

OBTENÇÃO DO GANGLIOSÍDIO GM₃ DE BAÇO DE CACHORRO*

Daniele Cristine NYLAND¹, M. Eliane A. ROSA¹, Chou Tsing CHENG², Juana L. GAMALL³,
Vera M. Treis TRINDADE⁴

¹. Bolsista de Iniciação Científica / FAPERGS. ². Monitor do Departamento de Bioquímica. ³. Aluna de Doutorado do Curso de pós-graduação em Bioquímica / Convênio UFPR-UFRGS. ⁴. Professora do Departamento de Bioquímica - Instituto de Biociências - UFRGS, Sarmento Leite 500 - 90050-000 Porto Alegre-RS.

* Trabalho agraciado com o primeiro lugar no 11º Concurso Acadêmico de Pesquisas Científicas, Diretório Acadêmico da Faculdade de Farmácia/UFRGS, 1990.

RESUMO: Gangliosídeos são glicolipídios que possuem em sua estrutura obrigatoriamente um derivado de ácido siálico. Estes compostos existem em grande quantidade nas membranas plasmáticas das células, exercem papel importante nos processos de diferenciação celular e neurotransmissão. Duas enzimas chaves controlam a biossíntese dos diferentes gangliosídeos: GD₃ sintase e GM₂ sintase. A primeira transfere um resíduo de ácido siálico ao GM₃ a partir de CMP-NANA e a segunda transfere N-Ac-galactosamina ao GM₃ a partir de UDP-N-Ac-Gal. Portanto para a medida das atividades destas enzimas é necessário, além dos nucleotídeos doadores de açúcar, o gangliosídeo GM₃. Quantidades razoáveis deste composto são encontradas em baço de cachorro. Este órgão foi extraído, particionado conforme o método de Folch-Pi, e a fase superior passada através de uma coluna de DEAE-sephadex A-50 segundo Nores e Caputto (*J. Neurochem.*, v.42, n.5, p.1205-1211, 1984). Os diferentes gangliosídeos foram eluídos da seguinte forma: monogangliosídeos com clorofórmio: metanol: formiato de amônio 0,08M (30:60:8); digangliosídeos com clorofórmio:metanol:formiato de amônio 0,25M (30:60:8); trigangliosídeos com clorofórmio:metanol:formiato de amônio 0,4M (30:60:8). Obteve-se uma maior recuperação no pico I da coluna, correspondente aos monogangliosídeos. Uma CCD analítica desta tração em sílica gel-G-60 revelou a presença de 2 bandas majoritárias as quais migram como GM₃ padrão. Provavelmente sejam duas isoformas de GM₃ que se diferenciam na composição de ácido graxo. Para melhor purificação de GM₃ fez-se a seguir CCD preparativa. Ao final do método de preparação conseguiu-se de aproximadamente 40g de baço, cerca de 1mg de GM₃.

UNITERMO: Gangliosídeo GM₃

ABSTRACT: **Obtention of Ganglioside GM₃ from Dog Spleen.** Ganglioside is the generic term for glycosphingolipids containing sialic acids, which are a group of derivatives of neuraminic acid. These compounds are present in large quantities in plasma cell membranes and may form part of receptors for neurotransmitters, peptides hormones and bacterial toxins. Two key enzymes control the biosynthesis of the different gangliosides: GD₃ synthase and GM₂ synthase. Both enzymes require GM₃ as one of their substrates. The first transfers one residue of sialic acid from the sugar nucleotide donor CMP-NANA to the acceptor GM₃ and the second transfers N-Ac-Galactosamine from UDP-N-Ac-Gal to GM₃. For measuring the activity of these enzymes, the sugar donors and the ganglioside GM₃ are required. Suitable quantities of this compound are found in dog spleen. This tissue was extracted and partitioned according to Folch-Pi Method. The upper phase was passed through a DEAE-Sephadex A-50 column according to Nores and Caputto (*J. Neurochem.*, v.42, n.5, p.1205-1211, 1984). The different gangliosides were eluted as follows: monogangliosides with chloroform: methanol: ammonium formate 0.08 M (30:60:8); digangliosides with chloroform:methanol:ammonium formate 0.25 M (30:60:8) and trigangliosides with chloroform:methanol:ammonium formate 0.4 M (30:60:8). The best recovery of eluted gangliosides was that corresponding to monogangliosides. Analytical TLC of this fraction on Silica-gel G-60 was developed with C:M:NH₄OH:conc:H₂O (55:40:2:8) and showed the presence of 2 major bands which migrated as GM₃ standard. This is attributed to the existence of two isomer forms of GM₃ with variable fatty acid composition. For further purification of GM₃ preparative TLC was carried out. Approximately 1mg of GM₃ was obtained from 40g of dog spleen with this approach.

KEYWORD: Ganglioside GM₃

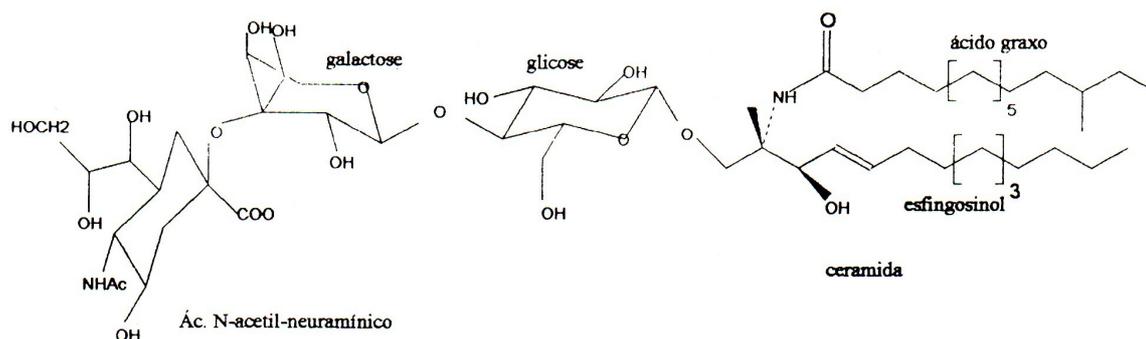


Figura 1. Estrutura do gangliosídeo GM₃.

INTRODUÇÃO

Gangliosídeos são glicolipídios que possuem em sua estrutura resíduos de oses e obrigatoriamente um derivado de oses chamado ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico - NANA). Estes compostos são abreviados pela letra G com subscrição M, D ou T, a fim de designar a presença de um, dois, ou três resíduos de ácido siálico, respectivamente, e um número ou letra para distinguir os diferentes membros de cada grupo. Por exemplo, GM₁, GM₂, GM₃, GD_{1a}, GD_{1b}. Os gangliosídeos existem em grande quantidade nas membranas plasmáticas das células, exercem um papel importante no processo de diferenciação celular, fazem parte de receptores para neurotransmissores, hormônios e toxinas bacterianas (ANDO, 1983).

A síntese "de novo" destes glicolipídios consiste em adições sequenciais de oses ao lipídio precursor (ceramida), catalisadas por glicosiltransferases específicas localizadas no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi (TETTAMANTI & PITTO, 1989). Duas enzimas chaves controlam a biossíntese dos diferentes gangliosídeos: GD₃ sintase e GM₂ sintase. Ambas utilizam o GM₃ como um dos seus substratos. A primeira transfere um resíduo de NANA ao GM₃ a partir de CMP-NANA, e a segunda transfere N-acetil-galactosomina ao GM₃ a partir de UDP-NAC-Gal. Portanto, para a medida das atividades dessas enzimas é necessário, além dos nucleotídeos doadores de açúcar, o gangliosídeo GM₃. Quantidades razoáveis deste composto são encontradas em baço de cachorro (NORES & CAPUTTO, 1984).

O presente trabalho visa a purificação de GM₃ para sua posterior utilização como substrato das enzimas acima mencionadas. A medida das atividades destas transferases pode servir para avaliar a biossíntese de gangliosídeos em diferentes modelos experimentais, como os que estão sendo executados no desenvolvimento hipotalâmico de ratos normo e hiponutridos e em testículos de ratos durante o período de maturação sexual. O gangliosídeo GM₃ corresponde a neuramil-lactose ligada a ceramida.

MATERIAL E MÉTODOS

METODOLOGIA:

EXTRAÇÃO LIPÍDICA: Baço de cachorro foi extraído com clorofórmio (C): metanol (M) (2:1) na proporção de 1g de tecido para 19ml da mistura de solventes. A seguir foi realizada a partição com 0,2 volumes de H₂O (FOLCH-PI e colaboradores, 1957). A fase superior (FS) foi separada por decantação e a fase inferior (FI) lavada com C:M:H₂O (3:48:47). O lavado foi adicionado à FS. A quantidade de gangliosídeos extraída foi avaliada através da medida do conteúdo de NANA pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) (WARREN, 1959).

COLUNA DE TROCA IÔNICA: DEAE-sephadex A-50 foi suspensa em 10 volumes de clorofórmio:metanol:NH₄OH 1M (3:48:47) e deixado em repouso durante à noite. A seguir, a suspensão foi diluída com 2,3 volumes de C:M:H₂O (3:48:47) e estocada. A resina (aproximadamente 0,1g/g de tecido processado) foi colocada numa coluna de vidro de 2,4 cm de diâmetro até uma altura de 18 cm e lavada com 10 volumes de C:M:H₂O (3:48:47) (NORES & CAPUTTO, 1984).

A amostra aplicada na coluna consistiu na FS e no primeiro lavado. A eluição dos diferentes gangliosídeos foi realizada da seguinte forma: monogangliosídeos com C:M:formiato de amônio 0,08M (30:60:8); digangliosídeos com C:M:formiato de amônio 0,25M (30:60:8); trigangliosídeos com C:M:formiato de amônio 0,4M (30:60:8). As frações eluídas da coluna foram controladas através da medida do conteúdo de ácido siálico pelo método do resorcinol (SVENNERHOLM, 1957) modificado por MIETTINEN & TAKKI-LUKKAINEN (1959).

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) ANALÍTICA : Foi aplicado volume variável de 15 a 40 µl de amostra que continha aproximadamente 30 mmoles de NANA gangliosídeos

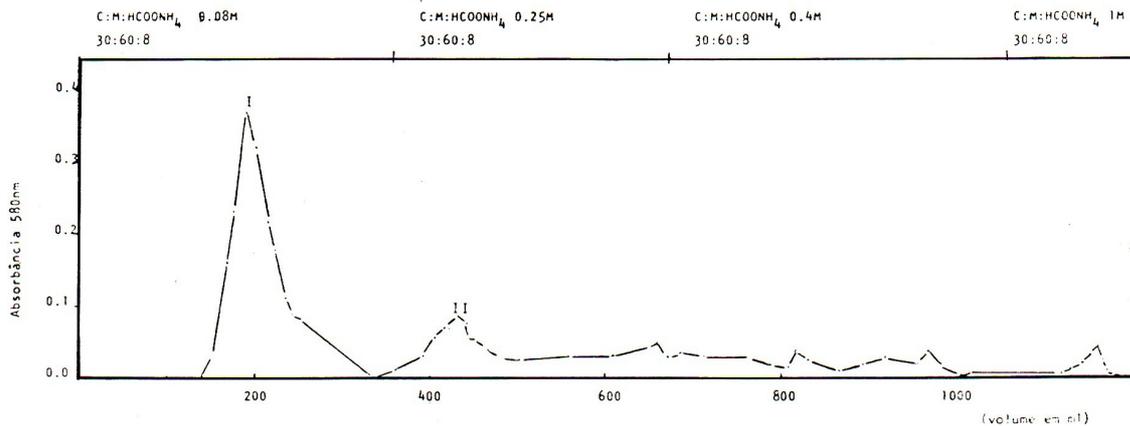


Figura 2- Cromatografia em coluna DEAE-sephadex da fase superior e do primeiro lavado de extrato lipídico de baço (aproximadamente 22000nmoles em NANA). Eluição por gradientes descontínuos indicados na parte superior do cromatograma.

sobre 1 cm de uma cromatofolha de alumínio de sílica-gel G-60 Merck. Solvente utilizado: C:M:NH₄OHconc:H₂O (55:40:2:8). A revelação foi feita com resorcinol (SVENNERHOLM, 1957) modificado por SMITH e SEAKINS (1976).

CCD PREPARATIVA: Isolamento de GM₃ a partir do pico I. Foram aplicados 30 µl (30 nmoles de NANA) do pico I por centímetro da cromatofolha de alumínio sílica-gel G-60 Merck. A mistura de solventes utilizada foi C:M:NH₄OH:H₂O (55:40:2:8) e a corrida durou cerca de três horas. A revelação foi feita com vapores de iodo por três minutos e a banda de GM₃ foi demarcada a lápis. Pequena parte da placa foi revelada também com resorcinol para comparação com o padrão, confirmando a banda como GM₃. A sílica-gel corresponde à banda de GM₃ foi raspada com lâmina de bisturi e eluída três vezes com 2ml de C:M:NH₄OHconc:H₂O (55:40:2:8) num total de 6ml de solvente. A mistura de solvente ficou em contato com a sílica por 10 min, com agitação em "mixer" de dois em dois minutos por quinze segundos. Centrifugou-se por 10 min e juntou-se os três sobrenadantes num tubo de rosca. O GM₃ foi guardado a 4°C (WINTERBOURN, 1971).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 2 apresenta o resultado da cromatografia em coluna de DEAE sephadex da mistura da fase superior do extrato de baço com o

primeiro lavado. Obteve-se dois picos denominados I e II, os quais foram eluídos respectivamente com C:M:HCOONH₄ 0,08M (30:60:8) e C:M:HCOONH₄ 0,25M (30:60:8). A maior recuperação ocorreu no pico I da coluna, correspondente aos monogangliosídeos.

A figura 3 compara através de CCD analítica a composição da FS e primeiro lavado, da FI e dos picos eluídos da coluna (I e II). Observou-se de fato, que na FS e primeiro lavado extraiu-se a maior parte dos gangliosídeos representados pelas cinco bandas coradas de azul. Na FI encontrou-se as bandas 2, 4, 5 em menor quantidade e principalmente bandas coradas de marrom que provavelmente equivalem a fosfolipídios. No pico I da DEAE-sephadex detectou-se a presença de duas bandas principais (1 e 2) as quais migram do mesmo modo que o padrão de GM₃, podendo ser duas isoformas que se diferenciam ao nível dos seus ácidos graxos constituintes. A banda mais intensa destas duas foi isolada por CCD preparativa e corresponde ao GM₃ purificado. O pico II apresenta um perfil cromatográfico semelhante ao do pico I. Talvez seja um excesso do pico I que não tenha sido totalmente eluído com a primeira força iônica.

A tabela 1 mostra de modo parcial o acompanhamento das etapas de purificação do GM₃, segundo a técnica de NORES & CAPUTTO (1984). Obteve-se em tomo de 1200 nmoles de GM₃ a partir de 45 g de baço o que equivale a aproximadamente 1 mg deste glicolipídio.

TABELA 1 - Quantidade total de gangliosídios nas etapas de purificação

ETAPAS	Quantidade total de gangliosídeos (em mmoles NANA)
Fase superior FOLCH	8.655
1º lavado da fase inferior	14.093
Fase inferior remanescente	5.422
Pico I DEAE-sephadex	4.850
Banda correspondente a GM obtida por várias CCD preparativas	1.197

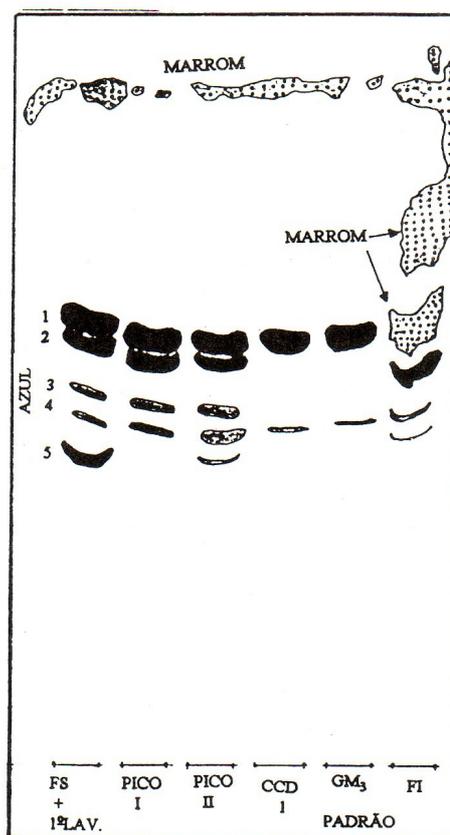


Figura 3. CCD em sílica gel G60 da fase superior e primeiro lavado (FS+1L), dos picos I e II obtidos da coluna DEAE-sephadex (respectivamente PI e PII), da banda eluída após separação por CCD preparativa (CP1), padrão (GM₃) e fase inferior (FI).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDO, S. Gangliosides in the Nervous System. *Neurochem. Int.*, v.5, p.507-537, 1983.
2. FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, v. 226, p.497-509, 1957.
3. MIETTINEN, T.E. and TAKKI-LUKKAINEN, I.I. Use of butyl Acetate in Determination of Sialic Acid. *Acta. Chem. Scand.*, v.13, p.856-858, 1959.
4. NORES, G.A. and CAPUTIO, R. Inhibition of the UDP-N-Acetylgalactosamine: GM₃ N-Acetylgalactosaminyl transferase by Gangliosides. *J. Neurochem.*, v.42, p.1205-1211, 1984.
5. SMITH, I. and SEAKINS. *Chromatographic and Electrodephoretic Techniques*. V.1 - 4th. ed. - London: William Heinemann Medical, 1976. p. 354.
6. SVENNERHOLM, L. Quantitative Estimation of Sialic Acids a colorimetric Resorcinol - Hydrochloric Acid Method. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.24, p. 604-611, 1957.
7. TETTAMANTI, G. and PITTO, M. Ganglioside Metabolism and Brain Function. *J. Neurochem.*, v.52, suppl., p. S4c, 1989.
8. WARREN, L. The Thiobarbituric Acid Assay of Sialic Acids. *J. Biol. Chem.*, v. 234, p. 1971-1975, 1959.
9. WINTERBOURN, C.C. Separation of Brain Gangliosides by Column Chromatography on DEAE-cellulose. *J. Neurochem.*, v.18, p. 1153-1155, 1971.

AGRADECIMENTOS: Aos professores Marcelo Grillo e Eneida Brasil (Departamento de Fisiologia, IBC-UFRGS), Elena Bernard (Departamento de Bioquímica, IBC-UFRGS) e às acadêmicas de Farmácia Luciana Scotti e Daniela Becker.

(FAPERGS, PROPESP/UFRGS, CNPq, FINEP)

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Vera M. Treis Trindade
 Dept. Bioquímica - Inst. Biociências/UFRGS
 Rua Sarmiento Leite 500
 90050-170 Porto Alegre RS

Recebido em 28.08.1990