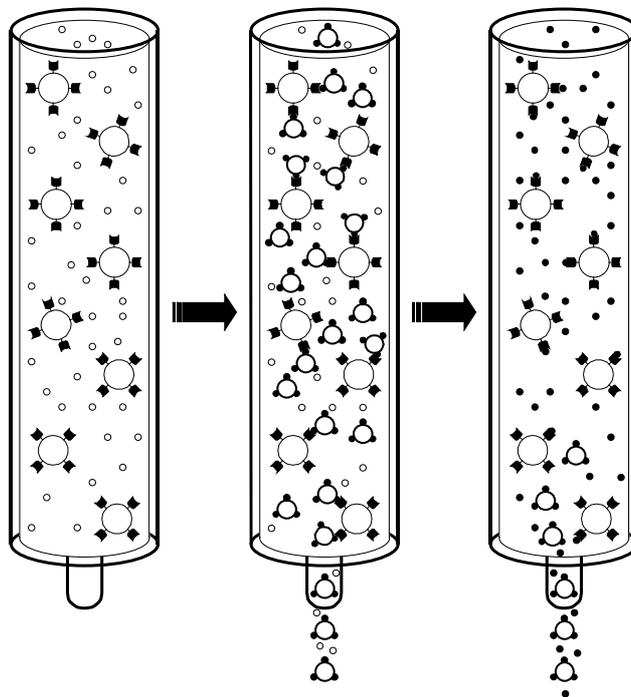


TEODOMIRO GOMES DOS SANTOS FILHO

**ISOLAMENTO DE GLICOPROTEÍNAS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNAS CONTENDO LECTINAS IMOBILIZADAS.**



RECIFE – 2001

**TEODOMIRO GOMES DOS SANTOS FILHO**

**ISOLAMENTO DE GLICOPROTEÍNAS ATRAVÉS DE  
CROMATOLOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNAS  
CONTENDO LECTINAS IMOBILIZADAS.**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestre em Bioquímica.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho**

RECIFE – 2001

Título da Dissertação:

**Isolamento de Glicoproteínas Através de Cromatografia de Afinidade em Colunas Contendo Lectinas Imobilizadas.**

Autor:

**Teodomiro Gomes dos Santos Filho**

Banca Examinadora:

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Presidente)**  
**Departamento de Bioquímica/CCB/UFPE**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia**  
**Departamento de Bioquímica/CCB/UFPE**

**Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior**  
**Departamento de Bioquímica/CCB/UFPE**

**Prof. Dr. Cláudio Augusto Machado Sampaio**  
**Departamento de Bioquímica/EMP/UNIFESP**

**Dedico aos meus pais, por tudo o que são e o que me fizeram ser, aos meus irmãos, aos meus amigos e a todos aqueles que estiveram comigo hoje e sempre.**

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva por todo o apoio e compreensão, pela orientação, pela paciência e confiança, pela dedicação e, principalmente, pela amizade que se fez e se fortaleceu durante este período.

À Professora Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho pela co-orientação científica, confiança, apoio e amizade.

À Professora Dra. Maria do Socorro de Mendonça de Cavalcanti pela confiança.

À Professora Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva, pelo apoio e estímulo para a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, por seu apoio e atenção.

Àqueles que cederam seu produtos de pesquisa e desta forma foram essenciais para o desenvolvimento desta dissertação, especialmente aos Professores Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Dra. Luana C. B. B. Coelho , Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti e Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva.

A todos os que fazem o Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da UFPE, pelo apoio, companheirismo e paciência. Em especial à Maria Barbosa Reis da Silva, que muito me ajudou neste trabalho. Também a Ana Célia Oliveira dos Santos e Edilson Gomes de Santana.

A Andréa de Fátima Silva Santos, amiga de mestrado e de orientação, e que esteve sempre me apoiando e ajudando nos momentos em que mais precisei.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, pela constante ajuda neste período. Em especial a Djalma, Neide e Miron.

Aos meus amigos de Mestrado, Rosângela, Morgana, Thayza, Teodora, Isaura, Veridiana, César, Cláudio, Shirley, Taciana, Emília, Geane e Wilma, pela amizade constante, ajuda diária e companheirismo nas melhores horas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta me ajudaram para a realização de mais este trabalho em minha vida.

Aos meus irmãos, Ana Lúcia, Levino, Luciana, Ana Paula e João, que torceram por mim e também ficaram felizes à cada vitória que conquistei.

Um agradecimento, que não sei dizer o quanto é grande, à minha mãe, Maria José Lacerda dos Santos, por todo o carinho, atenção e ensinamento que me deu, e ao meu pai, Teodomiro Gomes dos Santos, por tudo que fez por mim e me ensinou em toda a minha vida.

À Maria Gomes dos Santos, minha tia, por todo apoio, torcida e incentivo, além, claro, pela amizade durante todas as etapas da minha vida.

Também, e de forma muito especial, à Maria Andréa Ferreira, que um dia foi apenas amiga, hoje é muito mais, e que está e sei que estará comigo por muito mais tempo.

E especialmente a Deus, que me deu a oportunidade de poder ter todos estes a quem agradecer. Também por me guiar nesta vida, pois sem Ele nada seria possível.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AH – Atividade Hemaglutinante

BmoLL – Lectina de folha *Bauhinia monandra*

BmoLL-PVA-glutaraldeído – Lectina de folha *Bauhinia monandra* imobilizada em PVA-glutaraldeído fibroso.

Con A – Concanavalina A (lectina de *Canavalia ensiformis*)

Cra Iso 1,2,3 – Isolectinas 1, 2 e 3 de lectina de sementes *Cratylia mollis*

Cra Iso 1,2,3-Sepharose - Isolectinas 1, 2 e 3 de lectina de *Cratylia mollis* imobilizadas em Sepharose-4B

Ig – Imunoglobulina

IgA – Imunoglobulina A

Iso – Isolectina

PHA-E – Eritrohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*

PVA – álcool polivinílico

SDS – Sulfato sódico de dodecila

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SpiL – Lectina de *Swartzia pickellii*

SpiL-Sepharose – Lectina de *Swartzia pickellii* imobilizada em Sepharose-4B.

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametilenodiamina

Tris – Tris-hidroximetil-aminometano

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Imobilização de proteína em Sepharose-4B	<b>6</b>
Figura 2:	Estrutura do álcool polivinílico	<b>6</b>
Figura 3:	Estrutura do álcool polivinílico-glutaraldeído	<b>7</b>
Figura 4:	Etapas da cromatografia de afinidade em suportes contendo lectina imobilizada	<b>8</b>
Figura 5:	Cromatografia em coluna de BmoLL-PVA-glutaraldeído sem aplicação de amostra glicoprotéica	<b>24</b>
Figura 6:	Cromatografia de soro fetal bovino em colunas contendo lectinas imobilizadas	<b>27</b>
Figura 7:	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes da glicoproteína isoladas em Cra Iso 1,2,3-Sepharose	<b>28</b>
Figura 8:	Cromatografia de colostro humano em colunas contendo lectinas imobilizadas	<b>30</b>
Figura 9:	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes de glicoproteínas isoladas em BmoLL-PVA-glutaraldeído	<b>31</b>
Figura 10:	Cromatografia de ovoalbumina em colunas contendo lectinas imobilizadas	<b>33</b>
Figura 11:	Ensaio em batelada em suportes contendo lectinas imobilizadas para isolamento de glicoproteínas de soro fetal bovino	<b>35</b>
Figura 12:	Ensaio em batelada em suportes contendo lectinas imobilizadas para ligação de ovoalbumina	<b>36</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1:	Famílias de lectinas de plantas: Ocorrência e especificidade.	<b>2</b>
Tabela 2:	Lectinas mais comumente usadas como ligantes em suportes para cromatografia de afinidade.	<b>9</b>
Tabela 3:	Imunoglobulinas humanas.	<b>10</b>
Tabela 4:	Atividade hemaglutinante (Título <sup>-1</sup> ) de BmoLL, SpiL e Cra Iso 1,2,3 em presença de glicoproteínas.	<b>21</b>
Tabela 5:	Imobilização de lectinas em suportes insolúveis.	<b>23</b>

**SUMÁRIO**

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>IX</b>
<b>SUMÁRIO</b>	<b>X</b>
<b>RESUMO</b>	<b>XII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Lectinas	<b>1</b>
1.2 Purificação de lectinas através de cromatografia de afinidade	<b>3</b>
1.3 Imobilização de proteínas em suportes insolúveis para cromatografia de afinidade	<b>5</b>
1.4 Glicoproteínas	<b>9</b>
1.5 Lectinas de leguminosas isoladas no Laboratório de Glicoproteínas da UFPE	<b>10</b>
1.6 Relevância do trabalho	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo Geral	<b>13</b>
2.2 Objetivos Específicos	<b>13</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
3.1 Materiais	<b>14</b>
3.1.1 Lectinas isoladas no Laboratório de Glicoproteínas da Universidade Federal de Pernambuco	<b>14</b>
3.1.2 Lectinas imobilizadas em Sepharose-4B	<b>14</b>
3.1.3 Glicoproteínas	<b>14</b>
3.1.4 Soro fetal bovino e colostro humano	<b>14</b>
3.1.5 Suportes insolúveis para imobilização de lectinas	<b>14</b>
3.1.6 Materiais para eletroforese	<b>14</b>
3.2 Métodos	<b>15</b>
3.2.1 Dosagem de Proteína	<b>15</b>
3.2.2 Obtenção de eritrócitos	<b>15</b>

	<i>XI</i>	
3.2.3	Fixação de eritrócitos em glutaraldeído	<b>15</b>
3.2.4	Determinação de atividade hemaglutinante	<b>16</b>
3.2.5	Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante	<b>16</b>
3.2.6	Obtenção de colostro humano	<b>17</b>
3.2.7	Diálise	<b>17</b>
3.2.8	Imobilização de Cra Iso 1,2,3 em Sepharose-4B	<b>17</b>
3.3.9	Imobilização de BmoLL em PVA-glutaraldeído fibroso	<b>18</b>
3.2.10	Cromatografia de afinidade em colunas contendo lectina imobilizada	<b>18</b>
3.2.11	Ensaio em batelada utilizando Cra Iso 1,2,3-Sepharose e SpiL-Sepharose	<b>18</b>
3.2.12	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>20</b>
4.1	Atividade hemaglutinante e inibição de lectinas por glicoproteínas	<b>20</b>
4.2	Imobilização de Cra Iso 1,2,3 em Sepharose e BmoLL em PVA	<b>22</b>
4.3	Avaliação da estabilidade de Cra Iso 1,2,3-Sepharose e BmoLL-PVA-glutaraldeído	<b>22</b>
4.4	Avaliação da ligação de glicoproteínas em colunas de lectinas-imobilizadas	<b>25</b>
4.4.1	Soro fetal bovino como amostra	<b>26</b>
4.4.2	Colostro humano como amostra	<b>26</b>
4.4.3	Ovoalbumina como amostra	<b>29</b>
4.5	Ensaio em batelada para ligação de glicoproteínas em suportes de lectinas imobilizadas	<b>32</b>
4.5.2	Soro fetal bovino como amostra	<b>32</b>
4.5.3	Ovoalbumina como amostra	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>39</b>

## RESUMO

A lectina de folha de *Bauhinia monandra* (BmoLL) e as isolectinas de sementes de *Cratylia mollis* (Cra Iso 1,2,3), isoladas no Laboratório de Glicoproteínas da UFPE, foram imobilizadas em álcool polivinílico-glutaraldeído (PVA-glutaraldeído) e Sepharose-4B, respectivamente. Os suportes Cra Iso 1,2,3-Sepharose, SpiL-Sepharose (lectina de semente de *Swartzia pickellii* imobilizada em Sepharose-4B) e BmoLL-PVA-glutaraldeído foram avaliados quanto à eficiência de ligação de ovoalbumina e isolamento de glicoproteínas de soro fetal bovino e de colostro humano. Os rendimentos das imobilizações para Cra Iso 1,2,3-Sepharose e BmoLL-PVA-glutaraldeído foram de 90% e 50%, respectivamente. Distintas condições experimentais utilizando os suportes foram avaliadas (cromatografia em coluna e ensaio em batelada) as quais forneceram diferentes resultados. Proteínas de migração eletroforética similar à IgA secretória de colostro humano e à fetuína foram obtidas após cromatografia de colostro humano em coluna de BmoLL-PVA-glutaraldeído e de soro fetal bovino em coluna de Cra Iso 1,2,3-Sepharose, respectivamente. Ovoalbumina foi retida em Cra Iso 1,2,3-Sepharose nos ensaios em batelada. Os suportes foram estáveis nas condições cromatográficas utilizadas. Cra Iso 1,2,3-Sepharose e BmoLL-PVA-glutaraldeído podem ser incluídas no grupo de suportes para cromatografia de afinidade visando a obtenção de glicoconjugados. SpiL-Sepharose não foi eficiente, nas condições experimentais avaliadas, para a ligação de ovoalbumina e de glicoproteínas de soro fetal bovino.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Lectinas

Entre os reinos vegetal e animal (Sato *et al.*, 2000; Kawagishi *et al.*, 2001) está distribuída uma classe de proteínas conhecidas como lectinas que aglutinam eritrócitos de diferentes espécies animais (Paiva e Coelho, 1992; Correia e Coelho, 1995). O nome lectina é derivado do latim "lectus", que significa "selecionado", um termo que reflete o fato destas proteínas ligarem-se de uma forma não-covalente com carboidratos específicos (Kennedy *et al.*, 1995). Os sítios de ligação para carboidratos tendem a se localizar na superfície da molécula protéica, e a seletividade da ligação é obtida através de pontes de hidrogênio e interações de van der Waals entre o açúcar e a proteína (Surolia *et al.*, 1996; Weis e Drickamer, 1996).

As lectinas ligam carboidratos reversivelmente; a especificidade é definida em função do monossacarídeo que mais eficazmente inibe a atividade lectínica (Kennedy *et al.*, 1995). Este é um critério para classificar lectinas de plantas em grupos de especificidade (Peumans e van Damme, 1998): grupo fucose; grupo galactose/N-acetilgalactosamina; grupo N-acetilglicosamina; grupo manose; grupo ácido siálico; e grupo glicanos complexos.

A interação de lectinas com oligossacarídeos viabiliza o uso potencial em biotecnologia (Gilljam *et al.*, 1994; Endo, 1996).

Formas moleculares múltiplas de lectinas são definidas como proteínas existentes em um material biológico que apresentam atividade hemaglutinante e diferentes características quanto à estrutura molecular, aglutinação de eritrócitos, resistência a temperaturas elevadas, entre outras. A presença de formas moleculares múltiplas de lectinas com diferentes padrões de ligação a monossacarídeos é comum na natureza (Kennedy *et al.*, 1995). Pequenas alterações na estrutura da molécula protéica podem efetuar modificações na orientação do carboidrato ligado a ela e, portanto, alterar a especificidade da lectina (Ng *et al.*, 1996).

Atualmente, mais de 200 estruturas tridimensionais de lectinas de plantas, animais, bactérias e vírus foram avaliadas, onde as de plantas constituem pouco mais de 50% dos casos (Vijayan e Chandra, 1999).

A grande maioria das lectinas podem ser distribuídas em famílias

(Tabela 1), de acordo com a relação evolucionária e estrutural. Membros de uma mesma família podem apresentar similar ou diferente especificidade monossacarídica (Peumans e Van Damme, 1998).

Tabela 1. Famílias de lectinas de plantas: Ocorrência e especificidade.

Família	Ocorrência (número de lectinas identificadas)	Especificidade
Legumes	> 100	Diversa
Ligadoras de manose de monocotiledôneas	> 50	Manose
Ligadoras de quitina	> 100	GlcNAc ou (GlcNAc) <sub>n</sub>
<i>Cucurbitaceae</i>	< 10	(GlcNAc) <sub>n</sub>
Jacalina	< 10	Gal
		Manose/Maltose
<i>Amaranthaceae</i>	< 10	GalNAc

Gal, galactose; GlcNAc, N-acetilglicosamina; GalNAc, N-acetilgalactosamina

As lectinas de legumes, em geral, são glicoproteínas constituídas de duas ou quatro subunidades, de massa molecular 30 kDa cada subunidade, podendo ser idênticas ou muito similares, cada uma contendo um sítio de ligação para carboidrato com a mesma especificidade monossacarídica (Sharon e Lis, 1990). A lectina de *Canavalia ensiformis*, concanavalina A, Con A, é um tetrâmero a pH acima de 7,0, e um dímero abaixo de pH 6,0; cada monômero possui um sítio de ligação a carboidrato em adição a um sítio para metal de transição (normalmente, Mn<sup>2+</sup>) e um sítio de ligação de cálcio (Hong *et al.*, 2001).

As funções biológicas das lectinas ainda não são bem conhecidas. Discute-se seu papel nos processos de endocitose de glicoproteínas e transporte intracelular de carboidratos, na relação simbiótica legume/bactéria, no processo de aderência celular, na interação parasita/hospedeiro, no mecanismo de defesa de plantas, na função estrutural e como receptores celulares para glicoproteínas (Barondes, 1981; Dazzo e Truchet, 1983; Haltiwanger e Hill, 1986; Macha *et al.*, 1985; Osborn *et al.*, 1988; Appenzeller *et al.*, 1999).

Devido à sua inerente especificidade biológica para carboidratos,

lectinas têm uma grande aplicação na pesquisa médica e bioquímica. As lectinas são amplamente utilizadas no estudo de moléculas contendo carboidratos na sua estrutura; assim, são aplicadas para isolamento de glicoconjugados (Pilatte *et al.*, 1989), para estudar alterações em cadeias de carboidratos de glicoproteínas em processos patológicos ou até mesmo alterações genéticas (Yoshida *et al.*, 1997) e para a caracterização e análise de glicoconjugados (Biedrzycka *et al.*, 1987; Young e Oomen, 1992; Sánchez e Cabezas, 1998).

## 1.2 Purificação de lectinas através de cromatografia de afinidade

O termo cromatografia refere-se ao grupo de técnicas de separação que se caracteriza pela distribuição de moléculas a serem separadas entre duas fases: uma estacionária e outra móvel. Moléculas capazes de interagir com a fase estacionária (matriz, suporte) se moverão em uma velocidade menor no sistema do que aquelas que não interagem.

A configuração física mais comum na cromatografia líquida de proteínas é a coluna cromatográfica (Janson e Rydén, 1989); o suporte é empacotado em um tubo, através do qual a fase móvel passará. A amostra contendo as proteínas a serem separadas é introduzida no topo da coluna e as macromoléculas que percorrerão com diferentes velocidades a coluna são subseqüentemente coletadas e detectadas através de leitura espectrofotométrica a 280 nm.

A forma de eluição (retirada das proteínas ligadas à matriz) é função do tipo de cromatografia. Em cromatografia de troca iônica, em geral, melhor resolução (capacidade de separar diferentes proteínas) é obtida pela eluição através de um gradiente linear de NaCl (Paiva e Coelho, 1992); em cromatografia de gel filtração efetua-se a lavagem da coluna com a mesma solução de equilíbrio, desde que ela funciona como uma peneira molecular.

O suporte deve ser química e fisicamente estável para suportar diferentes condições cromatográficas, tais como extremos de pH (Janson e Rydén, 1989) e elevada velocidade de fluxo (Weiss *et al.*, 2000). Os suportes utilizados para o isolamento de proteínas podem ser inorgânicos, polímeros sintéticos orgânicos ou polissacarídicos, do tipo hidroxiapatita (Janson e Rydén, 1989), poliácridamida (Funatso *et al.*, 2001) e dextrana (Zenteno *et al.*,

2000), respectivamente.

O procedimento de isolamento de lectinas envolve, em geral, as etapas de extração de proteínas, seguindo-se pelo tratamento do extrato com sulfato de amônio e métodos cromatográficos convencionais, tais como cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular (Taylor e Sammerfield, 1987; Weiss *et al.*, 2000). A cromatografia de afinidade, técnica que explora as afinidades biológicas para adsorção da molécula a uma fase sólida, tem sido amplamente utilizada em purificação de lectinas.

Para que a cromatografia de afinidade seja efetiva é necessário que a matriz tenha a capacidade de formar complexos reversíveis com a proteína a ser isolada; a constante de ligação não deve exceder  $10^3 - 10^6$  M.

A magnitude da constante de dissociação entre a matriz e a proteína deve ser alta o suficiente para a formação de complexos estáveis ou para fornecer uma velocidade menor durante a passagem na coluna cromatográfica; porém o complexo deve ser facilmente dissociado por uma troca no meio cromatográfico sem que ocorra a destruição da proteína ou de um ligante imobilizado na matriz. Constantes maiores que  $10^6 - 10^{11}$  M tornam impraticável a utilização do processo cromatográfico, desde que as condições necessárias para dissociar o complexo levam à desnaturação da molécula protéica (Janson e Rydén, 1989).

A dessorção de biomoléculas do suporte de afinidade pode ser feita de modo específico ou inespecífico. No primeiro tipo utiliza-se uma solução contendo o competidor e portanto envolve a quebra de interações existentes apenas a nível de sítio de ligação. A eluição inespecífica se dá pela quebra de interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e pontes salinas presentes no contato entre o sítio específico de ligação de biomoléculas e a matriz, e/ou efetuadas em outras partes da estrutura protéica. Condições como pH e aumento da força iônica do meio são então modificadas (Lotan e Nicolson, 1979).

A cromatografia de afinidade é uma técnica poderosa no isolamento de lectinas, fornecendo preparações protéicas homogêneas (Coelho e da Silva, 2000). Utilizando a propriedade de ligação a carboidratos, lectinas podem ser isoladas por cromatografia de afinidade em colunas contendo suportes polissacarídicos (Sato *et al.*, 1991; Anuradha e Bhide, 1999) tais como Sephadex (polímero de glicose), Sepharose (polímero de galactose) e quitina

(polímero de N-acetilglicosamina).

A eluição específica de lectinas geralmente ocorre com uma solução de monossacarídeos (Coelho e da Silva, 2000); uma alternativa é o uso de um gradiente linear de monossacarídeo, que ao irrigar a coluna com concentrações crescentes do competidor promove a separação de formas moleculares que diferem quanto ao grau de ligação da matriz (Janson e Rydén, 1989).

### **1.3 Imobilização de proteínas em suportes insolúveis para cromatografia de afinidade**

A propriedade de ligação a carboidratos das lectinas facilita a purificação através de suportes polissacarídicos, porém muito freqüentemente o uso de cromatografia de afinidade em protocolos de isolamento de biomoléculas requer uma etapa anterior: a síntese do suporte de afinidade. O suporte é obtido pela introdução de grupos ligantes a um suporte insolúvel; por exemplo, a imobilização de íon metálico para o isolamento de proteínas que se ligam ao metal (Janson e Rydén, 1989) ou de lectinas para o isolamento de glicoconjugados (Kobata e Endo, 1992; Peumans e Van Damme, 1998).

A síntese da matriz inicia-se com a introdução do grupo ligante, seguindo-se da etapa de ligação covalente do ligante ao suporte insolúvel. As características que o ligante deve ter incluem: ser compatível com as soluções usadas durante o processo de imobilização; possuir no mínimo um grupo funcional através do qual ele será acoplado à matriz (-NH<sub>2</sub>, amino; -COOH, carboxílico; -CHO aldeído; -SH, tiol; -OH, hidroxílico) e que este grupo funcional não seja essencial para a sua função biológica, ou seja, sua capacidade de ligação não deve ser afetada pela imobilização (Janson e Rydén, 1989).

Entre os suportes que podem ser usados para imobilização de proteínas estão a Sepharose-4B, a agarose e o álcool polivinílico (PVA).

A agarose é um polissacarídeo isolado de algas vermelhas (Rhodophyceae), constituído de unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose, com cadeias laterais de 6-metil-D-galactose (Garrett e Grisham, 1995). A agarose pode ser processada para a remoção de grupos carregados, fornecendo a Sepharose, que em geral é ativada com brometo de cianogênio antes do procedimento de imobilização da proteína (Figura 1).

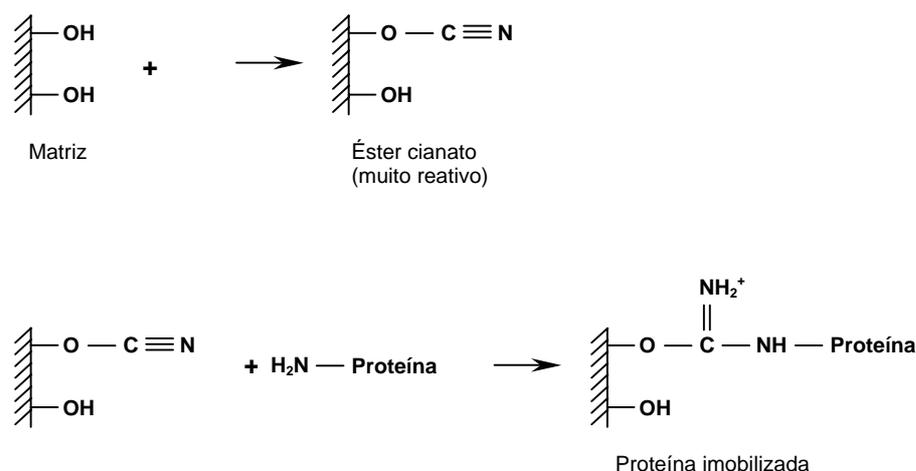


Figura 1. Imobilização de proteína em Sepharose-4B (modificado de Janson e Rydén, 1989).

O PVA (Figura 2) é um dos polímeros mais estudados desde sua descoberta (Araújo *et al.*, 1996).

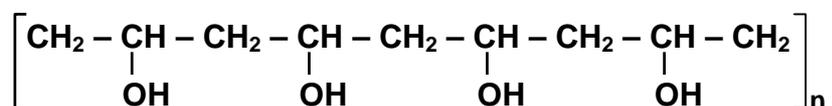


Figura 2. Estrutura do álcool polivinílico.

O PVA tem sido usado como suporte para vários biomateriais, tais como aprisionamento de células (Szczesna *et al.*, 2001) e componentes contendo grupamento amina (Xu *et al.*, 2001).

PVA-glutaraldeído é um suporte alternativo para imobilização covalente de proteínas (Araújo *et al.*, 1996). Esta proposta é baseada na reação de acetilação que ocorre entre o PVA e o glutaraldeído (Figura 3), um dos reagentes bifuncionais mais empregados em imobilização de proteínas (Walt e Agayn, 1994; Isgrove *et al.*, 2001).



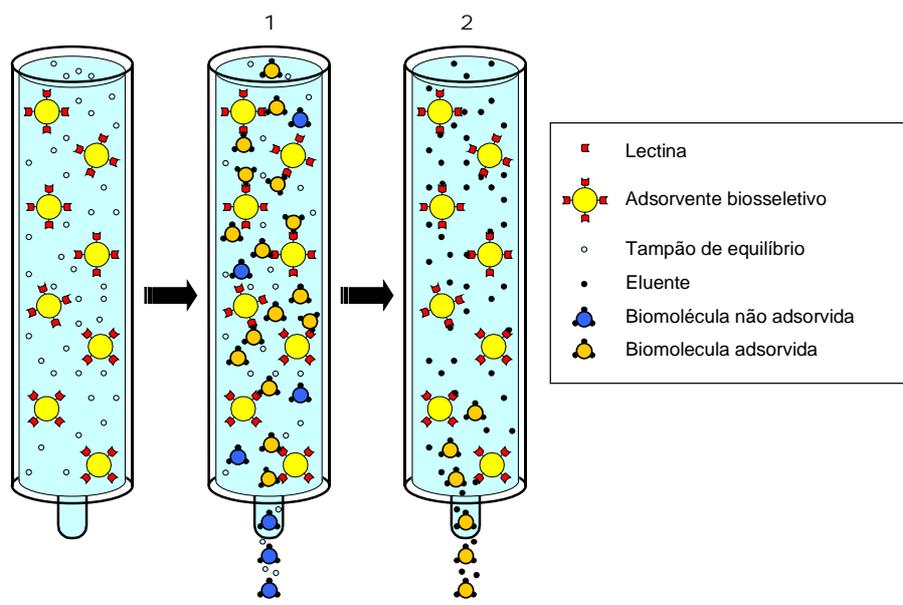


Figura 4 – Etapas da cromatografia de afinidade em suportes contendo lectina imobilizada

(1) Adsorção da biomolécula: amostra contendo glicoproteínas é aplicada à coluna; o contato adsorvente biosseletivo x biomolécula resulta em interações não covalentes via o sítio de ligação para carboidrato da lectina. As biomoléculas não retidas à coluna são coletadas no tampão de equilíbrio como frações não adsorvidas. (2) Dessorção da biomolécula: glicoproteína é obtida através de eluição biosseletiva ou não específica.

Na tabela 2 estão listadas as lectinas mais comumente usadas, bem como suas especificidades monossacarídicas, o nome do suporte e preço respectivo (Catálogo Sigma, 2000).

Os grupos amino das lectinas são usados para a sua imobilização. No método mais amplamente empregado a imobilização da proteína é feita por reação entre o grupo amino da lectina e o resíduo imidocarbonato da Sepharose-CNBr ativada. Dentre os suportes mais amplamente usados para imobilização de lectinas podem ser citados a Sepharose e a agarose (Yoshida *et al.*, 1997).

Tabela 2. Lectinas mais comumente usadas como ligantes em suportes para cromatografia de afinidade.

Lectina	Especificidade	Matriz	Lectina (mg/ml)	Volume (ml)	Preço (US\$)
<i>Arachis hypogea</i>	Gal/GalNAc	Agarose	2 – 4	1,0	80.30
<i>Canavalia ensiformis</i>	Glc/Man	Sepharose-4B	10 – 16	5,0	38.70
<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc	Agarose	2 – 4	1,0	58.90
<i>Glycine max</i>	GalNAc	Agarose	2 – 4	1,0	49.20
<i>Hellix pomatia</i>	GalNAc	Agarose	1,5	1,0	91.70
<i>Lens culinaris</i>	Glc/Man	Sepharose-4B	2	5,0	140.70
<i>Phaseolus vulgaris</i> *	GalNAc	Agarose	2 – 4	1,0	122.30
<i>Pisum sativum</i>	Glc/Man	Agarose	2 – 4	1,0	56.20
<i>Triticum vulgaris</i>	GlcNAc	Agarose	5 – 10	0,5	65.10

Man, manose; Glc, glicose; GlcNAc, *N*-acetilglicosamina; Gal, galactose; GalNAc, *N*-acetilgalctosamina. \* Eritroaglutinina (PHA-E)

#### 1.4 Glicoproteínas

As glicoproteínas resultam da associação covalente de oligo ou polissacarídeos com proteínas. Papéis biológicos importantes têm sido conferidos à porção glicídica: estabilização da estrutura protéica, proteção contra degradação, controle do transporte da proteína na célula e controle da meia-vida da proteína no sangue (Gravel e Golaz, 1996).

As glicoproteínas diferem entre si quanto ao conteúdo glicídico, variando de menos que 1 % a mais de 90 % do seu peso (Voet e Voet, 1995). A incorporação das cadeias glicídicas corresponde a um tipo de modificação traducional, ou seja, sua ligação covalente à cadeia polipeptídica ocorre durante ou após a síntese protéica.

As glicoproteínas resultam da ligação glicosídica entre oligossacarídeos e o nitrogênio da amida de resíduos da asparagina, ligação *N*-glicosídica ou a átomos de oxigênio das cadeias laterais dos resíduos de serina, hidroxilisina ou treonina, ligação *O*-glicosídica.

*N*-Acetilglicosamina é o resíduo de carboidrato usualmente encontrado em sacarídeos *O*-ligados, embora unidades de manose, galactose e xilose sejam também encontradas (Garrett e Grisham, 1995).

As glicoproteínas de humanos incluem proteínas estruturais, enzimas, receptores de membrana, proteínas de transporte e defesa, dentre elas as imunoglobulinas (Ig). Existem cinco classes de imunoglobulinas que

diferem tanto estruturalmente (Tabela 3) quanto em relação à função biológica (Stites e Terr, 1992; Voet e Voet, 1995).

Tabela 3. Imunoglobulinas humanas.

Classe	Massa molecular	Função
<b>IgG</b>	150	É a principal Ig sérica.
<b>IgA</b>	360 -720	Protege as mucosas.
<b>IgM</b>	950	Mais efetiva contra microrganismos. É abundante no início da resposta imune à maioria dos antígenos.
<b>IgD</b>	160	Não é bem conhecida, mas é sugerido seu envolvimento no processo de diferenciação celular de linfócitos B.
<b>IgE</b>	190	Protege contra parasitas e está envolvida em reações alérgicas.

Cromatografia de afinidade em colunas contendo lectinas imobilizadas tem sido bastante utilizada no estudo de glicoproteínas humanas e de outras espécies animais. A enzima gama-glutamil-transferase de plaquetas humanas foi obtida através de cromatografia em Con A-Sepharose (Sener e Yardinci, 2000). Dois componentes protéicos da zona pelúcida de camundongo, altamente glicosilados, foram submetidos a digestão exaustiva com N-glicanase e os oligossacarídeos resultantes foram separados em colunas de lectinas imobilizadas (Tulsiani, 2000).

### 1.5 Lectinas de leguminosas isoladas no Laboratório de Glicoproteínas da UFPE

O Laboratório de Glicoproteínas da Universidade Federal de Pernambuco desde 1983 vem se dedicando ao isolamento, caracterização e aplicação biotecnológica de lectinas de plantas introduzidas e autóctones.

Folhas de *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca; subfamília *Faboideae*) contêm uma concentração relativamente alta de uma lectina (BmoLL) que aglutina sangue de coelho. BmoLL foi purificada através de precipitação com sulfato de amônio (fração 0-60%) e cromatografia de afinidade em matriz de gel de guar (Coelho e da Silva, 2000). A lectina apresenta afinidade

monossacarídica para a D(+)-galactose, D(+)-rafinose e metil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (grupo de especificidade galactose/N-acetilgalactosamina). Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e redutoras da proteína pura revelou uma banda principal de massa molecular 33 kDa (glicosilada) e traços de uma banda de 26 kDa (não glicosilada).

Sementes de *Swartzia pickellii* (jacarandá-branco; subfamília *Caesalpinioideae*) contêm uma lectina (SpiL) específica para eritrócitos humanos tipo A. SpiL foi purificada através de fracionamento com sulfato de amônio (fração 20-40%) e cromatografia de gel filtração em coluna de Sephadex G-75 (Cavalcanti e Coelho, 1990). SpiL é inibida por N-acetilgalactosamina (mesmo grupo de especificidade de BmoLL) e tem massa molecular 36 kDa. SpiL apresentou diferente padrão de aglutinação de linhagens de *Yersinia pestis* (Cavalcanti *et al.*, 1990) e interagiu com carboidratos da superfície de *Leishmania donovani chagasi* (Cavalcanti *et al.*, 1989).

Sementes de *Cratylia mollis* (feijão camaratú; subfamília *Faboideae*) contêm uma mistura de formas moleculares com atividade hemaglutinante, as isolectinas (Iso) 1, 2 e 3 (Paiva e Coelho, 1992; Correia e Coelho, 1995). As Iso foram isoladas através de procedimentos que combinaram precipitação salina com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Celulose, cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-75 e gel filtração em coluna de Bio-gel P-2. As Iso 1, 2 e 3 aglutinam eritrócitos humanos e de coelho e pertencem a diferentes grupos de especificidade (Paiva e Coelho, 1992; Correia e Coelho, 1995): grupo manose (Iso 1 e 2) e galactose/N-acetilgalactosamina (Iso 3). As Iso 1 e 3 têm massa molecular 31 kDa; a Iso 2 apresenta massa molecular 60 kDa. Apenas a Iso 3 tem natureza glicoprotéica.

A Iso 1 conjugada à peroxidase foi empregada para caracterização de células tumorais (Texeira *et al.*, 1995; Beltrão *et al.*, 1998); a Iso 1 também foi avaliada quanto à atividade citotóxica para células KB, e quanto à atividade antitumoral, empregando os tumores experimentais carcinoma de Erlich e sarcoma 180 (Pereira, 1995). As Iso aglutinaram diferentemente plaquetas humanas e de coelho (Silva, 2000). Uma das propostas do trabalho de tese da doutoranda Ana Célia Oliveira dos Santos (Doutorado em Ciências Biológicas, UFPE) foi a determinação do N-terminal das isoformas, buscando uma

definição da origem gênica destas proteínas.

## 1.6 Relevância do trabalho

Lectinas imobilizadas em suportes insolúveis têm sido amplamente utilizadas na purificação e caracterização de glicoconjugados (Hayunga e Sumner, 1986; Kobata e Endo, 1992; Gilljam *et al.*, 1994; Endo, 1996; Lima *et al.*, 1997; Matsui *et al.*, 2001).

A imobilização de BmoLL em PVA-glutaraldeído e de Cra Iso 1,2,3 em Sepharose-4B, assim como a avaliação de BmoLL-PVA-glutaraldeído, Cra Iso 1,2,3-Sepharose e SpiL-Sepharose como suportes de afinidade para isolamento de glicoconjugados, constitui uma alternativa de aplicação biotecnológica de lectinas puras obtidas no Laboratório de Glicoproteínas da UFPE.

As biomoléculas isoladas podem ser utilizadas em estudos laboratoriais ou diagnóstico de doenças humanas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Produção de suportes insolúveis contendo lectinas de *B. monandra*, *S. pickellii* e isolectinas de *C. mollis* como ligantes e avaliação dos mesmos em cromatografia de afinidade para o isolamento de glicoproteínas.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Imobilizar Cra Iso 1,2,3 em Sepharose-4B.
- Imobilizar BmoLL em PVA-glutaraldeído.
- Avaliar Cra Iso 1,2,3-Sepharose, SpiL-Sepharose e BmoLL-PVA-glutaraldeído como suportes cromatográficos para isolamento de glicoproteínas presentes em colostro humano e soro fetal bovino.
- Determinar o padrão eletroforético das glicoproteínas isoladas.
- Avaliar a ligação de ovoalbumina a Cra Iso 1,2,3-Sepharose, SpiL-Sepharose e BmoLL-PVA-glutaraldeído.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Lectinas isoladas no Laboratório de Glicoproteínas da Universidade Federal de Pernambuco

BmoLL foi preparada segundo Coelho e da Silva (2000) e fornecida pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Luana C. B. B. Coelho; SpiL foi gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti. A preparação contendo as isolectinas de *C. mollis* (Cra Iso 1,2,3) foi fornecida pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva.

##### 3.1.2 Lectina Imobilizada em Sepharose-4B

O suporte SpiL-Sepharose foi gentilmente cedido pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti.

##### 3.1.3 Glicoproteínas

As glicoproteínas ovoalbumina e fetuína foram obtidas da Sigma.

##### 3.1.4 Soro fetal bovino e colostro humano

Soro fetal bovino foi obtido da Sigma; colostro humano foi fornecido pelo Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

##### 3.1.5 Suportes insolúveis para imobilização de lectinas

Sepharose-4B ativada com brometo de cianogênio foi obtida da Sigma; álcool polivinílico (PVA)-glutaraldeído fibroso foi fornecido pelo Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior.

##### 3.1.6 Materiais para eletroforese

Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, obtidos da Sigma; sulfato sódico de dodecila (SDS),  $\beta$ -mercaptoetanol, N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED), azul brilhante de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue R-250*), obtidos da Merck. Como padrão foram utilizados: IgA de colostro humano e fetuína obtidos da Sigma.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Dosagem de Proteína

A determinação quantitativa de proteínas foi feita de acordo com Lowry *et al.* (1951) utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina, com valores compreendidos entre 0 e 500  $\mu\text{g}$ .

Neste método 0,2 ml de solução protéica foram incubados por 10 min, em temperatura ambiente, com 1 ml de uma solução alcalina de cobre [constituída por 1 ml de sulfato de cobre a 0,5% (p/v) em citrato de sódio a 1% (p/v) e 50 ml de solução de carbonato de sódio a 2% (p/v) em hidróxido de sódio a 0,1% (p/v)]. Em seguida a esta incubação, 0,1 ml do reagente de Folin-Ciocalteu, diluído 1:1 com água, foi adicionado e, após 30 min, a absorbância foi medida a 720 nm.

A estimativa de concentração protéica relativa foi feita através de leitura espectrofotométrica a 280 nm.

### 3.2.2 Obtenção de eritrócitos

As amostras de sangue humano (tipo A) e de coelho foram coletadas por punção endovenosa e misturadas com uma solução de Alsever (Bukantz *et al.*, 1946) na proporção de 1 volume de sangue para 1,6 volumes da solução. O conteúdo da solução de Alsever compreendeu: 2,05 g de dextrose, 1,2 g de citrato de sódio, 0,42 g de cloreto de sódio, 0,055 g de ácido cítrico e água destilada para um volume final de 100 ml. O sangue coletado em solução de Alsever foi centrifugado em centrífuga de bancada (Excelsa 2, Mod. 205, FANEM, São Paulo, Brasil) a 1.300 x g, por 15 min. O precipitado (eritrócitos) foi, então, ressuspenso em NaCl 0,15 M e nova centrifugação foi procedida; esta etapa de lavagem de eritrócitos foi repetida três vezes.

### 3.2.3 Fixação de eritrócitos em glutaraldeído

A fixação de eritrócitos foi feita de acordo com Bing *et al.* (1967). Os eritrócitos lavados com NaCl 0,15 M (item 3.2.2) foram misturados em uma solução de glutaraldeído a 1% (v/v) para uma concentração final de 1,5 % (v/v). A solução de glutaraldeído foi obtida diluindo o mesmo em uma solução contendo 1 volume de tampão fosfato de sódio 0,15 M, pH 8,2; 9 volumes de

NaCl 0,15 M e 5 volumes de água destilada. A mistura foi incubada a 4°C, por um período de 30 min, durante os quais agitação lenta foi periodicamente efetuada a intervalos de 5 min. Após incubação, os eritrócitos foram centrifugados a 1.300 x g, por 10 min, sendo o precipitado ressuspensionado em NaCl 0,15 M; esse procedimento foi repetido nove vezes, tendo sido o precipitado ressuspensionado em água destilada, a partir da quarta vez.

Uma suspensão de eritrócitos glutarizados a 2,5 % (v/v) em NaCl 0,15 M foi feita, sendo a mesma armazenada a 4°C, em alíquotas de 5 ml, até o momento de uso.

#### 3.2.4 Determinação da atividade hemaglutinante

Para essas determinações foram utilizadas placas de microtitulação (Biolab, Brasil), as quais continham oito fileiras com doze poços cada. Em cada poço foram colocados 50 µl de NaCl 0,15 M e, em seguida, foram adicionados, no segundo poço, 50 µl da amostra lectínica. Os conteúdos foram misturados e 50 µl dessa mistura foram transferidos para o terceiro poço. Esse processo de diluição foi sucessivamente efetuado até o último poço, sendo os últimos 50 µl desprezados. Após as diluições, 50 µl da suspensão de eritrócitos fixados (item 3.2.3) foram adicionados a todos os poços.

A placa foi mantida em repouso, por 45 min, em temperatura ambiente e o título foi definido como o inverso da maior diluição onde se observava aglutinação total. A atividade hemaglutinante (AH) é definida como o inverso do título.

#### 3.2.5 Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante

De acordo com o título da lectina avaliada os poços de uma ou duas fileiras horizontais da placa de microtitulação foram preenchidos com 50 µl de soro fetal bovino (8,0 mg de proteína/ml), ovoalbumina (3,0 mg de proteína/ml) ou colostro humano descaseinado (1,5 mg de proteína/ml), exceto o poço onde foram adicionados 50µl da preparação de BmoLL (0,2mg/ml), Cra Iso 1,2,3 (1,0mg/ml) ou SpiL (0,1mg/ml). Neste poço a solução glicoprotéica continha o dobro da concentração presente nos outros poços da placa. O ensaio foi então efetuado conforme descrito no item 3.2.4.

### 3.2.6 Obtenção de colostro humano

O colostro foi centrifugado a 12.000 x g, durante 20 min e submetido a acidificação (pH 4,6) com ácido acético glacial. O precipitado obtido (caseína) foi descartado e o sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi utilizado nos ensaios de inibição da atividade hemaglutinante e de cromatografia de afinidade em suportes de lectinas imobilizadas.

### 3.2.7 Diálise

As amostras eluídas das colunas cromatográficas com NaCl 1 M foram dialisadas (Plumer, 1978) em membranas semipermeáveis a 4°C, sob agitação constante, durante 4 h contra NaCl 0,15 M.

### 3.2.8 Imobilização de Cra Iso 1,2,3 em Sepharose-4B

Sepharose-4B ativada com brometo de cianogênio (3,0 g) foi misturada a 200 ml de NaCl 0,5 M, pH 2,5, e lavada com 800 ml da mesma solução. Em seguida, a Sepharose-4B foi lavada com 200 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M em NaCl 0,5 M, pH 8,2. Cra Iso 1,2,3 (7,0 mg) foi dissolvida em 5,0 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M em NaCl 0,5 M, pH 8,2 e misturada ao gel. A suspensão foi gentilmente agitada durante 3 h em temperatura ambiente e deixada em repouso durante a noite a 4°C. Em seguida, o suporte Cra Iso 1,2,3-Sepharose foi inicialmente lavado com 15 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M em NaCl 0,5 M, pH 8,2 e foi medida a absorvância (280 nm) no eluato. O suporte foi lavado com 200 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M em NaCl 0,5 M, pH 8,2 e glicina 0,5 M foi adicionada. Agitação durante 2 h foi efetuada em temperatura ambiente e o suporte de afinidade foi então lavado com tampões de alto e baixo valores de pH (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M em NaCl 0,5 M, pH 8,2 e acetato de sódio 0,1 M em NaCl 0,5 M, pH 4,0). Cra Iso 1,2,3-Sepharose foi armazenado em água contendo azida de sódio 0,02% a 4°C até a sua utilização. A ligação de Cra Iso 1,2,3 ao suporte foi estimada pela diferença entre a quantidade de proteína aplicada para a imobilização e a quantidade de proteína que foi retirada na lavagem.

### 3.2.9 Imobilização de BmoLL em PVA-glutaraldeído fibroso

A obtenção de BmoLL-PVA-glutaraldeído foi procedida no Setor de Bioquímica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami. BmoLL (7,0 mg em 5,0 ml) foi incubada com PVA-glutaraldeído sob agitação, durante a noite, a

4°C. Em seguida, o suporte fibroso (BmoLL-PVA-glutaraldeído) foi colocado em uma coluna (1,0 x 5,0 cm) e lavado exaustivamente com NaCl 1,0 M; a absorbância a 280 nm foi efetuada para detectar a presença de proteínas nas frações coletadas. O suporte foi lavado com glicina 1,0 M em tampão citrato fosfato 0,1 M, pH 6,4. A ligação de BmoLL ao suporte foi estimada pela diferença entre a quantidade de proteína aplicada para a imobilização e a quantidade de proteína que foi retirada na lavagem.

### 3.2.10 Cromatografia de afinidade em coluna contendo lectina-imobilizada

O mesmo procedimento foi utilizado para BmoLL-PVA-glutaraldeído, SpiL-Sepharose e Cra Iso 1,2,3-Sepharose. As colunas foram montadas em seringas: BmoLL-PVA-glutaraldeído (4,0 ml; 5,0 x 1,0 cm), SpiL-Sepharose (1,2 ml; 2,5 x 0,8 cm) e Cra Iso 1,2,3-Sepharose (0,8 ml; 1,5 x 0,8 cm) e as cromatografias foram realizadas em temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ). Após a lavagem do suporte (quatro vezes o volume da coluna) com tampão citrato/fosfato 0,1 M, pH 6,4, fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4, ou fosfato de sódio 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 7,4, as amostras ovoalbumina (1,0 ml, 27,0 mg), soro fetal bovino (1,0 ml, 8,0 mg de proteínas) ou colostro (1,0 ml, 15,0 mg de proteínas) foram aplicadas às colunas. A etapa de lavagem foi efetuada com o tampão de equilíbrio da coluna até obter-se A 280 nm menor que 0,05. A eluição foi efetuada com tampão glicina/HCl, 0,1 M, pH 2,8, tampão borato de sódio 0,015 M, pH 7,4, NaCl 1,0 M ou galactose 0,2 M. Frações de 1,0 ml foram coletadas a um fluxo de 15 ml/h e a concentração protéica foi determinada em cada fração por absorção em 280 nm.

### 3.2.11 Ensaios em batelada utilizando Cra Iso 1,2,3-Sepharose e SpiL-Sepharose

Cra Iso 1,2,3-Sepharose (1,5 ml) e SpiL-Sepharose (2,5 ml) foram misturados a ovoalbumina (1,0 ml, 27,0 mg) ou soro fetal bovino (1,0 ml, 8,0 mg de proteínas) e deixados a 4°C durante 2 h sob agitação. Em seguida as matrizes foram colocadas em colunas e efetuou-se lavagem com tampão fosfato de sódio 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 7,4 até que a A280 nm fosse menor que 0,05. A eluição foi efetuada com NaCl 1,0 M.

### 3.2.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

O gel de poliacrilamida, contendo sulfato sódico de dodecila (SDS) foi preparado de acordo com Laemmli (1970).

O gel (10%) de corrida foi preparado com 3,0 ml de acrilamida/bisacrilamida (29,2 g de acrilamida, 0,8 g de bisacrilamida e água destilada para um volume final de 100 ml), 3,75 ml de água destilada, 2,25 ml de tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, contendo SDS a 0,4% (p/v), 45 µl de persulfato de amônio a 10% (p/v) e 8,7 µl de TEMED. O gel de concentração consistiu de 0,5 ml da mistura acrilamida/bisacrilamida citada acima, 1,8 ml de água destilada, 780 µl de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo SDS a 0,4% (p/v), 10,7 µl de persulfato de amônio a 10% (p/v) e 5,7 µl de TEMED.

As amostras contendo 50 µg de proteínas foram ressuspensas em 15 µl de um tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS a 2% (p/v), glicerol a 10% (v/v) e azul de bromofenol a 0,002% (p/v).

A corrida eletroforética foi desenvolvida em tampão Tris-glicina (3,0 g de Tris, 14,4 g de glicina e 1,0 g de SDS, para um volume final de 100 ml), durante aproximadamente 2 h, a 100 mA.

A detecção das bandas protéicas foi feita por coloração com Azul de Coomassie a 0,002% (p/v) em ácido acético a 10% (v/v) por 16 h, em temperatura ambiente. A etapa de descoloração consistiu de sucessivas lavagens do gel com ácido acético a 10% (v/v).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Atividade hemaglutinante e inibição de lectinas por glicoproteínas

AH de BmoLL, SpiL e Cra Iso 1,2,3 foi avaliada com eritrócitos humanos e de coelho (Tabela 4).

A AH é devida à interação da lectina com moléculas glicídicas da superfície dos eritrócitos (Kennedy *et al.*, 1995); uma rede entre as células é formada resultando na aglutinação.

A escolha dos eritrócitos para a realização dos ensaios de hemaglutinação é feita após a avaliação da AH com diferentes eritrócitos. Cra Iso 1,2,3 e BmoLL aglutinam eritrócitos humanos e de coelho (Paiva e Coelho, 1992; Coelho e Silva; 2000); a opção por eritrócitos de coelho (Tabela 4) foi devida à disponibilidade dessas células no Laboratório de Glicoproteínas da UFPE. SpiL aglutina apenas eritrócitos humanos tipo A (Cavalcanti e Coelho, 1990), inviabilizando a realização de ensaios com eritrócitos de coelho.

A definição da especificidade monossacarídica de lectinas é importante para a caracterização da proteína (Peumans *et al.*, 1997) e para a definição das condições de eluição da lectina em cromatografia de afinidade (Coelho e Silva, 2000).

Lectinas também são inibidas por oligossacarídeos e glicoproteínas (Yan *et al.*, 1997); a inibição da AH de BmoLL, SpiL e Cra Iso 1,2,3 foi avaliada com ovoalbumina, soro fetal bovino e colostro descaseinado (Tabela 4). BmoLL foi parcialmente inibida por ovoalbumina e soro fetal bovino; inibição total de AH foi obtida com colostro. Cra Iso 1,2,3 e SpiL foram totalmente inibidas por ovoalbumina e quase totalmente por soro fetal bovino. Colostro inibiu SpiL.

Apesar da diferente especificidade monossacarídica, BmoLL, Cra Iso 1,2,3 e SpiL foram inibidas por ovoalbumina; provavelmente este resultado reflete a natureza heterogênea da porção glicídica da glicoproteína (Tai *et al.*, 1977). Resultado semelhante ocorreu quando se avaliou o soro fetal bovino e colostro; neste caso, porém, a inibição pode ser devida à presença de diferentes glicoproteínas.

Tabela 4 – Atividade hemaglutinante de BmoLL, SpiL e Cra Iso 1,2,3 em presença de glicoproteínas.

Lectina	Atividade hemaglutinante			
	NaCl 0,15 M	Ovoalbumina (3,0 mg/ml)	Soro Fetal Bovino (8,0 mg/ml)	Colostro (1,5 mg/ml)
Cra Iso 1,2,3	128	0	2	Nd
<i>SpiL</i>	64	0	2	4
BmoLL	32.768	512	4.098	0

Nd, não determinado. Atividade Hemaglutinante (AH): o título foi definido observando-se o inverso da maior diluição que apresentava aglutinação. A AH foi verificada com uma suspensão de eritrócitos glutarizados de coelho a 2,5% (v/v) em NaCl 0,15 M (Cra Iso 1,2,3 e BmoLL) ou com uma suspensão de eritrócitos glutarizados humanos tipo A a 2,5% (v/v) em NaCl 0,15 M (*SpiL*).

Os resultados de inibição da AH das lectinas levanta a possibilidade de purificação de glicoproteínas de soro e colostro, através de cromatografia de afinidade em colunas contendo BmoLL, SpiL ou Cra Iso 1,2,3 imobilizada.

#### **4.2 Imobilização de Cra Iso 1,2,3 em Sepharose-4B e de BmoLL em PVA-glutaraldeído**

Uma característica do suporte é a densidade do ligante (mg/ml do suporte); geralmente este valor é calculado como a diferença entre a quantidade do ligante original adicionado à matriz e a quantidade do ligante recuperado na etapa de lavagem após processo de imobilização (Janson e Rydén, 1989).

A quantidade de Cra Iso 1,2,3 ligada a Sepharose-4B foi correspondente a um rendimento da imobilização de 90%. O processo de imobilização de BmoLL em PVA-glutaraldeído correspondeu a 50% da proteína inicial (Tabela 5).

#### **4.3 Avaliação da estabilidade de Cra Iso 1,2,3-Sepharose e BmoLL-PVA-glutaraldeído**

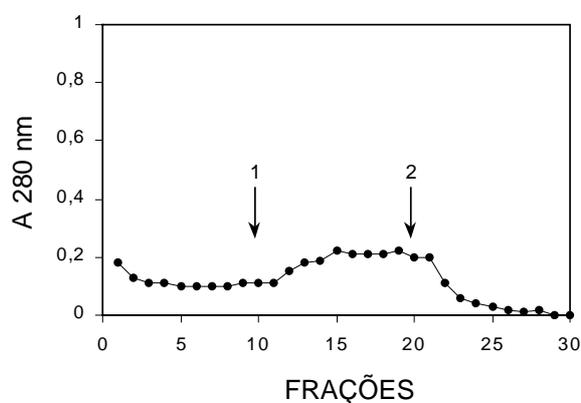
As matrizes Cra Iso 1,2,3-Sepharose e BmoLL-PVA-glutaraldeído foram submetidas a um ciclo cromatográfico completo (equilíbrio com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4; eluição com tampão glicina/HCl 0,1 M, pH 2,8 em Cra Iso 1,2,3-Sepharose, galactose 0,2 M em BmoLL-PVA-glutaraldeído e NaCl 1,0 M) eliminando apenas a etapa de aplicação da amostra glicoprotéica. Nas frações coletadas determinou-se a A 280 nm e a AH.

Resultados negativos foram obtidos nas frações provenientes da coluna de Cra Iso 1,2,3-Sepharose; porém, absorção espectrofotométrica foi observada naquelas coletadas de BmoLL-PVA-glutaraldeído (Figura 5). Nenhuma AH foi observada nestas frações, revelando a ausência de BmoLL. A possibilidade das frações conterem BmoLL inativa como conseqüência do procedimento de imobilização foi afastada, após a determinação da concentração protéica pelo método do Lowry *et al.* (1951). Nenhuma proteína

Tabela 5 – Imobilização de lectinas em suportes insolúveis.

Lectina	Proteína inicial (mg)	Proteína obtida na etapa de lavagem (A 280 nm)	Volume da etapa de lavagem (ml)	Proteína não imobilizada (A 280 x volume)	(%)
Cra Iso 1,2,3	7,0	0,07	10	0,7	90
BmoLL	7,0	0,35	10	3,5	50

R, rendimento: corresponde a diferença entre a quantidade de proteína inicial e àquela obtida na etapa de lavagem vezes 100.



**Figura 5** – Cromatografia em coluna de BmoLL-PVA-glutaraldeído sem aplicação de amostra glicoprotéica

O suporte foi equilibrado com tampão citrato de sódio 0,01 M, pH 6,5 a um fluxo de 15 ml/h. A eluição foi processada com (1) galactose 0,2 M e (2) NaCl 1,0 M. Frações de 1,0 ml foram coletadas.

(•→) Absorção proteica (A 280 nm).

foi encontrada, indicando que a elevação na absorção (A280 nm) foi devida a

contaminante de origem não protéica.

#### **4.4 Avaliação da ligação de glicoproteínas em colunas de lectinas imobilizadas**

Os processos biológicos dependem de interações específicas entre moléculas; exemplos podem ser as interações hormônio-receptor, DNA-proteína e antígeno-anticorpo. Estas interações intermoleculares podem ser exploradas para a purificação de macromoléculas através de cromatografia de afinidade. Matrizes contendo lectina imobilizada representam uma alternativa para a purificação de glicoconjugados, sendo o princípio de separação a interação lectina-porção glicídica da molécula.

Um problema observado na cromatografia em matrizes contendo proteínas imobilizadas é a baixa eficiência de ligação da matriz decorrente de impedimento estérico que inviabiliza o acesso da molécula a ser isolada ao ligante. A incorporação de braços espaçadores na matriz de afinidade minimiza ou resolve este problema; por outro lado, pode promover interações não-específicas de várias proteínas à matriz (DeMartino, 1989).

Colunas contendo lectinas imobilizadas estão sendo amplamente usadas para fracionar oligossacarídeos derivados de glicoproteínas (Endo, 1996), para análise estrutural de oligossacarídeos (Kobata e Endo, 1992; Matsui *et al.*, 2001), para análise de glicoconjugados de tegumento de *Schistosoma mansoni* (Hayunga e Sumner, 1986), para isolamento de glicoproteínas do vírus da imunodeficiência de símios (Gilljam *et al.*, 1994) e para o isolamento da fosfatase ácida de próstata humana (Van Etten e Satini, 1977) e da enzima lecitina colesterol aciltransferase de plasma humano (Lima *et al.*, 1997).

Alternativamente, as colunas contendo lectinas imobilizadas podem ser utilizadas para determinação da especificidade oligossacarídica da lectina, pela análise do padrão de ligação de diferentes oligossacarídeos (Yamashita *et al.*, 1985; Yan *et al.*, 1997).

##### **4.4.1 Soro fetal bovino como amostra**

As lectinas de germen de trigo (WGA) e Con A já foram utilizadas

para a caracterização de glicoproteínas de soro humano, suíno e bovino (Sánchez e Cabezas, 1998) e cromatografia em coluna contendo a lectina de *Sambucus nigra* imobilizada em Sepharose-4B revelou microheterogeneidade da fetuína (Shibuya *et al.*, 1987). A escolha de soro fetal bovino como amostra para cromatografia de afinidade nas matrizes Cra Iso 1,2,3-Sepharose, SpiL-Sepharose e BmoLL-PVA-glutaraldeído se deve a estes fatos, bem como, pelo mesmo conter glicoproteínas de interesse biotecnológico.

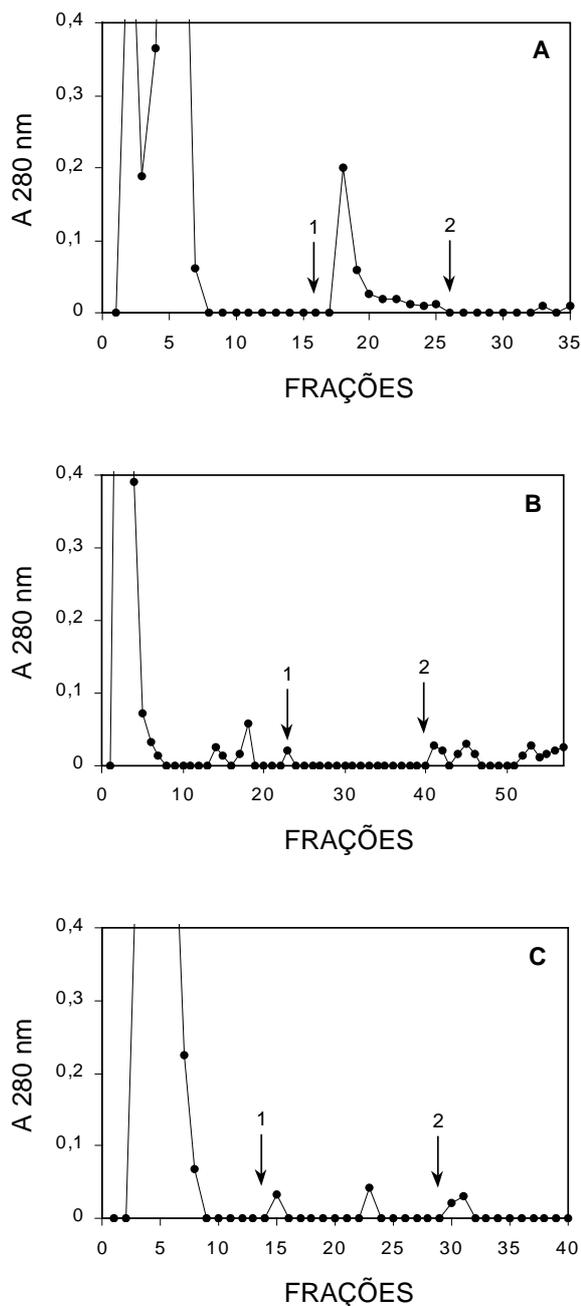
Quando soro fetal bovino foi cromatografado na coluna de Cra Iso 1,2,3-Sepharose (Figura 6A), três picos protéicos foram obtidos: dois não adsorvidos e um eluído com tampão glicina/HCl 0,1 M, pH 2,8.

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (Figura 7) revelou que a proteína eluída apresentava o mesmo padrão eletroforético da fetuína (Sigma); portanto, Cra Iso 1,2,3-Sepharose constitui uma matriz de afinidade para isolamento desta proteína. A fetuína tem sido amplamente utilizada na composição de meios enriquecidos para cultura de tecido (Catálogo Sigma, 2000); alternativamente, a disponibilidade desta proteína possibilita a sua imobilização em suportes insolúveis, objetivando o isolamento de lectinas inibidas por fetuína.

Nenhuma eluição de glicoproteínas foi obtida com tampão glicina/HCl 0,1 M, pH 2,8 nas cromatografias em SpiL-Sepharose e BmoLL-PVA-glutaraldeído. Outra tentativa foi realizada utilizando como eluente o tampão borato de sódio 0,015 M, pH 7,4 (Figura 6B e 6C), desde que esta solução é eficiente na liberação de carboidratos fortemente ligados à lectina (Kennedy e Rosevear, 1973). Novamente nenhuma proteína foi eluída. O ensaio de inibição da AH de BmoLL com soro fetal bovino (Tabela 4) mostrou ser esta, dentre as amostras glicoprotéicas utilizadas, a que menos inibiu BmoLL, o que poderia justificar a não-adsorção em BmoLL-PVA-glutaraldeído.

#### 4.4.2 Colostro humano como amostra

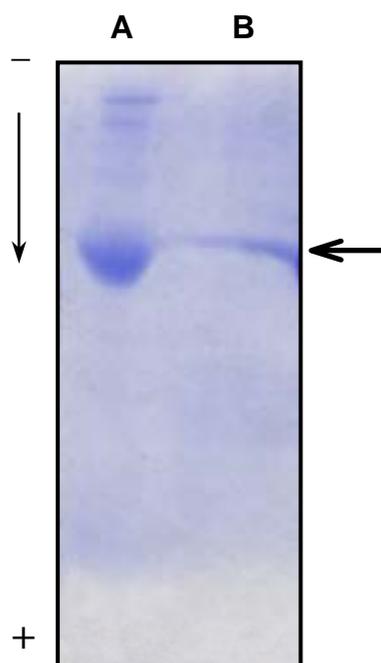
Imunoglobulina A (IgA) secretória tem sido isolada de leite humano através de cromatografia convencional (Romero-Piffiguer e Riera, 1979) ou de



**Figura 6** – Cromatografia de soro fetal bovino em colunas contendo lectinas imobilizadas

Os suportes foram equilibrados com tampão fosfato de sódio 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 7,4 a um fluxo de 15 ml/h e amostras de soro fetal bovino (8,0 mg de proteínas) foram aplicadas a cada suporte. **(A)** Cra Iso 1,2,3-Sepharose; eluição com (1) tampão glicina/HCl 0,1 M, pH 2,8 e (2) NaCl 1,0 M. **(B)** SpiL-Sepharose e **(C)** BmoLL-PVA-glutaraldeído; eluição com (1) tampão borato de sódio 0,015 M, pH 7,4 e (2) NaCl 1,0 M. Frações de 1,0 ml foram coletadas.

(●—) Absorção protéica (A 280 nm).



**Figura 7** – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes da glicoproteína isolada em Cra Iso 1,2,3-Sepharose

Amostras contendo 60  $\mu\text{g}$  de proteínas: **(A)** padrão de fetúina (Sigma); **(B)** glicoproteína eluída com tampão glicina/HCl 0,1 M, pH 2,8. Após a eletroforese, a coloração foi efetuada com azul de Coomassie a 0,02% (p/v), como descrito em 3.2.12.

colostro humano, por cromatografia de afinidade utilizando coluna contendo

lectina imobilizada (Kondoh *et al.*, 1987). Hutchens *et al.* (1989) obteve uma mistura de imunoglobulinas (IgA secretória, IgG e IgM) a partir de colostro humano através de cromatografia em coluna de tio-éter-sulfona-agarose.

Cra Iso 1,2,3-Sepharose, SpiL-Sepharose e BmoLL-PVA-glutaraldeído foram então avaliadas quanto à capacidade de ligação de glicoproteínas de colostro humano descaseinado (Figura 8).

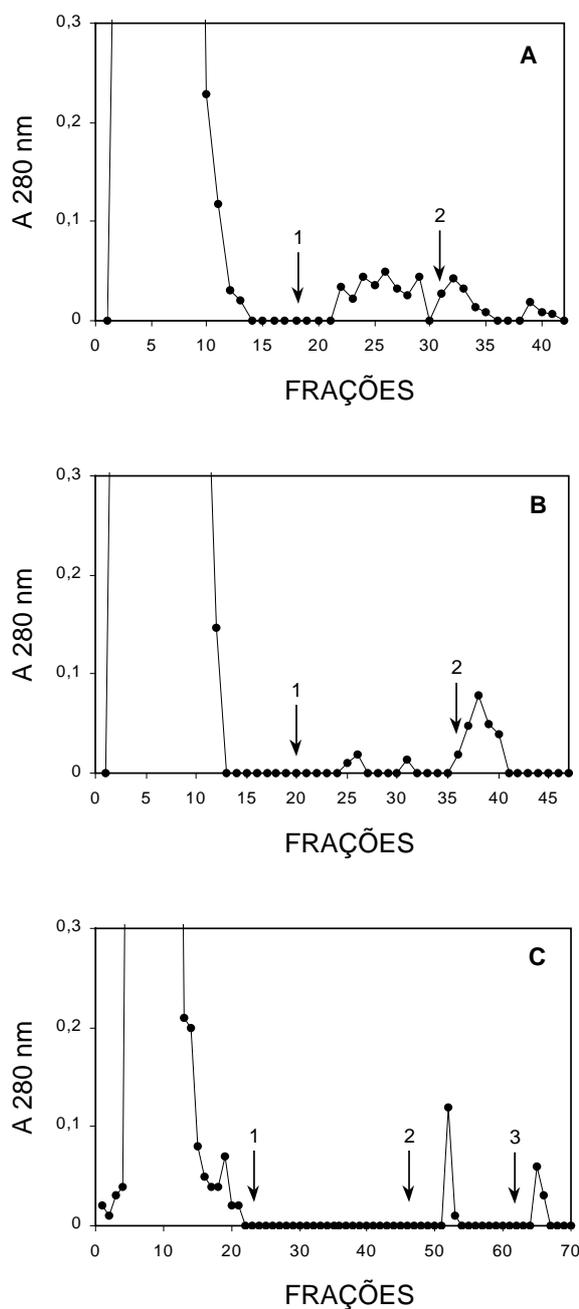
A matriz mais eficiente foi BmoLL-PVA-glutaraldeído (Figura 8C) obtendo-se um pico protéico de 0,15 (A280 nm) com tampão borato de sódio 0,015 M, pH 7,4 e pequena eluição (0,05 de A280 nm) com NaCl 1,0 M; irrigação da coluna com galactose 0,2 M, antes da eluição com o borato, não foi capaz de retirar a proteína.

Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (Figura 9) revelou que a preparação eluída da coluna de BmoLL-PVA-glutaraldeído com borato de sódio apresenta três bandas protéicas; a principal tendo migração eletroforética igual ao padrão de IgA secretória de colostro (Sigma). Um padrão semelhante foi observado para a preparação eluída com NaCl 1,0 M; exceto pela ausência de uma das bandas protéicas. BmoLL-PVA-glutaraldeído é uma alternativa para obtenção de IgA secretória que poderá ser utilizada em estudos laboratoriais ou diagnóstico de doenças humanas (Goil *et al.*, 1998; Simell *et al.*, 2001).

O perfil cromatográfico obtido em Cra Iso 1,2,3-Sepharose (Figura 8A) revela a inexistência de picos protéicos sendo uma pequena quantidade de proteína arrastada com borato de sódio e NaCl 1,0 M. Na cromatografia em SpiL-Sepharose pequena eluição de proteína (0,08 de A280 nm) foi obtida apenas com NaCl 1,0 M (Figura 8B).

#### 4.4.3 Ovoalbumina como amostra

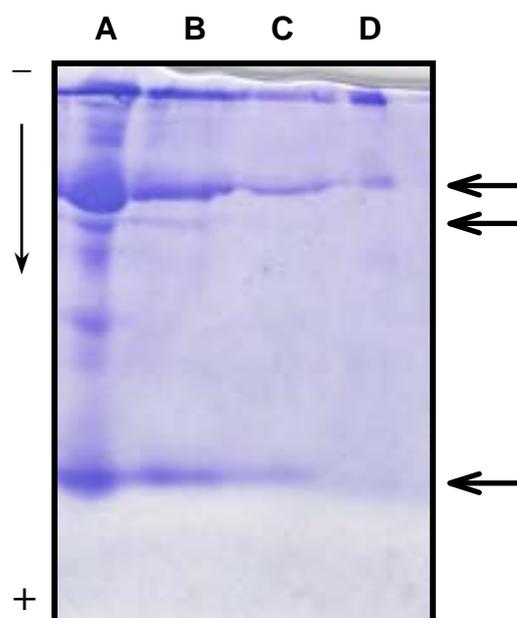
A avaliação da eficiência de ligação de ovoalbumina a Cra Iso 1,2,3-Sepharose, SpiL-Sepharose e BmoLL-PVA-glutaraldeído foi devida ao fato desta glicoproteína conter um grande percentual de cadeias glicídicas variadas (Ohyama *et al.*, 1985).



**Figura 8** – Cromatografia de colostro humano em colunas contendo lectinas imobilizadas

Os suportes foram equilibrados com tampão fosfato de sódio 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 7,4 a um fluxo de 15 ml/h e amostras de colostro humano (15,0 mg de proteínas) foram aplicadas a cada suporte. **(A)** Cra Iso 1,2,3-Sepharose e **(B)** SpiL-Sepharose; eluição com (1) tampão borato de sódio 0,015 M, pH 7,4 e (2) NaCl 1,0 M. **(C)** BmoLL-PVA-glutaraldeído; eluição com (1) galactose 0,2 M, (2) tampão borato de sódio 0,015 M, pH 7,4 e (3) NaCl 1,0 M. Frações de 1,0 ml foram coletadas.

(●—) Absorção protéica (A 280 nm).



**Figura 9** – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes de glicoproteínas isoladas em BmoLL-PVA-glutaraldeído

Amostras contendo 60  $\mu\text{g}$  de proteínas: **(A)** colostro descaseinado; **(B)** glicoproteínas eluídas com tampão borato de sódio 0,015 M, pH 7,4; **(C)** glicoproteínas eluídas com NaCl 1,0 M; **(D)** padrão de IgA secretória de colostro humano (Sigma). Após a eletroforese, a coloração foi efetuada com azul de Coomassie a 0,02% (p/v), como descrito em 3.2.12.

Três condições foram testadas na cromatografia de ovoalbumina. Quando as colunas foram equilibradas com tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH

6,4, ovoalbumina não foi eluída com tampão glicina/HCl 0,1 M, pH 2,8. Aumento na força iônica do tampão de equilíbrio foi praticado pela utilização do tampão fosfato de sódio 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 7,4. A eluição foi modificada para tampão borato de sódio 0,015 M, pH 7,4. Também nestas condições as matrizes de afinidade não retiveram a ovoalbumina (Figura 10).

O fato de ovoalbumina inibir a AH de Cra Iso 1,2,3, SpiL e BmoLL não resultou na adsorção da glicoproteína às colunas contendo as lectinas imobilizadas. Impedimento estérico pode ter surgido após a imobilização da lectina pela presença do suporte insolúvel (Kennedy e Rosevear, 1973), dificultando o acesso do sítio de ligação da proteína à porção glicídica da ovoalbumina. Ohyama *et al.* (1985) trataram a ovoalbumina com glicosparginase e estudaram a ligação dos produtos da atividade enzimática em uma coluna de Con A-Sepharose; os resultados revelaram que Con A reconhece e liga com alta afinidade somente algumas estruturas específicas e sugerem ser ela a trimanose.

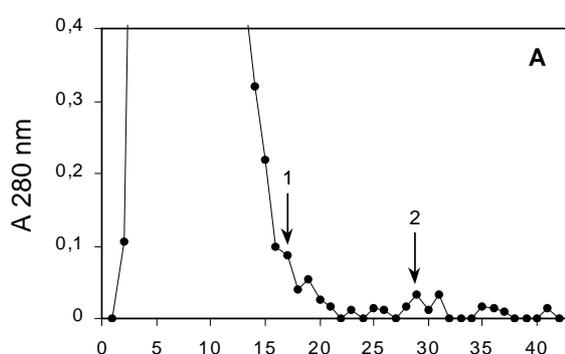
#### 4.5 Ensaio em batelada para ligação de glicoproteínas a suportes contendo lectinas imobilizadas

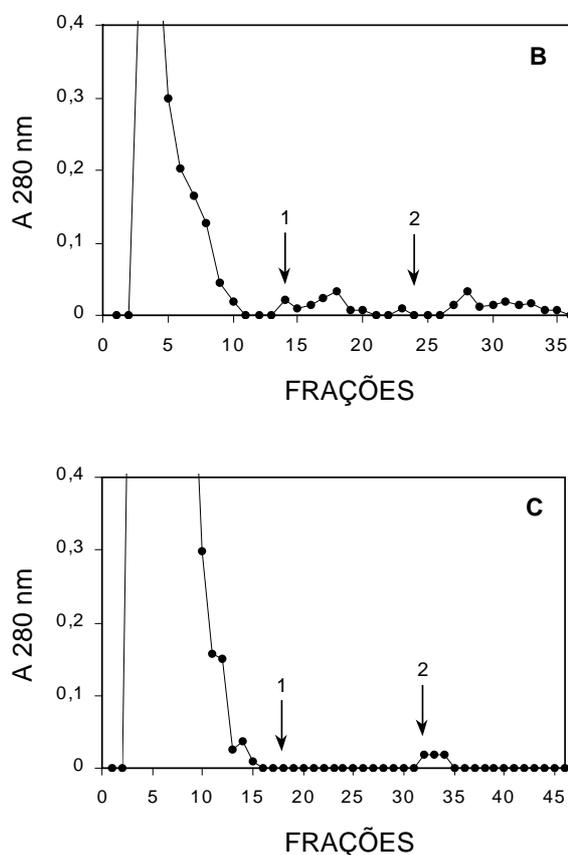
Uma alternativa à cromatografia em coluna é o ensaio em batelada que consiste em misturar a preparação protéica com o suporte, permitindo uma maior interação entre o suporte cromatográfico e a biomolécula a ser isolada (Janson e Rydén, 1989).

O ensaio em batelada foi realizado com Cra Iso 1,2,3-Sepharose e SpiL-Sepharose. BmoLL-PVA-glutaraldeído não foi utilizado devido a sua natureza fibrosa.

##### 4.5.1 Soro fetal bovino como amostra

A mesma quantidade de proteínas de soro fetal bovino (8,0 mg) submetida à cromatografia em coluna foi utilizada nos experimentos.





**Figura 10** – Cromatografia de ovoalbumina em colunas contendo lectinas imobilizadas

Os suportes foram equilibrados com tampão fosfato de sódio 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 7,4 a um fluxo de 15 ml/h e amostras de ovoalbumina (27,0 mg de proteínas) foram aplicadas a cada suporte. **(A)** Cra Iso 1,2,3-Sepharose e **(C)** BmoLL-PVA-glutaraldeído; eluição com (1) tampão borato de sódio 0,015 M, pH 7,4 e (2) NaCl 1,0 M; **(B)** SpiL-Sepharose; eluição com (1) tampão glicina/HCl 0,1 M, pH 2,8 e (2) NaCl 1,0 M. Frações de 1,0 ml foram coletadas.

(●→) Absorção protéica (A 280 nm).

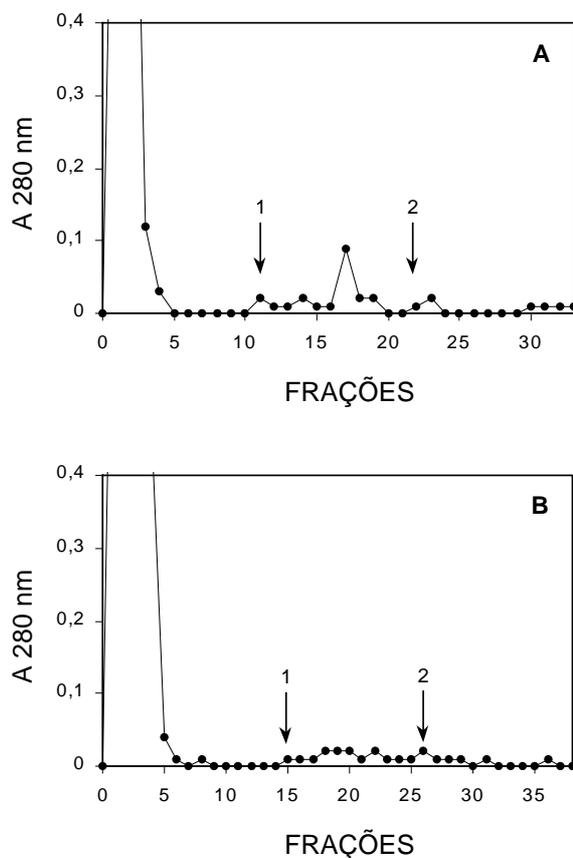
Cra Iso 1,2,3-Sepharose foi menos eficiente na retenção de glicoproteínas nas condições do ensaio em batelada (Figura 11A). Talvez a temperatura de 4°C tenha interferido na ligação.

Nenhuma glicoproteína foi retida em SpiL-Sepharose (Figura 11B),

tal como ocorreu anteriormente (Figura 6B).

#### 4.5.2 Ovoalbumina como amostra

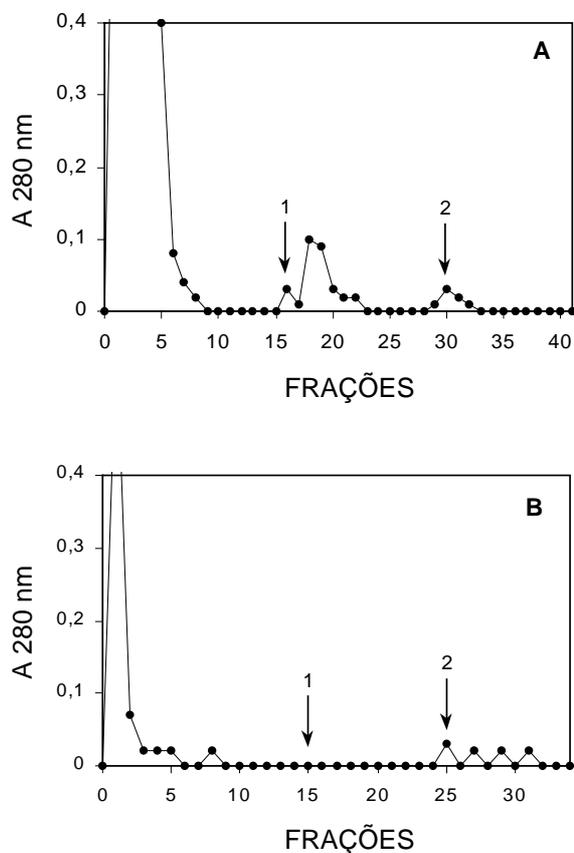
As condições experimentais do ensaio em batelada determinaram a ligação de ovoalbumina a Cra Iso 1,2,3-Sepharose (Figura 12A), fato não ocorrido quando o ensaio em coluna foi realizado (Figura 10A). Nenhuma ligação de ovoalbumina foi observada em SpiL-Sepharose (Figura 12B).



**Figura 11** – Ensaio em batelada em suportes contendo lectinas imobilizadas para isolamento de glicoproteínas de soro fetal bovino

Os suportes foram equilibrados com tampão fosfato de sódio 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 7,4. As amostras de soro fetal bovino (8,0 mg de proteínas) foram misturadas a cada suporte e incubação foi efetuada durante 2 h sob agitação suave. A mistura foi então colocada em uma coluna (fluxo de 62 ml/h). (A) Cra Iso 1,2,3-Sepharose e (B) SpiL-Sepharose; eluição com (1) tampão borato de sódio 0,015 M, pH 7,4 e (2) NaCl 1,0 M. Frações de 1,0 ml foram coletadas.

(●→) Absorção protéica (A 280 nm).



**Figura 12** – Ensaio em batelada em suportes contendo lectinas imobilizadas para ligação de ovoalbumina

Os suportes foram equilibrados com tampão fosfato de sódio 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 7,4. As amostras de ovoalbumina (27,0 mg de proteínas) foram misturadas a cada suporte e incubação foi efetuada durante 2 h sob agitação suave. A mistura foi então colocada em uma coluna (fluxo de 62 ml/h). **(A)** Cra Iso 1,2,3-Sepharose e **(B)** SpiL-Sepharose; eluição com (1) tampão borato de sódio 0,015 M, pH 7,4 e (2) NaCl 1,0 M. Frações de 1,0 ml foram coletadas.

(●—●) Absorção protéica (A 280 nm).

## 5 CONCLUSÕES

A proteína obtida na cromatografia de soro fetal bovino em coluna de Cra Iso 1,2,3-Sepharose apresentou migração eletroforética similar à fetuína;

Cromatografia de colostro humano em coluna de BmoLL-PVA-glutaraldeído resultou em preparações ricas em proteína de migração eletroforética similar à IgA secretória de colostro humano;

O ensaio em batelada em Cra Iso 1,2,3-Sepharose não foi eficiente no isolamento de glicoproteínas de soro fetal bovino;

As condições do ensaio em batelada foram próprias para a ligação de ovoalbumina a Cra Iso 1,2,3-Sepharose;

SpiL-Sepharose não foi eficiente, nas condições experimentais avaliadas em batelada, para a ligação de ovoalbumina e de glicoproteínas de soro fetal bovino.

## 6 ABSTRACT

*Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) and the isolectins from *Cratylia mollis* seeds (Cra Iso 1,2,3) isolated in the Laboratory of Glycoproteins from UFPE were immobilized in polyvinyl alcohol-glutaraldehyde (PVA-glutaraldehyde) and Sepharose-4B, respectively. The matrices Cra Iso 1,2,3-Sepharose, SpiL-Sepharose (seed lectin from *Swartzia pickellii* immobilized in Sepharose-4B), and BmoLL-PVA-glutaraldehyde were evaluated in relation to the binding efficiency of ovalbumin and isolation of glycoproteins from fetal bovine serum and human colostrum. The yields of immobilization to Cra Iso 1,2,3-Sepharose and BmoLL-PVA-glutaraldehyde were 90 % and 50%, respectively. Distinct experimental conditions using the matrices were evaluated (column chromatography and batch assay) which gave different results. Proteins with electrophoretic migration similar to secretory IgA from human colostrum and similar to fetuin were obtained after chromatography of human colostrum in BmoLL-PVA-glutaraldehyde column and fetal bovine serum in Cra Iso 1,2,3-Sepharose column, respectively. Ovalbumin was retained in Cra Iso 1,2,3-Sepharose using batch assays. The matrices were stable under the used chromatographic conditions. Cra Iso 1,2,3-Sepharose and BmoLL-PVA-glutaraldehyde can be included in the group of matrices to affinity chromatography with the aim to obtain glycoconjugates. SpiL-Sepharose was not efficient to bind ovalbumin or fetal bovine serum glycoproteins, under the evaluated experimental conditions.

## 7 REFERÊNCIAS

- ANURADHA, P.; BHIDE, S. V. An isolectin complex from *Trichosanthes anguina* seeds. *Phytochemistry*, v. 52, p. 751 – 758, 1999.
- APPENZELER, C. *et al.* The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Natural Cellular Biology*, v. 1, n. 6, p. 330 – 334, 1999.
- ARAÚJO A. M. *et al.* Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilization. *Biotechnology Techniques*, v. 112, p. 67 – 72, 1996.
- BARONDES, S. H. Lectins: their multiple endogenous cellular functions. *Annual Review Biochemistry*, v. 50, p. 207 – 231, 1981.
- BELTRÃO, E. I. C. *et al.* Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to mammary human tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 74, p. 125 – 134, 1998.
- BIEDRZYCKA, A. *et al.* Characterization of protease cleavage sites involved in formation of envelope glycoprotein and three non-structural proteins of dengue virus type 2, New Guinea C strain. *Journal of Genetical Virology*, v. 68, p. 1317 – 1326, 1987.
- BING, D. H.; WEYAND, J. G. M.; STAVINSKY, A. B. Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceeding of Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 124, p. 1166 – 1170, 1967.
- BUKANTZ, C. S. C.; REIN, L. C. C.; KENT, C. J. F. Studies in complement fixation. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in complement fixation reaction. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 31, p. 394 – 399, 1946.
- CATÁLOGO SIGMA. Biochemicals and Reagents for Life Science research. *Sigma-Aldrich Co.* p. 2040 – 2066, 2000.
- CAVALCANTI, M. S. M. *et al.* Evaluation of the surface of *Leishmania donovani chagasi* using lectins. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 32, p. 154, 1989.
- CAVALCANTI, M. S. M.; ALMEIDA, A. M.; COELHO, L. C. B. B. Interaction of lectins with *Yersinia pestis* strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 26, n. 6, p. 125 – 131, 1990.
- CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Isolation and partial purification of a lectin from *Swartzia pickellii* Killip (white jacaranda). *Memórias do Instituto Oswaldo cruz*, v. 85, p. 371 – 372, 1990.
- COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*, v. 11, p. 295 – 300, 2000.
- CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose

specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, p. 261 – 273, 1995.

DAZZO, F. B.; TRUCHET, G. L. Interactions of lectins and their saccharides receptors in *Rhizobium* legume symbiosis. *The Journal of Membrane Biology*, v. 73, p. 1 – 16, 1983.

DEMARTINO, G. N. Purification of Proteolytic enzymes. In: Beynon, R.J. & Bond, J.S. *Proteolytic enzymes*, New York, IRL Press, p. 15 – 23, 1989.

ENDO, T. Fractionation of glycoprotein-derived oligosaccharides by affinity chromatography using immobilized lectin columns. *Journal of Chromatography A*, v. 720, p. 251 – 261, 1996.

FUNATSO, O. *et al.* Structural study of N-linked oligosaccharides of human intercellular adhesion molecule-3 (CD50). *European Journal of Biochemistry*, v. 268, p. 1020 – 1029, 2001.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. *Biochemistry*, p. 310 – 350, 1995. Saunders College Publishing.

GILLJAN, G.; SIRIDEWA, K.; HAMMAR, L. Purification of simian immunodeficiency virus, SIV<sub>MAC251</sub>, and of its envelope glycoprotein, gp148. *Journal of Chromatography A*, v. 675, p. 89 – 100, 1994.

GOIL, S. *et al.* Simplified method for purification of colostrum to obtain secretory component of immunoglobulin A, using secretory component as a reference protein in tracheal aspirate fluid. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, v. 705, n. 2, p. 203 – 211, 1998.

GRAVEL, P.; GOLAZ, O. Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes using lectin blotting. *The Protein Protocols. Handbook*, p. 603 – 617. Ed. John M. Walker: Human Press, 1996.

HALTIWANGER, R. S.; HILL, R. L. The isolation of a rat alveolar macrophage lectin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 261, n. 16, p. 7440 – 7444, 1986.

HAYUNGA, E. G. SUMMER, M. P. Characterization of surface glycoprotein on *Schistosoma mansoni* adult worms by lectin affinity chromatography. *Journal of Parasitology*, v. 72(2), p. 283 – 291, 1986.

HONG, M. *et al.* Sugar-lectin interactions investigate through affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, v 752, p. 207 – 216, 2001.

HUTCHENS, T. W.; MAGNUSON, J. S.; YIP, T. T. Selective removal, recovery, and characterization of immunoglobulins from human colostrum. *Pediatric Research*, v. 26, n. 6, p. 623 – 628, 1989.

ISGROV, F. H. *et al.* Enzyme immobilization on nylon-optimization and the steps used to prevent enzyme linkage from support. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 225 – 232, 2001.

JANSON, J. C.; RYDÉN, L. *Protein Purification. Principles, High resolution methods, and applications*. VCH Publishers, 502 p., 1989.

KAWAGISHI, H. *et al.* Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycocleptodonoides aitchisonii*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 53 – 58, 2001.

KENNEDY, J. F.; ROSEVEAR, A. An assessment of the fractionation of carbohydrates on concanavalina A-Sepharose 4-B by affinity chromatography. *Journal of Chemistry Society [Perkin 1]*, v. 19, p. 2041 – 2061, 1973.

KENNEDY, J. F. *et al.* Lectin, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, p. 219 – 230, 1995.

KOBATA, A.; ENDO, T. Immobilized lectin columns: useful tools for the fractionation and structural analysis of oligosaccharides. *Journal of Chromatography*, v. 597, p. 111 – 122, 1992.

KONDOH, H.; KABAYASHI, K.; HAGIWARA, K. A simple procedure for isolation of human secretory IgA of IgA1 and IgA2 subclass by a jackfruit lectin, jacalin, affinity chromatography. *Molecular Immunology*, v. 24, n. 11, p. 1219 – 1222, 1987.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 660 – 667, 1970.

LIMA, V. L. M. *et al.* Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*, v. 33, p. 27 – 32, 1997.

LOTAN, R.; NICOLSON, G. L. Purification of cell membrane glycoproteins by lectin affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 559, p. 329 – 376, 1979.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n.1, p. 265 – 275, 1951.

MACHA, J. *et al.* Isolation and characterization of a lectin from *Sarcocystis gigantea*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 16, p. 243 – 249, 1985.

MASHIKO, H.; TAKAHASHI, H. Factor XI: purification from porcine plasma by affinity chromatography and some properties of factor XI and activated Factor XI. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, v. 375, p. 481 – 484, 1994.

MATSUI, T. *et al.* Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1525, p. 50 – 57, 2001.

NG, K. K.; DRICKAMER, K.; WEIS, I. Structural analysis of monosaccharides recognition by rat liver mannose-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 663 – 647, 1996.

OHYMA, Y. *et al.* Frontal affinity chromatography of ovalbumin glycoasparagines on a concanavalin A-Sepharose column. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 260, n. 11, p. 6882 – 6887, 1985.

OSBORN, T. C. *et al.* Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science*, v. 240, n. 4849, p. 207 – 210, 1988.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 36, p. 113 – 118, 1992.

PEREIRA, L. F. L. C. *Avaliação de citotoxicidade e atividade antitumoral em preparações contendo lectinas autóctones*. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1995.

PEUMANS, W. J. *et al.* Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. *Glycoconjugate Journal*, v. 14, n. 2, p. 259 – 265, 1997.

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

PILLATTE, Y. *et al.* A new simplified procedure for C1 inhibitor purification. A novel use for jacalin-agarose. *Journal of Immunological Methods*, v. 120, p. 37 – 43, 1989.

ROMERO-PIFFIGUER, M. D.; RIERA, C. M. A simple two-step method for purification of secretory IgA from human colostrum. *Journal of Immunological Methods*, v. 30, n. 2, p. 153 – 159, 1979.

SÁNCHEZ, M. M.; CABEZAS, J. A. Use of two lectins for characterization of glycoconjugates from human, porcine and bovine sera. *Biochemical Education*, v. 26, p. 309 – 312, 1998.

SATO, S.; ANIMASHAUM, T.; HUGHES, R. C. Carbohydrate-binding specificity of *Tetracarpidium conophorum* lectin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 18, p. 11485 – 11494, 1991.

SENER, A.; YARDINCI, T. Lectin affinity chromatography and electrophoretic properties of human platelet gamma-glutamyl transferase. *Platelets*, v. 11, p. 325 – 330, 2000.

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

SHIBUYA, N. *et al.* Fractionation of sialyated oligosaccharides, glycopeptides, and glycoproteins an immobilized elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 254, p. 1 – 8, 1987.

SILVA, F. A. *Caracterização de isoformas da lectina de Cratylia mollis e sua*

*utilização em aglutinação de plaquetas*. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

SIMELL, B. *et al.* Pneumococcal carriage and otitis media induce salivary antibodies to pneumococcal surface adhesin a, pneumolysin, and pneumococcal surface protein a in children. *Journal of Infect Disease*, v. 183, n. 6, p. 887 – 896, 2001.

STITES, D. P.; TERR, A.I. *Imunologia Básica*. p. 85 – 94, 1992. Editora PHB Ltda.

SUROLIA, A.; SHARON, N.; SCHWARZ, F. P. Thermodynamics of monosaccharide and disaccharide binding of *Erythrina corallodendron* lectin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 30, p. 17697 – 17703, 1996.

SZCZESNA, M.; GALAS, E; BIELECKI, S. PVA-biocatalyst with entrapped viable *Bacillus subtilis* cells. *Journal of Molecular Catalysis*, v. 11, p. 671 – 676, 2001.

TAI, T. *et al.* Structure of the carbohydrate moiety of ovoalbumin glycopeptide III and the difference in specificity of endo-beta-N-acetylglucosaminidase CII and H. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 252, p. 6687 – 6694, 1977.

TAYLOR, M. E.; SUMMERFIELD, J. A. Carbohydrate-binding proteins of human serum: isolation of two manose/fucose specific lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 915, n. 1, p. 60 – 67, 1987.

TEXEIRA, M. J. R. T. *et al.* Specific binding identification of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to uterus tissues. *Programa e Resumos da XXIVa. Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, p. 157, Minas Gerais, 1995.

TULSIANI, D. R. Structural analysis of the asparagine-linked glycan units of the ZP2 and ZP3 glycoproteins from mouse zona pellucida. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 382, p. 275 – 283, 2000.

VAN ETTEN, R. L.; SAINI, M. Preparation of homogeneous human prostatic acid phosphatase using concanavalin A-Sepharose 4-B. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 484, p. 487 – 492, 1977.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 9, p. 707 – 714, 1999.

VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*, Second Edition. p. 266 – 276, 1995. John Wiley & Sons, Inc.

WALT, D. R.; AGAYN, V. I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 13(10), p. 425 – 430, 1994.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Reviews in Biochemistry*, v. 65, p. 441 – 473, 1996.

WEISS, I. M. *et al.* Purification and characterization of perleucin and perlustrin two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 267, n. 1, p. 17 – 21, 2000.

XU, M. *et al.* Synthesis of gelatin-PVA adsorbent and its application in the separation of ginkgo flavonol glycosides and terpene lactones. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p. 273 – 282, 2001.

YAMASHITA, K.; HITOI, A.; KOBATA, A. Structural determinants of *Phaseolus vulgaris* erythroagglutinating lectin for oligosaccharides. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 258, p. 14753 – 14755, 1983.

YAN, L. Y. *et al.* Immobilized *Lotus tetragonolobus* agglutinin binds oligosaccharides containing the Le(x) determinant. *Glycoconjugate Journal*, v. 14, p. 45 – 55, 1997.

YOSHIDA, K. *et al.* Serial lectin affinity chromatography with concanavalin A and wheat germ agglutinin demonstrates altered asparagine-linked sugar-chain structures of prostatic acid phosphatase in human prostate carcinoma. *Journal of Chromatography B*, v. 695, p. 439 – 443, 1997.

YOUNG, N. M.; OOMEN, R. P. Analysis of sequence variation among legume lectins – A ring of Hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. *Journal of Molecular Biology*, v. 228, p. 924-934, 1992.

ZENTENO, R. *et al.* Identification of lectin isoforms in juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan, 1879). *Glycoconjugate Journal*, v. 17, p. 339 – 347, 2000.