No Brasil especificamente, Recife, é consideradamente endêmica para filariose concentrada nas comunidades de baixo nível sócio-econômico (Dreyer et al. 2000; Cavalcanti 1999).

Mudanças quantitativas e/ou qualitativas significativas nos componentes glicoprotéicos de membranas e organelas celulares podem ocorrer durante o desenvolvimento e progressão de vários processos patológicos infecciosos (Astoul 2000; Nishimura et al. 2000), evidenciando modificações nos glicoconjugados das membranas celulares que são importantes na evolução de muitas doenças (Takano et al. 2000, Yu et al. 2001). A forma específica com que as lectinas interagem com carboidratos e os efeitos biológicos conseqüentes desta interação, associados à disponibilidade deste material, devido à ampla ocorrência e relativa facilidade de purificação fazem destas proteínas valiosos instrumentos com aplicações práticas em biologia e medicina (Astoul 2000).

A caracterização de nematódeos ou ovos, através da utilização de lectinas, vem sendo usada para o estudo da biologia dos parasitas e na diferenciação das espécies dos mesmos (Berrada et al. 1990; Leducq et al. 1990; Palmer & Mccombe 1996). Lectinas tem demonstrado, do ponto de vista taxonômico, as diferentes espécies de determinadas famílias de parasitas como Tripanossomatidae (Da Cunha et al. 1989). Depósitos de

melanina na superfície de microfilárias forma identificados através da marcação destes com PNA, WGA e Con A conjugadas ao FITC (Nayar et al. 1995).

A capacidade pelas lectinas de exploração de superfícies celulares, ligando-se a porção carboidrato de glicoconjugados, tem sido utilizada em histoquímica para detectar alterações na composição desses resíduos de carboidratos (Sarkar et al. 1991; Remani et al. 1994; Beltrão et al. 1998; Beltrão et al. 2001; Beltrão et al. 2003; Kamath et al. 2006).

O fato da região metropolitana do Recife ser foco de endemia para filariose e o crescente interesse na utilização da histoquímica com lectinas como ferramenta biotecnológica para avaliação de alterações patobioquímicas que ocorrem com as células durante o surgimento e desenvolvimento dos mais variados processos patológicos, bem como na interação parasita-hospedeiro nas doenças infecciosas, estes se apresentam como apelo para o desenvolvimento do presente trabalho.

5.2 Materiais e Métodos

Seleção dos casos

Foram estudadas biópsias de epidídimo (n=05) e funículo espermático (n=12) de pacientes infectados com o parasita *Wuchereria bancrofti*, atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE (Núcleo de Estudos em Filariose Bancroftiana) foram cedidas pela Profa. Dra. Patrícia Jungmann ao Setor de Patologia do LIKA. As amostras dos pacientes seguiram os padrões do Sistema Nacional de Ética em Pesquisa – SISNEP.

Coloração com Hematoxilina-Eosina

As lâminas com cortes (4 µm) foram desparafinizadas em xilol (1x5 min e 4x10 imersões) e reidratadas em álcool etílico (3x100% e 1x70%) seguido de água corrente e água destilada (10 imersões cada). Os cortes foram então incubados com solução de hematoxilina de Carazzi a 2% por 8 min, etanol a 70% (10 imersões) e carbonato de lítio 5,05% (10 imersões), intercaladas por lavagem com água corrente (3 min) e água destilada (10 imersões). Na seqüência, as lâminas contendo os cortes foram incubadas com solução de eosina a 2% por 30 s, seguida de 4 banhos em álcool etílico (10 imersões cada) e 4 banhos de xilol (10 imersões cada) e montadas com Entellan.

Histoquímica com Lectinas

Cortes (4 µm) de biópsias de epidídimo, fixados em formalina e embebidos em parafina, foram desparafinizados em xilol e hidratados em álcool etílico (70-100%), foram tratados com solução de tripsina a 1% (p/v), por 2 min a 37°C e com solução de peróxido de hidrogênio-metanol a 0,3 % (v/v), por 20 min (quando lectinas conjugadas a peroxidase foram utilizadas). Em seguida, os cortes foram incubados com lectinas conjugadas a peroxidase (Con A-Per; WGA-Per; LTA-Per; PNA-Per, UEA I-Per) (Sigma, USA) a 4°C por 2 horas. Os cortes foram lavados (2 x 5 min) com tampão

fosfato 10mM, contendo NaCl 0,15 M (PBS), pH 7,2, após cada etapa realizada anteriormente. A peroxidase foi visualizada por incubação (5 a 8 min) em PBS contendo uma solução de diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio(H₂O₂). A contra-coloração dos tecidos foi realizada com hematoxilina sendo, então, avaliados através de microscopia de luz. Ensaios de inibição da ligação das lectinas aos tecidos foram efetuados utilizando-se os respectivos carboidratos em soluções de 300 mM, em PBS, metil- α -D-manosídeo (Con A), N-acetil-glicosamina (WGA), L-fucose (LTA e UEA I) e N-Acetil-galactosamina (PNA), (Sigma, USA).

5.3 Resultados

A coloração com hematoxilina-eosina evidenciou os segmentos de vermes adultos de *W. bancrofti* mortos e em diferentes estágios de degeneração além da presença de células inflamatórias (histiócitos, linfócitos e predominantemente eosinófilos) como resposta a reação inflamatória granulomatosa intensa. Os granulomas mostraram-se com idade variada, onde os mais antigos apresentaram maior deposição de colágeno com diminuição do conteúdo parasitário que era fagocitado.

A avaliação histológica empregando histoquímica com lectinas apresentou um padrão de marcação de fraco a intenso, dependente do tipo de lectina utilizada e independente do tecido observado (epidídimo ou funículo espermático). Foi padronizada a concentração de 25µg/mL para os procedimentos a qual apresentou uma máxima marcação com menor coloração de fundo (“background”) inespecífica.

Os resultados obtidos (Tabela 1 e 2) demonstraram reconhecimentos diferenciados pelas lectinas utilizadas quanto às estruturas estudadas (vermes em diferentes estágios de degeneração, granulomas e os vasos, linfáticos e sanguíneos, nos epidídimo e funículo espermático humanos).

A UEA I (específica para L-fucose) marcou de forma intensa as estruturas observadas no epidídimo (Figura 1A e 2B). No funículo espermático, a UEA reconheceu apenas carboidratos no verme marcando de maneira intensa (Figura 2F). A WGA (N-acetil-glicosamina específica) apresentou, no epidídimo, uma marcação moderada dos sistemas verme-granulomas, marcando fracamente os epitélios dos vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 1C). Esta lectina, no funículo espermático, marcou os vermes moderadamente enquanto que os granulomas (Figura 2A) e o epitélio dos vasos foram fracamente marcados (Figura 2B).

Epidídimos marcados com a lectina específica para L-fucose, LTA, apresentaram marcação variando de moderada a intensa dos vermes e granulomas (Figura 1E), não reconhecendo o epitélio dos vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 1F). A LTA marcou fracamente os vermes no funículo espermático não evidenciando nenhuma das outras estruturas estudadas. Con A, capaz de reconhecer glicose/manose, marcou fracamente apenas o verme, tanto no epidídimo (Figura 2D) quanto no funículo espermático (Figura 2C). Apenas o granuloma no epidídimo foi marcado fracamente pela PNA (N-acetil-galactosamina) sendo negativa no funículo espermático.

TABELA 1. Histoquímica com lectinas para biópsias de epidídimo humano

ESTRUTURA	LECTINA				
	UEA I	WGA	LTA	Con A	PNA
Verme	+++	++	++	+	-
Granuloma	+++	++	++	-	+
Epitélio vasos	+++	+	-	-	-

TABELA 2. Histoquímica com lectinas para biópsias de funículo espermático.

ESTRUTURA	LECTINA				
	UEA I	WGA	LTA	CON A	PNA
Verme	+++	++	+	+	-
Granuloma	-	+	-	-	-
Epitélio vasos	-	+	-	-	-

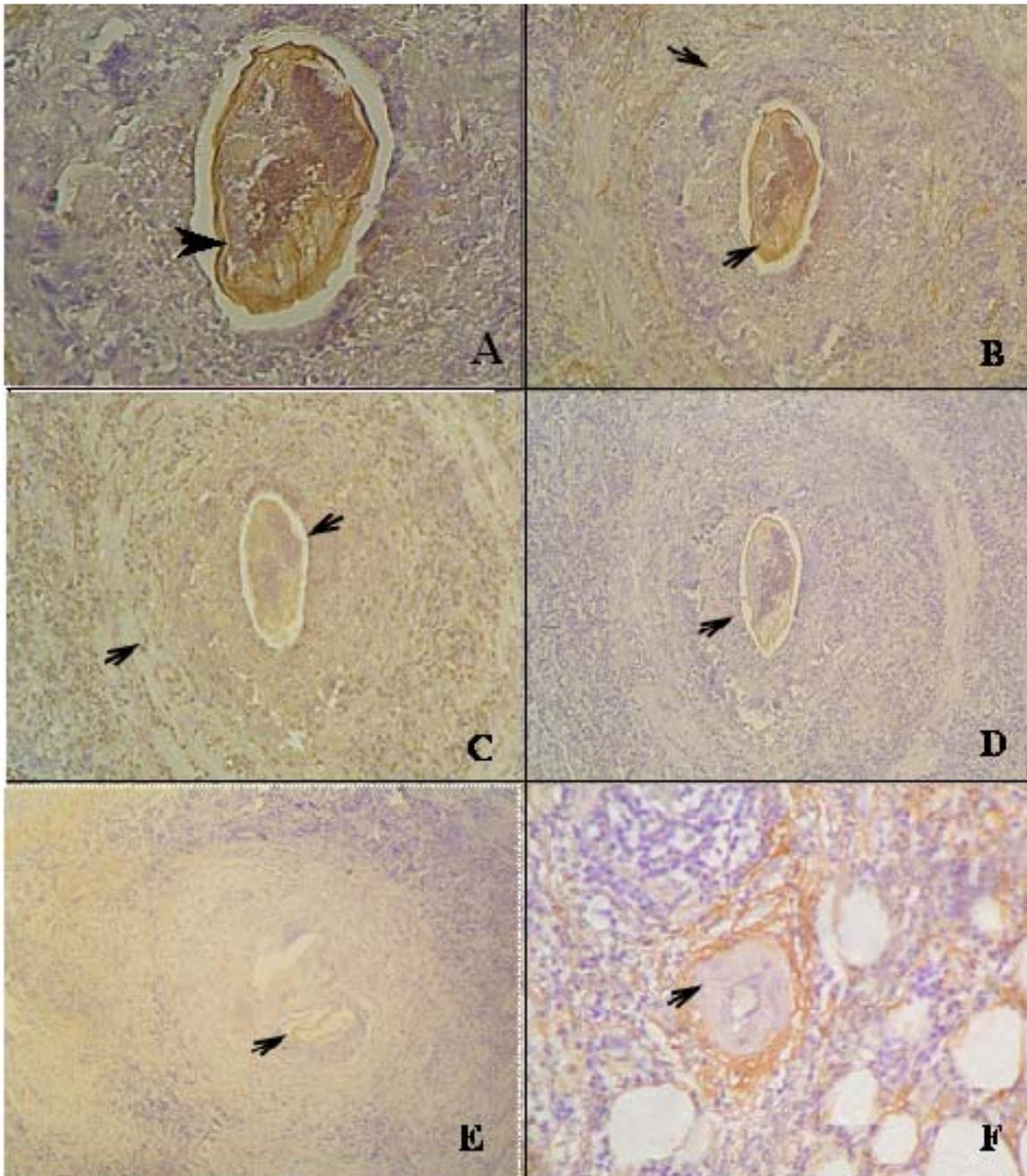


Figura 1: Epidídimo Humano. **A:** Verme de *W. bancrofti*, com marcação intensa pela UEA I (Amplificação x400); **B:** Sistema verme-granuloma de *W. bancrofti* intensamente marcado pela UEA I; **C:** Marcação moderada do verme e granuloma por WGA; **D:** Marcação fraca do verme por Con A; **E:** Marcação moderada dos vermes em estágio avançado de degeneração pela LTA; **F:** Ausência de marcação por LTA do epitélio de vaso linfático (Amplificação x200).

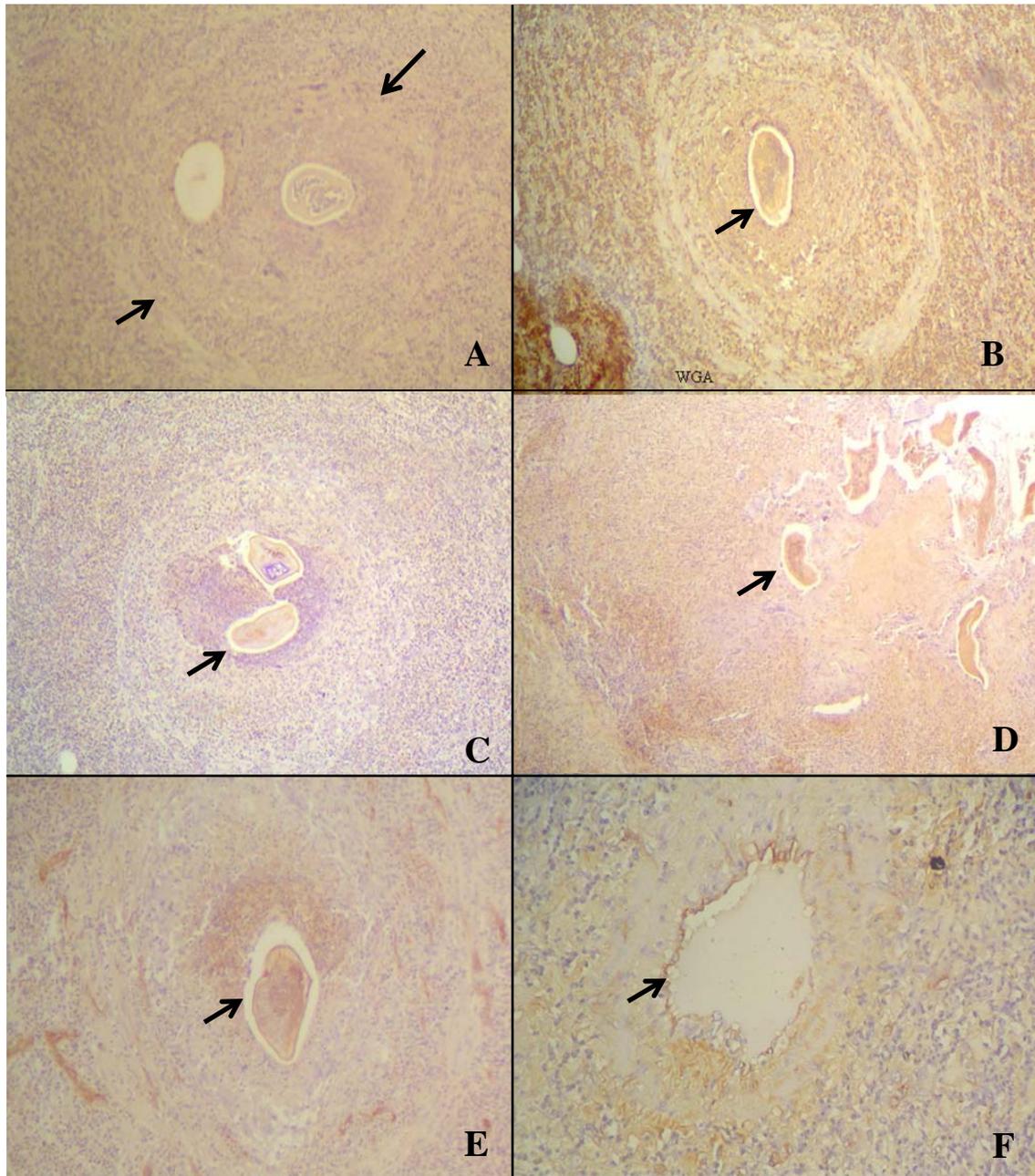


Figura 2: Funículo espermático. **A:** Marcação fraca do granuloma pela WGA (Amplificação x100); **B:** Marcação moderada da lectina WGA no verme; **C e D:** Marcação muito fraca pela e Con A e LTA no verme; **E:** Lectina UEA-I marcando fortemente o verme; **F:** marcação moderada pela UEA-I da porção luminal do vaso (Amplificação x200).

5.4 Discussão

Estudos realizados nas décadas de oitenta e noventa utilizaram lectinas conjugadas a ouro-coloidal para a investigação da ultra-estrutura da superfície de microfilárias (Araújo et al. 1993) e da cutícula de vermes adultos de *W. bancrofti* acrescentando aos conhecimentos já disponíveis informações quanto ao perfil de carboidratos destas estruturas (Araújo et al. 1995).

O emprego de histoquímica com lectinas para a investigação de resíduos de carboidratos na superfície de vermes de *W. bancrofti* ainda é muito escasso ou quase inexistente.

Nayar e colaboradores, em 1995, publicaram um estudo utilizando lectinas de *Helix pomatia* (HPA), de *Arachis hypogea* (peanut agglutinin – PNA) e Con A conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC) e a ouro coloidal para avaliação de depósitos de melanina na superfície de microfilárias de *Brugia malay*.(Nayar et al. 1995).

Relatos não foram encontrados quanto à utilização de histoquímica com lectinas para a investigação do perfil sacarídico de glicoconjugados da superfície de vermes e de granulomas de tecidos humanos infectados por *W. bancrofti* ou outras espécies causadoras de filariose.

Os resultados observados indicam características quanto ao sistema verme-granuloma bem como o epitélio de vasos sanguíneos e linfáticos quando avaliados utilizando-se histoquímica com lectina.

O verme apresentou resíduos de N-acetil-glicosamina, fucose e glicose e/ou manose na sua superfície como evidenciado a partir da marcação com WGA, LTA, UEA I e Con A, respectivamente, em ambos os tecidos, de epidídimo e de funículo

espermático. Araújo e colaboradores (1995) encontraram resíduos de N-acetilglicosamina e fucose na cutícula de *W. bancrofti*. Os resultados do presente trabalho corroboram estes achados e acrescentam a informação de que resíduos de glicose e/ou manose também estão presentes no verme. Este resultado, obtido com a Con A, coloca esta lectina como sonda sacarídica de reconhecimento específico para o verme. Comportamento semelhante foi observado para a PNA (específica para N-acetilgalactosamina), com relação ao granuloma, contudo apenas em amostras de epidídimo (Araújo et al. 1995).

Os resultados aqui apresentados e os de Araújo e colaboradores (1995) são complementares apesar de os vermes terem sido avaliados em situações diferentes e estarem sob a ação de ambientes celulares diferentes. No primeiro os vermes estudados fazem parte do sistema verme-granuloma (com idades e fases de degeneração diferentes) e estão mortos, diferentemente dos utilizados no estudo desenvolvido por Araújo e colaboradores (1995), onde eles estavam vivos e fora de interações com o tecido do órgão hospedeiro (Araújo et al. 1995).

A WGA foi específica para os granulomas no funículo espermático indicando a presença de N-acetilglicosamina nesta estrutura. Esta seletividade quanto ao granuloma, quando comparada outras lectinas, não se apresenta uma vantagem visto que a mesma também reconhece o verme e as células do epitélio dos vasos. Comportamento semelhante se observou para a PNA no funículo espermático, contudo a ausência de marcação de todas as estruturas estudadas é que é a característica marcante e que exclui esta lectina como sonda no estudo da filariose bancroftiana, nas condições experimentais utilizadas. No entanto, para o epidídimo a PNA foi uma sonda exclusiva para o granuloma, indicando a presença de N-acetilgalactosamina. Esta característica é

possível ser uma resposta à presença do verme que induz modificações nas células do sistema verme-granuloma.

Resíduos de N-acetil-glicosamina e fucose foram reconhecidos pela WGA e UEA I nos vasos linfáticos e sanguíneos. A não marcação com LTA, também específica para fucose, pode estar relacionada com o impedimento estérico para formação do complexo lectina-carboidrato de maneira adequada para estabilização desta ligação.

Observou-se ainda que na reação inflamatória granulomatosa, como resposta de presença do verme, os eosinófilos não foram reconhecidos por nenhuma das lectinas utilizadas.

Assim, a histoquímica com lectinas é uma ferramenta útil, visto que o padrão de carboidratos expresso pelos vermes pode ser de importância para o desenvolvimento de drogas ou direcionamento destas para um tratamento auxiliar desta parasitose

Os resultados obtidos indicam que a utilização da histoquímica com lectinas proporciona informações úteis quanto a composição sacarídica de componentes da matrix extracelular do verme adulto de *W. bancrofti* bem como do granuloma desenvolvido em resposta a presença deste parasita no epidídimo e funículo espermático humanos de pacientes com filariose bancroftiana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo A, Souto-Padron T and De Souza W 1993. Cytochemical localization of carbohydrate residues in microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *J Histochem Cytochem* 41(4), 571-578.

Araujo A, Souto-Padron T and De Souza W 1995. Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Cuticle of Adult *Wuchereria bancrofti* (Nematoda: Filarioidea). *Intern J Parasitology*, 25(5): 569-577.

Astoul CH, et al 2000. Accessibility of the high-mannose glycans of glycoprotein gp120 from human immunodeficiency virus type 1 probed by in vitro interaction with mannose-binding lectins. *Biochem Biophys Res Commun* 274(2): 455-460.

Beltrão EIC, Correia MTS, Figueredo-Silva J, Coelho LCB 1998. Binding Evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* Lectin to Human Mammary Tissue. *Appl Biochem Biotech*, 74(3): 125-134.

Beltrão EIC, Figuerêdo-Silva J, Coelho LCB, Carvalho-Jr LB 2001. Infiltrating ductal mammary carcinoma: lectin histochemistry study. *An Fac. Med. Univ. Pernamb.*, Recife, Brazil, v.46, p. 32-5.

Beltrao EIC, Medeiros PL, Rodrigues OG, Figueredo-Silva J, Valenca MM, Coelho LC, Carvalho-Jr LB 2003. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. *Eur J Histochem*, 47(2):139-142.

Berrada-Rkhami O, Leducq R, Gabrion J, Gabrion C 1990. Selective distribution of sugars on the tegumental surface of adult *Bothriocephalus gregarius* (Cestoda: pseudophyllidea). *Int J Parasitol*, 20: 285–297.

Cavalcanti CLB 1999. Proteína eosinofílica básica principal, peroxidase eosinofílica e proteína eosinofílica catiônica, no granuloma da filariose bancroftiana. Dissertação (Mestrado) Bioquímica. CCB - Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

Da Cunha E, Silva NL, Hasson-Voloch A, De Souza W 1989. Isolation and characterization of a highly purified flagellar membrane fraction from trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*, 37(1):129-36.

Dreyer G, Addiss D, Norões J 2005. Does longevity of adult *Wuchereria bancrofti* increase with decreasing intensity of parasite transmission? Insights from clinical observations. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, 99: 883-892.

Dreyer G, Norões J, Figueredo-Silva J, Piessens WF 2000. Pathogenesis of Lymphatic Disease in *Bancroftian Filariasis*: A Clinical Perspective. *Parasitol Today*, 16(12): 344-349.

Komath Ss, Kavitha M, Swamy Mj 2006. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. *Org Biomol Chem* 4(6): 973-88.

Leducq R, Berrada-Rkhami O, Gabrion J, Gabrion C 1990. Lectin analysis of glycoconjugate distribution during differentiation and stabilization of *Bothriocephalus gregarius* metacestode in a paratenic host. *Int J Parasitol*, 20:645-654.

Nayar JK, Mikarts LL, Chikilian ML, Knight JW, Bradley TJ 1995. Lectin binding to extracellularly melanized microfilariae of *Brugia malayi* from the hemocoel of *Anopheles quadrimaculatus*. *J Invertebr Pathol*, 66(3):277-286.

Nishimura A, Sawada Z, Ushiyama I, Yamamoto Y, Nakagawa T, Tanegashima A, Nishi K 2000. Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. *Forensic Sci Int*, 113(1-3): 265-269.

Palmer DG, Mccombe IL 1996. Lectin staining of trichostrongylid nematode eggs of sheep: rapid identification of *Haemonchus contortus* eggs with peanut agglutinin. *Int J Parasitol*, 26:447-450.

Reda MR, Ramzl 2006. Effect of yearly mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on bancroftian filariasis in Egypt: a comprehensive assessment. *The Lancet*, 367(March 25): 567-571.

Remani P, Pillai KR, Haseenabeevi VM, Ankathil R, Bhattathiri VN, Nair MK, Vijayakumar T 1994. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. *Neoplasma*, 41(1): 39-42.

Sarkar M, Majumde GCE, Chaterjee T 1991. Goat sperm membrane lectin binding sites of sperm surface and lectin affinity-cromatography of the mature sperm membrane antigens. *Biochemistry and Biophysical Acta*, 1070 (1): 196-204.

Takano Y, Teranishi Y, Terashima S, Motoki, R, Kawaguchi, T 2000. Lymph node metastasis-related carboydrate epitopes of gastric cance whit submucosal invasion. *Surgery Today*, 30(12): 1073-1082.

Yu LG, Milton JD, Fernig DG, Rhodes JM 2001. Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen-Fredereich antigen-binding lectins. *J Cell Physiol*, 186(2): 282-87.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- A histoquímica com lectinas evidenciou o perfil e carboidratos de gliconjugados da matriz extracelular de forma diferenciada nos sistemas verme-granulomas filariais e no epitélio dos vasos linfáticos e sanguíneos em biópsias de epidídimo e funículo espermático humanos;
- A UEA I reconheceu de forma indiferenciada resíduos de L-fucose nas estruturas observadas no epidídimo, de maneira que se mostra ineficaz para o estudo específico de uma estrutura em particular. Ao passo que no funículo a UEA I reconheceu fortemente apenas o verme;
- A Con A mostra-se uma sonda específica para a caracterização do verme tanto no epidídimo quanto de funículo espermático;
- A LTA marcou especificamente o verme encontrado nas amostras de funículo espermático, reconhecendo o sistema verme-granuloa nos tecidos de epidídimo;
- O granuloma foi reconhecido com exclusividade pela PNA apenas nas biópsias de epidídimo estudados;
- A porção luminal das células de epitélio dos vasos linfáticos e sanguíneos foi marcada pela WGA nos tecidos de funículo espermático. Porém esta mesma lectina não apresentou caracterização diferenciada para o sistema verme-granuloma em ambos tecidos avaliados;

7 ANEXO



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Objetivos e política editorial
- Formato e estilo
- Checklist para os manuscritos

Objetivos e política editorial

As **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** são uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão só quando solicitados. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são aparecem como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos preferencialmente em inglês. Quando neste idioma, devem ser checados por alguém que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às **Memórias** requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação.

Todo o material deve ser enviado para a Produção Editorial, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Av. Brasil 4365, Pavilhão Mourisco, sala 308, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Os manuscritos que não estiverem de acordo com estas instruções serão imediatamente devolvidos.

Ao encaminhar um manuscrito para a revista, os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as **Memórias**. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus trabalhos.

Favor providenciar e checar cada item abaixo antes de submeter seu manuscrito para as **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**:

- Carta de submissão do trabalho, assinada por todos os autores, especificando o autor de contato, bem como endereço, telefone, fax e e-mail.
- Quatro cópias completas do artigo, incluindo as ilustrações e um disquete contendo o texto, tabelas, gráficos e fotografias digitalizadas.
- O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos,

em espaço duplo, fonte 12, impresso em papel padrão e paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm.

• A seqüência do artigo deve ser: **título resumido** (com até 40 caracteres - letras e espaços), **título** (com até 250 caracteres), **autores** (sem títulos ou graduação), **afiliação institucional** (endereço completo somente do autor correspondente), **resumo**, **palavras-chave**, **notas de rodapé** indicando a fonte de financiamento ou mudanças de endereço, **introdução**, **material e métodos**, **resultados**, **discussão**, **agradecimentos** (os mínimos necessários), **referências**, **tabelas** (fora do texto e com título), e **figuras** (com legendas em folha separada).

• Só as referências citadas no texto devem aparecer nas lista e devem seguir o estilo do Index Medicus. Se a referência for de artigo ainda não publicado, mas já deverá ser apresentada carta da revista que publicará o manuscrito ou de outros autores autorizando a referida citação.

Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou entrar em contato com a Editoria Científica pelo telefone (+55-21-2598.4335), fax (+55-21-2561.1442 / 2280-5048), ou e-mail (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br)

Formato e estilo

O manuscrito deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem: título corrente, título, nomes dos autores, afiliações institucionais, resumo, palavras-chave, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, agradecimentos e referências. Patrocínios devem ser mencionados em nota de rodapé na primeira página.

Resumo: Com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves), o resumo deve apresentar os objetivos do estudo ou pesquisa, seus procedimentos básicos (seleção dos temas de estudo ou animais de laboratório; métodos analíticos ou de observação), as principais descobertas ou resultados (oferecendo dados específicos e seu significado estatístico, se possível), e as principais conclusões. Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: Devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do *Index Medicus*.

Introdução: Deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, e especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e métodos: Deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: Ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Não citar os nomes ou iniciais dos pacientes ou registros de hospitais, especialmente nos materiais ilustrativos. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais, ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: Devem oferecer uma descrição concisa das novas informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: Deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: Devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: Devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no *Index Medicus*. Consultar a List of Journals Indexed no *Index Medicus* publicada no número de janeiro do *Index Medicus* ou no website <http://www.nlm.nih.gov/serials/lii.html>.

- No texto, usar o sobrenome dos autores e a data: Lutz (1910) ou (Lutz 1910).

Com dois autores, a forma é: (Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912).

Quando há mais que dois autores, somente o primeiro é mencionado: Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

- No final do trabalho, usar os seguintes estilos:

Artigo de revista

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomiase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 14: 15-61.

Livro ou Tese

Morel CM 1983. *Genes and Antigens of Parasites*. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Capítulo de livro

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, *The Prevention of Malaria*, John Murray, London. p. 390-398.

Ilustrações: As ilustrações devem ser limitadas ao mínimo necessário para exemplificar estruturas ou condições particulares, para sintetizar dados ou para registrar resultados quantitativos. Detalhes de resultados apresentados nessa forma não devem ser repetidos no texto. Figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

- **Figuras** devem ser apresentadas em uma folha de mesmo tamanho que as do manuscrito. As fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante. As fotografias e os desenhos devem ser marcados no verso com o nome do autor, o número da figura e uma seta indicando a parte de cima da ilustração. Se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (7 cm) ou na largura completa (14.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As legendas devem ser encaminhadas em uma folha separada. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Por outro lado, uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de **Memórias**, e os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa sem custos para os autores.

- **Tabelas** devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

Comunicações breves devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que quatro páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato para artigos originais. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

Formato alternativo: Os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (*Annals of Internal Medicine* 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

- um disquete contendo o texto completo da versão final aprovada do manuscrito (incluindo tabelas e gráficos), processado em um editor de texto como Word ou Word Perfect para Windows (formato Macintosh deverá ser convertido);

- uma declaração assinada por todos os autores afirmando que:

- (i) todos os dados contidos no trabalho são precisos;
- (ii) todos os autores participaram do trabalho de forma substancial e estão preparados para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo;
- (iii) o manuscrito ora apresentado a essa revista não está sendo publicado no todo ou em parte por outra revista, assim como não está sendo encaminhado para outra publicação. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração;

- uma declaração de copyright fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor responsável pela correspondência.

Taxas: A revista não cobra taxas para publicação.

Provas: Serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.

Separatas: Os autores receberão 30 separatas gratuitamente. Junto, um formulário de pedidos e uma lista de preços serão enviados aos autores, permitindo que novas separatas sejam solicitadas

Checklist para os manuscritos

Os autores devem verificar cada um dos itens abaixo antes de enviar seus manuscritos a **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.

- Incluir uma carta de apresentação assinada por todos os autores, junto com o manuscrito, especificando o nome do autor que será responsável pela correspondência, assim como endereço, números de telefone e fax, e e-mail.

- Enviar quatro cópias do manuscrito (original mais três cópias), cada uma acompanhada de um jogo completo de ilustrações.
- Todo o manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser digitado em espaço duplo, usando fonte tamanho 12, e impresso em folhas de papel de tamanho padrão. Margens esquerdas e direitas devem ser de pelo menos 3 cm.
- As páginas devem ser numeradas a partir da página de rosto.
- A página de rosto deve incluir um cabeçalho com no máximo 40 letras e espaços, um título de no máximo três linhas impressas (250 letras e espaços), nomes dos autores (não citar títulos ou graus), afiliações institucionais, endereço completo do autor responsável pela correspondência, e notas de rodapé indicando as fontes de recursos financeiros e mudanças de endereço.
- A ordem de apresentação do material em todos os manuscritos deve ser a seguinte: cabeçalho, título, autores, afiliações institucionais, resumo, palavras-chave, notas de rodapé, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, agradecimentos, referências, tabelas, legendas para as figuras, e figuras.
- As referências devem ser citadas no texto entre parênteses, por exemplo, (Chagas 1909). As referências não citadas no texto não podem aparecer na seção de referências. As referências bibliográficas devem seguir o formato estabelecido pelo "Index Medicus and Biological Abstract" (veja exemplos em Formato e estilo).

Se um trabalho não publicado de autoria de um dos autores do manuscrito for citado (ou seja, um artigo "in press"), será necessário incluir a carta de:

- aceitação da revista que publicará o referido artigo.
- Se dados não publicados pertencentes a outros pesquisadores forem citados pelo manuscrito, será necessário incluir uma carta de autorização dos respectivos autores dos referidos dados.
- Incluir quatro impressões de cada figura em papel fotográfico ou produzidas por laser. Identificar todas as figuras com o nome do primeiro autor e o número da figura (por meio de uma etiqueta auto-adesiva datilografada e colada no verso da figura). Incluir uma legenda para cada figura. As legendas devem ser apresentadas em folha separada no final do manuscrito.
- As tabelas também devem ser apresentadas em folhas separadas no final do manuscrito. Um título breve e descritivo deve encabeçar cada tabela.

Para outras informações, consultar as **Instruções aos Autores** publicadas no primeiro número de cada volume da revista.

Av. Brasil, 4365
21040-900 Rio de Janeiro RJ Brazil
Tel.: +55 21 2598-4335
Fax: +55 21 2280-5048 / 2561-144

memorias@fiocruz.br

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, NÍVEL MESTRADO, DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

Aos quatro dias do mês de agosto de dois mil e seis, às catorze horas, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a Defesa de Dissertação apresentada pela Mestranda **Cynarha Dasy Cardoso da Silva**, intitulada: "**Identificação histoquímica de carboidratos em epidídimo e funículo espermático humano de pacientes com filariose**". A Banca Examinadora foi homologada em seis de julho de dois mil e seis, pela PROPESQ, tendo como membros titulares, os Professores: **Luiz Bezerra de Carvalho Júnior** (Orientador), Doutor em Bioquímica, pela Universidade de Saint Andrews, Escócia, **Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão**, Doutor em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco, **Patrícia Maria Guedes Paiva**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de São Paulo; **Maria Tereza dos Santos Correia**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de São Paulo e **Maria das Graças Carneiro da Cunha**, Doutora em Biotecnologias, pela Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, suplentes. O Prof. Luiz de Carvalho deu início à Sessão, para apresentação de defesa de Dissertação de Mestrado. Agradeceu a presença de todos em seguida passou a palavra à Mestranda para sua apresentação que efetuou durante vinte e cinco minutos. Continuando, o Prof. Luiz de Carvalho solicitou à Comissão Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à argüição na seguinte ordem: Dr.ª Patrícia Paiva (1º examinador); Dr. Eduardo Beltrão (2º examinador), Dr. Luiz de Carvalho (3º examinador). O presidente fez agradecimentos e em seguida solicitou dos convidados que se retirassem por alguns minutos a fim proceder a avaliação. A Banca Examinadora atribuiu a **Cynarha Dasy Cardoso da Silva** a seguinte menção: "**Aprovada com Distinção**" por unanimidade. Face ao resultado a mesma está apta a colar o grau de Mestre em Ciências Biológicas, Área **Biotecnologia**, pela Universidade Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar a sessão foi encerrada e para constar eu, Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, lavrei, datei e assinei a presente ata que também assinam os demais presentes. Recife, 04 de agosto de 2006.

Patrícia M. Guedes Paiva
Eduardo I. Carneiro Beltrão

Luiz Bezerra de Carvalho
M. Tereza dos Santos Correia
Adenilda Eugênia de Lima
M. das Graças Carneiro da Cunha
Juliano Roberto Barbosa de Oliveira

Cynarha Dasy Cardoso da Silva
S. Tereza dos Santos Correia
Solam da Silva