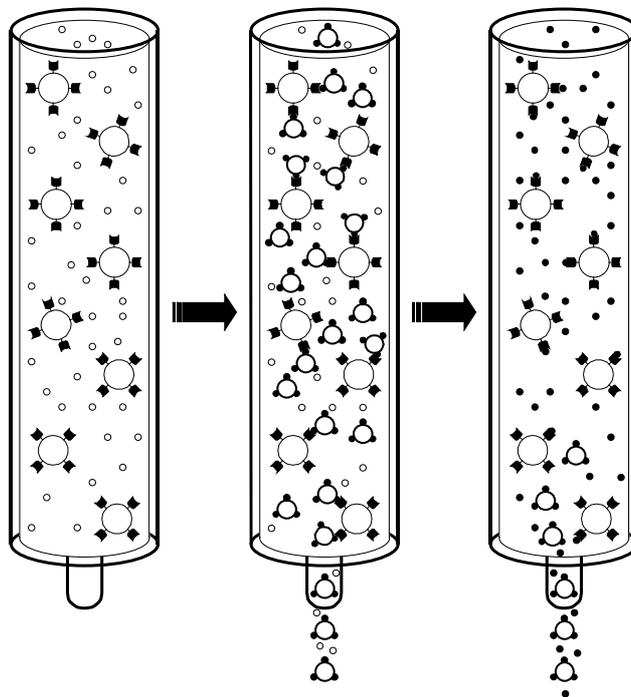


TEODOMIRO GOMES DOS SANTOS FILHO

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^a Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Co-orientadora: Prof^a 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^a. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Presidente)
Departamento de Bioquímica/CCB/UFPE

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

LISTA DE TABELAS

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

SUMÁRIO

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

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

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.

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.