

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS**

**ESTUDO DE MODELO ANIMAL DE α -MANOSIDOSE INDUZIDA
POR *SIDA CARPINIFOLIA***

MARISETE BEDIN

Orientador: Dr. Roberto Giugliani

Tese de Doutorado

2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS**

**ESTUDO DE MODELO ANIMAL DE α -MANOSIDOSE INDUZIDA
POR *SIDA CARPINIFOLIA***

MARISETE BEDIN

Orientador: Dr. Roberto Giugliani

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Mestrado e Doutorado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Tese de Doutorado

2006

PENSAMENTO

ENQUANTO HOVER SOL

*Quando não houver saída, quando não houver mais solução.
Ainda há de haver saída, nenhuma idéia vale uma vida.*

*Quando não houver esperança, quando não restar nem ilusão.
Ainda há de haver esperança, em cada um de nós, algo de uma criança.*

*Enquanto houver sol, enquanto houver sol, ainda haverá.
Enquanto houver sol, enquanto houver sol.*

*Quando não houver caminho, mesmo sem amor, sem direção.
A sós ninguém está sozinho, é caminhando que se faz o caminho.*

*Quando não houver desejo, quando não restar nem mesmo dor.
Ainda há de haver desejo, em cada um de nós, aonde Deus colocou.*

*Enquanto houver sol, enquanto houver sol, ainda haverá.
Enquanto houver sol.*

Titãs

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a meu filho Guilherme, que através de seu sorriso de criança mostra a cada dia que existe esperança e ilusão, me dá forças para seguir em frente, seguir meu caminho, mostrando que sempre haverá uma saída.

Eu te amo meu filho.

Marisete

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse realizado e em especial:

Ao Dr. Roberto Giugliani, professor do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e chefe do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em aceitar me orientar neste trabalho, pela oportunidade, incentivo e exemplo de pesquisador.

Ao Dr. David Driemeier, professor do Departamento de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela colaboração no trabalho e por ceder as instalações da Faculdade de Veterinária durante os experimentos com os caprinos.

Ao Dr. Edson Moleta Colodel, professor do Departamento de Clínica Médica Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso e professor colaborador do Departamento de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela sua diária e incessante dedicação junto aos caprinos durante os experimentos realizados, pela coordenação da equipe de bolsistas que o auxiliaram nesta tarefa árdua e pela amizade.

À Marli Viapiana e Jurema De Mari, farmacêuticas/bioquímicas, Régis Rolim Guidobono, biólogo, Christine Rachelle Prescendo Chaves e Kátia Lazzaroni, bolsistas de iniciação científica, todos do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio na realização das análises enzimáticas e cromatografias, pelo apoio e principalmente pela amizade.

À Dra. Maira Burin, pela colaboração na realização deste trabalho.

À Dra. Rossana Peres, médica pediatra, pela ajuda na realização das análises estatísticas e pela amizade.

À Dra. Ursula Matte, bióloga do Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio e por disponibilizar o laboratório para o cultivo das células e à bióloga Cristina Rojas Kath pela realização do cultivo das células.

Aos colegas do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, instituição que devo imensa gratidão por toda minha formação acadêmica e mestrado, pela oportunidade em obter mais este título.

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e seu corpo docente, pela minha qualificação e obtenção deste título.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), pelo auxílio financeiro.

A meus pais Almerindo e Ivany, a minha irmã Margarete e ao meu sobrinho Matheus Henrique, por fazerem parte da minha vida.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>13</u>
FIGURA DA REVISÃO DA LITERATURA	13
FIGURA DO PRIMEIRO ARTIGO EM PORTUGUÊS	13
FIGURA DO PRIMEIRO ARTIGO EM INGLÊS	14
<u>LISTA DE TABELAS</u>	<u>14</u>
TABELAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	14
TABELAS DO PRIMEIRO ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	15
TABELAS DO PRIMEIRO ARTIGO EM INGLÊS	15
TABELAS DO SEGUNDO ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	16
TABELAS DO SEGUNDO ARTIGO EM INGLÊS.....	16

<u>INTRODUÇÃO.....</u>	<u>17</u>
<u>REVISÃO DA LITERATURA.....</u>	<u>19</u>
OLIGOSSACARIDOSES.....	19
OLIGOSSACARÍDEOS.....	23
α - MANOSIDOSE.....	24
ENZIMA α -MANOSIDASE.....	24
ESTRUTURA DO GENE.....	25
ASPECTOS CLÍNICOS	26
DIAGNÓSTICO	27
TRATAMENTO	28
PREVALÊNCIA DA DOENÇA	30
MODELO ANIMAL	32
<u>OBJETIVOS.....</u>	<u>34</u>
OBJETIVO GERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....</u>	<u>35</u>
<u>PRIMEIRO ARTIGO EM PORTUGUÊS</u>	<u>42</u>

RESUMO	43
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODO	45
ANIMAIS EXPERIMENTAIS	45
AMOSTRAS	45
SEPARAÇÃO DOS LEUCÓCITOS	46
ANÁLISE ENZIMÁTICA.....	47
CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DE OLIGOSSACARÍDEOS.....	48
ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
RESULTADOS.....	49
DISCUSSÃO.....	53
AGRADECIMENTOS.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	56
<u>PRIMEIRO ARTIGO EM INGLÊS</u>	<u>60</u>
ABSTRACT.....	61
INTRODUCTION.....	62
MATERIALS AND METHODS.....	63
EXPERIMENTAL ANIMALS	63
SAMPLES	63
LEUKOCYTE ISOLATION	64
ENZYME ASSAYS.....	64
THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC) OF OLIGOSACCHARIDES (OLS)	65

	11
STATISTICAL ANALYSIS	66
RESULTS	67
DISCUSSION	71
ACKNOWLEDGEMENTS.....	73
BIBLIOGRAPHY	74
<u>SEGUNDO ARTIGO EM PORTUGUÊS</u>	<u>78</u>
RESUMO	79
INTRODUÇÃO.....	80
MATERIAL E MÉTODO	81
ANIMAIS EXPERIMENTAIS	82
CULTURA DE FIBROBLASTOS DE CAPRINOS.....	82
ANÁLISE DA α -MANOSIDASE, β -MANOSIDASE E β -GALACTOSIDASE	83
ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
RESULTADOS.....	85
DISCUSSÃO.....	87
AGRADECIMENTOS	88
BIBLIOGRAFIA.....	89
<u>SEGUNDO ARTIGO EM INGLÊS</u>	<u>92</u>
ABSTRACT.....	93
INTRODUCTION.....	94
MATERIAL AND METHODS	95

EXPERIMENTAL ANIMALS	96
GOAT FIBROBLASTS CULTURE.....	96
ASSAY OF α -MANNOSIDASE, β -MANNOSIDASE AND β -GALACTOSIDASE.....	97
STATISTICAL ANALYSIS	98
RESULTS	99
DISCUSSION	101
ACKNOWLEDGEMENTS.....	102
BIBLIOGRAPHY	103
<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	<u>106</u>

LISTA DE FIGURAS

FIGURA DA REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1: Rota metabólica de degradação de oligossacarídeos

FIGURA DO PRIMEIRO ARTIGO EM PORTUGUÊS

Figura 1: Cromatografia de camada delgada de OLS em urina de caprinos alimentados com *Sida carpinifolia* (94 e 28 dias).

FIGURA DO PRIMEIRO ARTIGO EM INGLÊS

Figure 1: Thin layer chromatography of OLS in urine of goats fed with *Sida carpinifolia* (94 and 28 days).

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1: Aspectos moleculares e bioquímicos das oligossacarídeos

Tabela 2: Frequência estimada das oligossacarídeos

TABELAS DO PRIMEIRO ARTIGO EM PORTUGUÊS

Tabela 1: Efeito da dieta com *Sida carpinifolia* (94 dias) sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase em leucócitos de caprinos.

Tabela 2: Efeito da dieta com *Sida carpinifolia* (28 dias) sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase em leucócitos de caprinos.

Tabela 3: Efeito da dieta com *Sida carpinifolia* (28 dias) sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase em plasma de caprinos.

TABELAS DO PRIMEIRO ARTIGO EM INGLÊS

Table 1: Efeito da dieta com *Sida carpinifolia* (28 dias) sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase em plasma de caprinos.

Table 2: Short term effect of *Sida carpinifolia* diet on α -mannosidase, β -mannosidase, and β -galactosidase activities in goat leukocytes.

Table 3: Short term effect of *Sida carpinifolia* diet on α -mannosidase, β -mannosidase, and β -galactosidase activities in goat plasma.

TABELAS DO SEGUNDO ARTIGO EM PORTUGUÊS

Tabela 1: Efeito *in vivo* da dieta com *Sida carpinifolia* em cultura de fibroblastos de caprinos sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase.

Tabela 2: Efeito *in vitro* do swainsonine em cultura de fibroblastos de caprinos sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase.

TABELAS DO SEGUNDO ARTIGO EM INGLÊS

Table 1: *In vivo* effect of *Sida carpinifolia* diet in goat fibroblasts culture on α -mannosidase, β -mannosidase, and β -galactosidase activities.

Table 2: *In vitro* effect of swainsonine in goat fibroblasts culture on α -mannosidase, β -mannosidase, and β -galactosidase activities.

INTRODUÇÃO

As doenças lisossômicas de depósito (DLD) representam um grupo heterogêneo de quase 50 doenças genéticas, que possuem em comum um defeito genético em uma enzima específica, receptor, proteína ativadora, proteína de membrana ou transportador lisossomal, levando ao acúmulo progressivo de substratos específicos e deterioração da função celular. A extensão e a severidade

das DLD dependem do tipo e da quantidade do substrato que acumulam, porém quase todas desordens possuem manifestações clínicas e neurológicas progressivas. Muitos pacientes com DLD morrem na infância ou na adolescência e os que sobrevivem apresentam decréscimo no tempo de vida e morbidades significantes.

A α -manosidose é uma DLD causada pela deficiência da α -manosidase lisossomal e os indivíduos afetados apresentam acúmulo de oligossacarídeos na urina e nos tecidos, originários da degradação incompleta destas macromoléculas dentro dos lisossomos. O fenótipo clínico desta doença é heterogêneo, variando desde a forma infantil severa até a forma juvenil moderada, sendo o retardo mental sua principal característica. Considerando que a disfunção neurológica é a principal característica da α -manosidose humana e que a patofisiologia dos indivíduos afetados por esta doença ainda é pouco entendida, a validação de um modelo animal em caprinos possibilitará estudar mecanismos bioquímicos capazes de explicar a desordem neurológica provocada pela α -manosidose.

REVISÃO DA LITERATURA

OLIGOSSACARIDOSES

Os lisossomos contêm numerosas hidrolases ácidas que catabolizam proteínas, ácidos nucléicos, lipídios, sulfatos, fosfatos e carboidratos

complexos. Cada enzima lisossomal é parte de uma rota metabólica complexa que reduz macromoléculas em componentes menores, que são reutilizados ou eventualmente eliminados pela célula. A ausência ou o mau funcionamento de uma enzima causa o bloqueio desta rota metabólica, levando ao acúmulo progressivo de produtos intermediários tais como triglicerídeos não degradados, esteróides, esfingolipídeos, sulfatídeos, esfingomielina, gangliosídeos e lipofucinas, que ocupam cada vez mais espaço no lisossomo, aumentando o tamanho dos mesmos e interferindo na função celular.

As oligossacaridoses (glicoproteinoses ou enfermidades de acúmulo de glicoproteínas) são doenças lisossômicas de depósito cuja causa é a atividade deficiente de uma das enzimas que participam na degradação das cadeias de oligossacarídeos das glicoproteínas. A tabela 1 mostra os aspectos moleculares e bioquímicos das oligossacaridoses. As conseqüências clínicas desses defeitos dependem do tipo e da quantidade de macromoléculas acumuladas nas células, dos tecidos envolvidos e da influência destas alterações sobre a fisiologia celular. Podemos destacar o retardo mental e motor, dismorfias, problemas musculares, problemas esqueléticos e organomegalias, que ocorrem em idades diferentes, dependendo do tipo de doença. A α -manosidose é uma doença causada pela deficiência da enzima α -D-manosidase ácida, produzindo um acúmulo intracelular e o aumento na excreção urinária de oligossacarídeos ricos em manose [1]. A figura 1 mostra a rota metabólica de degradação de um oligossacarídeo.

Tabela 1 – Aspectos moleculares e bioquímicos das oligossacaridoses.

DOENÇA	GENE	MUTAÇÃO	ENZIMA DEFICIENTE
α -Manosidose	MAN B	19p13.2-112	α -manosidase ácida
β -Manosidose	MAN B1	4q22-25	β -manosidase
Fucosidose	FUCA 1	1p34	α -fucosidase
Sialidose	NEU	6p21.3	α -neuraminidase

Adaptado de: Thomas, G.H., Disorders of Glycoprotein degradation: Alpha-Mannosidosis, Beta-Mannosidosis, Fucosidosis, and Sialidosis: In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Scriver CR, Sly WS, Valle D, editors, McGraw-Hill, 2001: New York, p.3507-3533.

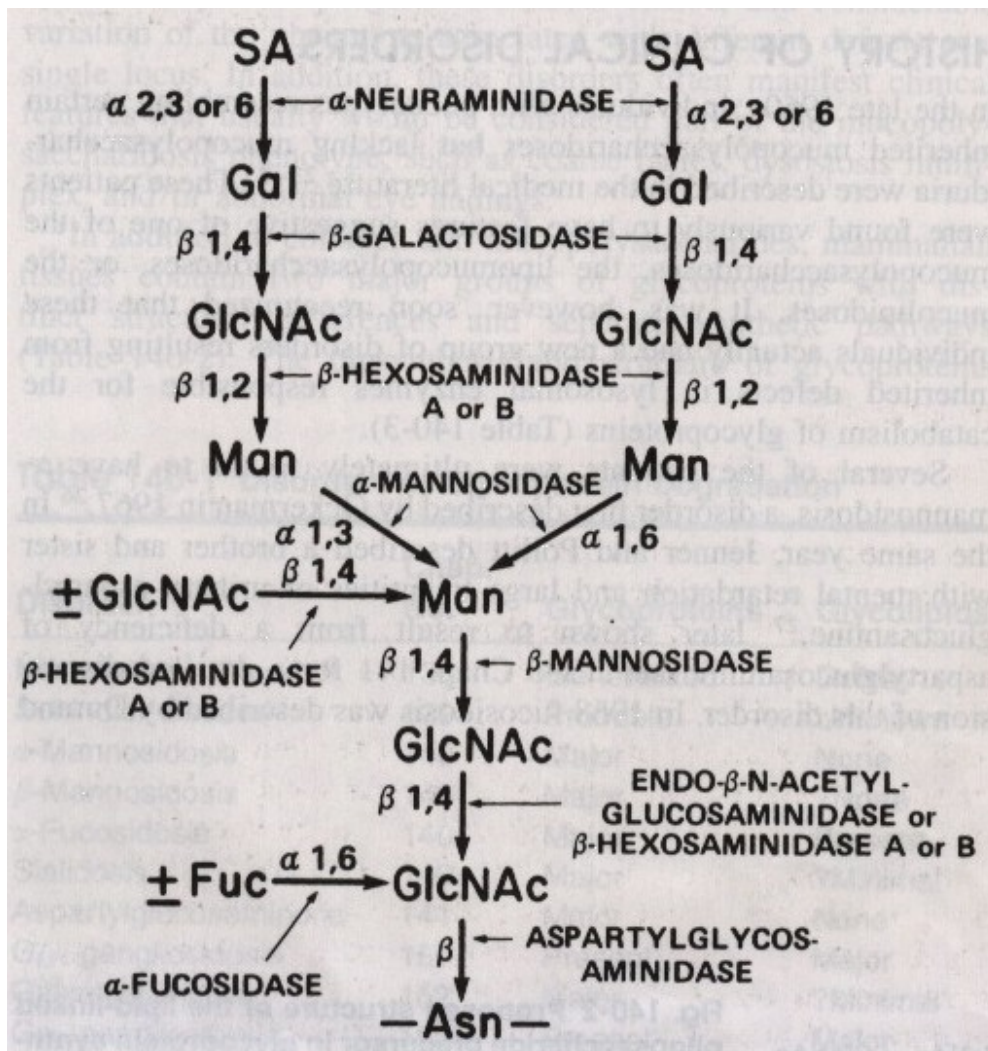


Figura 1: Rota metabólica de degradação de oligossacarídeos. SA = ácido siálico; Gal = galactose; GlcNAc = ácido N acetil-glicosamina; Man = manose; Fuc = fucose; Asn = asparagina. Adaptado de: Thomas, G.H., Disorders of Glycoprotein degradation: Alpha-Mannosidosis, Beta-Mannosidosis, Fucosidosis, and Sialidosis: In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Scriver CR, Sly WS, Valle D, editors, McGraw-Hill, 2001: New York, p.3507-3533.

OLIGOSSACARÍDEOS

Oligossacarídeos são hidratos de carbono (açúcares) pequenos constituídos de 3 a 100 moléculas de monossacarídeos ligados à asparagina (Asn), que fornecem diversas modificações pós-traducional às proteínas intracelulares e às recentemente sintetizadas. A estrutura de um oligossacarídeo influencia na bioatividade, na conformação, na localização e na imunogenicidade das proteínas, como também define características de adesão entre glicoconjugados e outras proteínas. Os oligossacarídeos são mediadores nos processos de reconhecimento celular [2-5]. Diversas proteínas intra e extracelulares estão ligadas a oligossacarídeos, incluindo enzimas, receptores de superfície celular, hormônios, imunoglobulinas e antígenos virais. A biossíntese de oligossacarídeos ligados à Asn é altamente compartimentalizada nas células eucarióticas e ocorre em membranas de organelas com rotas metabólicas secretoras, incluindo o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi [6].

α - MANOSIDOSE

A α -manosidose (MIM 248500) foi descrita primeiramente em 1967 por Öckerman como um distúrbio metabólico resultante do defeito geneticamente condicionado à enzima lisossomal α -manosidase (EC 3 .2.1.24), responsável pelo catabolismo de glicoproteínas [7]. É uma doença autossômica recessiva que afeta tanto homens quanto mulheres [8] e que se apresenta clinicamente através de duas formas: α -manosidose tipo I ou infantil e α -manosidose tipo II ou juvenil [1].

ENZIMA α -MANOSIDASE

A atividade normal da α -manosidase na célula resulta de ações combinadas das α -manosidases presentes na membrana do complexo de Golgi, com pH neutro e da forma presente nos lisossomos, com pH ácido, especificidade restrita ao substrato, incluindo compostos sintéticos como o p-nitrofenil- α -manosideo e sensibilidade a alcalóides indolizidínicos como o swainsonine [9]. Os

pacientes com α -manosidose possuem ausência da forma ácida da enzima, porém mantém a forma neutra [10].

ESTRUTURA DO GENE

O gene que codifica a enzima α -manosidase em humanos foi isolado e codificado como MANB, possui aproximadamente 22 kb e consiste de 24 exons. Mais precisamente, sabe-se que este gene está localizado no cromossomo 19p 13.2 [11]. Até hoje estão identificadas 28 mutações deste gene que codificam para doenças de acúmulo lisossomal (DLD), sendo a maior parte delas privadas e sem uma clara relação fenótipo-genótipo. A mutação mais freqüentemente encontrada é a R750W, presente em 21% dos alelos de pacientes europeus [12]. O RNAm do gene MANB possui 3443 pb [11] sendo também isolado e seqüenciado em DNA de felinos [13] [1] e bovinos [14]. Já em felinos a semelhança é de 81% [15]. O gene também foi purificado de fígado bovino e, da mesma forma como no tecido humano, apresenta-se organizado em 24 exons [14]. Em ratos, o gene da α -manosidase possui 75% da seqüência de aminoácidos semelhantes com o gene da α -manosidase humana [16].

ASPECTOS CLÍNICOS

Os pacientes com α -manosidose tipo I e tipo II apresentam retardo mental, face grosseira, algum grau de disostose múltipla, surdez, hepatoesplenomegalia, hérnias, bem como cristalinos e córneas opacos. Adicionalmente, os pacientes apresentam infecções bacterianas recorrentes. A estrutura óssea dos pacientes apresenta configuração de aparência ovóide e cuneiforme e a ressonância magnética cerebral pode apresentar sinais sugestivos e ou mudança na intensidade da substância branca. Os pacientes com α -manosidose tipo I têm deterioração mental bastante rápida e, muitas vezes vêm a falecer entre 3 e 10 anos de idade, contrastando com indivíduos com α -manosidose tipo II onde o retardo mental torna-se aparente somente durante a adolescência. A perda da audição é particularmente proeminente nos pacientes com α -manosidose tipo II, enquanto que a disostose múltipla apresenta-se mais moderada que a encontrada nos indivíduos com α -manosidose tipo I. O curso clínico desta doença é descrito como gradual, algumas vezes com progressão imperceptível [8, 17]. Existem indícios de que os pacientes com α -manosidose apresentam imunodeficiência humoral e celular [18].

DIAGNÓSTICO

A investigação inicial dos pacientes com suspeita de α -manosidose inclui o estudo radiológico da coluna lombo-sacra, com o objetivo de confirmar ou excluir a presença de disostose múltipla, e a busca de linfócitos vacuolados no sangue periférico. Como os pacientes apresentam um padrão típico de excreção urinária de oligossacarídeos, faz-se necessário realizar cromatografia destes compostos na urina. Os pacientes afetados por α -manosidose apresentam quantidades elevadas de diversos oligossacarídeos nos tecidos e na urina, derivados da digestão incompleta de glicoproteínas [7, 19]. Os indivíduos afetados apresentam excreção anormal de oligossacarídeos, que podem ser detectados através da técnica de HPLC. Os indivíduos afetados apresentam excreção anormal de oligossacarídeos, que podem ser detectados através da técnica de HPLC [20] e da cromatografia em camada delgada. Porém, o diagnóstico de α -manosidose somente é confirmado ou excluído através da atividade reduzida da α -manosidase em leucócitos, podendo também ser utilizados fibroblastos e células cultivadas do fluido amniótico [21]. A medida direta da α -manosidase em amostras de soro ou plasma não tem mostrado a mesma confiabilidade dos níveis enzimáticos celulares [8]. No entanto, se o pH for cuidadosamente selecionado em 4,0, o plasma pode

ser utilizado para o diagnóstico de α -manosidose [22]. Foram registrados casos de diagnóstico para α -manosidose no primeiro trimestre de gestação, entre a 8^a-10^a semana, usando amostras de vilo coriônico [23], demonstrando que α -manosidose pode ser detectada no início da gestação pela medida da enzima [24].

TRATAMENTO

O transplante de medula óssea foi realizado em um paciente com sete anos de idade com α -manosidose, vindo a falecer 18 semanas após a cirurgia, em decorrência de broncopneumonia. Foi realizada necropsia do paciente e a atividade da α -manosidase em células do pulmão, fígado e cérebro foi normal e a presença de oligossacarídeos no pulmão e fígado foi pequena, porém bastante aumentada no tecido cerebral. Através da microscopia eletrônica, o pulmão e o fígado apresentaram morfologia normal, entretanto o tecido cerebral apresentou vacuolização bastante definida. Estes achados sugerem que o transplante de medula óssea reverteu a atividade da α -manosidase, mas não conseguiu reverter o acúmulo de oligossacarídeos no tecido cerebral [25]. A indicação primária de transplante de medula óssea em pacientes com α -manosidose tem como objetivo preservar a função neurocognitiva e prevenir o óbito precoce destes pacientes, uma vez que a maior parte dos pacientes afetados manifestam a doença cedo (α -manosidose tipo I) e somente 10-15% dos pacientes afetados manifestam a doença

mais tarde (α -manosidose tipo II) [1]. Entre janeiro de 1997 e outubro de 2003, quatro pacientes com α -manosidose submeteram-se ao transplante de medula óssea na Universidade de Minesota, nos Estados Unidos. Todos apresentavam desequilíbrio neurocognitivo antes do procedimento. Em três deles, testes neuropsicológicos realizados após o procedimento cirúrgico, demonstraram estabilização da função intelectual para a maioria dos domínios. O estudo demonstrou que pacientes com α -manosidose tipo II e que apresentam sinais prematuros de déficit neurocognitivo devem ser indicados para transplante de medula óssea [26]. A reposição enzimática da α -manosidase em fibroblastos de pacientes com α -manosidose a partir de linfócitos demonstrou redução no depósito lisossomal de oligossacarídeos contendo manose. No entanto, para o prolongamento da correção enzimática há a necessidade de renovação periódica, demonstrando que estes achados podem ser altamente relevantes à função que os linfócitos exercem na terapia de reposição enzimática [27].

PREVALÊNCIA DA DOENÇA

Através de dados fornecidos por registros de famílias que possuem prole de homens e mulheres afetadas com α -manosidose e através de resultados de mapeamento molecular confiou-se que esta doença é autossômica recessiva [8]. Deste modo, entre indivíduos heterozigotos, a cada gestação, o risco de gerar uma criança afetada com α -manosidose é de 25%. A literatura registra pelo menos 90 casos de α -manosidose [1] sendo que um caso foi diagnosticado no Laboratório Regional de Erros Inatos do Metabolismo (Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil) entre 1982-2000 [21], sendo que até a presente data este laboratório não diagnosticou novos casos da doença. Na Austrália, foram diagnosticados 4 casos entre 1980 e 1996 sendo que a prevalência da doença neste país (calculada com os casos diagnosticados nos períodos pré e pós-natal/número de recém nascidos vivos) foi estimada em 1/1.056.000 [28]. A tabela 2 mostra a frequência estimada da α -manosidose.

Tabela 2 – Freqüência estimada das oligossacaridoses.

Doença	Nº de casos diagnosticados pelo LREIM* (1982-2000)	Nº de casos diagnosticados na Austrália** (1980-1996)	Prevalência na Austrália** (/RN vivo)
α -Manosidose	1	4	1/1.056.000
β -Manosidose	0	0	
Fucosidose	1	0	
Sialidose	6	1	1/4.222.000

*LREIM: Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil).

**Prevalência: (casos diagnosticados no período pré-natal + casos diagnosticados no período pós-natal/número de recém nascidos vivos)

Adaptado de: Schwartz IVD, Moura de Souza CF, Giugliani R, Oligosacaridoses y Mucopolipidosis, In: Diagnóstico e Tratamiento de las Enfermedades Metabólicas Hereditarias, Sanjurjo P y Baldellou A, editores, 2001, Ergon, Majadahonda (Madrid). p. 431-438.

MODELO ANIMAL

A doença α -manosidose induzida por plantas do gênero *Swainsona*, *Oxytropis*, *Astragalus* e *Ipomoea* desenvolve um quadro clínico em animais conhecido como “locoísmo”, com vacuolização de células em diversos tecidos [29]. Embora a doença induzida seja muito similar à α -manosidose genética, ela não é idêntica. Estas plantas contêm o alcalóide indolizidínico swainsonine, que inibe a enzima lisossomal α -manosidase e induz o acúmulo de oligossacarídeos contendo manose nos lisossomos de diversas células [30-33] e a Golgi manosidase II, enzima associada com os processos de oligossacarídeos durante a glicosilação de glicoproteínas. A consequência da doença induzida em animais é o acúmulo de oligossacarídeos contendo manose e oligossacarídeos híbridos nos lisossomos [34-36]. Através de cromatografia líquida e gasosa, o alcalóide swainsonine foi identificado como constituinte tóxico da planta nativa *Sida carpinifolia* (gênero *Swainsona*) em uma concentração de 0,006% de seu peso seco [37].

A α -manosidose foi observada pela ingestão de plantas do gênero *Swainsona*, *Oxytropis*, *Astragalus* e *Ipomoea* em cavalos, bovinos, ovinos e caprinos, causando perturbações neurológicas ocasionadas pelo alcalóide indolizidínico swainsonine [30-33]. Na Inglaterra, em 1980, a α -manosidose felina foi a primeira a ser descoberta em gatos domésticos e, subsequente, em gatos Persas na Suíça, Estados Unidos e na Bélgica. Em felinos, a doença foi caracterizada por hepatomegalia sinais neurológicos e ampla vacuolização de

hepatócitos, neurônios e células gliais. A análise bioquímica no tecido cerebral dos felinos detectou deficiência da enzima α -manosidase e a urina apresentou grande quantidade de oligossacarídeos ricos em manose [38-42]. Em ovelhas que ingeriram *Oxytropis sericea*, Stegelmeier et al (1999) observaram diminuição da α -manosidase no soro, vacuolização celular no pâncreas, epitélio renal, células de Purkinje e neurônios cerebelares, entre outros tecidos [43]. Daniel et al (1984), verificou que em ovelhas que ingeriram *Astragalus lentiginosus* ocorreu a presença de oligossacarídeos na urina a partir do 3º dia após a ingestão da planta, com declínio rápido da molécula após sua retirada da dieta [42]. Em Moçambique, num estudo realizado por Balogh et al (1999), foi observado que caprinos que ingeriram *Ipomoea carnea* apresentaram mudanças histológicas no cérebro e na medula espinhal, com ampla vacuolização de neurônios e células gliais [45]. Em ovinos e bovinos, a redução da α -manosidase no plasma readquiriu valores normais 4-6 dias após a interrupção da dieta contendo *Astragalus lentiginosus*. As alterações na quantidade de oligossacarídeos na urina foram observadas no primeiro dia de tratamento e perturbações neurológicas decorrentes da dieta foram observadas 38 dias após o início da dieta [29,44]. Em trabalho de Driemeier et al (2000), a análise ultraestrutural e histológica em tecido pancreático e cerebral de caprinos alimentados com *Sida carpinifolia*, demonstrou a presença de vacúolos, com predominância nas células de Purkinje e pancreáticas acinares [31]. Tulsiani e Touster (1983) observaram que após 12 semanas de injeções intramusculares de swainsonine em ratos *Wistar* a α -manosidase lisossomal aumentou sua atividade no fígado e no cérebro e reduziu no plasma [46]

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar um modelo animal caprino para α -manosidose humana a partir do consumo de dieta com *Sida carpinifolia*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.1 Avaliar *in vivo* a atividade da α -manosidase e β -manosidase sobre leucócitos e plasma de caprinos alimentados com *Sida carpinifolia*.
- 1.2 Avaliar *in vivo* a atividade da β -galactosidase em leucócitos de caprinos alimentados com *Sida carpinifolia*.
- 1.3 Avaliar *in vivo* a atividade da β -glicuronidase em plasma de caprinos alimentados com da *Sida carpinifolia*.
- 1.4 Avaliar *in vivo* a excreção urinária de oligossacarídeos em caprinos alimentados com da *Sida carpinifolia*.
- 1.5 Avaliar *in vivo* a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase em fibroblastos de caprinos alimentados com *Sida carpinifolia*.
- 1.6 Avaliar *in vitro* a atividade da α -manosidase em fibroblastos de caprinos na presença de swainsonine.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

DA LITERATURA

- [1] Thomas G Disorders of Glycoprotein degradation: Alpha-Mannosidosis, Beta-Mannosidosis, Fucosidosis, and Sialidosis. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) 2001 McGraw-Hill New York. p. 3507-3533
- [2] Kornfeld S 1992 Structure and Function of the Mannose 6-Phosphate/Insulinlike Growth Factor II Receptors. *Ann Rev Biochem* 6:307-330
- [3] Lee, YC 1992 Biochemistry of Carbohydrate-protein Interaction. *Faseb J* 6(13): 3193-3200
- [4] Bevilacqua MP, Nelson RM 1993 Selectins. *J Clin Invest* 91(2):379-387
- [5] Varki A 1993 Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct *Glycobiology* 3(2): 97-130
- [6] Moremen KW Alpha-Mannosidosis in asparagine-linked oligosaccharide processing and catabolism. In: *Oligosaccharides in Chemistry and Biology: A Comprehensive Handbook*. Ernst HG, Sinay P (eds) 2000 Wiley New York p. 81-117
- [7] Öckerman P-A 1967 A generalized storage disorder resembling Hurler's syndrome. *Lancet* 2(239)

- [8] Chester MA, Lundblad A, Öckerman P-A, Autio S Mannosidosis. In: Genetic Errors of Glycoprotein Metabolism. Durand P and O'Brien JS (eds) 1982 Berlin p. 89
- [9] Opheim DJ, Touster O 1978 Lysosomal alpha-D-mannosidase of rat liver. Purification and comparison with the Golgi and cytosolic alpha-D-mannosidases. *J Biol Chem* 253(4):1017-1023
- [10] Taylor HA, Thomas GH, Aylsworth A, Stevenson RE, Reynolds LW 1975 Mannosidosis: deficiency of a specific alpha-mannosidase component in cultured fibroblasts. *Clin Chem Acta* 59(1): 93-99
- [11] Riise HMF, Berg T, Nilssen O, Romeo G, Tollersrud OK, Ceccherini I 1997 Genomic Structure of the Human Lysosomal alpha-Mannosidase Gene (MANB). *GENOMIC* 42:200-207
- [12] Michalski JC, Klein A 1999 Glycoprotein lysosomal storage disorders: alpha- and beta-mannosidosis, fucosidosis and alpha-N-acetylgalactosaminidase deficiency. *Biochem Biophys Acta* 1455(2-3): 69-84
- [13] Berg T, Tollersrud OK, Walkley S U, Siegel D, Nilssen O 1997 Purification of feline lysosomal alpha-mannosidase, determination of its cDNA sequence and identification of a mutation causing alpha-mannosidosis in Persian cats. *Biochem J* 328: 863-870
- [14] Tollersrud OK, Berg T, Healy P, Evejen G, Ramachandram U and Nilssen O 1997 Purification of bovine lysosomal alpha-mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutations that cause alpha-mannosidosis. *Eur J Biochem* 246(2):410-419

- [15] Berg T, Monica M, Riise F, Hansen GM, Malm D, Tranebjærg L, Tollersrud OK, Nilssen O 1999 Spectrum of Mutations in α -Mannosidosis. *Am J Hum Genet* 64:77-88
- [16] Beccari T, Appolloni MG, Costanzi E, Stinchi S, Stirling JL, Della Fazia MA, Servillo G, Viola MP, Orlacchio A 1997 Lysosomal alpha-mannosidases of mouse tissues: characteristics of the isoenzymes, and cloning and expression of a full-length cDNA. *Biochem J* 327(1): 45-49
- [17] Desnick RJ, Grabowski GA, Brunning RD, Quie PG, Sung JH, Gorlin RJ, Ikonne JU 1976 Clinical, morphological, immunologic and biochemical studies. *Pediatric Res* 19(985)
- [18] Malm D, Halvorsen S, Tranebjærg L, Sjursen H 2000 Immunodeficiency in alpha-mannosidosis: a matched case-control study on immunoglobulins, complement factors, receptor density, phagocytosis and intracellular killing in leucocytes. *Eur j Pediatr* 159(9): 699-703
- [19] Strecker G, Fournet B, Bouquelet S, Montreuil J, Dhondt JL, Farriaux JP 1976 Chemistry of urinary mannosides excreted in mannosidosis. *Biochimie* 1976 58(5): 579-586
- [20] Sewell AC 1979 An improved thin-layer chromatographic method for urinary oligosaccharide screening. *Clin Chim Acta* 92(3): 411-414
- [21] Schwartz IVD, Moura de Souza CF, Giugliani R Oligosacaridosis y Mucopolidosis. In: *Diagnóstico e Tratamiento de las Enfermedades Metabólicas Hereditarias*. Sanjurjo P y Baldellou A (eds) 2001, Ergon Majadahonda (Madrid). p. 431-438.

- [22] Prence EM, Natowicz MR 1992 Diagnosis of alpha-mannosidosis by measuring alpha-mannosidase in plasma. *Clin Chem* 38(4): 501-503
- [23] Poenaru L, Kaplan L, Dumez J, Dreyfus JC 1974 Evaluation of possible first trimester prenatal diagnosis in lysosomal diseases by trophoblast biopsy. *Pediatr Res* 18(10):1032-1034
- [24] Petushkova NA 1991 First-trimester diagnosis of an unusual case of alpha-mannosidosis. *Prenat Diag* 11(5): 279-283
- [25] Will A, Cooper A, Hatton C, Sardharwalla IB, Evans DI, Stevans RF 1987 Bone marrow transplantation in the treatment of alpha-mannosidosis. *Arch Dis Child*. 62(10):1044-1049
- [26] Grewal S, Shapiro E, Krivit W, Charnas L, Lockman L, Delaney K, Davies S, Wenger D, Rimell F, Abel S 2004 Effective treatment of α -mannosidosis by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Pediatr* 144(5): 569-573
- [27] Abraham D, Shapiro E, Krivit W, Charnas L, Lockman L, Delaney K, Davies S, Wenger D, Rimell F, Abel S 1985 Direct enzyme transfer from lymphocytes corrects a lysosomal storage disease. *Biochem Biophys Res Commun* 129:5417-425
- [28] Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF 1999 Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* 281(3): 249-254
- [29] Glew RH, Basu A, Prende, EM, Remaley AT 1985 Lysosomal storage diseases. *Lab Invest* 53(3): 250-259

- [30] Jolly RD, Slack PM, Winter PJ, Murphy CE 1980 Mannosidosis: patterns of storage and urinary excretion of oligosaccharides in the bovine model. *Aust J Exp Biol Med Sci* 58(4): 421-428
- [31] Driemeier D, Colodel EM, Gimeno EJ, Barros,SS 2000 Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. *Vet Pathol* 37(2): 153-159
- [32] Loretto AP, Colodel EM, Gimeno EJ, Driemeier D 2003 Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. *Equine Vet J* 35(5): 434-438
- [33] Molyneux RJ, James LF 1982 Loco intoxication: indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Science* 216(4542): 190-191
- [34] Dorling PR, Huxtable CR, Colegate SM 1980 Inhibition of lysosomal alpha-mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. *Biochem J* 191(2): 649-651
- [35] Gross V, Andus T, Tran-Thi TA, Schwarz RT, Decker K, Heinrich PC 1983 1-deoxynojirimycin impairs oligosaccharide processing of alpha 1-proteinase inhibitor and inhibits its secretion in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 258(20): 12203-12209.
- [36] Tulsiani DR, Harris TM, Touster O 1982 Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi mannosidase II. *J Biol Chem* 257(14): 7936-9

- [37] Colodel EM, Gardner DR, Zlotowski P, Driemeier D 2002 Identification of swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. *Vet Hum Toxicol* 44(3): 177-178
- [38] Blakemore WF 1986 A case of mannosidosis in the cat: clinical and histopathological findings. *J Small Anim Pract* 27:447-455
- [39] Burditt LJ, Chotai K, Hirani S, Nugent PG, Winchester BG, Blakemore W F 1980 Biochemical studies on a case of feline mannosidosis. *Biochem J* 189(3): 467-473
- [40] Jezyk PF, Haskins ME, Newman ALR 1986 Alpha-mannosidosis in a Persian cat. *J Am Vet Med Assoc* 189(11): 1483-1485
- [41] Maenhout, Kint JA, Dacremont GJ, Ducatelle R, Leroy JG, Hoorens JK 1988 Mannosidosis in a litter of Persian cats. *Vet Rec* 122(15): 351-354
- [42] Warren CD, Alroy J, Bugge B, Daniel PF, Raghavan SS, Kolodny EH, Lamar JJ, Jeanloz RW 1986 Oligosaccharides from placenta: early diagnosis of feline mannosidosis. *FEBS Lett.* 195(1-2): 247-252
- [43] Stegelmeier BL, James LF, Panter KE, Ralphs MH, Gardner DR, Molyneux RJ, Pfister JA 1999 The pathogenesis and toxicokinetics of locoweed (*Astragalus* and *Oxytropis* spp.) poisoning in livestock. *J Nat Toxins* 8(1): 35-45
- [44] Daniel PF, Warren CD, James ALF 1984 Swainsonine-induced oligosaccharide excretion in sheep. Time-dependent changes in the oligosaccharide profile. *Biochem J* 221(3): 601-607

- [45] de Balogh KK, Dimande AP, Van Der Lugt JJ, Molyneux RJ, Naude TW, Welman WG 1999 A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. *J Vet Diagn Invest* 11(3): 266-273
- [46] Tulsiani DR, Touster O 1986 Swainsonine, a potent mannosidase inhibitor, elevates rat liver and brain lysosomal alpha-D-mannosidase, decreases Golgi alpha-D-mannosidase II, and increases the plasma levels of several acid hydrolases. *Arch Biochem Biophys*. 224(2): 594-600

PRIMEIRO ARTIGO EM PORTUGUÊS

ALFA-MANOSIDASE LISSOSSOMAL EM CAPRINOS ALIMENTADOS COM *SIDA CARPINIFOLIA*

Marisete Bedin^{1,4}, Edson Moleta Colodel^{2,3}, Marli Viapiana¹, Jurema de Mari¹,
Christine Rachelle Prescendo Chaves¹, Ursula Matte¹, David Driemeier³, Roberto
Giugliani^{1,4}.

¹ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Brasil.

³ Departamento de Patologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

⁴ Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Palavras chave: α -manosidose, swainsonine, *Sida carpinifolia*, doença lisossomal, modelo animal.

Endereço do autor:

Dra. Marisete Bedin

Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350 CEP 90.035-003
Porto Alegre, RS, Brasil.

Tel.: +55 51 21018011 fax: +55 51 21018010

Endereço eletrônico: marisetebedin@yahoo.com.br

Artigo submetido para: Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

RESUMO

A α -manosidose humana resulta a partir da deficiência da enzima α -manosidase e acúmulo do progressivo de oligossacarídeos ricos em manose nos lisossomos. Em modelo animal caprino, no 5º dia após a introdução da dieta com *Sida carpinifolia*, a atividade da α -manosidase em leucócitos aumentou significativamente, retornando aos níveis normais 2 dias após a retirada da planta da dieta. A atividade da α -manosidase foi analisada no plasma e decresceu significativamente 4 dias após a exposição dos animais à dieta com *Sida carpinifolia*, retornando aos níveis normais 10 dias após a retirada da planta da dieta. As atividades da β -manosidase e β -galactosidase em leucócitos não apresentou alteração significativa, sendo similar para a atividade da β -glicuronidase no plasma durante a exposição dos animais à dieta com *Sida carpinifolia*. Através de cromatografia de camada delgada (CCD), foi observada uma excreção anormal de oligossacarídeos na urina a partir do segundo dia após a exposição à dieta, que persistiu até um dia após a retirada da planta. Os animais apresentaram sinais clínicos neurológicos que iniciaram no 10º dia após a ingestão da planta. Estudos bioquímicos das conseqüências da dieta contendo *Sida carpinifolia* em caprinos indicam que este modelo pode ser usado em investigações relacionadas à α -manosidose humana.

INTRODUÇÃO

A doença humana α -manosidose resulta da deficiência da enzima α -manosidase, levando a um acúmulo gradual de oligossacarídeos ricos em manose nos lisossomos. O alcalóide swainsonine é conhecido como agente causador do "locoísmo", uma doença neurológica descrita em animais e que tem as mesmas características da α -manosidose humana [1-5]. O swainsonine é um inibidor potente da α -manosidase lisossomal (E.C. 3.2.1.24) e da Golgi manosidase [6-8]. Este alcalóide foi isolado e identificado como constituinte da planta *Sida carpinifolia* [9]. Caprinos e eqüinos que natural e experimentalmente ingeriram esta planta apresentaram sinais clínicos da doença neurológica e vacuolização no fígado, pâncreas, células acinares e neurônios, principalmente nas células de Purkinje [1,3]. A disfunção neurológica é a principal característica da α -manosidose humana [10], contudo a fisiopatologia dos indivíduos afetados por esta doença é ainda pouco conhecida. O objetivo deste trabalho foi caracterizar um possível modelo animal para a α -manosidose humana, através de estudos bioquímicos da α -manosidase em leucócitos, plasma e oligossacarídeos (OLS) na urina de caprinos alimentados com dieta contendo *Sida carpinifolia*.

MATERIAL E MÉTODO

ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram realizados dois experimentos. O primeiro experimento incluiu 6 caprinos machos da raça *Saanen* com 7 meses \pm 10 dias de idade e o segundo, incluiu 3 caprinos fêmeas da raça *Saanen* com 4 meses \pm 15 dias de idade. Os animais foram forçados a ingerir 500 g diárias de *Sida carpinifolia*, por 94 dias (no primeiro experimento) ou 28 dias (no segundo experimento). Os animais receberam também ração comercial para complementar as necessidades diárias e livre acesso à água. Os sinais clínicos foram observados durante todo período experimental e a contagem sangüínea foi realizada semanalmente. O protocolo dos animais experimentais foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

AMOSTRAS

As amostras de urina foram coletadas e guardadas a -20°C para análise dos oligossacarídeos através de CCD. As amostras de sangue foram coletadas em tubos com heparina e guardados a $2-8^{\circ}\text{C}$ para a separação dos

leucócitos. As amostras de plasma foram obtidas a partir da centrifugação do sangue (400 x g/10 min) e guardadas a -20°C.

SEPARAÇÃO DOS LEUCÓCITOS

Os leucócitos foram separados de acordo com Wottawa (1974) [11]. Para cada amostra foram diluídos 5ml de sangue total com 5ml of PBS (tampão fosfato salino). Com uma pipeta Pasteur, 5ml de sangue diluído foi cuidadosamente transferido em um tubo limpo, sobre 1,5ml de Ficoll-Paque. As amostras foram centrifugadas a 400 x g por 35 minutos a 20°C. Com uma pipeta Pasteur, foi removida a camada de leucócitos, sobre a interface, entre o Ficoll-Paque e o plasma. Os leucócitos foram lavados com 5ml de PBS e centrifugados a 100 x g por 10 minutos a 20°C. Para remover o excesso de eritrócitos foi adicionado 1ml de solução de sal balanceado e foi realizada uma centrifugação final (100 x g por 10 minutos a 20°C). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al [12].

ANÁLISE ENZIMÁTICA

Todos substratos e reagentes foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). A atividade da α -manosidase e β -manosidase foram determinadas com os substratos fluorogênicos 4-metilumbeliferil- α -L-manopiranosídeo e 4-metilumbeliferil- β -L-manopiranosídeo, respectivamente. Para o ensaio enzimático, 20 μ l de leucócitos, previamente diluídos em água, e 20 μ l de amostra de plasma, foram homogeneizados com 100 μ l da solução do substrato específico 2mM em tampão sódio acetato 0,2M pH 4,0. A atividade da β -galactosidase foi analisada pelo método de Suzuki (2001) [13], usando 4-metilumbeliferil- β -D-galactosídeo como substrato. O ensaio conteve 200 μ L do substrato 1.33mM dissolvido em tampão citrato-fosfato 0,1M, 100 μ L de cloreto de sódio 0,2M e 100 μ L de leucócitos previamente diluídos em cloreto de sódio 0,9%. A atividade da β -Glicuronidase foi analisada pelo método de Beudet et al. [14]. O plasma (30 μ L) com 50 μ L de 4-metilumbeliferil- β -D-glicuronídeo 2mM foi dissolvido em tampão sódio-acetato 0,5M pH 3,0. Todas reações enzimáticas foram incubadas por 1 hora a 37°C e interrompidas com 1,5mL de tampão glicina-NaOH, pH 10,3. O conteúdo protéico dos leucócitos foi obtido entre 15 e 30mg de proteína. A fluorescência foi lida com espectrofluorômetro Hitachi F-2000 (comprimento de onda de excitação e emissão de of 365 e 450nm, respectivamente).

CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA DE OLIGOSSACARÍDEOS

Todos solventes foram adquiridos pela Merck (Darmstadt, Germany). As amostras foram aplicadas com seringa Hamilton a partir da parte inferior de uma placa de alumínio de sílica gel H-60, sobre bandas de 8 mm de largura. As placas desenvolveram duas corridas ascendentes em cuba de vidro horizontal saturada com uma fase móvel, que consistiu de butano-ácido acético-água (2:1:1 v/v/v). Entre as corridas, as placas foram secas em corrente de ar com ajuda de um secador. As placas desenvolvidas foram nebulizadas com orcinol 0,2% em H₂SO₄ 20% e aquecidas em estufa por 10 min a 250°C.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do teste estatístico ANOVA, seguido pelo teste de Duncan, quando o teste *F* foi significativo. A análise foi realizada com software estatístico SPSS/PC1, versão 11.0 Chicago, IL, USA), e o nível de significância foi $p < 0.05$.

RESULTADOS

No dia anterior ao experimento, quando os caprinos não haviam sido alimentados com *Sida carpinifolia*, a atividade da α -manosidase em leucócitos foi 128 ± 28 nmoles4-MU/h/mg.proteína no primeiro experimento (tabela 1) e 104 ± 6 nmoles4-MU/h/mg.proteína, no segundo (tabela 2). Após os animais terem sido alimentados com *Sida carpinifolia*, a atividade da α -manosidase permaneceu nesses valores até o 4º dia, em ambos experimentos. No 5º dia após a introdução da *Sida carpinifolia* à dieta, a atividade da enzima aumentou significativamente no primeiro (288 ± 13 nmoles4-MU/h/mg.proteína) como no segundo experimento (303 ± 45 nmoles4-MU/h/mg.proteína), retornando aos níveis normais 2 dias após a retirada da planta da dieta (114 ± 7 nmoles4-MU/h/mg.proteína, no primeiro experimento e 108 ± 25 nmoles4-MU/h/mg.proteína, no segundo). A atividade da α -manosidase no plasma foi analisada no segundo experimento (tabela 3), havendo um decréscimo significativo 4 dias após a exposição dos animais à dieta com *Sida carpinifolia* (769 ± 167 nmoles4-MU/h/ml) e retornando aos valores normais 9 dias após a retirada da dieta. As atividades da β -manosidase e da β -galactosidase em leucócitos não apresentou mudanças significativas (tabelas 1 e 2) como a atividade da β -glicuronidase no plasma (tabela 3) que também permaneceu invariável durante a exposição dos animais à dieta com *Sida carpinifolia*.

Tabela 1 – Efeito da dieta com *Sida carpinifolia* (94 dias) sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase em leucócitos de caprinos.

Enzimas	2 dias antes	Dieta com <i>Sida carpinifolia</i> (dias)					Dieta sem <i>Sida carpinifolia</i> (dias)
		5°	40°	60°	94°	96°	
α -manosidase	128±28	288±13*	533±103*	427±101*	369±96*	114±7	
β -manosidase	1,9±0,6	1,7±0,4	1,7±0,3	2,8±0,8	1,9±0,7	2,1±0,5	
β galactosidase	59±10	54±12	53±13	51±4	58±5	56±8	

As dados são médias de seis experimentos independentes realizados em duplicata. A atividade das enzimas foi expressa em nmoles4-MU/h/mg.proteína. *p< 0.01 (teste de Duncan). 4-MU = 4-metilumbeliferil

Tabela 2 – Efeito da dieta com *Sida carpinifolia* (28 dias) sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase em leucócitos de caprinos.

Enzimas	2 dias antes	Dieta com <i>Sida carpinifolia</i> (dias)					Dieta sem <i>Sida carpinifolia</i> (dias)
		5°	15°	20°	28°	30°	
α -manosidase	104±6	303±45*	338±38*	334±36*	326±16*	108±25	
β -manosidase	1,8±0,6	2,0±0,5	2,1±0,4	1,7±0,2	2,0±0,2	1,8±0,4	
β -galactosidase	68±2	57±3	68±13	79±3	59±5	63±4	

Os dados são medias de três experimentos independentes realizados em duplicata. A atividade das enzimas foi expressa em nmoles4-MU/h/mg.proteína. *p< 0.01 (teste de Duncan).

Tabela 3 – Efeito da dieta com *Sida carpinifolia* (28 dias) sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase em plasma de caprinos.

Enzimas	2 dias antes	Dieta com <i>Sida carpinifolia</i> (dias)			Dieta sem <i>Sida</i> <i>carpinifolia</i> (dias)
		4°	10°	28°	37°
α -manosidase	1274±104	769±167*	463±162*	615±144*	1289±163*
β -manosidase	33±8	34±6	29±2	30±3	28±5
β -galactosidase	16±2	17±3	13±6	16±1	18±4

Os dados são media de três experimentos independentes realizados em duplicata.

A atividade das enzimas foi expressa em nmoles4-MU/h/mg.proteína.*p< 0.01 (teste de Duncan).

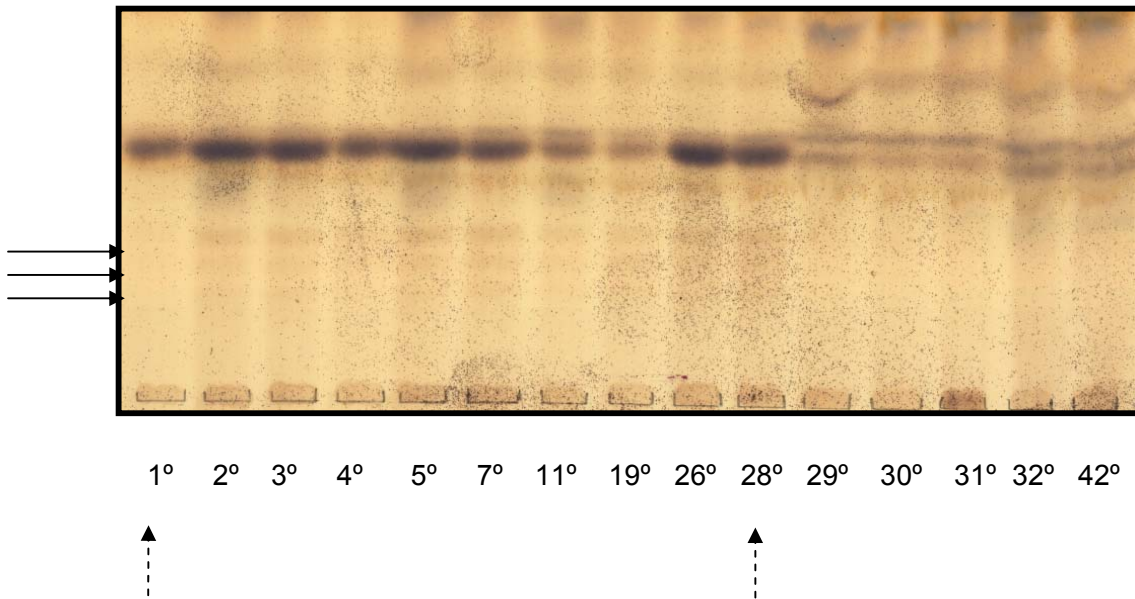


Figura 1: Cromatografia de camada delgada de OLS em urina de caprinos alimentados com *Sida carpinifolia* (94 e 28 dias). As setas contínuas horizontais indicam as bandas normalmente observadas em pacientes com α -manosidose humana. As setas descontínuas verticais indicam o início (dia 1) e a retirada (dia 28) da *Sida carpinifolia* da dieta dos animais.

Em ambos experimentos foram observadas mudanças nos sinais clínicos à partir do 10º dia após a exposição dos animais à dieta com *Sida carpinifolia*. No primeiro experimento, os sinais clínicos de doença neurológica iniciaram no 37º dia, caracterizados por movimentos lentos evoluindo para tremores musculares da cabeça e pescoço, ataxia cerebelar, hipermetria e dificuldade de permanecer em pé após a posição de decúbito. Os animais apresentaram olhar fixo e instabilidade no teste HR (levantar e soltar a cabeça rapidamente). Quando colocados em decúbito lateral, retornavam à estação (ficar em pé) somente com

ajuda. Os animais permaneciam a maior parte do tempo deitados, em posição de decúbito lateral ou esternal e apresentaram alterações intermitentes na consistência das fezes (líquidas ou pastosas), que persistiram por 2 ou 3 dias. Sete dias após a retirada da dieta com *Sida carpinifolia*, foi observada redução gradual nos sinais clínicos neurológicos, embora alterações discretas ainda persistiram por mais 30 dias. No segundo experimento, no qual os caprinos ingeriram a dieta com *Sida carpinifolia* durante 28 dias, não foram observados sinais neurológicos, porém no 25º dia após a exposição da planta, os animais demonstraram ligeira instabilidade quando induzidos ao teste RH, que persistiram até 4 dias após a retirada da planta da alimentação. Em ambos experimentos, foi observada excreção anormal de oligossacarídeos na urina, através da cromatografia de camada delgada a partir do 2º dia após a exposição à dieta, que persistiu até um dia após a retirada da planta. Em ambos experimentos, não observamos mudança na contagem sangüínea durante a exposição à dieta com *Sida carpinifolia* (figura 1).

DISCUSSÃO

O alcalóide swainsonine, encontrado em plantas do gênero *Swainsona* e identificado na planta *Sida carpinifolia* [9], é conhecido como agente que causa, em animais, condição similar à α -manosidose humana, com redução na atividade da α -manosidase ácida e acúmulo de oligossacarídeos na urina e tecidos

[15-18]. Em nossos experimentos, observamos que a exposição de caprinos a 94 e 28 dias à dieta com *Sida carpinifolia* aumenta em 2-4 vezes a atividade da α -manosidase em leucócitos, enquanto que a atividade da β -manosidase e da β -galactosidase não foram alteradas. No mesmo período experimental, a atividade da α -manosidase no plasma diminuiu em 1,5-2 vezes. Nossos dados concordam com Stegelmeier (1995, 1999) em bovinos e ovinos, e também por Locke (1980) em bovinos e por Crawley (1999) em suínos, animais ingeriram plantas que contém o alcalóide swainsonine [19-22]. Em Tulsiani (1983) a atividade da α -manosidase está aumentada no fígado e no cérebro de ratos que foram tratados com swainsonine [5]. A atividade diminuída da α -mannosidase no plasma de caprinos alimentados com dieta com *Sida carpinifolia* concorda com os achados de Bennet e Prencz no plasma de pacientes com α -manosidose [15,16]. A atividade da β -manosidase, β -galactosidase e β -glicuronidase não alterou durante o período experimental. As alterações observadas na atividade da α -manosidase em leucócitos iniciaram a partir do 5º dia e no plasma a partir do 4º dia. Com a interrupção do tratamento, os níveis da α -manosidase retornaram normal em 2 dias (leucócitos) e em 9 dias (plasma), demonstrando que a inibição da enzima pelo swainsonine é reversível. O aumento da atividade da α -manosidase em leucócitos e sua redução no plasma pode estar relacionado a formação de moléculas híbridas a partir do alcalóide swainsonine durante o mecanismo de formação das glicoproteínas. O alcalóide swainsonine presente na *Sida carpinifolia* é hidrossolúvel, sendo rapidamente absorvido pelas células e amplamente distribuído nos tecidos. No entanto, a estrutura modificada das glicoproteínas na membrana dos leucócitos pode estar

dificultando a saída da α -manosidase da célula [23]. A análise urinária demonstrou um modelo anormal de excreção de OLS a partir do 2º dia indicando que o acúmulo de oligossacarídeos na célula pode estar ocorrendo mesmo antes de ser detectada redução na atividade da α -manosidase. Estes estudos bioquímicos das conseqüências da dieta com *Sida carpinifolia* em caprinos nos indicam que este modelo pode ser usado em investigações relacionadas à α -manosidose humana.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado através da CNPq, CAPES, e GPPG-HCPA.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Driemeier D, Colodel EM, Gimeno EJ, Barros SS 2000 Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. *Vet Pathol* 37:153-159
- [2] Jolly RD, Slack PM, Winter PJ, Murphy CE 1980 Mannosidosis: patterns of storage and urinary excretion of oligosaccharides in the bovine model. *Aust J Exp Biol Med Sci* 58:421-428
- [3] Loretto AP, Colodel EM, Gimeno EJ, Driemeier D 2003 Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. *Equine Vet J* 35: 434-438
- [4] Molyneux RJ, James LF 1982 Loco intoxication: indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Science* 216:190-191
- [5] Tulsiani DR, Touster O 1983 Swainsonine, a potent mannosidase inhibitor, elevates rat liver and brain lysosomal alpha-D-mannosidase, decreases Golgi alpha-D-mannosidase II, and increases the plasma levels of several acid hydrolases. *Arch Biochem Biophys* 224:594-600
- [6] Gross V, Andus T, Tran-Thi TA, Schwarz RT, Decker K, Heinrich PC 1983 1-deoxynojirimycin impairs oligosaccharide processing of alpha 1-proteinase inhibitor and inhibits its secretion in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 258: 12203-12209

- [7] Dorling PR, Huxtable CR, Colegate SM 1980 Inhibition of lysosomal alpha-mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. *Biochem J* 191:649-651
- [8] Tulsiani DR, Harris TM, Touster O 1982 Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi mannosidase II. *J Biol Chem* 257: 7936-7939
- [9] Colodel EM, Gardner DR, Zlotowski P, Driemeier D 2002 Identification of swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. *Vet Hum Toxicol* 44:177-178
- [10] Thomas, G Disorders of Glycoprotein degradation: Alpha-Mannosidosis, Beta-Mannosidosis, Fucosidosis, and Sialidosis. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) 2001 McGraw-Hill New York. p. 3507-3533
- [11] Wottawa AKG, Altman H 1974 A method for the isolation of human and animal lymphocytes with Ficoll-Urografin. *Wiener Klin Wochenschr* 86:161-163
- [12] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- [13] Suzuki YSH, Oshima A Beta-Galactosidase Deficiency (beta-galactosidosis), GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) 2001 McGraw-Hill New York p. 2785-2823.
- [14] Beaudet AL, Diferrante NM, Ferry GD, Nichols BL 1975 Variation in the phenotypic expression of β -glucuronidase deficiency. *Pediatrics* 86:388-394

- [15] Prence EM, Natowicz MR 1992 Diagnosis of alpha-mannosidosis by measuring alpha-mannosidase in plasma. *Clin Chem* 38:501-503
- [16] Bennet JK, Dembure PP, Elsas LJ 1995 Clinical and biochemical analysis of two families with type I and type II mannosidosis. *Am J Med Genet* 55:21-26
- [17] Chester MA, Lundblad A, Öckerman P-A, Autio S Mannosidosis. In: Durand P and O'Brien JS (eds) Genetic Errors of Glycoprotein Metabolism Springer-Verlag Berlin 1982 p.89
- [18] Öckerman, P-A 1967 A generalized storage disorder resembling Hurler's syndrome. *Lancet* 2(239)
- [19] Stegelmeier BL, James LF, Panter KE, Molyneux RJ 1995 Serum swainsonine concentration and alpha-mannosidase activity in cattle and sheep ingesting *Oxytropis sericea* and *Astragalus lentiginosus* (locoweeds). *Am J Vet Res* 56:149-154
- [20] Locke KB, McEwan DR, Hamdorf IJ 1980 Experimental poisoning of horses and cattle with *Swainsona canescens*. *Aust Vet J* 56:379-383
- [21] Stegelmeier BL, James LF, Panter KE, Ralphs MH, Gardner DR, Molyneux RJ, Pfister JA 1999 The pathogenesis and toxicokinetics of locoweed (*Astragalus* and *Oxytropis spp.*) poisoning in livestock. *J Nat Toxins* 8:35-45
- [22] Crawley AC, Jones MZ, Bonning LE, Finnie JW, Hopwood JJ 1999 Alpha-mannosidosis in the guinea pig: a new animal model for lysosomal storage disorders. *Pediatr Res* 46:501-509

- [23] Stahl P, Six H, Rodman JS, Schlesinger P, Tulsiani DR, Touster O 1976
Evidence for specific recognition sites mediating clearance of lysosomal
enzymes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:4045-4049

PRIMEIRO ARTIGO EM INGLÊS

LYSOSOMAL ALPHA-MANNOSIDASE IN GOATS FED WITH *SIDA CARPINIFOLIA*

Marisete Bedin^{1,4}, Edson Moleta Colodel^{2,3}, Marli Viapiana¹, Christine Rachelle Prescendo Chaves¹, Ursula Matte¹, David Driemeier³, Roberto Giugliani^{1,4}.

¹ Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

² Department of Veterinary Pathology, Federal University of Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Brazil.

³ Department of Pathology, Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁴ Post graduate Course in Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Key-words: α -mannosidosis, swainsonine, *Sida carpinifolia*, lysosomal diseases, animal models.

Corresponding author:

Dra. Marisete Bedin

Medical Genetics Service, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350 CEP 90.035-003

Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 21018011 fax: +55 51 21018010

E-mail address: marisetebedin@yahoo.com.br

Article submitted to: Brazilian Journal of Medical and Biological Research

ABSTRACT

Human α -mannosidosis results from α -mannosidase deficiency and progressive accumulation of oligosaccharides rich in mannose in the lysosomes. In goat animal model, in the 5th day after introduction of the *Sida carpinifolia* diet, the α -mannosidase activity in leukocyte was significantly increased, returning to the normal levels 2 days after the withdrawal of the plant from the diet. The plasma α -mannosidase activity was analyzed, decreasing significantly 4 days after animal exposition to the *Sida carpinifolia* diet, returning to normal values 10 days after the withdrawing the plant from the diet. Activities of β -mannosidase and β -galactosidase in leukocytes did not show significant change, being similar for β -glucuronidase activity in plasma during animal exposition to the *Sida carpinifolia* diet. An abnormal excretion of oligosaccharides in urine TLC was observed from the 2nd day after the diet exposition, which persisted until one day after the withdrawal of the plant. Animals presented neurological clinical signs beginning in the 10th day after feeding the plant. The biochemical study of the consequences of the *Sida carpinifolia* diet in goats indicates that this model can be used in investigations related to human α -mannosidosis.

INTRODUCTION

The human disease α -mannosidosis results from deficiency of the enzyme α -mannosidase, leading to a gradual accumulation of rich oligosaccharide mannose in the lysosomes. The alkali swainsonine is known as agent causing "locoism", a neurological illness described in animals which has the same characteristics of human α -mannosidosis [1-5]. Swainsonine is a powerful inhibitor lysosomal α -mannosidase (E.C. 3.2.1.24) and mannosidase II of the Golgi [6-8]. This alkali was isolated and identified as a constituent of the plant *Sida carpinifolia* [9]. Goats and equine that naturally and experimentally ingested this plant presented clinical signals of the neurological illness and vacuolization in liver, pancreas and acinar cells and neurons, mainly in Purkinje cells [1,3]. The neurological dysfunction is the main characteristic of human α -mannosidosis [10], however the physiopathology of the individuals affected by this illness is still poorly understood. The aim of this work was to characterize a possible animal model to human α -mannosidosis, through biochemical studies of α -mannosidase in leukocytes, plasma and oligosaccharides (OLS) in urine of goats fed with *Sida carpinifolia* diet.

MATERIALS AND METHODS

EXPERIMENTAL ANIMALS

Two trials were carried out. The first trial included 6 male goats of *Saanen* race with 7 months \pm 10 days of age and the second, 3 female goats of *Saanen* race with 4 months \pm 15 days of age. The animals were force fed with 500 g of *Sida carpinifolia* daily, for 94 days (in the first trial) or 28 days (in the second trial). Animals received also commercial feeding to complement dietary needs and had free access to water. Clinical signals were accessed during all experimental period and blood counts were made every week. The protocol to animals was approved by the Research and Post-Graduation Committee of the Porto Alegre Clinical Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil.

SAMPLES

Urine samples were collected and kept at -20°C to be analyzed by oligosaccharides thin-layer chromatography (TLC). Blood samples were collected in heparinized vials and kept at $2-8^{\circ}\text{C}$ for leukocytes isolation. Plasma was obtained from blood centrifugation ($400 \times g/10 \text{ min}$) and kept at -20°C .

LEUKOCYTE ISOLATION

Leukocytes were isolated according to Wottawa (1974) [11]. For each sample, 5ml of total volume blood were diluted with 5ml of PBS (phosphate buffer saline). Using a Pasteur pipette, 5ml of diluted blood sample were carefully transferred to a clean centrifuge tube, on 1.5ml Ficoll-Paque. The samples were centrifuged at 400 x g for 35 minutes at 20°C. Using a Pasteur pipette the leukocytes layer was removed on interface between Ficoll-Paque and plasma. Leukocytes were washed with 5ml PBS and centrifuged at 100 x g for 10 minutes at 20°C. To remove the excess of erythrocytes it was added 1ml balanced salt solution and a final centrifugation (100 x g for 10 minutes at 20°C) was performed. Protein concentration was determined by the method of Lowry et al [12].

ENZYME ASSAYS

All reagents and substrates were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Activities of α -mannosidase and β -mannosidase were determined with the fluorogenic substrates 4-methylumbelliferyl- α -L-mannopiranoside and 4-methylumbelliferyl- β -L-mannopiranoside, respectively. For assay, 20 μ l of the

leukocytes, previously diluted in water, and 20 μl of the plasma sample, were mixed with 100 μl of a 2mM solution of specific substrate in 0.2M sodium acetate buffer, pH 4.0. β -galactosidase activity was assayed by the method of Suzuki (2001) [13] using 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside as substrate. The assay mixture contained 200 μL of substrate at 1.33mM dissolved in 0.1M citrate-phosphate buffer, 100 μL of sodium chloride 0.2M and 100 μL of leukocytes previously diluted in 0.9% sodium chloride. β -Glicuronidase activity was assayed by the method of Beaudet et al. [14]. Plasma (30 μL) was incubated in an assay mixture contained 50 μL of 4-methylumbelliferyl- β -D-glicuronide 2mM and dissolved in sodium acetate buffer 0.5M pH 3.0. All reactions were incubated for 1 hour at 37°C and stopped with 1.5mL of 0.5M glycine-NaOH buffer pH 10.3. The protein content of leukocytes was between 15 and 30mg of protein. Fluorescence was read with a Hitachi F-2000 spectrofluorometer (excitation and emission wave-length of 365 and 450nm, respectively).

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC) OF OLIGOSACCHARIDES (OLS)

All solvents were of analytical grade and supplied by Merck (Darmstadt, Germany). The samples were spotted 10 mm from the bottom edge of the plate, in the form of bands 8 mm width, with a Hamilton microlitre syringe on

silica gel aluminum plate H-60. Plates developments two linear ascendant carried out trough horizontal glass chamber saturated with the mobile phase, witch consisted of butane–acetic acid–water (2:1:1, v/v/v). Between subsequent developments, plates were dried in a current of air with an air dryer for help. Developed plates were sprayed with orcinol 0.2% in H₂SO₄ 20% and heated for 10 min at 250°C in an oven.

STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed by 1-way ANOVA, followed by the Duncan multiple range test, when the *F* test was significant. The analysis was performed using the statistical software pack-age SPSS/PC1, version 11.0 Chicago, IL, USA), and the level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

In the day before the experiment, which goats were still not fed with the *Sida carpinifolia*, α -mannosidase activity in leukocytes was 128 ± 28 nmoles4-MU/h/mg.protein in the first trial (table 1), and 104 ± 6 nmoles4-MU/h/mg.protein in the second (table 2). After animals were fed with the *Sida carpinifolia*, α -mannosidase activity remained in these values until the 4th day, in both trials. In the 5th day after the introduction of the *Sida carpinifolia* diet, the activity of enzyme was significantly increased in the first (288 ± 13 nmoles4-MU/h/mg.protein) as in the second trial (303 ± 45 nmoles4-MU/h/mg.protein), returning to the normal levels 2 days after the withdrawal of the plant from the diet (114 ± 7 nmoles4-MU/h/mg.protein, in first trial, and 108 ± 25 nmoles4-MU/h/mg.protein, in the second). The plasma α -mannosidase activity was analyzed in the second trial (table 3), having a significant decrease 4 days after animal exposition to the *Sida carpinifolia* diet (769 ± 167 nmoles4-MU/h/ml) and returning to normal values 9 days after withdrawal of diet. Activities of β -mannosidase and β -galactosidase in leukocytes did not show significant change (tables 1 and 2) as β -glucuronidase activity in plasma (table 3) which also remained unchanged during animal exposition to the *Sida carpinifolia* diet.

Table 1 – Long term effect of *Sida carpinifolia* diet on α -mannosidase, β -mannosidase, and β -galactosidase activities in goat leukocytes.

Enzymes	2 days before	Diet with <i>Sida carpinifolia</i> (days)				Diet without <i>Sida carpinifolia</i> (days)
		5 th	40 th	60 th	94 th	96 th
α -mannosidase	128±28	288±13*	533±103*	427±101*	369±96*	114±7
β -mannosidase	1.9±0.6	1.7±0.4	1.7±0.3	2.8±0.8	1.9±0.7	2.1±0.5
β -galactosidase	59±10	54±12	53±13	51±4	58±5	56±8

Data are mean for six independent experiments performed in duplicate. Enzyme activity expressed in nmoles4-MU/h/mg.protein.*p< 0.01 (Duncan's multiple range test). 4-MU = 4-methylumbeliferil

Table 2 – Short term effect of *Sida carpinifolia* diet on α -mannosidase, β -mannosidase, and β -galactosidase activities in goat leukocytes.

Enzymes	2 days before	Diet with <i>Sida carpinifolia</i> (days)				Diet without <i>Sida carpinifolia</i> (days)
		5 th	15 th	20 th	28 th	30 th
α -mannosidase	104±6	303±45*	338±38*	334±36*	326±16*	108±25
β -mannosidase	1.8±0.6	2.1±0.5	2.1±0.4	1.7±0.2	2.0±0.2	1.8±0.4
β -galactosidase	68±2	57±3	68±13	79±3	59±5	63±4

Data are mean for three independent experiments performed in duplicate. Enzyme activity expressed in nmoles4-MU/h/mg.protein.*p< 0.01 (Duncan's multiple range test).

Table 3 – Short term effect of *Sida carpinifolia* diet on α -mannosidase, β -mannosidase, and β -galactosidase activities in goat plasma.

Enzymes	2 days before	Diet with <i>Sida carpinifolia</i> (days)			Diet without <i>Sida carpinifolia</i> (days)
		4 th	10 th	28 th	37 th
α -mannosidase	1274 \pm 104	769 \pm 167*	463 \pm 162*	615 \pm 144*	1289 \pm 163*
β -mannosidase	33 \pm 8	34 \pm 6	29 \pm 2	30 \pm 3	28 \pm 5
β -galactosidase	16 \pm 2	17 \pm 3	13 \pm 6	16 \pm 1	18 \pm 4

Data are mean for three independent experiments performed in duplicate. Enzyme activity expressed in nmoles4-MU/h/mg.protein.*p< 0.01 (Duncan's multiple range test).

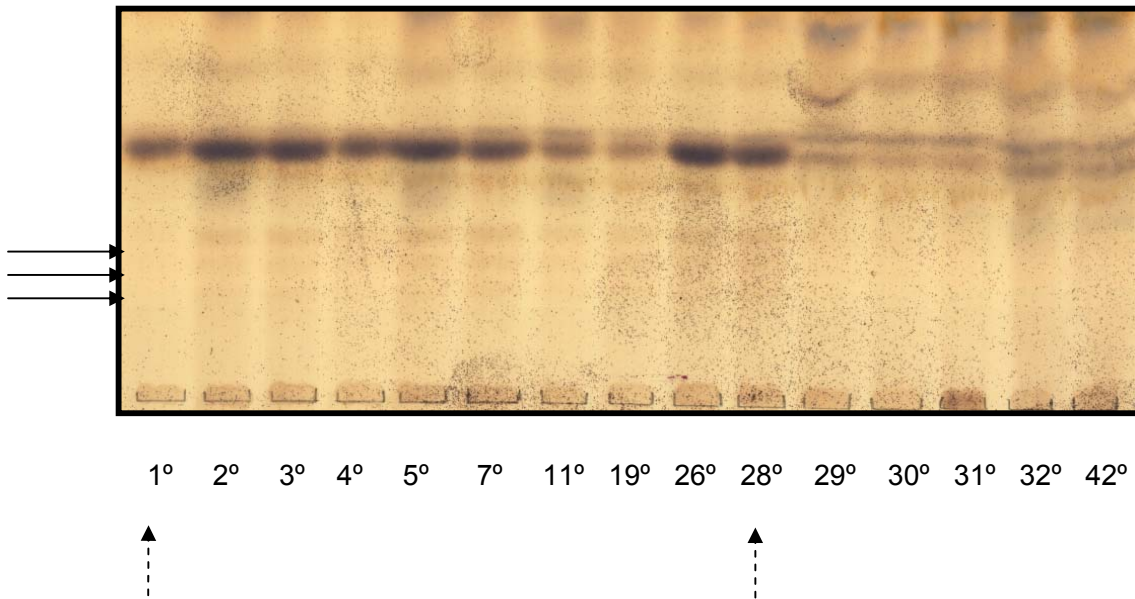


Figure 1: Thin layer chromatography of OLS in urine of goats fed with *Sida carpinifolia* (94 and 28 days). The horizontal continuous arrows indicate the bands normally observed in patients with human α -mannosidosis. The vertical discontinuous arrows indicate begin (day 1) and withdrawal (day 28) of the *Sida carpinifolia* diet from animals.

In both trials, clinical pictures were observed from the 10th day after animal exposition to the *Sida carpinifolia* diet. In the first trial, in the 37th day, began neurological clinical signs characterized by slow movements evolving to muscular tremors of head and neck, cerebellar ataxia, hypermetria and difficulty to get up after decubitus position. Animals presented fixed gaze, instability on the HR test (raise and free the head quickly). When placed in lateral decubitus position, they had difficulty in sains back the station, standing again only with aid. Animals remaining

most of the time lying in esternal or lateral decubitus position and had presented intermittent alterations in the consistency of feces (liquid or soft), that persisted for 2 and 3 days. Seven days after withdrawal of the *Sida carpinifolia* diet, it was noticed gradual reduction of the clinical signals, although discrete alterations had still persisted for more 30 days. In the second trial, in which goats ingested *Sida carpinifolia* diet during 28 days, neurological signs were not observed, but in the 25th day after the exposition to the plant, animals had demonstrated light instability, when induced to HR test, that persisted up to 4 days after withdrawal of the plant from feeding. In both trials, an abnormal excretion of oligosaccharides on urinary TLC was observed from the 2nd day after the diet exposition, which persisted until one day after withdrawal of the plant. In both trials, we did not observed changes alteration in the blood counts during the exposition of the *Sida carpinifolia* diet (figure 1).

DISCUSSION

The alkali swainsonine, found in plants of the *Swainsona* genus and identified in the *Sida carpinifolia* plant [9], has been known as an agent that could cause a condition similar to human α -mannosidosis in animals, with reduction in acid α -mannosidase activity and accumulation of oligosaccharides in urine and tissues [15-18]. In our experiments, we observed that the exposition of goats to 94 and 28 days to the *Sida carpinifolia* diet increased 2-4 times the α -mannosidase activity in leukocytes while β -mannosidase and β -galactosidase activities were not

affected. In the same experimental period, α -mannosidase activity in the plasma diminished 1.5-2 times. Our data agree with Stegelmeier (1995, 1999) in bovines and ovine, and also by Locke (1980) in bovines and by Crawley (1999) in swines, animals which ingested plants that contained the swainsonine alkali [19-22]. In Tulsiani (1983) the α -mannosidase activity increased in the liver and in the brain of rats that were made treatment with swainsonine [5]. The diminished α -mannosidase plasma activity in goats fed with *Sida carpinifolia* diet is in accordance with the findings of Bennet and Prenc in plasma of patients with α -mannosidosis [15,16]. The β -mannosidase, β -galactosidase and β -glucuronidase activities had not changed during the experimental period. The alterations observed in α -mannosidase activity in leukocytes were from day 5 and in plasma from day 4. With the interruption of the treatment, the α -mannosidase activity returned to normal levels in two days (leukocytes) and in 9 days (plasma), demonstrating that the inhibition of the enzyme by swainsonine is reversible. The increased α -mannosidase activity in leukocytes and its reduction in the plasma can be related to the hybrid molecule formation from swainsonine alkali in the mechanism of glycoproteins formation. The swainsonine alkali present in *Sida carpinifolia* is hydro soluble and is quickly absorbed by the cells and widely distributed in tissues. However, the modified structure of the glycoprotein in leukocyte membrane can make difficult to α -mannosidase exit the cell [23]. Urine analysis showing abnormal pattern of OLS excretion from day 2 indicates that accumulation of oligosaccharides in cell may occur even before a reduction in α -mannosidase activity is detected. This biochemical study of the consequences of

Sida carpinifolia diet in goats indicates that this model can be used in investigations related to human α -mannosidosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Brazilian funds CNPq, CAPES, and GPPG-HCPA.

BIBLIOGRAPHY

- [1] Driemeier D, Colodel EM, Gimeno EJ, Barros SS 2000 Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. *Vet Pathol* 37:153-159
- [2] Jolly RD, Slack PM, Winter PJ, Murphy CE 1980 Mannosidosis: patterns of storage and urinary excretion of oligosaccharides in the bovine model. *Aust J Exp Biol Med Sci* 58:421-428
- [3] Loretto AP, Colodel EM, Gimeno EJ, Driemeier D 2003 Lysosomal storage disease in *Sida carpinifolia* toxicosis: an induced mannosidosis in horses. *Equine Vet J* 35: 434-438
- [4] Molyneux RJ, James LF 1982 Loco intoxication: indolizidine alkaloids of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Science* 216:190-191
- [5] Tulsiani DR, Touster O 1983 Swainsonine, a potent mannosidase inhibitor, elevates rat liver and brain lysosomal alpha-D-mannosidase, decreases Golgi alpha-D-mannosidase II, and increases the plasma levels of several acid hydrolases. *Arch Biochem Biophys* 224:594-600
- [6] Gross V, Andus T, Tran-Thi TA, Schwarz RT, Decker K, Heinrich PC 1983 1-deoxynojirimycin impairs oligosaccharide processing of alpha 1-proteinase inhibitor and inhibits its secretion in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biol Chem* 258: 12203-12209

- [7] Dorling PR, Huxtable CR, Colegate SM 1980 Inhibition of lysosomal alpha-mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. *Biochem J* 191:649-651
- [8] Tulsiani DR, Harris TM, Touster O 1982 Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi mannosidase II. *J Biol Chem* 257: 7936-7939
- [9] Colodel EM, Gardner DR, Zlotowski P, Driemeier D 2002 Identification of swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. *Vet Hum Toxicol* 44:177-178
- [10] Thomas, G Disorders of Glycoprotein degradation: Alpha-Mannosidosis, Beta-Mannosidosis, Fucosidosis, and Sialidosis. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) 2001 McGraw-Hill New York. p. 3507-3533
- [11] Wottawa AKG, Altman H 1974 A method for the isolation of human and animal lymphocytes with Ficoll-Urografin. *Wiener Klin Wochenschr* 86:161-163
- [12] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- [13] Suzuki YSH, Oshima A Beta-Galactosidase Deficiency (beta-galactosidosis), GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) 2001 McGraw-Hill New York p. 2785-2823.
- [14] Beaudet AL, Diferrante NM, Ferry GD, Nichols BL 1975 Variation in the phenotypic expression of β -glucuronidase deficiency. *Pediatrics* 86:388-394

- [15] Prencz EM, Natowicz MR 1992 Diagnosis of alpha-mannosidosis by measuring alpha-mannosidase in plasma. *Clin Chem* 38:501-503
- [16] Bennet JK, Dembure PP, Elsas LJ 1995 Clinical and biochemical analysis of two families with type I and type II mannosidosis. *Am J Med Genet* 55:21-26
- [17] Chester MA, Lundblad A, Öckerman P-A, Autio S Mannosidosis. In: Durand P and O'Brien JS (eds) Genetic Errors of Glycoprotein Metabolism Springer-Verlag Berlin 1982 p.89
- [18] Öckerman, P-A 1967 A generalized storage disorder resembling Hurler's syndrome. *Lancet* 2(239)
- [19] Stegelmeier BL, James LF, Panter KE, Molyneux RJ 1995 Serum swainsonine concentration and alpha-mannosidase activity in cattle and sheep ingesting *Oxytropis sericea* and *Astragalus lentiginosus* (locoweeds). *Am J Vet Res* 56:149-154
- [20] Locke KB, McEwan DR, Hamdorf IJ 1980 Experimental poisoning of horses and cattle with *Swainsona canescens*. *Aust Vet J* 56:379-383
- [21] Stegelmeier BL, James LF, Panter KE, Ralphs MH, Gardner DR, Molyneux RJ, Pfister JA 1999 The pathogenesis and toxicokinetics of locoweed (*Astragalus* and *Oxytropis spp.*) poisoning in livestock. *J Nat Toxins* 8:35-45
- [22] Crawley AC, Jones MZ, Bonning LE, Finnie JW, Hopwood JJ 1999 Alpha-mannosidosis in the guinea pig: a new animal model for lysosomal storage disorders. *Pediatr Res* 46:501-509

- [23] Stahl P, Six H, Rodman JS, Schlesinger P, Tulsiani DR, Touster O 1976
Evidence for specific recognition sites mediating clearance of lysosomal
enzymes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:4045-4049

SEGUNDO ARTIGO EM PORTUGUÊS

EFEITO DO SWAINSONINE SOBRE CULTURA DE FIBROBLASTOS DE CAPRINOS

Marisete Bedin^{1,4}, Edson Moleta Colodel^{2,3}, Cristina Kath¹, Marli Viapiana¹, Jurema de Mari¹, Ursula Matte¹, David Driemeier³, Roberto Giugliani^{1,4}

¹Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

²Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Brasil

³Departamento de Patologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

⁴Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Palavras-chave: α -manosidose, fibroblastos, swainsonine, *Sida carpinifolia*

Endereço do autor:

Dra. Marisete Bedin

Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350 CEP 90.035-003

Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55 51 21018011; fax: +55 51 21018010

Endereço eletrônico: marisetebedin@yahoo.com.br

Artigo submetido para: Clinica Chimica Acta

RESUMO

Introdução: A ingestão de dieta com *Sida carpinifolia* por caprinos causa doença neurológica conhecida como "locoísmo", caracterizada por ataxia muscular, hipermetria, hiperestesia e tremores na cabeça e pescoço. O alcalóide swainsonine é inibidor específico da enzima lisossomal α -manosidase, enzima deficiente na doença genética humana α -manosidose e foi identificado como constituinte tóxico da *Sida carpinifolia*. Neste trabalho, nós investigamos o efeito *in vivo* da dieta com *Sida carpinifolia* e o efeito *in vitro* do swainsonine em cultura de fibroblastos de caprinos sobre a atividade da α -manosidase. **Material e Método:** O estudo consistiu de seis caprinos fêmeas que ingeriram 500 g diárias de *Sida carpinifolia* durante 28 dias. Os fibroblastos foram obtidos de biopsias a partir da pele de caprinos e cultivados com meio de cultura HAM-F10 contendo 10% de soro bovino fetal. Para os estudos *in vivo*, as biopsias foram obtidas 02 dias antes e, 07, 14 e 28 dias após a ingestão de *Sida carpinifolia* e 8 dias após a retirada da planta da dieta. Para os estudos *in vitro*, os fibroblastos foram cultivados 48 horas em concentrações de swainsonine de 0,02, 0,2, 2,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$. **Resultados:** Nós observamos alterações neurológicas discretas nos animais, que iniciaram entre a primeira e a segunda semana de consumo de *Sida carpinifolia*. A atividade da α -manosidase em cultura de fibroblastos de caprinos aumentou significativamente a partir do 14º dia após o consumo da dieta com *Sida carpinifolia*, permanecendo alterada até o final do

experimento. No 8º dia após a retirada da dieta com *Sida carpinifolia*, a atividade da α -manosidase permaneceu nos níveis normais. Em fibroblastos de caprinos cultivados com swainsonine nas concentrações de 2,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$, a atividade da α -manosidase reduziu 52 e 72 por cento, respectivamente, em relação ao controle.

Conclusão: O alcalóide swainsonine adicionado à cultura de fibroblastos de caprinos parece reproduzir a doença hereditária humana α -manosidose. No entanto, a concentração de swainsonine presente na *Sida carpinifolia* provocou efeito contrário sobre a α -manosidase. Os resultados estimam que a planta pode conter substâncias que não são restritas somente à inibição da atividade da α -manosidase, mas capazes de compensar o efeito inibitório e modificar a ação do swainsonine sobre a enzima, ou mesmo impossibilitar o tráfego da enzima na célula.

INTRODUÇÃO

A ingestão de *Sida carpinifolia* por caprinos causa doença neurológica, conhecida como "locoísmo" e caracterizada por ataxia, hipermetria, hiperestesia e tremores musculares na cabeça e no pescoço e pela presença de vacúolos nas células [1] com sintomas similares à doença genética humana α -manosidose [2]. As características clínicas e patológicas desta doença em caprinos

que ingeriram *Sida carpinifolia* são similares aos animais que ingeriram plantas do gênero *Swainsona*, *Oxytropis*, *Astragalus* e *Ipomoea* [3-5]. O swainsonie é o mesmo alcalóide encontrado nas plantas do gênero *Swainsona* *cenescens* [6] e foi identificado como constituinte tóxico da *Sida carpinifolia*, planta perene encontrada no Sul do Brasil [7]. O swainsonine bloqueia o processamento de glicoproteínas complexas [8] e leva ao aumento de oligossacarídeos ricos em manose na urina e nos tecidos [9]. Neste trabalho, nós investigamos o efeito *in vivo* da dieta com *Sida carpinifolia* e o efeito *in vitro* do swainsonine em cultura de fibroblastos de caprinos sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase.

MATERIAL E MÉTODO

Os substratos 4-metilumbeliferil- α -L-manopiranosídeo, 4-metilumbeliferil- β -L-manopiranosídeo, 4-metilumbeliferil- β -D-galactosídeo e swainsonine sintético foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA), o fosfato sódico e o citrato, da Merck (Darmstadt, Germany) e os reagentes e os meios de cultura da Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).

ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O estudo experimental consistiu de seis caprinos fêmeas com 4 meses de idade da raça *Saanen* originários de uma fazenda livre de *Sida carpinifolia*. Os caprinos foram forçados a ingerir 500g diárias de *Sida carpinifolia* durante 28 dias. A alimentação dos animais foi complementada com ração comercial e água *ad libitum*. Os sinais clínicos foram monitorados durante todo período experimental e a contagem sangüínea foi realizada semanalmente. O experimento foi ética e cientificamente aprovado pelo Comitê de Pesquisa e de Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

CULTURA DE FIBROBLASTOS DE CAPRINOS

Para o estudo *in vivo*, as biopsias de caprinos foram obtidas 02 dias antes e, 7, 14 e 28 dias após a ingestão de dieta com *Sida carpinifolia* e 8 dias após a retirada da planta da dieta. As biopsias (fragmentos de aproximadamente 1,0 x 0,5cm) foram coletadas alternativamente, na arte superior e medial das orelhas,

previamente lavadas com água corrente e detergente neutro e desinfetadas com solução de álcool-iôdo a 5%. A área dicotomizada foi pressionada com gaze estéril e os caprinos receberam aplicação de antibiótico e repelente. As amostras foram transferidas para um frasco estéril contendo meio de cultura HAM-F10 adicionado ao soro bovino fetal (SBF). Quando as culturas atingiram confluência foram removidas com tripsina-EDTA e adicionadas a dois frascos contendo meio de cultura HAM-F10 suplementado com SBF 10% e lavadas três vezes com tampão sódio-fosfato. Após a centrifugação, o pelet contendo as células foi guardado em freezer -40°C até a determinação do conteúdo protéico e atividade enzimática. Para os estudos *in vitro*, os fibroblastos foram cultivados por 48 horas com concentração de swainsonine de 0,02, 0,2, 2,0 e 5,0 µg/mL [10].

ANÁLISE DA α -MANOSIDASE, β -MANOSIDASE E β -GALACTOSIDASE

As atividades da α -manosidase e β -manosidase foram determinadas usando os substratos fluorogênicos 4-metilumbeliferil- α -L-manopiranosídeo and 4-metilumbeliferil- β -L-manopiranosídeo, respectivamente. Para os ensaios, foram misturados 20µl de fibroblastos previamente diluídos em água com 100µl da respectiva solução do substrato 2mM em tampão fosfato-citrato 0,2 M, pH 4.0 a 37°C por 1 hora. A atividade da β -galactosidase foi analisada pelo

método de Suzuki [11] usando 4-metilumbeliferil- β -D-galactosídeo como substrato. O conteúdo protéico dos leucócitos foi ajustado entre 15–30 mg. Para o ensaio, os fibroblastos foram previamente diluídos em solução de cloreto de sódio 0,9% e, 100 μ L foram misturados com 200 μ L da solução do substrato 1,33mM em tampão fosfato-citrato 0,1M, pH 4,0 e 100 μ L de solução de cloreto de sódio 0,2M a 37 °C por 1 hora. A reação foi interrompida com 3mL de tampão glicina-NaOH 0,5M, pH 10,3. A fluorescência foi lida com espectrofluorômetro Hitachi F-2000 (comprimento de onda de excitação e emissão de 365 e 450nm, respectivamente). O conteúdo protéico foi determinado pelo método de Lowry et al [12].

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo teste estatístico ANOVA, seguido pelo teste de Duncan quando o teste F foi significativo. A análise foi realizada usando o software estatístico SPSS/PC1, versão 11.0 Chicago, IL, USA, e o nível de significância usado foi $p < 0.01$.

RESULTADOS

Tabela 1: Efeito *in vivo* da dieta com *Sida carpinifolia* em cultura de fibroblastos de caprinos sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase.

Enzimas	Dois dias antes	Dieta com <i>Sida carpinifolia</i> (dias)				Dieta sem <i>Sida carpinifolia</i> (dias)
		7°	14°	28°	8°	
α -manosidase	76±22	78±7	106±6*	148±36*	83±12	
β -manosidase	1,1±0,1	0,7±0,5	1,3±0,2	0,9±0,1	0,9±0,2	
β -galactosidase	254±29	204±11	283±12	260±48	235±13	

Os dados são media para seis experimentos independentes realizados em triplicata.

A atividade enzimática foi expressa em in nmoles4-MU/h/mg.proteína.*p< 0.01 (teste de Duncan). 4-MU = 4-metilumbeliferona

Tabela 2: Efeito *in vitro* do swainsonine em cultura de fibroblastos de caprinos sobre a atividade da α -manosidase, β -manosidase e β -galactosidase.

Enzimas	Swainsonine (μ g/mL)				
	0,0	0,02	0,2	2,0	5,0
α -manosidase	74±2	64±11	72±5	35±5*	21±6*
β -manosidase	1,1±0,1	1,2±0,3	0,9±0,1	1,1±0,05	1±0,3
β -galactosidase	229±17	226±19	246±18	245±19	225±26

Os dados são média de seis experimentos independentes realizados em triplicata. A atividade enzimática foi expressa em nmoles4-MU/h/mg.proteína.*p< 0.01 (teste de Duncan).

O quadro clínico dos caprinos variou durante a fase experimental de consumo da dieta com *Sida carpinifolia* e foi caracterizado por alterações nos excrementos, redução do peso e principalmente por sinais clínicos neurológicos. As alterações clínicas neurológicas foram discretas e iniciaram entre a primeira e a segunda semana do consumo da dieta com *Sida carpinifolia* e consistiram de depressão aparente, olhar fixo e movimentos lentos. A contagem sangüínea não apresentou mudança significativa durante todo período experimental. A atividade da α -manosidase em cultura de fibroblastos de caprinos aumentou significativamente a partir do 14º dia após o consumo da dieta com *Sida carpinifolia*, permanecendo modificada até o final do experimento. No 8º dia após a retirada da dieta com *Sida carpinifolia*, a atividade da α -manosidase voltou aos níveis normais (83 ± 54 MU/h/mg.proteína) (tabela 1). No entanto, a atividade da α -manosidase em cultura de fibroblastos de caprino com swainsonine nas concentrações de 2,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ ($1,15 \times 10^{-8}\text{mM}$ e $2,88 \times 10^{-8}\text{mM}$) reduziu 52e 72 por cento, respectivamente, em relação ao controle(tabela 2). As atividades da β -manosidase e β -galactosidase não apresentaram alteração em ambos experimentos (tabela 1 e 2).

DISCUSSÃO

O swainsonine é inibidor específico da α -manosidase [13] e a *Sida carpinifolia* contém swainsonine em concentração de 0,006% de seu peso seco [7]. Em nosso laboratório, em caprinos alimentados com dieta com *Sida carpinifolia*, a atividade da α -manosidase diminuiu no plasma (dados não publicados). A atividade da α -manosidase reduziu em cultura de fibroblastos de caprinos nas concentrações de swainsonine de 2,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ ($1,15 \times 10^{-8}\text{mM}$ e $2,88 \times 10^{-8}\text{mM}$) e aumentou em cultura de fibroblastos de caprinos que foram alimentados com dieta com *Sida carpinifolia* durante 14 e 28 dias. Em nosso trabalho, o alcalóide swainsonine adicionado à cultura de fibroblastos de caprinos parece mimetizar a doença hereditária humana α -manosidose, concordando com Ikeda (2003) em linfoblastos humanos [14]. No entanto, a concentração de swainsonine presente na *Sida carpinifolia* provocou efeito contrário ao esperado em fibroblastos. O efeito do swainsonine parece restringir não somente a inibição da α -manosidase, sendo capaz de interferir na glicosilação de macromoléculas de importante papel no reconhecimento celular e induzir à formação de glicoproteínas híbridas, como em fibroblastos humanos [15]. Ao mesmo tempo, os resultados da cultura de fibroblastos em caprinos alimentados com dieta com *Sida carpinifolia* estimam que

ela possui substâncias que, quando metabolizadas pelo organismo, podem compensar o efeito inibitório do swainsonine sobre a α -manosidase. Por outro lado, é possível que a modificação de glicoproteínas, induzida pelo swainsonine presente na *Sida carpinifolia* possa estar modificando o tráfego e o processamento da α -manosidase. Isto explicaria o porquê, apesar do aumento significativo na atividade enzimática da α -manosidase em leucócitos e fibroblastos, ocorre acúmulo de oligossacarídeos na urina (dados não publicados) e sinais clínicos de doença neurológica. Para esta hipótese seriam necessários estudos de sub-fracionamento celular em cultura de fibroblastos de caprinos alimentados com dieta com *Sida carpinifolia*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado através de verbas dos fundos brasileiros CNPq, CAPES e GPPG-HCPA.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Driemeier D, Colodel EM, Gimeno EJ, Barros SS 2000 Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. *Vet Pathol* 37(2):153-159
- [2] Öckerman, P-A 1967 A generalized storage disorder resembling Hurler's syndrome. *Lancet* 2(239)
- [3] Locke KB, McEwan DR, Hamdorf IJ 1980 Experimental poisoning of horses and cattle with *Swainsona canescens* var *horniana*. *Aust Vet J.* 56(8):379-383
- [4] Damir HA, Adam SE, Tartour G 1987 The effects of *Ipomoea carnea* on goats and sheep. *Vet Hum Toxicol* 29(4):316-319
- [5] Stegelmeier BL, James LF, Panter KE, Molyneux RJ 1995 Serum swainsonine concentration and alpha-mannosidase activity in cattle and sheep ingesting *Oxytropis sericea* and *Astragalus lentiginosus* (locoweeds). *Am J Vet Res* 56(2): 149-154
- [6] Dorling PR, Huxtable CR, Colegate SM 1980 Inhibition of lysosomal alpha-mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. *Biochem J* 191(2):649-651
- [7] Colodel EM, Gardner DR, Zlotowski P, Driemeier D 2002 Identification of swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. *Vet Hum Toxicol.* 44(3):177-178

- [8] Elbein AD, Solf R, Dorling PR, Vosbeck K 1981 Swainsonine: an inhibitor of glycoprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12):7393-7397
- [9] Elbein AD, Dorling PR, Vosbeck K, Horisberger M 1982 Swainsonine prevents the processing of the oligosaccharide chains of influenza virus hemagglutinin. *J Biol Chem* 257(4):1573-1576
- [10] Coelho JC, Giugliani R 2000 Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases: technical recommendations. *Genet Mol Biol* 23: 269–271
- [11] Suzuki YSH, Oshima A Beta-Galactosidase Deficiency (beta-galactosidosis), GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) 2001 McGraw-Hill New York p. 2785-2823
- [12] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275
- [13] Opheim DJ, Touster O 1978 Lysosomal alpha-D-mannosidase of rat liver. Purification and comparison with the golgi and cytosolic alpha-D-mannosidases. *J Biol Chem* 253(4):1017-1023
- [14] Ikeda K, Kato A, Adachi I, Haraguchi M, Asano N 2003 Alkaloids from the poisonous plant *Ipomoea carnea*: effects on intracellular lysosomal glycosidase activities in human lymphoblast cultures. *J Agric Food Chem* 51(26):7642-7646

- [15] Tulsiani DR, Touster O 1983 Swainsonine causes the production of hybrid glycoproteins by human skin fibroblasts and rat liver Golgi preparations. *J Biol Chem* 258(12)7578-7585

SEGUNDO ARTIGO EM INGLÊS

SWAINSONINE EFFECT ON FIBROBLASTS CULTURE FROM GOATS

Marisete Bedin^{1,4}, Edson Moleta Colodel^{2,3}, Cristina Kath¹, Marli Viapiana¹, Jurema de Mari¹, Ursula Matte¹, David Driemeier³, Roberto Giugliani^{1,4}.

¹ Medical Genetics Service, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

² Department of Veterinary Pathology, Federal University of Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Brazil.

³ Department of Pathology, Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

⁴ Post graduate Course in Medical Sciences, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

Key-words: α -mannosidosis, fibroblasts, swainsonine, *Sida carpinifolia*

Corresponding author:

Dra. Marisete Bedin

Medical Genetics Service, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350 CEP 90.035-003

Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 21018011; fax: +55 51 21018010

E-mail address: marisetebedin@yahoo.com.br

Article submitted to: Clinica Chimica Acta

ABSTRACT

Introduction: Ingestion of *Sida carpinifolia* diet for goats cause neurological illness known as "locoism", characterized for muscular ataxia, hipermetria, hiperestesia and tremors in the head and neck. The alkali swainsonine is specific inhibitor of lysosomal α -mannosidase, deficient enzyme in human genetic illness α -mannosidosis and it was identified as a toxic constituent of the *Sida carpinifolia*. In this work, we investigated *in vivo* effect of *Sida carpinifolia* diet and *in vitro* effect of swainsonine in goat fibroblasts culture on α -mannosidase activity. **Material and Methods:** The study consisted of three female goats force fed with 500 g of *Sida carpinifolia* daily for 28 days. Fibroblasts were obtained from skin biopsy goats and cultured with HAM-F10 medium containing 10% fetal bovine serum. For *in vivo* study, biopsies were obtained two days before and, seven, fourteen and twenty eight days after ingestion of *Sida carpinifolia* diet and eight days after the withdrawal of the plant of the diet. For *in vitro* study, fibroblasts were cultured for 48 hours at 0.00, 0.02, 0.2, 2.0 and 5.0 $\mu\text{g/mL}$ of swainsonine concentration. **Results:** We observed discrete neurological alterations in the animals, witch beginning between first and second week of consumption of *Sida carpinifolia* diet. The activity of α -mannosidase in goat fibroblasts culture increased significantly from 14th day after consumption of *Sida carpinifolia* diet, remaining modified until the end of the experiment. In the 8th day after withdrawal of *Sida carpinifolia* diet, α -mannosidase activity was at normal

levels. In goat fibroblasts cultured on 2.0 and 5.0 $\mu\text{g/mL}$ of swainsonine concentration, α -mannosidase activity reduced 52 and 72 per cent, respectively, from control. **Conclusion:** The alkali swainsonine added to goat fibroblasts cultured seems to reproduce the hereditary human α -mannosidosis. However, the swainsonine concentration present in *Sida carpinifolia* provoked contrary effect on α -mannosidase. The results estimate that the plant may be contain substances that are not only restricted to the inhibition α -mannosidase activity, but capable to compensate the inhibitory effect and modify swainsonine action on the enzyme, or even disable the traffic of the enzyme inside the cell.

INTRODUCTION

Ingestion of *Sida carpinifolia* for goats cause neurological disease, known as "locoism" and characterized by ataxia, hypermetria, hyperesthesia, and muscle tremors of head and neck and present vacuoles in several cells [1] with similar symptoms of human genetic illness α -mannosidosis [2]. The clinical and pathological characteristics these diseases in the goats that ingest *Sida carpinifolia* are similar to animals that ingested plants of the genus *Swainsona*, *Oxytropis*, *Astragalus* and *Ipomoea* [3-5]. The swainsonine, is the same alkaloid found in plants

of the genus *Swainsona cenescens* [6] and was identified as a toxic constituent of the *Sida carpinifolia*, perennial plant found in Brazilian south [7]. The swainsonine blocks the processing of glycoprotein complexes [8] and leads to an increase of oligosaccharides rich of mannose in urinary and tissues [9]. In this work, we investigated *in vivo* effect of *Sida carpinifolia* diet and *in vitro* effect of swainsonine in goat fibroblasts culture on α -mannosidase, β -mannosidase and β -galactosidase activities.

MATERIAL AND METHODS

Substrates 4-methylumbelliferyl- α -L-mannopiranoside, 4-methylumbelliferyl- β -L-mannopiranoside, 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside and synthetic swainsonine were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), sodium phosphate and citrate, from Merck (Darmstadt, Germany), and the reagents and medium culture cell from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).

EXPERIMENTAL ANIMALS

The experimental study consisted of six female goats with 4-month-old age of *Saanen* race from a free farm of *Sida carpinifolia*. The goats were forced fed 500g of *Sida carpinifolia* daily for 28 days. The feeding animals were complemented with commercial ration and water *ad libitum*. Clinical signals were accessed during all experimental period and blood counts were made every week. The experiment was ethical and scientifically approved by the Research and Post-Graduation Committee of the Porto Alegre Clinical Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil.

GOAT FIBROBLASTS CULTURE

For *in vivo* study, goat biopsies were obtained two days before and, seven, fourteen and twenty eight days after ingestion of *Sida carpinifolia* diet and eight days after the withdrawal of the plant of the diet. Biopsies (fragments of approximately 1.0 x 0.5cm) were collected alternately, in the apex and medial border of ears previously washed with abundant running water and neutral detergent and disinfected with alcohol-iodine 5% solution. The dichotomized area was pressured

with sterile gauze and goats received antibiotic and repellent application. Samples were transferred for a sterile flask containing HAM-F10 middle culture added to 10% of fetal bovine serum (FBS). When had confluence cells culture were removed with trypsin-EDTA and added to other two flasks containing HAM-F10 medium culture supplemented with 10% FBS and washed with phosphate buffer sodium (PBS) three times. After centrifugation, the pellet containing the cells was kept frozen at -40°C until protein content and enzyme activity determination. For *in vitro* study, fibroblasts were cultured for 48 hours at 0.00, 0.02, 0.2, 2.0 and 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of swainsonine concentration [10].

ASSAY OF α -MANNOSIDASE, β -MANNOSIDASE AND β -GALACTOSIDASE

The α -mannosidase and β -mannosidase activities were determined using the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl- α -L-mannopiranoside and 4-methylumbelliferyl- β -L-mannopiranoside, respectively. For assay, 20 μl of fibroblasts previously diluted in water were mixed with 100 μl of respectively substrate solution 2mM in phosphate citrate buffer 0.2M, pH 4.0 at 37°C for 1 hour. The β -galactosidase activity was assayed by the method of Suzuki [11] using 4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside as a substrate. Protein contents of leukocytes

were between 15–30 mg. For assay, fibroblasts were previously diluted in 0.9% of sodium chloride, and 100 μ L were mixed with 200 μ L of substrate solution 1.33mM in citrate-phosphate buffer 0.1M, pH 4.0 and 100 μ L sodium chloride 0.2M, at 37 °C for 1 hour. The reaction was stopped with 3mL of glycine-NaOH buffer 0.5M, pH 10.3. Fluorescence was read with a Hitachi F-2000 spectrofluorometer (excitation and emission wave-length of 365 and 450nm, respectively). Protein concentration was determined by method the Lowry et al. [12].

STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed by ANOVA two-way, followed by the Duncan multiple range test when the *F* test was significant. The analysis was performed using the statistical software pack-age SPSS/PC1, version 11.0 Chicago, IL, USA, and the level of significance was set at $p < 0.01$.

RESULTS

Table 1: *In vivo* effect of *Sida carpinifolia* diet in goat fibroblasts culture on α -mannosidase, β -mannosidase, and β -galactosidase activities.

Enzymes	Two days before	Diet with <i>Sida carpinifolia</i> (days)			Diet without <i>Sida carpinifolia</i> (days)
		7 th	14 th	28 th	8 th
α -mannosidase	76 \pm 22	78 \pm 7	106 \pm 6*	148 \pm 36*	83 \pm 12
β -mannosidase	1.1 \pm 0.1	0.7 \pm 0.5	1.3 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2
β -galactosidase	254 \pm 29	204 \pm 11	283 \pm 12	260 \pm 48	235 \pm 13

Data are mean for six independent experiments performed in triplicate. Enzymatic activity was expressed in nmoles4-MU/h/mg.protein.*p< 0.01 (Duncan's multiple range test). 4-MU = 4-methylumbelliferone

Table 2: *In vitro* effect of swainsonine in goat fibroblasts culture on α -mannosidase, β -mannosidase, and β -galactosidase activities.

Enzymes	Swainsonine ($\mu\text{g/mL}$)				
	0.0	0.02	0.2	2.0	5.0
α -mannosidase	74 \pm 2	64 \pm 11	72 \pm 5	35 \pm 5*	21 \pm 6*
β -mannosidase	1.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.3	0.9 \pm 0.1	1.1 \pm 0.05	1 \pm 0.3
β -galactosidase	229 \pm 17	226 \pm 19	246 \pm 18	245 \pm 19	225 \pm 26

Data are mean for six independent experiments performed in triplicate. Enzymatic activity expressed in nmoles4-MU/h/mg.protein.*p< 0.01 (Duncan's multiple range test).

The clinical picture in goats was varying during the experimental phase consumption of *Sida carpinifolia* diet and was characterized for excrements alterations, weight profit reduction and mainly neurological clinical signals. Neurological alterations were discrete and beginning between the first and second week of *Sida carpinifolia* diet consumption and consisted of apparent depression, look fixture and slow movements. Blood counts did not show significant change during all experimental period. The α -mannosidase activity in goat fibroblasts culture was significant increased from 14th day after *Sida carpinifolia* diet consumption, remaining modified until the end of the experiment. In the 8th day after withdraw of the *Sida carpinifolia* diet, the α -mannosidase activity was at normal levels (83 \pm 54 MU/h/mg.protein) (table 1). However, α -mannosidase activity in goat fibroblasts culture at 2.0 and 5.0 $\mu\text{g/mL}$ of swainsonine concentration ($1.15 \times 10^{-8}\text{mM}$ and $2.88 \times$

10^{-8} mM) reduced 52 and 72 per cent, respectively, from control (table 2). The β -mannosidase and β -galactosidase activities did not show alteration in both experiments (table 1 and 2).

DISCUSSION

Swainsonine is specific inhibitor of α -mannosidase [13] and *Sida carpinifolia* contains swainsonine at 0.006% of dry weight [7]. In our laboratory, in goats that fed with *Sida carpinifolia* diet, the α -mannosidase activity increased in leukocytes and diminished in plasma (data not published). The α -mannosidase activity reduced in goat fibroblasts culture at 2.0 and 5.0 μ g/mL (1.15×10^{-8} mM and 2.88×10^{-8} mM) swainsonine concentrations and increased in goat fibroblasts culture that fed *Sida carpinifolia* diet for 14 and 28 days. In our work, swainsonine alkali added to goat fibroblasts culture seems alike the hereditary illness human α -mannosidosis, in agreement with Ikeda (2003) in human lymphoblast [14]. However, the swainsonine concentration present in *Sida carpinifolia* provoked contrary effect to wait in fibroblasts. Effect of swainsonine seems to be of restricting not only to α -mannosidase inhibition, being it able to intervene at macromolecules glycosylation the important roll in cellular recognition and to induce the hybrid glycoprotein formation, as in human fibroblasts [15]. At the same time, results from goat

fibroblasts culture fed with *Sida carpinifolia* diet estimate that it possesses substances that, when metabolized for organism can compensate the inhibitory effect of the swainsonine on α -mannosidase. On the other hand, it is possible that the modification of glycoprotein, induced for swainsonine present in *Sida carpinifolia* can be modifying traffic and processing of α -mannosidase. This would explain why, despite of the significant increase of enzymatic activity of α -mannosidase in leukocytes and fibroblasts, occurs urinary oligosaccharide accumulation (date not published) and clinical signals of the neurological illness. For this hypothesis would be necessary studies of cellular sub fracionament in goat fibroblasts culture fed with *Sida carpinifolia* diet.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Brazilian funds CNPq, CAPES, and GPPG-HCPA.

BIBLIOGRAPHY

- [1] Driemeier D, Colodel EM, Gimeno EJ, Barros SS 2000 Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. *Vet Pathol* 37(2):153-159
- [2] Öckerman, P-A 1967 A generalized storage disorder resembling Hurler's syndrome. *Lancet* 2(239)
- [3] Locke KB, McEwan DR, Hamdorf IJ 1980 Experimental poisoning of horses and cattle with *Swainsona canescens* var *horniana*. *Aust Vet J.* 56(8):379-383
- [4] Damir HA, Adam SE, Tartour G 1987 The effects of *Ipomoea carnea* on goats and sheep. *Vet Hum Toxicol* 29(4):316-319
- [5] Stegelmeier BL, James LF, Panter KE, Molyneux RJ 1995 Serum swainsonine concentration and alpha-mannosidase activity in cattle and sheep ingesting *Oxytropis sericea* and *Astragalus lentiginosus* (locoweeds). *Am J Vet Res* 56(2): 149-154
- [6] Dorling PR, Huxtable CR, Colegate SM 1980 Inhibition of lysosomal alpha-mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. *Biochem J* 191(2):649-651
- [7] Colodel EM, Gardner DR, Zlotowski P, Driemeier D 2002 Identification of swainsonine as a glycoside inhibitor responsible for *Sida carpinifolia* poisoning. *Vet Hum Toxicol.* 44(3):177-178

- [8] Elbein AD, Solf R, Dorling PR, Vosbeck K 1981 Swainsonine: an inhibitor of glycoprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12):7393-7397
- [9] Elbein AD, Dorling PR, Vosbeck K, Horisberger M 1982 Swainsonine prevents the processing of the oligosaccharide chains of influenza virus hemagglutinin. *J Biol Chem* 257(4):1573-1576
- [10] Coelho JC, Giugliani R 2000 Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases: technical recommendations. *Genet Mol Biol* 23: 269–271
- [11] Suzuki YSH, Oshima A Beta-Galactosidase Deficiency (beta-galactosidosis), GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) 2001 McGraw-Hill New York p. 2785-2823
- [12] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275
- [13] Opheim DJ, Touster O 1978 Lysosomal alpha-D-mannosidase of rat liver. Purification and comparison with the golgi and cytosolic alpha-D-mannosidases. *J Biol Chem* 253(4):1017-1023
- [14] Ikeda K, Kato A, Adachi I, Haraguchi M, Asano N 2003 Alkaloids from the poisonous plant *Ipomoea carnea*: effects on intracellular lysosomal glycosidase activities in human lymphoblast cultures. *J Agric Food Chem* 51(26):7642-7646

- [15] Tulsiani DR, Touster O 1983 Swainsonine causes the production of hybrid glycoproteins by human skin fibroblasts and rat liver Golgi preparations. *J Biol Chem* 258(12)7578-7585

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A rápida absorção do swainsonine pelas células e sua ampla distribuição facilita sua ação modificadora na estrutura dos oligossacarídeos na membrana dos leucócitos e de suas organelas, incluindo os lisossomos. A atividade diminuída da α -manosidase no plasma de caprinos que ingeriram *Sida carpinifolia* é uma indicação de que a estrutura dos oligossacarídeos possa estar modificada, alterando o reconhecimento celular na membrana e bloqueando a saída da enzima da célula. Ao mesmo tempo em que a atividade da α -manosidase nos leucócitos dos caprinos alimentados com *Sida carpinifolia* aumentou a partir do 5º dia após o consumo da planta, foi claramente observada a presença de oligossacarídeos na urina destes caprinos a partir do 2º dia após o consumo da *Sida carpinifolia*, indicando que a atividade da α -manosidase dentro dos lisossomos está diminuída, hipótese que poderia ser testada através do subfracionamento celular em fibroblastos de animais tratados com *Sida carpinifolia*.

O swainsonine nas concentrações de 2,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ em fibroblastos cultivados de caprinos diminuiu a atividade da α -manosidase, contrastando com o estudo *in vivo* onde a atividade da enzima em fibroblastos cultivados de caprinos que ingeriram *Sida carpinifolia* aumentou após o 14º dia de consumo da planta. Este estudo nos sugere que a atividade aumentada da α -manosidase em leucócitos possa ser atribuída a substâncias presentes na *Sida*

carpinifolia. Estas substâncias podem estar aumentando a expressão da α -manosidase para compensar o efeito inibitório do swainsonine sobre a enzima.

Os caprinos alimentados com a dieta contendo *Sida carpinifolia* apresentaram acúmulo de oligossacarídeos na urina, atividade da α -manosidase diminuída no plasma e sinais clínicos neurológicos, indicando que a *Sida carpinifolia* mimetiza a doença α -manosidose.

Os sinais clínicos neurológicos foram observados a partir do 10° dia após o início da ingestão da dieta contendo *Sida carpinifolia*, ou seja, 6 dias após a diminuição da α -manosidase no plasma e o acúmulo de oligossacarídeos na urina foi imediato, no 2° dia após a ingestão da dieta contendo *Sida carpinifolia*, indicando que a enzima lisossomal foi inibida pela presença do swainsonine na planta.

Apesar de que alterações discretas no comportamento dos caprinos ainda persistiram por 30 dias após o término do experimento, ocorreu diminuição nos sinais clínicos neurológicos nos animais após a retirada da planta da dieta, sugerindo que a *Sida carpinifolia* apresenta substâncias que se contrapõem à ação inibitória causada pelo swainsonine sobre a enzima lisossomal α -manosidase.