

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

EDILSON GOMES DE SANTANA

**LECTINAS DE SEMENTES DE *Cratylia mollis*
(Cramoll) E DE FOLHAS DE *Bauhinia
monandra* (BmoLL): IMOBILIZAÇÕES E
APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

RECIFE

2004

EDILSON GOMES DE SANTANA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – área de concentração Biotecnologia, do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

LECTINAS DE SEMENTES DE *Cratylia mollis* (Cramoll) E DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra* (BmoLL): IMOBILIZAÇÕES E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Orientadora: Prof^ª Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Co-Orientadora: Prof^ª Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

**RECIFE
2004**

Santana, Edilson Gomes de

Lectinas de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) e de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) : imobilizações e aplicações biotecnológicas / Edilson Gomes de Santana. – Recife : O Autor, 2004.
vii, 82 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2004.

Inclui bibliografia.

1. Lectinas (*Cratylia mollis* e *Bauhinia monandra*) – Imobilizações e aplicações. 2. Imunoglobulinas (IgAS) – Purificação (Dacron e Sepharose). 3. Voltametria cíclica (Nafion) – Lectinas - Caracterização. Título.

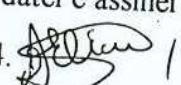
577.112
572.6

CDU(2.ed.)
CDD(21.ed.)

UFPE
BC2004-453

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

Aos vinte e sete dias do mês de agosto de dois mil e quatro, às nove horas, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas, realizou-se a defesa de tese apresentada pelo doutorando **Edilson Gomes de Santana**, intitulada: "**Lectinas de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) e de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL): Imobilizações e aplicações biotecnológicas**". A Banca Examinadora foi homologada em vinte e um de junho de dois mil e quatro, pela PROPESQ, tendo como membros titulares, os Professores: **Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho**, (orientadora), Ph.D em Bioquímica, pela Universidade de Londres, Inglaterra; **Vera Lúcia de Menezes Lima** Ph.D em Bioquímica, pela Universidade de Londres, Inglaterra; **Sandra Rodrigues de Souza**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco, **Maria Inês Sucupira Maciel**; Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco, **Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti**, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de São Paulo; como Suplentes **Ana Lúcia Figueiredo Porto**, Doutora em Engenharia Química, pela Universidade Estadual de Campinas/SP e **Patrícia Maria Guedes Paiva**, Doutora em Biologia Molecular, pela Universidade Federal de São Paulo. A Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia de Menezes Lima deu início à Sessão, para mais uma defesa de tese, a **décima primeira** do ano e a **septuagésima sétima** do Doutorado. Agradeceu a presença de todos, em especial à Banca Examinadora e passou a palavra à Prof.^a Luana Coelho para presidir os trabalhos. Após ler os termos a presidenta concedeu a palavra ao doutorando, que efetuou a apresentação de sua tese em trinta e cinco minutos. Continuando, a presidenta solicitou à Comissão Examinadora a ocupar seus lugares. A seguir, procedeu-se à arguição na seguinte ordem: Dr.^a Maria do Socorro Cavalcanti (1º examinador); Dr.^a Maria Inês Maciel (2º examinador); Dr.^a Sandra Souza (3º examinador); Dr.^a Vera Menezes de Lima (4º examinador); Dr.^a Luana Coelho (5º examinador). A presidenta teceu agradecimentos e em seguida solicitou dos convidados que se retirassem por alguns minutos a fim de proceder a valiação. A Banca Examinadora atribuiu a **Edilson Gomes de Santana** a seguinte menção:

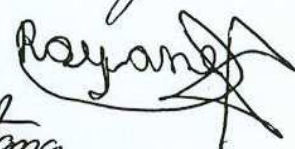
"Aprovado com Distinção" por unanimidade. Face ao resultado o mesmo está apto a receber o grau de Doutor em Ciências Biológicas, Área Biotecnologia pela Universidade Federal de Pernambuco. Nada mais havendo a tratar a sessão foi encerrada e para constar eu, Adenilda Eugênia de Lima, Secretária, lavrei, datei e assinei esta ata que também assinam os demais presentes. Recife, 27 de agosto de 2004. 

Sondre R.V.

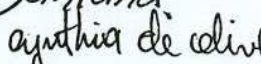
Maria Inês Sampaio Maciel. Vera Lucia M. L'a.
professora

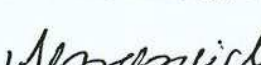
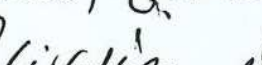
Edson José de Sotom, 

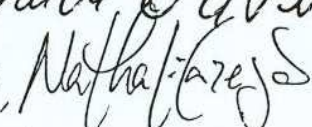
Ausciliadora, Julieta G. de Santana

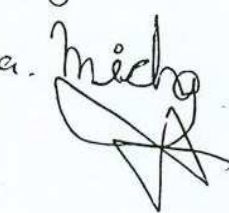
Mayara Reme De Santana, , Mariana Pinheiro

Bonila Gomes de Santana

Vanessa Passos Brustein, , 

Michelle Dalvina Correia da Silva, , 

Patrícia Peres, Renata Angeli, 

Renê Rodrigues de Melo, , 

**“Não podemos mudar o começo mas
podemos inventar um novo fim”**

Francisco Cândido Xavier

**A minha mãe, minha esposa Niedja, minhas
filhas Nayara e Rayane e a todos os amigos que
conquistei, vocês são de ouro !!!**

**A minha orientadora Luana, a minha co-orientadora
Tereza e todos os colegas do laboratório de
glicoproteínas pelo apoio e paciência. VALEU !!!**

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII

Capítulo 1: INTRODUÇÃO

1. Generalidades sobre lectinas	2
2. Lectinas de <i>Cratylia mollis</i> Mart	3
3. Lectina de <i>Bauhinia monandra</i> Kurtz	4
4. Imunoglobulinas	4
5. Purificação de proteínas por afinidade em lectinas imobilizadas	5
6. Estudos eletroquímicos	9
7. Objetivos	11
8. Referências	12

Capítulo 2: ARTIGO – 1

Purificação de imunoglobulina A secretória com lectina de <i>cratylia mollis</i> imobilizada em Sepharose CL-4B	19
--	----

Capítulo 3: ARTIGO – 2

Lectinas de sementes de <i>Cratylia mollis</i> e de folhas de <i>Bauhinia monandra</i> imobilizadas em Dacron ferromagnetizado: duas novas estratégias para a purificação de glicoproteínas	55
--	----

Capítulo 4: ARTIGO – 3

Transferência de elétrons entre o eletrodo e lectinas de sementes de <i>Cratylia mollis</i> adsorvida sobre o filme de Nafion	68
--	----

7 CONCLUSÕES	81
---------------------	----

8 PERSPECTIVAS	82
-----------------------	----

AGRADECIMENTOS

Este é um dos momentos mais importantes da minha vida acadêmica. Foram várias as situações que vivi durante minha permanência na UFPE, mais particularmente, no Laboratório de Glicoproteínas, onde foi desenvolvida a maior parte deste trabalho. Momentos difíceis e desagradáveis vieram apenas mostrar os seres humanos falhos que somos caminhando na estrada da evolução. Muitos foram os momentos agradáveis, que muito contribuíram para que eu alcançasse os objetivos traçados no início do Curso, e que vivos ficarão na minha memória. Quero com toda sinceridade, tanto homenagear como também agradecer:

A **Deus** primeiramente, por permitir a minha existência concomitantemente com esses, que sempre estiveram ao meu redor e pela oportunidade de desenvolver esse projeto.

Aos **meus pais**, que me concederam a vida e a **minha esposa** e **minhas filhas** que me ajudam a me manter na mesma com alegria.

À Dra. **Luana Cassandra B. B. Coelho**, cujo nome dispensa comentários, pelo voto de confiança que em mim depositou, pela amizade, pela força espiritual e pelas orientações importantes e seguras na condução deste trabalho. Sei que não fui tudo o que poderia e deveria ter sido, mas as entrelinhas, ninguém as conhece, a não ser o dono da página de sua própria vida.

Às Professoras Dras. **Patrícia Maria Guedes Paiva** e **Vera Menezes de Lima** por toda a força e principalmente pela amizade.

A minha co-orientadora, Dra. **Maria Tereza dos Santos Correia**, com a qual tive o prazer de defender também a minha tese de mestrado, pela paciência, pela boa orientação, pela simplicidade, em uma palavra, uma amiga que com a qual eu mais teria aprendido se não fosse minha imensa timidez.

À profa. Dra. **Sandra Rodrigues de Souza**, pelas valiosas contribuições e sugestões dadas para o enriquecimento deste trabalho acadêmico.

Aos profs. Drs. **Luiz Bezerra de Carvalho Júnior** e **Ranilson Bezerra** e ao aluno de iniciação científica **Ian Porto**, pela participação no trabalho envolvendo o Dacron.

À **Maria Barbosa Reis da Silva**, por todo apoio dado e pelas amizade e contribuições indispensáveis para o produto final deste projeto.

Aos **amigos e amigas** do Laboratório de Glicoproteínas, **Lidiane, Catarina, Renata, Clébia, Jessoneide, Mariana, Natália, Neila, René, Giselly, Cristina (Cris), Amanda, Rodrigo, Marília, Antônio, Vanessa, Cinthya, Viviane, Cintia Brito, Danielly, Manuel** pelos anos de convivência, de aprendizado entre erros e acertos. Pela grande amizade de todos. As poucas divergências, só me fizeram crescer e foram fundamentais para consolidar a nossa amizade.

À **Aninha, Michele e Flávio** do laboratório lipídeos pela amizade

Aos colegas de doutorado: **Angélica, Fátima, Ana, Cláudio, Mabel, Leila, Luciana, Veridiana, Isaura, Silvâna, Patrícia (as duas), Bruneska, Hercília, Flávia, Michele, Elba, Andréa e Regina, César (os dois)** que nunca negaram apoio e solidariedade direta ou indiretamente, em vários momentos deste projeto.

A todos os amigos “Caxambuenses” **Adenor, Rodrigo, Milena, Adriana, Carol, Ian, Jorge, Mário, Ricardo, Jadilma, Lúcio, Karla** “meus fofos e fofas” e a todos os “poeiras.”

A **Alexandre**, um amigo de verdade, que nestes anos últimos, sempre me incentivou e me ajudou nos meus momentos de dificuldades maiores.

À Dra. **Adriana Argôlo**, pelas palavras que me levaram a reflexões.

As secretárias do doutorado : **Adenilda, Jaciene, Liane**; e a **Miron, Neide e Djalma** do departamento de Bioquímica, que nunca mediram distância para me ajudar.

A **CAPES**, pelo apoio financeiro e pelo compromisso com a biotecnologia. E por fim, reafirmo os agradecimentos às **minhas filhas (Nayara e Rayane) minha mãe (Julieta) e minha esposa (Niedja)**, motivações maiores para a minha vida e à **Luana Cassandra B. B. Coelho** por todo aprendizado que extrapolou o âmbito da ciência e com certeza para o âmbito de minha vida.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo 1: INTRODUÇÃO

Figura - 01	Imobilização de proteínas em Sepharose CL-4B	6
Tabela - 01	Interação entre imunoglobulinas e lectinas galactose e manose específicas	7
Figura 02	Purificação de anticorpo em lectina imobilizada em Sepharose CL-4B	7
Figura 03	Esquema da reação de hidrazinólise do Dacron	9
Figura 04	Desenho esquemático do Nafion	10

Capítulo 2 – ARTIGO 1

Figura 01	Cromatografia de afinidade em Cramoll 1,4 Sepharose: IgAS controle e colostro clarificado livre de caseína	32
Figura 02	SDS-PAGE de IgAS purificada em Cramoll 1,4- Sepharose	33
Figura 03	IDRS	34

Capítulo 3 – ARTIGO 2

Figura 1	Padrão de eluição do colostro clarificado e descaseinado por afinidade em Cramoll 1,4 – DHFG e BmoLL-DHFG	62
Figura 2	SDS- PAGE a 10% de proteínas eluidas bioespecificamente de Cramoll 1,4 – DHFG e BmoLL-DHFG	63

Capítulo 4 – ARTIGO 3

Figura 1	Representação esquema do sistema eletroquímico	72
Figura 2	Voltamogramas cíclicos	76
Figura 3	Gráfico de calibração de Cramoll 1,4	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
AH	Atividade hemaglutinante
BmoLL	Lectina de folha de <i>Bauhinia monandra</i> (do inglês: <i>Bauhinia monandra Leaf lectin</i>)
BSA	Albumina do soro humano
Con A	Concanavalina A
Cramoll	Lectina de semente de <i>Cratylia mollis</i>
Cramoll 1,4	Isoformas 1 e 4 da lectina de semente de <i>Cratylia mollis</i>
Cramoll 1,4 Sepharose	Cramoll 1,4 imobilizada em Sepharose CL-4B
CL-4B	Ligações cruzadas do inglês (do inglês <i>Cross Linked</i>)
CCLC	Colostro clarificado livre de caseína
DH	Dacron na forma hidrazida
DHFG	Dacron-hidrazida ferromagnético ativado com glutaraldeído
DHFG-Cramoll 1,4	Cramoll 1,4 imobilizada em dacron-hidrazida ferromagnético ativado com glutaraldeído
DHFG-BmoLL	BmoLL imobilizada em dacron-hidrazida ferromagnético ativado com glutaraldeído
DGL	Lectina de <i>Dioclea glandifora</i>
H	Cadeia pesada (do inglês “ <i>Heavy</i> ”)
IgAS	Imunoglobulina A secretória
J	Cadeia J (do inglês, “ <i>Joining</i> ”)
Nafion-Cramoll 1,4	Cramoll 1,4 adsorvida em Nafion
L	Cadeia leve (do inglês, “ <i>Light</i> ”)
PBS	Tampão fosfato de sódio em NaCl (do inglês, “ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
PI	Ponto isoelétrico
PSN	Preparação de secreção nasal
PS	Preparação da saliva
SC	Componente secretor (do inglês, “ <i>secretory component</i> ”)
SRID	Imunodifusão radial simples (do inglês, <i>single radial immunodiffusion</i>)

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato de sódico de dodecila (do inglês, “Polyacrylamide Gel Electrophoresis containing Sodium Dodecyl Sulfate”)
Tris	Tris – hidroximetil - aminometano

RESUMO

Uma preparação contendo as isoformas 1 e 4 da lectina de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) e uma lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) foram previamente purificadas por fracionamento com sulfato de amônio seguidos por cromatografia de afinidade em Sephadex G-75 e gel de guar, respectivamente. Cramoll 1,4 foi imobilizada em Sepharose CL-4B ativada com CNBr (Cramoll 1,4-Sepharose) e usada para purificar imunoglobulina A secretória (IgAS) de diferentes secreções humanas. Dacron ferromagnético na forma hidrazida (FDH) foi utilizado como suporte sólido para imobilizar Cramoll 1,4 (Cramoll 1,4-Dacron) e BmoLL (BmoLL-Dacron). As lectinas imobilizadas foram usadas para a purificação de glicoproteínas do colostro humano. Cramoll 1,4 foi adsorvida a contas de Nafion e caracterizada por voltametria cíclica., Cramoll 1,4-Dacron BmoLL-Dacron e Cramoll 1,4-Sepharose mostraram picos após a eluição bioespecífica. Os materiais eluídos da coluna de Cramoll 1,4 Sepharose foram submetidos a imunodifusão radial simples (SRID) contra Anti-IgA humana. Para a avaliação por voltametria cíclica da interação de Cramoll 1,4 com seu carboidrato específico, a lectina foi adsorvida a contas de Nafion e a resposta eletroquímica foi obtida usando um sistema de três eletrodos. Uma curva de calibração avaliou a concentração de glicose. Os picos eluídos mostraram bandas com migrações eletroforéticas similares às da IgAS do colostro humano em SDS-PAGE: cadeias pesada (H) e leve (L) bem como componente secretor. Os picos eluídos da coluna de Cramoll 1,4-Sepharose mostraram anéis de precipitação contra anti-IgA humana. A interação entre Cramoll 1,4 e diferentes concentrações de glicose mostraram picos de redução e oxidação. Esses picos anódicos e catódicos diminuíram com o aumento da concentração de glicose. Neste estudo IgAS foi purificada de diferentes secreções humanas em colunas contendo Cramoll 1,4 Sepharose, utilizando metil- α -D-manopiranosídeo glicose como eluente. Cramoll 1,4 e BmoLL e foram capazes de ligarem-se a FDH, podendo ser usadas como matrizes de afinidade para a purificação de glicoproteínas do colostro humano. O resultado da transferência de elétrons da Cramoll 1,4 durante a interação com a glicose foi significativo. O sistema pode ser usado como um sensor de calibração para determinar glicose.

Palavras chave: lectinas de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) Lectinas de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) imobilização, purificação de IgAS, Dacron, Sepharose CL-4B, voltamogramas cíclicos, Nafion.

ABSTRACT

A *Cratylia mollis* seed lectin preparation containing Cramoll 1 and Cramoll 4 isoforms (Cramoll 1,4) and *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) were purified previously by ammonium sulphate fractionation followed by Sephadex G-75 and guar gel affinity chromatography, respectively. Cramoll 1,4 was immobilized in CNBr-activated Sepharose CL-4B (Cramoll 1,4-Sepharose) and was used to purify secretory immunoglobulin (IgAS) from different human secretions. Ferromagnetic Dacron hydrazide (FDH) was used as a solid-phase immobilize Cramoll 1,4 (Cramoll 1,4-Dacron) and BmoLL (BmoLL-Dacron). Immobilized lectins were used to purify human colostrum glycoproteins. Cramoll 1,4 was adsorbed to Nafion beads and characterized by cyclic voltammograms. BmoLL-Dacron, CramoLL-Dacron and CramoLL-Sepharose showed peaks after bioespecific elution. The materials eluted from Cramoll 14-Sepharose were submitted to single radial immunodiffusion (SRID) against anti-human IgA. To evaluate by cyclic voltammetry the interaction of Cramoll 1,4 with its specific carbohydrate, the lectin was adsorbed on Nafion beads. The electrochemical response was obtained with a three-electrode system. A calibration curve evaluated glucose concentration. The eluted peaks showed bands with electrophoresis migration similar to human colostrum IgAS on SDS-PAGE; heavy(H) and light (L) chains as well as secretory component. The eluted peaks from Cramoll 1,4-Sepharose columns showed precipitation rings against anti-human IgA. The interaction between Cramoll 1,4 and different glucose concentrations showed reduction and oxidation peaks. This anodic-cathodic peaks decreased with the glucose concentration. In this study IgA was purified from different human secretions on Cramoll 1,4-Sepharose columns using glucose as eluent; Cramoll 1,4 e BmoLL were able to bind FDH and can be used as affinity matrices to purify glycoproteins from human colostrum. Cramoll 1,4 electron transfer resulted from glucose interaction and was significant. The system can be used as a calibration sensor to determine glucose.

Key word: *Cratylia mollis* seed lectin (Cramoll), *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL), immobilization, purification of IgAS, Dacron, Sepharose CL-4B, cyclic voltammograms, Nafion.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Generalidades sobre lectinas

Stillmark observou pela primeira vez, em 1888, que a ricina, proteína extraída da planta *Ricinus communis*, era responsável pela hemaglutinação de diferentes espécies de eritrócitos (BIES *et al.*, 2004). Na década seguinte, Ehrlich utilizou a ricina e a abrina, esta última, uma proteína obtida da planta *Abrus precatorius*, ambas com atividade hemaglutinante (AH), como potencial modelo antigênico (SHARON & LIS, 1988).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune (BANERGEE *et al.*, 2004), que aglutinam células, precipitam carboidratos e glicoconjugados (NAEEM *et al.*, 2001), através de sítios de ligação (MOREIRA *et al.*, 1991). Propriedade que resulta na capacidade de aglutinar seletivamente eritrócitos (ELIFIO *et al.*, 2000) o que permite a sua detecção através de ensaio de hemaglutinação. Muitas lectinas apresentam íons adjacentes aos sítios de ligação a carboidratos para ajustar e manter a estrutura terciária em uma conformação favorável para a perfeita função biológica desta proteína (AUDETTE *et al.*, 2000).

A especificidade de uma lectina tem sido determinada por estudos de inibição, usando carboidratos simples ou oligossacarídeos para inibir a aglutinação de eritrócitos, ou pela inibição de precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas. A classificação das lectinas dentro de um pequeno número de grupos resulta da definição da especificidade em termos do melhor monossacarídeo inibidor da hemaglutinação (LIS & SHARON, 1981).

As lectinas estão presentes em animais (VAN DE WETERING *et al.*, 2004) e vegetais (HO *et al.*, 2004). Em plantas, encontram-se em grandes concentrações nas sementes (CORREIA & COELHO, 1995), como também estão presentes em folhas (COELHO & SILVA, 2000), caules, raízes (VANDENBOCH *et al.*, 1994).

Ainda não existe uma resposta conclusiva quanto à função dessas proteínas em plantas (MOREIRA *et al.*, 1991). A habilidade de reconhecer carboidratos é de importância crucial no reconhecimento de vários processos biológicos (HILDEBRAND *et al.*, 2002) ela é a base da associação entre legumes e uma bactéria simbiótica fixadora de nitrogênio tal como *Rhizobium* (PEUMANS & VAN DAMME, 1995), as lectinas também atuam na interação parasita/hospedeiro (MULLER *et al.*, 2004). Qualquer que seja a função destas proteínas, ela está necessariamente relacionada com a sua localização e distribuição nas várias partes da planta (MURAKI *et al.*, 2000). As recentes pesquisas em diferentes grupos de lectinas de plantas que relacionam estrutura, especificidade e função têm sido importantes para a aplicação das mesmas. O fato das famílias de lectinas apresentarem diferentes especificidades para carboidratos, como também diferentes estruturas, pode justificar diversos papéis fisiológicos destas lectinas em plantas (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

2. Lectinas de *Cratylia mollis* Mart

A planta *Cratylia mollis* (feijão camaratu ou camaratuba) é uma forrageira que encontra-se na região Semi-Árida do Estado de Pernambuco (Ibimirim); ela pertence a tribo Phaseoleae, subtribo Dioclineae, que contém o gênero *Canavalia*, botanicamente relacionado com *Cratylia*. Uma preparação de lectina das sementes de *C. mollis* (Cramoll 1,4), do tipo glicose/manose foi purificada no Laboratório de Glicoproteínas da UFPE por CORREIA & COELHO (1995), através do fracionamento com sulfato de amônio (40-60%) seguido por cromatografia de afinidade em Sephadex G-75. Cramoll 1,4 tem resultado em dissertações de mestrado, teses de doutorado e publicações que revelam caracterizações e aplicações desta lectina autóctone. Os estudos sobre Cramoll 1,4 imobilizada em Sepharose CL-4B (Cramoll 1,4 -Sepharose) têm sido empregada como etapa final na purificação da lecitina colesterol acil transferase (LIMA *et al.*, 1997). Estudos têm demonstrado um potencial emprego como marcador para detecção de células normais e transformadas (BELTRÃO *et al.*, 1998).

3. Lectinas de *Bauhinia monandra* Kutz

Bauhinia monandra Kurtz, conhecida vulgarmente por pata-de-vaca é uma planta pertencente à família das Caesalpiniaceae. Suas folhas, como as de outras deste mesmo gênero, têm sido usadas na medicina popular com suposta atividade hipoglicemiante em pacientes diabéticos (LEMUS *et al.*, 1999; PEPATO *et al.*, 2002).

Lectinas de *B. monandra* descritas em sementes por ABREU *et al.*, (1990) foram também detectadas em limbo foliar (COELHO & SILVA, 2000). A lectina de folhas de *B. monandra*, BmoLL (*B. monandra* Leaf Lectin) foi purificada através de fracionamento com sulfato de amônio (0-60%) seguido por cromatografia de afinidade em coluna de gel de guar, um polissacarídeo de manose com substituições de α 1-6 galactose (COELHO & SILVA, 2000). Em eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE), BmoLL apresentou uma banda principal de 33 kDa (glicosilada) e uma banda menor de 26 kDa (não glicosilada).

Esta lectina de folhas, galactose específica tem tido suas características estudadas no Laboratório de Glicoproteínas através da Profa. Dra. Luana C. B. B. Coelho, em parceria com outros Laboratórios na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no Brasil e exterior.

4. Imunoglobulinas

São glicoproteínas envolvidas com as respostas imunes. São conhecidas como receptores quando encontram-se nas superfícies celulares e quando localizadas livres no sangue ou na linfa, são denominadas anticorpos (HUSE *et al.*, 2002).

Carboidratos, lipídeos, ácidos nucléicos e polipeptídeos naturais ou sintéticos podem ser denominados antígenos ou imunógenos por serem capazes de levar à formação de um anticorpo. O contato entre as células B e o antígeno é necessário para induzir o

desenvolvimento de plasmócitos, células que produzem anticorpos (LUELLAU *et al.*, 1998).

A unidade básica de uma imunoglobulina (Ig) é formada por duas cadeias leves, L (do inglês, *light*) e duas cadeias pesadas, H (do inglês, *Heavy*) formando assim um tetrâmero ($H_2 L_2$). São cinco as classes das imunoglobulinas, que diferem entre si por suas cadeias H, enquanto as cadeias L são iguais para cada uma delas. As imunoglobulinas apresentam-se como um monômero (IgG), como polímeros de duas, três (IgA), ou cinco (IgM) unidades básicas tetraméricas ligadas entre si pela cadeia J (do inglês, *joining*), um pequeno polipeptídeo (HUSE *et al.*, 2002). A IgA ocorre como duas subclasses IgA₁ e IgA₂. A forma monomérica da IgA₁ ocorre principalmente no soro sangüíneo, enquanto nas secreções externas como colostro, saliva e secreção nasal predomina a forma dimérica IgA₂. A IgA₂ dimérica das secreções externas além de apresentar dois monômeros ligados por pontes de sulfeto à cadeia J, apresenta também um determinante antigênico extra, o componente secretor, SC (do inglês, *secretory component*) de acordo com GARCIA-PARDO *et al.*, (1981).

5. Purificação de proteínas por afinidade em lectinas imobilizadas

5.1 Em Sepharose CL – 4B

A cromatografia por afinidade com lectinas imobilizadas resultou em uma crescente utilização dessas versáteis proteínas, como instrumento em pesquisas médicas e biológicas. A lectina de *Canavalia ensiformes*, concanavalina A (Con A) imobilizada Sepharose CL-4B tem sido usada para purificar glicoproteínas (PRATT *et al.*, 1990). Suportes de afinidade com lectinas comerciais imobilizadas são largamente empregados para a purificação de glicoproteínas de membranas (TORRES & SMITH, 1988).

Os grupos amina de uma lectina interagem com a Sepharose CL-4B ativada com brometo de cianogênio (figura 01). A lectina imobilizada deixa exposto o seu sítio de ligação específico para carboidratos. Assim, uma lectina imobilizada em material inerte interage com glicoproteínas.

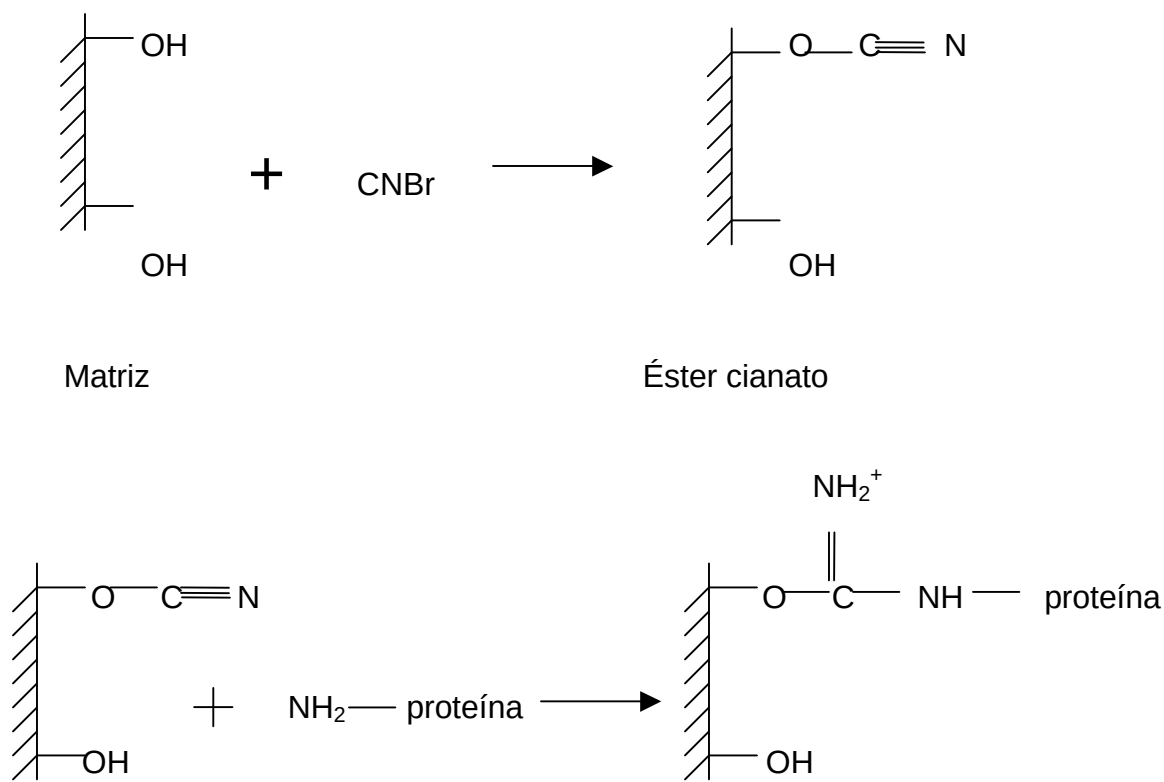


Figura 01. Imobilização de proteínas em Sepharose CL-4B (Fonte: Janson e Rydén, 1989)

A interação entre Ig e lectinas tem sido demonstrada por diversos autores (tabela 01). Uma lectina imobilizada em suporte inerte, como Sepharose CL-4B, pode ser utilizada como suporte para a purificação de Ig (figura 02) uma vez que as Ig apresentam oligossacarídeos ligados à sua cadeia H (BAENZIGER & KORNFELD, 1974). As condições brandas de eluição, quando lectinas são usadas como ligantes, garantem a atividade biológica da proteína de interesse ao contrário das condições de eluição quando se usa anticorpo como ligante que são feitas em rigorosas condições de pH (SATISH & SUROLIA, 2001). A jacalina imobilizada à Sepharose tem sido utilizada para purificar IgA (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985).

Tabela 01. Interação entre imunoglobulinas e lectinas galactose e manose específicas

Fonte	Lectina	Especificidade	Ig	Referência
<i>Ricinus communis</i>	RCA	Manose	IgM	KOPPEL & BEKA, 2001
<i>Agaricus bisporus</i>	ABL	Galactose	IgA ₁ e IgD	IRAZOQUI <i>et al.</i> , 1992
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	Manose	IgA e IgM	LIM <i>et al.</i> , 1997
<i>Artocarpus integrifolia</i>	Jacalina	Galactose	IgA ₁ e IgD	WANG <i>et al.</i> , 2004

RCA, *Ricinus comunis* Agglutinin, Aglutinina de *R. comunis*

ABL, *Agaricus bisporus* Lectin, Lectina de *Agaricus bisporus*

Con A, Lectina de *C. ensiformis*

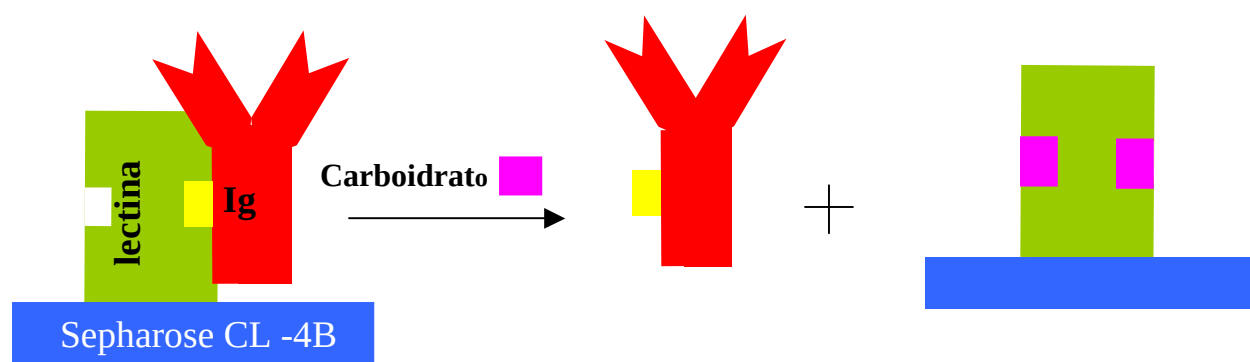


Figura 02. Purificação de anticorpo em lectina imobilizada em Sepharose CL-4B.

5.2 Em suportes alternativos

A cromatografia de afinidade tem sido uma técnica muito usada tanto na purificação de biomoléculas como instrumento de pesquisas como para a purificação em escala industrial. O desenvolvimento de novos suportes sólidos mais práticos e menos dispendiosos e que retenha a biomolécula com sua substancial atividade é de grande importância (FIRER, 2001).

A busca de novos ligantes para a síntese de matrizes de afinidade também tem sido uma das grandes áreas da pesquisa, visando a purificação de proteínas de interesse biotecnológico, como enzimas e anticorpos (FASSINA *et al.*, 2001). A síntese de uma matriz requer a introdução de um ligante que tenha afinidade pela proteína de interesse. Esses ligantes devem ser compatíveis com as soluções usadas durante a imobilização e possuir no mínimo um grupo funcional (amino, carboxílico, aldeído, tiol, hidroxílico) através do qual será acoplado ao suporte inerte. Este grupo funcional não pode ser essencial para a função biológica do ligante, garantindo sua atividade após a imobilização (JANSON E RYDÉN, 1989).

Os grupos funcionais dos ligantes são imobilizados em compostos que ligados ao suporte propriamente dito, servem de braços que neutralizam o impedimento estérico, permitindo assim a eficácia da ligação da proteína a ser purificada. O glutaraldeído é um dos reagentes bifuncionais mais empregados em imobilização de proteínas (WALT & AGAYN, 1994). O álcool polivinílico (PVA) tem sido usado como suporte alternativo para a imobilização covalente de enzimas (CHASE *et al.*, 1998).

A capacidade das lectinas imobilizadas de interagir seletivamente com carboidratos, as torna excelentes ligantes para a purificação de glicoproteínas. Seus grupos aminos responsáveis pela ligação com Sepharose-CNBr podem também ligarem-se a outros braços, tais como azida de sódio e glutaraldeído.

Dacron, um poliéster quimicamente conhecido como polietilenotereftalato largamente empregado no comércio tem sido em sua forma hidrazida (figura 03) ferromagnetizada usado para a imobilização de enzimas via glutaraldeído (CARVALHO, *et al.*, 1989) e para imobilização de albumina humana via glutaraldeído e azida (PINHEIRO *et al.*, 1999).

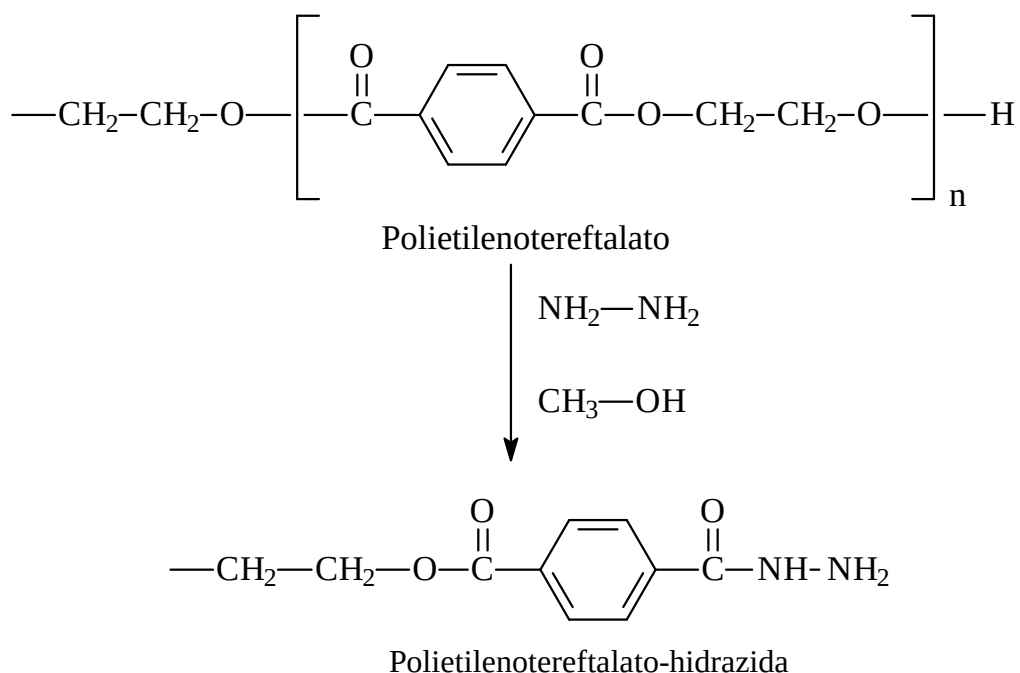


Figura 3 Esquema de hidrazinólise do Dacron (Fonte: HERMANSON *et al.*, 1992)

6 Estudos eletroquímicos

Num biossensor, um elemento biológico imobilizado em um suporte sólido (transdutor) detecta através de sinais eletroquímicos o seu analítico correspondente que deverá ser apenas um produto específico do material analisado (SIGRIST & GAO 1999).

Os transdutores são classificados em eletroquímicos, eletromagnéticos e ópticos. Existe um considerável interesse na transferência de elétrons direta entre eletrodos e proteínas para aplicações como em biossensores e estudos fundamentais (NASSAR *et al.*, 1995).

Estudos cinéticos e mecanísticos da interação de ligantes à proteínas podem ser realizados por métodos eletroquímicos (YOSHIZUMI *et al.*, 1999). A interação lectina-carboidrato tem sido avaliada por voltametria cíclica, um método amperométrico. (SUGAWARA, 2004). Potenciais redoxes para lectina foram obtidos por técnicas

potenciostáticas, usando uma solução salina como suporte para controle da distribuição de cargas entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho (SOUZA *et al.*, 2001). A voltametria é uma variação da técnica amperométrica, ela registra vários pontos numa região escolhida no perfil corrente-potencial. A voltametria de varrimento linear e a voltametria cíclica são as técnicas voltamétricas de varrimento mais conhecidas, enquanto na linear o varrimento é feito apenas numa direção, na cíclica a direção do varrimento é invertida (SOUZA *et al.*, 2003)

O primeiro passo tanto para a construção de biossensores como para a caracterização eletroquímica de uma lectina é a sua imobilização covalente ou adsorção num suporte. Imunossensores para a detecção de anticorpos de *Schistosoma japonicum* foi realizado utilizando o Nafion para a imobilização do imuno-reagente (ZHOU, *et al.*, 2003), isto por que o Nafion, um polímero perfluossulfonado, apresenta íons capazes de induzir interações eletrostáticas intermoleculares com um ligante (YOSHIZUMI *et al.*, 1999). Este ionômero é um polímero anfifílico, em que a região fluorcarbonada, onde localiza-se de 5 a 13 (n) unidades de tetrafluoropolietileno é responsável por sua hidrofobicidade; já a região hidrofílica parece ser constituída por um sítio contendo: grupamentos sulfônicos que absovem água, íons H^+ e cátions metálicos Na^+ revelados por experimentos utilizando análise de dispersão de raios-X de acordo com BROOKMAN *et al.*, 1986 (figura 04).

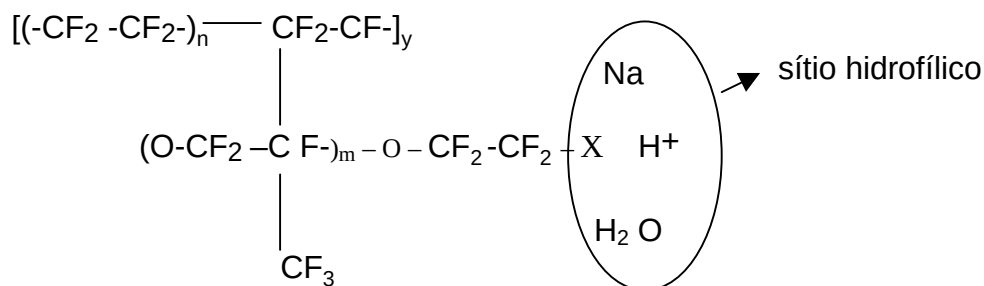


Figura 04 -Estrutura do Nafion. Fonte: modificado de YOSHIZUMI *et al.*, 1999)



7 Objetivos

7. 1 Objetivo Geral

Imobilizar Cramoll 1,4 e BmoLL para isolar glicoproteínas de interesse biotecnológico e caracterizar eletroquimicamente a ligação entre a glicose e a Cramoll 1,4 adsorvida em Nafion

7. 2 Objetivos específicos

7.2.1 Purificar imunoglobulinas de colostro humano, saliva e secreção nasal utilizando Cramoll 1,4 imobilizada em Sepharose CL-4B.

7.2.2 Utilizar o Dacron ferromagnético como suporte para a imobilização de Cramoll 1,4 e BmoLL e utilizar as matrizes como abordagens para purificar proteínas do colostro humano.

7.2.3 Detectar através da voltametria cíclica a transferência de cargas resultantes da interação da glicose com Cramoll 1,4 adsorvida em Nafion.

8. Referências

Abreu M, Castilho A, Rodrigez A, Gonzales I, Rodriguez N, Pinon D (1999) Effect of the ingestion of an extract from *Bauhinia monandra* seeds on rats. *Nahrung-Food* **43**, 689-693.

Audette GF, Vandonselaar M, Delbaare LTJ (2000) The 2.2 Å resolution structure of the O (H) blood-group-specific lectin I from *Ulex europaeus*. *Journal of molecular biology*, **304**, 423-433.

Baenzinger, J, Kornfeld, S (1974) Structure the carbohydrate units of IgA₁ immunoglobulin. *Journal of Biological Chemistry*. **249**, 7270-7280.

Banergee S, Chaka S, Bowel J (2004) Chattered–Mucking binding mutagenic lectins from freshwater Indian gastropod *Bulimia Bengalese*'s: purification and molecular characterization. *Archives of biochemistry and biophysics* **421**, 125-134.

Beltrão E I C, Correia M T S, Silva J F, Coelho L C B B (1998) Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **74**, 125-134.

Bies C, Lehr CM, Woodley JF (2004) Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56** (4), 425-435.

Brookman PJ, Nicholson JW (1986) in: *Developments in ionic polymers*. Elsevier Applied science **2**, 269-283.

Carvalho Jr LB, Lima CJ, Melo, EHM, Kennedy JF (1989) Determination of vitamin C by immobilized ascorbate oxidase process. *Biochemistry* **4**, 52-54.

Chase HA, Yang Y (1998) Immobilization of enzymes on poly (vinyl alcohol)-coated perfluorocarbon supports: Comparison of techniques for the immobilization of trypsin and

□-amylase on poly (vinyl alcohol)-coated solid and liquid perfluorocarbons. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **27**, 205–216.

Coelho LCBB, Silva MBR (2000) Simple method to purify milligram quantities of galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*. **11**, 295-300.

Correia MTS & Coelho LCBB (1995) Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (amaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **55** (3), 261-273.

Elifio SL, Da Silva MLCC, Jacomini M, Gorin PAJ (2000) A lectin from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum* *New Phytologist*. **148**, 327- 334.

Fassina G, Ruvo M, Palombo G, Verdoliva A, Marino M (2001). Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **49**, 481-490.

Firer MA (2001) Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography..*Journal of biochemical and biophysical methods* **49**, 433-442.

Garcia-Pardo L, Lamm M, Plaut A G, Frangione B (1981) J chains is covalently bound to both monomer subunits in human secretory IgA. *Journal of Biological Chemistry*. **256** (22)11734 - 8.

Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK (1992) Immobilised affinity ligand techniques. Academic Press, p. 453

Hildebrand A, Schaedlich A, Rothe U, Reinhard HH, Neubert (2002) Sensing specific adhesion of liposomal and micellar systems with attached carbohydrate recognition structures at lectin surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. **249**, 274-281.

Ho JC, Sze SC, Shen WZ, Liu WK (2004) Mitogenic activity of edible mushroom lectins. *Biochimica Biophysica Acta*. **17**, 1671(1-3), 9-17.

Huse K, Hans-Joachim B, Scholz GH (2002) Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biochemical Methods*. **51**, 217-231.

Irazoqui FJ, Zalazar FE, Chiabrando GA, Romero O, Vides MA (1992) Differential reactivity of *Agaricus Bisporus* lectin with human IgA subclasses in gel precipitation. *Journal of Immunological Methods*. **156**, 199-204.

Janson JC, Rydén L (1989) Protein Purification. Principles, High resolution methods, and applications. VCH Publishers, p. 502.

Koppel R, Beka S (2001) IgM diction via selective recognition by mannose-binding Protein. *Journal Biochemical and biophysical methods* **49**, 641-647.

Lemus L, Garcia R, Delvillar E, Knop G (1999) Hypoglycaemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. *Phytotherapy Research*. **12** (2), 1-94.

Lim SB, Chua CT, Hashim OH (1997) Isolation of a mannose-binding and IgE and IgM-reactive lectin from the seeds of *Artocarpus integer*. *Journal of Immunological Methods*. **209**, 177-186.

Lima VLM, Correia MTS, Cechinel YMN, Sampaio CAM, Owen JS, Coelho LCBB (1997) Immobilized *cratylia mollis* lectin a potential matrix to isolated plasma glycoproteins including lecithin cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*. **33** (892), 27-32.

Lis H, & Sharon N (1981) lectins in higher plants. (In): Marcus, A. The biochemistry of plants; a comprehensive treatise. Proteins and nucleic acids, Academic press **4**, 371-436.

Luellau E, Stockar UV, Vogt S, Freitag R (1998) Development of a downstream process for the isolation and separation of monoclonal immunoglobulin A monomers, dimers and polymers from cell culture supernatant. *Journal of Chromatography A*, **796**, 165-75.

Moreira RA, Ainouz L, Oliveira JTA, Cavada BS (1991) Plant lectins: chemical and biological aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.**86**, 211-218.

Muller I, Jenner J, Handgretinger R, Riberdy J, Kerst G (2004) Glycosylation and lectins- examples of immunesurveillance and immune evasion. *Histology and Histopathology* **19** (2), 527-33.

Muraki, M, Harata, K, Sugita NM, Sato K (2000) Protein carbohydrate interactions in human lysozyme probed by combining site directed mutagenesis and affinity labeling. *Biochemistry*. **39**, 292-299.

Naeem A, Khan Rh, Vikran H, Akif M (2001) Purification of cajanus cajan root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. *Archives of biochemistry and biophysics*. **396**, 99 -105.

Nassar A-EF, Willis WS, Rusling JF (1995) Electron transfer from electrodes to myoglobin: facilitated in surfactant films and blocked by adsorbed biomacromolecules. *Analytical Chemistry*. **67**, 2386-2392.

Pepato MT, Keller EH, Baviera A M, Kettelhut IC, Vendramini, R C, Brunetti I L (2002) Anti-diabetic activity of *Bauhinia fortificata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **81**, 191-197.

Peumans JW, Van Damme JM (1995) Lectins as plant defense protein. *Plant Physiology*. **109**, 347-352.

Peumans JW, Van Damme E J M (1998) Plants lectins: Versatile proteins with important perspectives biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. **15**, 199-226.

Pinheiro SMB, Carvalho Jr LB, Chaves MEC (1999) The use of ferromagnetic Dacron as solid-phase in chemiluminescent assays. *Biotechnology Techniques*. **13**, 919-922.

Pratt RC, Singh NK, Shade RE, Murdock LL, Bressan RA (1990) Isolation and partial characterization of a seed lectin from therapy bean that delays bruchid beetle development. *Plant Physiology* **93**, 1453-1459.

Roque-Barreira MC, Campos-Neto A (1985) Jacalin: an IgA-binding lectin. *Journal of Immunology*. **134**(3), 1740-1743.

Sharon N & Lis H (1988) A century of lectin research. *Trends in Biochemical Science*. **12**, 488-491.

Satish PR, Surolia A (2001) Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **49**, 625-640.

Sigrist H, Gao H (1999) Biosensors @ CSEM. *Chimia*, **53**, 81-86

Souza D, Machado SAS, Avaca LA (2003) Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Química Nova*, **26** (1), 81-89.

Souza SR, Correia M T S, Pessoa M M A, Kennedy JF, Lima-Filho J L, Coelho LCBB (2001) A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. *Carbohydrate Polymers* **46**, 191-193.

Sugawara K, Shirotori T, Hirabayashi G, Kuramitz H, Tanak S (2004) Voltammetric evaluation of lectin-sugar binding at a mannose/thionine-modified Au electrode. *Journal of electroanalytical Chemistry*. **568**, 7-12

Torres BV, Smith, DF (1998) Purification of Forsmann and human blood group A glycolipids by affinity chromatography on immobilized *Helix pomatia* lectin. *Analytical Biochemistry*. **170**, 209-219.

Vandenboch KA, Rodgers LR, Sherrier DJ, Kishinevsky (1994) A peanut nodule lectin in infected cells and in vacuoles and the extracellular matrix of nodule parenchyma. *Plant Physiology*. **104**, 327-337.

Van De Wetering JK, Van Golde LM, Batenburg JJ (2004) Collectins. *European Journal of Biochemistry*. **271** (7), 1229-1249.

Yoshizumi A, Kanayama N, Maehara Y, Ide M, Kitano H (1999) Self-Assembled Monolayer of Sugar-Carrying polymer Chain: Sugar Balls from 2-Methacryloyloxyethyl D-Glucopyranoside. *Langmuir*. **15**, 482-488.

Walt DR, Agayn VI (1994) The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends in Analytical Chemistry*. **13** (10), 425-430.

Wang Y, Zhao, MHY, Zhang YK, Li XM, Wang HY (2004) Binding capacity and pathophysiological effects of IgA₁ from patients with IgA nephropathy on human glomerular mesangial cells. *Clinical and Experimental Immunology* **136** (1), 168- 175.

Zhou Y-M, Wu Z-Y, Shen G-L, Yu, R-Q (2003) An amperometric Immonosensor based on nafion-modified electrode for the determination of *Schistosoma japonicum* antibody. *Sensors and actuators B*. **89**, 292-298.

CAPITULO 2

PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA A SECRETÓRIA COM LECTINA DE *Cratylia mollis* IMOBILIZADA EM SEPHAROSE CL-4B

A ser submetido ao periódico *Bioresource Technology*

PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA A SECRETÓRIA COM LECTINA DE *Cratylia mollis* IMOBILIZADA EM SEPHAROSE CL- 4B

Edilson G. Santana, Luana C. B. B. Coelho, Correia, M. T. S.*

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Bioquímica, Rua Prof. Nelson Chaves S/N, 50670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil.

Resumo

Imunoglobulina A secretória (IgAS) de colostro humano, secreção nasal e saliva foi purificada em apenas uma etapa por cromatografia de afinidade em uma preparação de lectina de *Cratylia mollis* (Cramoll) contendo as isoformas 1 e 4 (Cramoll 1,4) imobilizadas em Sepharose CL-4B ativada com brometo de cianogênio (Cramoll 1,4-Sepharose). O pH do sobrenadante do colostro, obtido por centrifugação foi ajustado para 4,6 para remover a caseína; a secreção nasal e a saliva foram diluídas em PBS e foram clarificados por centrifugação; a saliva foi fracionada com sulfato de amônio. As IgAS, parcialmente purificadas das diferentes fontes foram aplicadas a colunas de Cramoll 1,4-Sepharose. Os picos eluídos com carboidrato e a IgAS usada como controle mostraram três principais bandas em SDS-PAGE: cadeias pesada (H) e leve (L) e o componente secretor. Os controles de IgA e os materiais não adsorvidos e eluídos bioespecificamente da coluna Cramoll 1,4 Sepharose; colostro humano, secreção nasal e saliva mostraram anéis de precipitação quando submetidos a imunodifusão radial simples (SRID) contra anti-IgA de soro humano. Cramoll 1,4 -Sepharose retém efetivamente IgAS imunologicamente ativa e pode ser usada como uma matriz alternativa para obter esta imunoglobulina.

Palavras chave: Purificação de Imunoglobulina; secreção humana; IgAS; lectina; *Cratylia mollis*.

*Correspondência para: Correia, M. T. S ou Luana C. B. B. Coelho, fone/Fax: (+55-81) 2126-8576. E-mail: mcorreia@ufpe.br

Abstract

Secretory immunoglobulin A (IgAS) from human colostrum, nasal secretion and saliva were purified in a single step by affinity chromatography on a lectin preparation containing *Cratylia mollis* (Cramoll) isoforms, Cramoll 1,4, immobilized in CNBr-activated Sepharose CL-4B (Cramoll 1,4-Sepharose). Colostrum supernatant, obtained by centrifugation, was adjusted to pH 4.6 to remove casein; nasal secretion and saliva were diluted in phosphate buffered saline and also clarified by centrifugation; saliva was ammonium sulphate fractionated. Partially purified human IgAS from the distinct sources were applied to Cramoll 1,4-Sepharose columns. Carbohydrate eluted peaks and control purified human IgAS showed three main bands on SDS-PAGE: heavy (H) and light (L) chains, as well as a secretory component (SC). Control IgA, unbound and biospecifically eluted materials from Cramoll 1,4 – Sepharose column, colostrum, nasal secretion and saliva showed precipitate rings when submitted to single radial immunodiffusion (SRID) against anti-IgA from human serum. *C. mollis* lectin immobilized in Sepharose CL-4B effectively retained immunologically active dimeric IgAS and can be an alternative matrix to obtain this immunoglobulin.

Key words:Immunoglobulin purification; human secretions; IgAS; lectin; *Cratylia mollis*.

*Correspondence to: Correia, M.T.S or Luana C.B.B. Coelho, Phone/Fax: (+55-81) 2126-8576.

E-mail address: mcorreia@ufpe.br

1 Introdução

Lectinas são proteínas de origem não imune, ligantes a carboidratos, que têm sido imobilizadas em suportes inertes. Matrizes de afinidade com lectinas comerciais são muito usadas na purificação de glicoproteínas [1 2, 3, 4] como por exemplo imunoglobulinas [5].

Imunoglobulina A (IgA) associada com o componente secretor (SC, do inglês *secretory component*) é designada como IgA secretória (IgAS) por Zaha [6]. IgAS dimérica tem sido isolada do colostro humano clarificado e livre de caseína, por apenas uma etapa ou por uma combinação de técnica: precipitação em sulfato de amônio, cromatografias em gel de filtração e troca iônica em DEAE-Sephacel [7], bem como filtração em Sephadex G-200 e cromatografia em DEAE–Cellulose [8]. IgAS de colostro clarificado de baboon foi fracionado por cromatografia de filtração em Ultrogel AcA 34 [9]. IgA também já foi purificada por cromatografia de afinidade em Jacalina (lectina da semente da jaca) imobilizada em Sepharose CL-4B [10].

Em humanos IgA constitui a maior Ig do soro e é também a classe predominante de Ig encontrada nas secreções externas dos tratos respiratório, gastrintestinal e geniturinário, como também em saliva, suor, leite e colostro [11]. IgA do soro é representada predominantemente por moléculas monoméricas da subclasse IgA₁ que é produzida principalmente na medula óssea; em secreções externas a maior parte da IgA é produzida no próprio tecido da mucosa e ocorre na configuração polimérica, com relativo aumento da molécula IgA₂ [12].

Como principal anticorpo da superfície da mucosa, IgA representa a primeira linha de defesa contra doenças infecciosas causadas por microrganismos que entram no corpo através das membranas da mucosa [13]. IgAS é composta de dois monômeros de IgA, um SC e uma cadeia J (do inglês, *Joining*), seu peso molecular é de 390 kDa. A IgA do soro é composta por apenas um monômero [14]; cada monômero é composto por duas cadeias leves (L do inglês, *light*) e duas cadeias pesadas (H do inglês, *heavy*) [15].

A lectina Cramoll foi purificada e caracterizada das sementes de *Cratylia mollis* Kurt, uma forrageira nativa do Brasil. Esta lectina contém quatro isoformas: Cramoll 1, 2, 3 e 4. Cramoll 1 e Cramoll 4 foram fortemente inibidas por metil- α -D-manopiranosídeo [16] e pertencem à classe de reconhecimento glicose/manose de lectinas. Uma preparação contendo Cramoll 1 e Cramoll 4 (Cramoll 1,4) em miligramas (300 mg de lectinas / 100 gramas de sementes), foi obtida por cromatografia de afinidade em Sephadex G-75 [17]. Cramoll 1,4 foi imobilizada em Sepharose CL-4B e foi usada como matriz de afinidade para purificar a enzima colesterol acil transferase [18]. A presente investigação descreve a purificação de IgAS de colostro humano, secreção nasal e saliva por cromatografia de afinidade em Cramoll 1,4 imobilizada em Sepharose CL-4B (Cramoll 1,4-Sepharose).

2. Materiais e métodos

2.1 Purificação e imobilização de Cramoll 1,4

As sementes de *C. mollis* foram coletadas em Ibimirim, no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Cramoll 1,4 foi obtida de um extrato de sementes a 10% (p/v) em NaCl 0,15 M e as proteínas foram precipitadas usando sulfato de amônio a 40-60%, seguido por cromatografia de afinidade em colunas (70 x 2 cm) de Sephadex G-75; as proteínas ligadas foram eluídas com 0,3 M de D-glicose [16].

A concentração de proteínas foi definida segundo Lowry *et al.* [19] e absorbância a 280 nm (A_{280}). A atividade hemaglutinante (HA) foi feita em placas de microtitulação como previamente descrito [16].

Cramoll 1,4 (12 mg) foi incubada com Sepharose- CL 4B ativada com brometo de cianogênio (GE) por 3 h em temperatura ambiente e sob agitação suave; a imobilização

segiu-se por 16 h 4 °C. Cramoll 1,4 foi avaliada por A_{280} do sobrenadante antes e após a imobilização.

2.2 Preparação do colostro humano, secreção nasal e saliva.

Colostro humano foi obtido do Departamento de Microbiologia, Laboratório Central Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN), Secretaria de Saúde, cidade do Recife, Estado de Pernambuco (Brasil). As amostras foram obtidas de mulheres sadias pós-parto.

O colostro (20 ml) foi clarificado por centrifugação por 20 min a 10,000 x g. O pH do sobrenadante foi ajustado para 4,6 por adição de ácido acético glacial e a caseína foi precipitada em seu ponto isoelétrico. O colostro clarificado e livre de caseína (CCLC) foi armazenado à 4 °C até o uso.

Saliva (40ml) e secreção nasal (1ml) foram coletadas diretamente em um béquer, em banho de gelo. Em seguida foram diluídos a 80 ml e 2 ml respectivamente, em tampão fosfato salino (PBS), 0,15 M pH 7,2 contendo NaCl 0,15 M. A saliva diluída e a secreção foram clarificadas por centrifugação (15 min 10,000 x g). Apenas o sobrenadante da saliva foi fracionado com 60% de sulfato de amônio, em temperatura ambiente, por 3 h; o material precipitado foi ressuspenso em 5 ml de PBS e dialisado por três horas contra o mesmo tampão. Preparações de saliva (PS) e de secreção nasal (PSN) foram armazenadas a 4 °C até o uso.

2.3 Cromatografia em coluna de Cramoll 1,4-Sepharose

A IgAS humana (Sigma) usada como controle (500µg), CCLC (1 mg), PS (1mg), ou PSN (1mg) foram aplicadas a colunas de 1 ml (0,68 x 4 cm) contendo 0,9 ml de Cramoll 1,4-Sepharose. As colunas foram equilibradas e desenvolvidas em temperatura ambiente

com PBS pH 7,2 e velocidade de fluxo de 5 ml / h ajustada por uma bomba peristáltica. Após a remoção das proteínas não adsorvidas, as proteínas ligadas foram eluídas com metil- α -D-manopiranosídeo ou D-glicose 0,5 M. As frações (1 ml) foram coletadas e as proteínas foram determinadas por A_{280} . Os experimentos foram realizados três vezes em temperatura ambiente.

2.4 Imunodifusão radial simples

A imunodifusão radial simples (SRID, do inglês, *single radial immunodiffusion*) foi realizada de acordo com Mancine [20] usando uma placa contendo anti IgA humana produzida em cabra (específica para a porção Fc da imunoglobulina) em agarose tamponada a pH 7,2 na presença de NaN_3 0.1%. Amostras de IgAS (10 μl) foram adicionadas aos poços das placas, em seguida foram incubadas a 4 °C em atmosfera úmida por 72 h.

2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila

Amostras de IgAS foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE) em condições desnaturantes, de acordo com Laemmli [21]. As amostras foram misturadas com 30 μl do tampão redutor e incubadas por 5 min a 100 °C. A corrida foi desenvolvida num gel a 12% a 200 V por 1 h. Proteínas com peso molecular entre 14,2 e 66 kDa foram usadas como padrão (SIGMA). Detecção das bandas protéicas foi feita com azul de Coomassie (Merck) e a descoloração foi feita com ácido acético 10% (v/v).

3. Resultados e Discussão

A escolha da metodologia apropriada para a purificação de anticorpos, como para qualquer proteína, depende do rendimento, do grau de pureza e do custo do procedimento. Purificação de anticorpos por afinidade é um interessante método, baseado na habilidade dessas proteínas de reconhecerem especificamente um adsorvente de afinidade, que consiste num ligante imobilizado, geralmente a um braço espaçador, que por sua vez, encontra-se ligado a uma matriz [22].

A habilidade da Cramoll 1,4-Sepharose de ligar-se a LCAT representou o primeiro uso de Cramoll 1,4 na purificação de glicoproteínas [18]. No presente trabalho, o rendimento da imobilização de Cramoll 1,4 em Sepharose CL-4B foi de 96%.

Lectinas têm sido usadas para caracterizar imunoglobulinas, como IgM e IgA₁ [22,10]; interação de IgA com lectinas glicose-manose ou galactose específica acopladas à Sepharose CL-4B ativada com CNBr tem sido descrita [23]; a presença de lectinas manose-específicas em vários antígenos infecciosos, pode ser responsável por um opção não imune capaz de prevenir os primeiros passos de algumas doenças infecciosas da mucosa [24]. IgA₂ reagiu mais fortemente com a Con A, uma lectina glicose/manose específica; IgA₁ reconhece mais fortemente lectinas galactose-específicas como aglutinina I da *Ricinus communis* e aglutinina de *Abrus precatorius* [24].

Cromatografia de afinidade de IgAS de colostro humano (Figure 1A), como de CCLC (Figura 1B), PSN (Figura 1C) e PS (Figura 1D) em colunas de Cramoll 1,4-Sepharose apresentaram picos após a eluição específica. O melhor pico de proteínas ($A_{280} > 0,800$) foi obtido do CCLC eluído com metil α -D-manopiranosídeo ou glicose 0,5 M.

Isolar grandes quantidade de IgAS imunologicamente pura não tem sido fácil, pois IgA e IgG em soro humano são similares e as técnicas para separá-las são baseadas na carga líquida ou peso molecular e proporcionam um baixo rendimento. Protocolos usando cromatografia de afinidade com lectinas imobilizadas têm sido efetuados. Jacalina, uma lectina isolada da jaca (*Artocarpus integrifolia*) foi imobilizada em agarose e usada para purificar IgA. Visto que IgAS e IgA do soro possuem O-glicans em suas regiões dobradiças [10], lectinas glicose/manose e galactose específicas têm sido usadas na purificação destas moléculas [23]. Preparações de colostro, secreção nasal e saliva mostraram um pico eluído bioespecificamente com glicose ou metil- α D-manopiranosídeo.

Estas frações bioespecificamente eluídas do CCLC mostraram quatro bandas principais quando submetidos a SDS-PAGE; SC, cadeia H e um complexo L-J que migraram acima de 66 kDa, entre 66 e 45 kDa e aproximadamente 24 kDa, respectivamente (Figure 2). Resultados similares para as amostras foram obtidos das PS e PSN. As cadeias L e J não são bem resolvidas em SDS-PAGE [24].

Em teste SRID contra anti-IgA, IgA de soro humano, IgAS controle, CCLC, fração não adsorvida do CCLC, e as frações bioespecificamente eluídas do CCLC e das PS e PSN, com D-glicose ou metil α -D-manopiranosídeo resultaram em anéis de precipitação (Figure 3). A reatividade confirmou a presença das imunoglobulinas. A reatividade nos picos bioespecificamente eluídos do CCLC, PS e PSN, mostrou a eficácia da coluna Cramoll 1,4-Sepharose na obtenção de IgAS ativa em diferentes secreções.

Métodos de purificação de imunoglobulinas têm uma longa história de muitas tentativas para obter estes anticorpos, de forma pura e ativa. Até hoje, cromatografia em Proteína-A Sepharose é o método de purificação escolhido para uma produção em grande escala de anticorpo, mas as condições bruscas necessárias para a eluição destas proteínas sensíveis têm levado ao desenvolvimento de procedimentos alternativos de purificação [25]. A descoberta de novos ligantes para a purificação de anticorpos tem uma grande

aplicação; ligantes de afinidade como Proteína-A ou G para a purificação de IgG, ou lectinas para a purificação de IgA e IgM têm sido avaliados. Portanto, proteínas A e G são obtidas de microorganismos ou bactérias geneticamente modificadas através de procedimentos complexos e relativamente demorados [25]; jacalina usada para purificar IgA, requer D-galactose na eluição da imunoglobulina da coluna de afinidade, um carboidrato de alto custo, impraticável em larga escala [25]. A purificação de imunoglobulinas é muito importante para o estudo destas proteínas que representa uma classe de agentes terapêuticos inovadores para o tratamento de um vasto ramo de doenças [22]. Neste estudo IgA foi purificada de diferentes secreções humanas em colunas de Cramoll 1,4-Sepharose utilizando glicose como eluente, carboidrato de custo muito baixo.

Agradecimentos

Ao conselho Nacional para o desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e ao Departamento de Microbiologia, Laboratório Central Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN), Secretaria de Saúde, cidade do Recife, Estado de Pernambuco (Brasil) por ceder gentilmente o colostro humano.

4. Referências

- [1] Bakalova R, Ohba, H. Purification of normal lymphocytes from leukemic T -cells by lectin adsorbents – correlation with lectin-cell binding. *Cancer Lett* 2003; 192: 59- 65.
- [2] Franco-Fraguas L, Plá A, Ferreira F, Massaldi H, Suárez N, Batista-Vieira, F. Preparative purification of soybean agglutini by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *J Chromatogr B* 2003; 790: 365-372.
- [3] Gotschalk I, Gustavsson P-E, Ersson B, Lundahl P. Improved lectin-mediated immobilization of human red blood cells in superporous agarose beads. *J Chromatogr B* 2003; 784: 203-208.
- [4] Guo W, Ruckenstein E. Separation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography. *J Membr Sci* 2003; 211: 101-111.
- [5] Wang Y, Zhao, MHY, Zhang YK, Li XM, Wang HY, (2004) Binding capacity and pathophysiological effects of IgA₁ from patients with IgA nephropathy on human glomerular mesangial cells. *Clin Exp Immunol*. 136 (1), 168- 175.
- [6] Zaha MM. Purificação de IgA secretora (IgAS) de colostro humano e padronização de imunodifusão radial para a obtenção de valores “críticos” mínimos de IgAS na saliva de crianças brasileiras em diversos grupo etários. *Rev Bras Anál Clin* 1986; 18: 67.
- [7] Loomes LM., Stewart WW, Mazengera RL, Senior BW, Kerr MA. Purification and characterization of human immunoglobulin IgA1 and IgA2 isotypes from serum. *Journal of Immunological Methods* 1991; 141: 209.

- [8] Scavini LM, Alonso A, Rodriguez S. Immunochemical properties of secretory IgA of human colostrum. *Allergol Immunopathol* 1980; 8: 15.
- [9] Shearer MH, Corbitt SD, Stanley JR, White GL, Chodosh J, Chanh TC, Kennedy RC. Purification and characterization of secretory IgA from baboon colostrum. *J. Immunology Methods* 1997; 204: 67.
- [10] Roque-Barreira MC, Campos-Neto A. Jacalin: An IgA-binding lectin. *Journal of Immunology* 1985; 134: 1740.
- [11] Morton HC, Atkin JD, Owens RJ, Woof JM. Purification and characterization of chimeric human IgA1 and IgA2 expressed in COS and chinese hamster ovary cells. *Journal of Immunology* 1993; 151: 4743.
- [12] Davin JC, Senterre J, Mahieu PR. The high lectin-binding capacity of human secretory IgA protects nonspecifically mucosae against environmental antigens. *Biology of the Neonate* 1991; 59: 121.
- [13] Favre LI, Spertini F, Corthésy, b. Simplified procedure to recover recombinant antigenized secretory IgA to be used as a vaccine vector. *J. Chromatogr B* 2003; 786: 143-151.
- [14] Bastian A, Kratzin H, Eckart K, Hilschmann N. Intra and inter chain disulfide bridges of the human J chain in secretory immunoglobulin A. *Biol. Chem. Hop. Seyl.* 1992; 373: 1255.
- [15] Dul JL, Aviel S, Melnick J, Argon Y. Ig light chains are secreted predominantly as monomers. *J. Immun* 1996; 2969.
- [16] Correia MTS, Coelho LCBB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1995; 55: 261.

- [17] Maciel EVM, Araújo-Filho VS, Nakazawa M, Gomes YM, Coelho LCBB, Correia MTS. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 2004; *in press*.
- [18] Lima VLM, Correia MTS, CechineL YMN, Sampaio CAM, Owen JS, Coelho LCBB. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers* 1997; 33: 27.
- [19] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; 193: 265.
- [20] Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; 2: 235.
- [21] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680.
- [22] Huse K, Hans-Joachim B, Scholz GH. Purification of antibodies by affinity chromatography. *J Biochem Methods* 2002; 51: 217-231.
- [23] Wold AE, Motas C, Svanborg C, Mestecky J. Lectin receptor on IgA isotypes. *Scandinavian Journal of Immunology* 1994; 39: 195.
- [24] Fassina G, Ruvo M, Palombo G, Verdoliva A, Marino M. Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2001; 49: 481-490.
- [25] Koshland, M.E. Structure and function of the J chain. *Advances in immunology*, 1975; 20: 41

Abreviaturas: Cramoll 1,4-Sepharose, Lectina Cramoll 1,4 imobilizada em Sepharose CL 4 B; PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) tampão salina fosfatada; IgAS, Imunoglobulina A secretória; SDS-PAGE (do inglês, *sodium dodecil sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila; IDRS, imunodifusão radial simples; CS, componente secretor; cadeias H (do inglês *heavy*); e L (do inglês *light*)

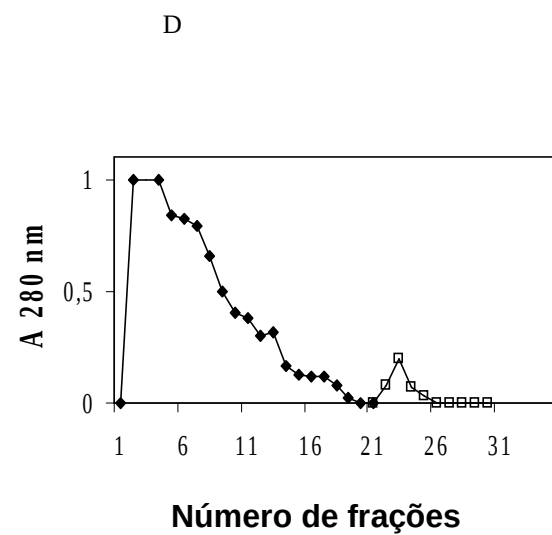
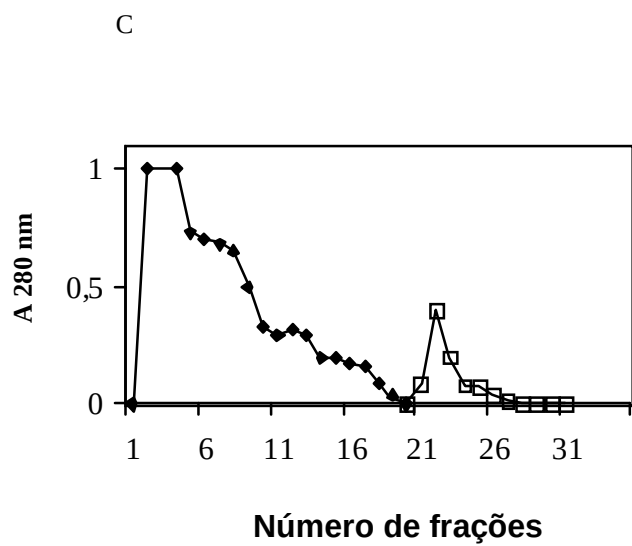
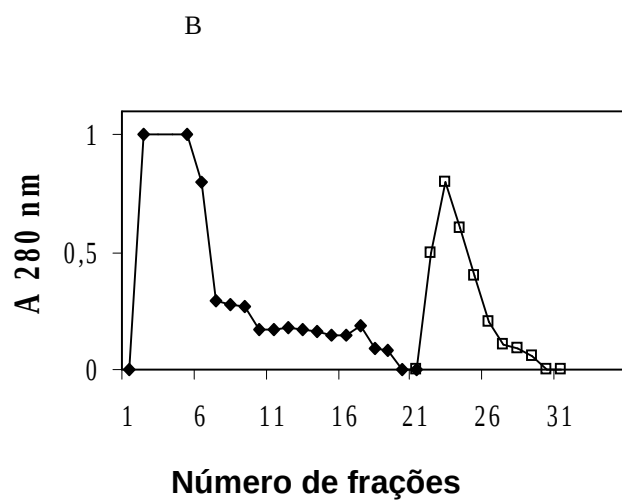
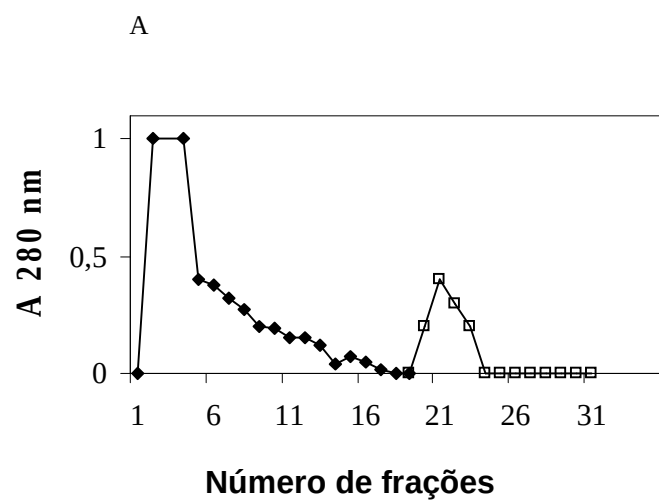


Figura 01

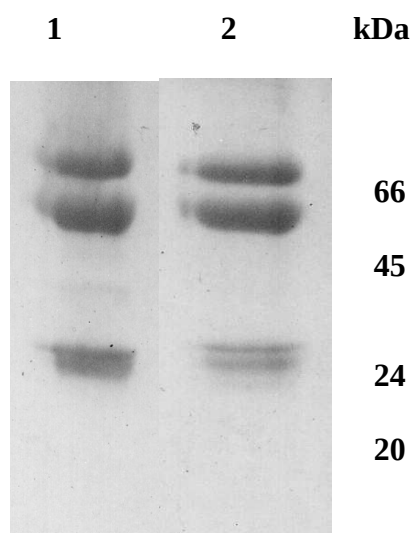


Figura 02

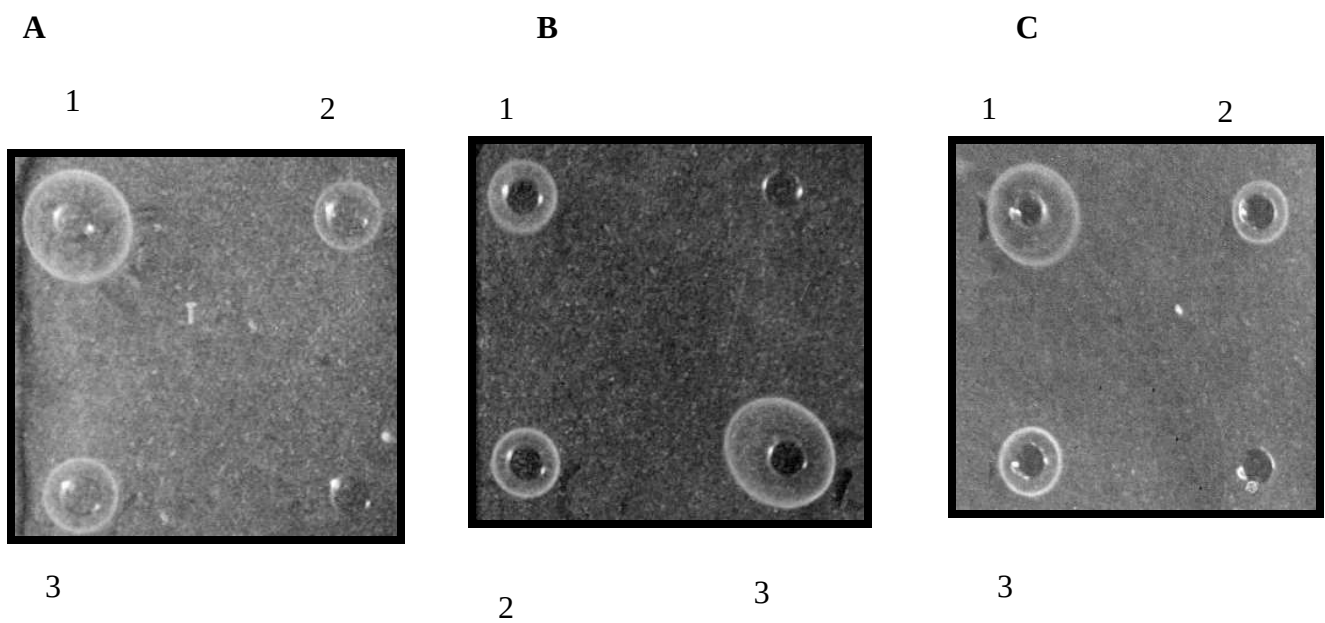


Figura 03

Figura1. Cromatografia de afinidade em Cramoll 1,4-Sepharose: IgAS controle (A), colostro clarificado e livre de caseína (B), preparação da saliva (D) e secreção nasal (C) eluição com PBS (♦) seguido por metil- α -D-manopiranosídeo ou glicose 0,5 M em PBS (□)

Figura 2. SDS-PAGE de IgAS purificada em Cramoll 1,4-Sepharose. Colostro clarificado e livre de caseína, eluído da coluna Cramoll 1,4-Sepharose com metil- α -D-manopiranosídeo (1) ou glicose 0,5 M em PBS (2).

Figura 3. SRID de: (A) colostro clarificado e livre de caseína (1), fração da cromatografia do colostro eluído com D-glicose (2) e fração não adsorvida da cromatografia do colostro (3); (B) fração não adsorvida da cromatografia do colostro (1), Fração da cromatografia do colostro eluída com metil- α -D-manopiranosídeo (2), IgA do soro humano (3); (C) IgAS controle (1), fração da cromatografia da saliva (2) e secreção nasal (3) eluída com D-glicose.

**Purification of Secretory Immunoglobulin A with *Cratylia mollis*
Lectin Immobilized on Sepharose CL-4B**

Segue o trabalho do capítulo 2, em inglês, de acordo com as normas correspondentes ao *Bioresource Technology*, periódico ao qual o mesmo será submetido.

Purification of Secretory Immunoglobulin A with *Cratylia mollis* Lectin Immobilized on Sepharose CL-4B

Edilson G. Santana, Luana C. B. B. Coelho, Correia, M. T. Santos.*

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas (CCB), Departamento de Bioquímica, Rua Prof. Nelson Chaves S/N, 50670-901, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil.

Abstract

Secretory immunoglobulin A (IgAS) from human colostrum, nasal secretion and saliva were purified in a single step by affinity chromatography on a lectin preparation containing *Cratylia mollis* (Cramoll) isoforms, Cramoll 1,4, immobilized in CNBr-activated Sepharose CL-4B (Cramoll 1,4-Sepharose). Colostrum supernatant, obtained by centrifugation, was adjusted to pH 4.6 to remove casein; nasal secretion and saliva were diluted in phosphate buffered saline and also clarified by centrifugation; saliva was ammonium sulphate fractionated. Partially purified human IgAS from the distinct sources were applied to Cramoll 1,4-Sepharose columns. Carbohydrate eluted peaks and control purified human IgAS showed three main bands on SDS-PAGE: heavy (H) and light (L) chains, as well as a secretory component (SC). Control IgA, unbound and biospecifically eluted materials from Cramoll 1,4-Sepharose column, colostrum, nasal secretion and saliva showed precipitate rings when submitted to single radial immunodiffusion (SRID) against anti-human IgA from human serum. *C. mollis* lectin immobilized in Sepharose CL-4B effectively retained immunologically active dimeric IgAS and can be an alternative matrix to obtain this immunoglobulin.

Key words: *Immunoglobulin purification; human secretions; IgAS; lectin; Cratylia mollis.*

*Correspondence to: Correia, M. T. S or Luana C. B. B. Coelho, Phone/Fax: (+55-81) 2126-8576. E-mail address: mcorreia@ufpe.br

1. Introdução

Lectin, are carbohydrate - binding proteins of nonimmune origin which have readily been immobilized to inert supports. Commercial lectin affinity matrices are widely used in the purification of glycoproteins [1, 2, 3, 4] such as immunoglobulins [5].

Immunoglobulin A (IgA) associated with the secretory component (SC) has been designated as secretory IgA (IgAS) by Zaha [6]. Dimeric IgAS has been isolated from deffated and clarified human colostrum by one step or a combination of techniques: ammonium sulphate precipitation, gel filtration and ion-exchange on DEAE-Sephacel chromatography [7], Sephadex G-200 gel filtration and DEAE–Cellulose chromatography [8]. IgAS from clarified baboon colostrum was fractionated by Ultrogel AcA 34 gel filtration chromatography [9]. Also, human serum IgA was purified by affinity chromatograph in jacalin (lectin from jack fruit seeds) immobilized to Sepharose CL-4B [10].

In humans, IgA, constitutes a major serum Ig and the predominant class of Ig found in external secretions from respiratory, gastrointestinal, and genitourinary tracts, as well as saliva, tears, milk, and colostrum [11]. Serum IgA is represented predominantly by monomeric molecules of IgA₁ subclass and is produced mainly in bone marrow; in external secretion most of IgA, produced locally in mucosal tissues, occurs in polymeric configuration with a relatively increased proportion of IgA₂ molecules [12].

As the main antibody at mucosal surfaces, IgA represents the first line of defense against infection diseases caused by microorganisms entering the body through the mucosal membranes [13]. IgAS is composed of two

monomers of IgA, one SC and one J (joining) chain, with a sedimentation coefficient 11S and molecular weight (MW) of 390 KDa. Serum IgA is composed of one 7S monomer [14]; such monomer is composed of two light (L) and two heavy (H) chains [15].

Cratylia mollis lectin (Cramoll) was purified and characterized from a seed extract of the native Brazilian forage *C. mollis* (camaratu bean), which contains four isoforms (Iso): Cramoll 1, 2, 3 and 4. Cramoll 1 and Cramoll 4 were strongly inhibited by methyl- α -D-mannopyranoside [16] and belongs to the glucose/mannose recognition class of lectins. One preparation containing Cramoll 1 and Cramoll 4 (Cramoll 1,4) in milligram quantities (100 g of seeds yields 300 mg of lectin) was obtained by affinity chromatograph in Sephadex G-75 [17]. Cramoll 1,4 was immobilized to Sepharose CL-4B and was used as an affinity matrix to purify the enzyme lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT [18]. The present investigation describes the purification of IgAS from human colostrum, nasal secretion and saliva by affinity cromatography with Cramoll 1,4 immobilized on Sepharose CL-4B (Cramoll 1,4-Sepharose).

2. Materials and methods

2.1 Purification and immobilization of Cramoll 1,4

C. mollis seeds were collected in the State of Pernambuco, Northeastern Brazil. Cramoll 1,4 was obtained from a 10% (w/v) seed extract in 0.15 M NaCl and the proteins were precipitated using a 40-60% ammonium sulphate

fractionation, followed by affinity chromatography on Sephadex G-75 column (70 x 2 cm); the bound protein was eluted with 0.3 M D-glucose [16].

Protein concentration was performed according to Lowry *et al.* [19] and absorbance at 280 nm (A_{280}). Hemagglutination activity (HA) was carried out in microtitre plates as previously described [16].

Cramoll 1,4 (12 mg) was incubated with CNBr-activated Sepharose-4B (GE) for 3 h at room temperature, under gentle mixing; immobilization was carried out by 16 h at 4 °C. Cramoll 1,4 was evaluated through A_{280} of original and final solutions.

2.2 Preparations of human colostrum, nasal secretion and saliva

Colostrum was obtained from the Departamento de Microbiologia, Laboratório Central Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN), Secretaria de Saúde, Recife city, State of Pernambuco (Brazil). Samples were obtained from healthy *post-partum* women.

Colostrum (20 ml) was first clarified by centrifugation for 20 min at 10,000 x g. The supernatant was adjusted at pH 4.6 by addition of glacial acetic acid and casein was precipitated in its isoelectric point. Defatted colostrum without casein (DCC) was then aliquoted in fractions (5 ml) and frozen at 4 °C until used.

Saliva (40 ml) and nasal secretion (1 ml) were collected directly in a becker, in a bath of ice and diluted in 0.15 M phosphate buffer containing 0.15 M NaCl, pH 7.2 (PBS) to 80 ml and 2 ml, respectively. Following, diluted saliva and nasal secretion were clarified by centrifugation (15 min at 9,200 x g). Only saliva supernatant was treated with 60% saturated ammonium sulphate, at room

temperature, for 3 h; the precipitated material was redissolved in 5 ml of PBS, and dialyzed by 3 h against the same buffer. Saliva and nasal secretion preparations (SP and NSP, respectively) were stored at 4 °C until used.

2.3 Cra-Sepharose column chromatography

Human IgAS (Sigma) used as control (500 µg), DC (1 mg), SP (1 mg), or NSP (2 mg) were applied to 1 ml columns (0.68 x 4 cm) containing 0.9 ml Cra-Sepharose. The columns were equilibrated and developed at room temperature with PBS pH 7.2, at a flow rate of 5 ml / h adjusted through a peristaltic pump. Bound proteins were eluted with 0.5 M methyl- α -D-mannopyranoside or D-glucose, after PBS removal of unbound proteins. Fractions (1ml) were collected and protein was determined (A_{280}). The experiments were performed three times, at room temperature.

2.4 Single Radial Immunodiffusion (SRID)

Immunodiffusion was performed according to Mancine [20] using an endoplate test (Sanofi kits) containing a buffered agarose goat anti-human IgA (specific to Fc portion of immunoglobulin) at pH 7.2 with 0.1% NaN₃. IgAS samples (10 µl) were added to the wells in the plates and incubated at 4 °C in a humid atmosphere, by 72 h.

2.5 Polyacrylamide Gel Electrophoresis containing Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE)

IgAS samples were submitted to electrophoresis in SDS-PAGE under reducing conditions according to Laemmli [21]. First, samples were mixed with 30 μ l of reducing buffer and incubated for 5 min at 100 °C. Then, samples were run on 12% SDS-PAGE gel at 200 V for 1 h. Proteins with molecular weight ranges of 14.2 to 66 KDa were used as standards (SIGMA). Proteins were stained with Coomassie Brillhante Blue (Merck) and destained with 10% (v/v) acetic acid.

3. Results and discussion

The choice of appropriate methodology for the antibodies purification, as to every proteins, depends on the yield, purity and the procedure cost; antibodies affinity purification is an interesting method based on ability of these proteins to recognize specifically an affinity adsorbent, which consists of an immobilized ligand, sometimes a spacer, and the matrix to which the ligand is attached [22].

The ability of Cramoll 1,4-Sepharose to adsorb LCAT represented the first use of immobilized Cramoll 1,4 to purify glycoproteins [18]. In the present work Cramoll 1,4-Sepharose yielded 96% of retained proteins in Sepharose CL-4B.

Lectins have already been used to characterize immunoglobulins such as IgM and IgA₁ [22, 10]; interaction between IgA with glucose-mannose or galactose especific lectins coupled to CNBr-activated Sepharose has been described [23]; also the presence of mannose-specific lectin in various infectious antigens, may be responsible for a nonimmune opsonization able to prevent the early step of some

infectious mucosal diseases [24]. IgA₂ reacted more strongly with Con A, a glucose/mannose-specific lectin; IgA₁ reacted more strongly with two galactose-specific lectins, *Ricinus communis* agglutinin I and *Abrus precatorius* agglutinin [24].

Human colostrum IgAS (Figure 1A), as well as DC (Figure 1B), NSP (Figure 1C) and SP (Figure 1D); affinity chromatographed on Cramoll1,4-Sepharose columns, showed peaks after bioespecific elution. The highest peaks of adsorbed protein were obtained from DC ($A_{280} > 0,800$) eluted with methyl α -D-mannopyranoside. Same results were obtained with 0,5 M D-glucose elution.

Isolation of large quantities of immunochemically pure IgAS has been difficult, IgA and IgG in human serum are similar and techniques to separate them on the basis of net-charge or molecular-weight give a low yield. Protocols using affinity chromatography with immobilized lectins have been reported. A lectin isolated from the tropical jackfruit, jacalin, conjugated to agarose has been used to purify IgA. Since IgAS and serum IgA possess a series of O-glycans which are closely located within the hinge region of the molecule [10], mannose and galactose-specific lectins have been used in the purification of IgA [23]. Colostrum, nasal secretion and saliva preparations showed only one peak biospecifically eluted with D-glucose or methyl- α -D-mannopyranoside.

These biospecifically eluted fractions from DC showed three main bands when submitted to electrophoresis in SDS-PAGE; SC, Heavy (H) and light (L) chains migrated above 66, between 66 and 45 and about 24 kDa, respectively (Figure 2), similar results were observed to sample obtained from SP and NSP; the latter polypeptide may represent a complex of one L and J chains. L and J chains are not well resolved in SDS-PAGE [24].

When SRID containing anti-IgA was assayed with IgA from human serum, control IgAS, DC, non-adsorbed fraction from DC and biospecifically fractions from DC eluted with methyl α -D-mannopyranoside or D-glucose, and biospecifically fractions from SP and NSP eluted with D-glucose precipitated rings were observed (Figure 3). The presence of precipitation ring in control IgAS, as well as chromatography fractions from unbound and biospecifically eluted materials showed reactivity that confirmed the presence of the immunoglobulin. The rings obtained for biospecifically eluted samples from DC, SP and NSP are similar showed the performance of Cramoll 1,4-Sepharose in obtain IgA from different secretions.

Purification methods for immunoglobulins have a long history of highly qualified attempts to obtain them in an active and pure manner. Until now, Protein-A-chromatography is the purification method of choice for a large scale of antibodies, but the harsh conditions necessary to elute these sometimes sensitive proteins have led to the development of alternative purification procedures [25]. The discovery of novel ligands for the purification of antibodies have a great application; affinity ligands, such as Protein A or G for IgG purification, or lectins for IgA and IgM purification are already available. However protein A and G are obtained from microorganisms or genetically modified bacteria through complex and expensive procedures [25]; jacalin, used to purify IgA required D-galactose to elute the immunoglobulin from affinity columns, a carbohydrates used to elution are costly and impractical for large-scale operations [25]. Purification of immunoglobulins is of most importance to study these proteins, which represent a class of innovative therapeutic agents for the treatment of a vast array of diseases

[22]. In this study IgA was purified from different human secretions on Cramoll 1,4-Sepharose columns utilizing glucose as eluent; a cheap carbohydrate.

Acknowledgements

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil).

4. References

- [1] Bakalova R, Ohba, H. Purification of normal lymphocytes from leukemic T-cells by lectin adsorbents – correlation with lectin-cell binding. *Cancer Lett* 2003; 192: 59-65.
- [2] Franco-Fraguas L, Plá A, Ferreira F, Massaldi H, Suárez N, Batista-Vieira, F. Preparative purification of soybean agglutini by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *J Chromatogr B* 2003; 790: 365-372.
- [3] Gotschalk I, Gustavsson P-E, Ersson B, Lundahl P. Improved lectin-mediated immobilization of human red blood cells in superporous agarose beads. *J Chromatogr B* 2003; 784: 203-208.
- [4] Guo W, Ruckenstein E. Separation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography. *J Membr Sci* 2003; 211: 101-111.

- [5] Wang Y, Zhao, MHY, Zhang YK, Li XM, Wang HY, (2004) Binding capacity and pathophysiological effects of IgA₁ from patients with IgA nephropathy on human glomerular mesangial cells. Clin Exp Immunol. 136 (1), 168-175.
- [6] Zaha MM. Purificação de IgA secretora (IgAS) de colostro humano e padronização de imunodifusão radial para a obtenção de valores “críticos” mínimos de IgAS na saliva de crianças brasileiras em diversos grupo etários. Rev Bras Anál Clin. 1986; 18: 67.
- [7] Loomes LM., Stewart WW, Mazengera RL, Senior BW, Kerr MA. Purification and characterization of human immunoglobulin IgA1 and IgA2 isotypes from serum. Journal of Immunological Methods 1991; 141: 209.
- [8] Scavini LM, Alonso A, Rodriguez S. Immunochemical properties of secretory IgA of human colostrum. Allergol Immunopathol 1980; 8: 15.
- [9] Shearer MH, Corbitt SD, Stanley JR, White GL, Chodosh J, Chanh TC, Kennedy RC. Purification and characterization of secretory IgA from baboon colostrum. J. Immunology Methods 1997; 204: 67.
- [10] Roque-Barreira MC, Campos-Neto A. Jacalin: An IgA-binding lectin. Journal of Immunology 1985; 134: 1740.

- [11] Morton HC, Atkin JD, Owens RJ, Woof JM. Purification and characterization of chimeric human IgA1 and IgA2 expressed in COS and chinese hamster ovary cells. *Journal of Immunology* 1993; 151: 4743.
- [12] Davin JC, Senterre J, Mahieu PR. The high lectin-binding capacity of human secretory IgA protects nonspecifically mucosae against environmental antigens. *Biology of the Neonate* 1991; 59: 121.
- [13] Favre LI, Spertini F, Corthésy, b. Simplified procedure to recover recombinant antigenized secretory IgA to be used as a vaccine vector. *J. Chromatogr B* 2003; 786: 143-151.
- [14] Bastian A, Kratzin H, Eckart K, Hilschmann N. Intra and inter chain disulfide bridges of the human J chain in secretory immunoglobulin A. *Biol Chem Hop Seyl* 1992; 373: 1255.
- [15] Dul JL, Aviel S, Melnick J, Argon Y. Ig light chains are secreted predominantly as monomers. *J. Immunol* 1996; 296: 2969.
- [16] Correia MTS, Coelho LCBB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (amaranth bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1995; 55: 261.
- [17] Maciel EVM, Araújo-Filho VS, Nakazawa M, Gomes YM, Coelho LCBB, Correia MTS. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 2004; *in press*.

- [18] Lima VLM, Correia MTS, CechineL YMN, Sampaio CAM, Owen JS, Coelho LCBB. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin cholesterol acyltransferase. Carbohydrate Polymers 1997; 33: 27.
- [19] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 1951; 193: 265.
- [20] Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 1965; 2: 235.
- [21] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680.
- [22] Huse K, Hans-Joachim B, Scholz GH. Purification of antibodies by affinity chromatography. J Biochem Methods 2002; 51: 217-231.
- [23] Wold AE, Motas C, Svanborg C, Mestecky J. Lectin receptor on IgA isotypes. Scandinavian Journal of Immunology 1994; 39: 195.
- [24] Fassina G, Ruvo M, Palombo G, Verdoliva A, Marino M. Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 2001; 49: 481-490.
- [25] Koshland, M.E. Structure and function of the J chain. Advances in immunology, 1975; 20: 41

Abbreviation: Cramoll 1,4-Sepharose, Cramoll 1,4 lectin immobilized in Sepharose 4 B; PBS, phosphate buffered saline; IgAS, secretory immunoglobulin A; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; SRID, single Radial immunodiffusion; SC, secretory component; H, heavy chain; L, light chain

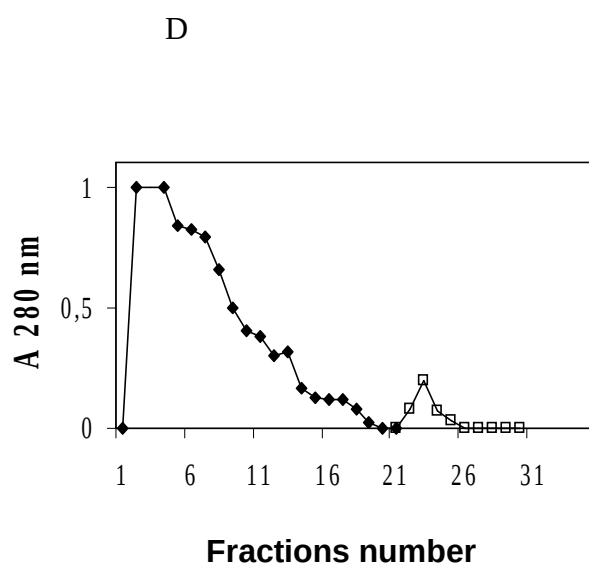
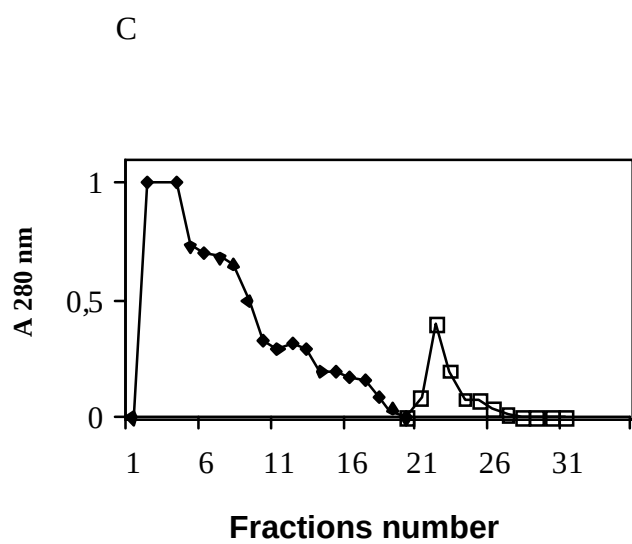
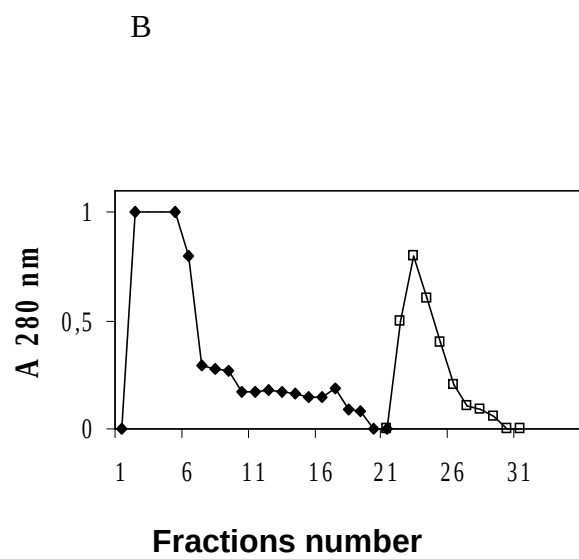
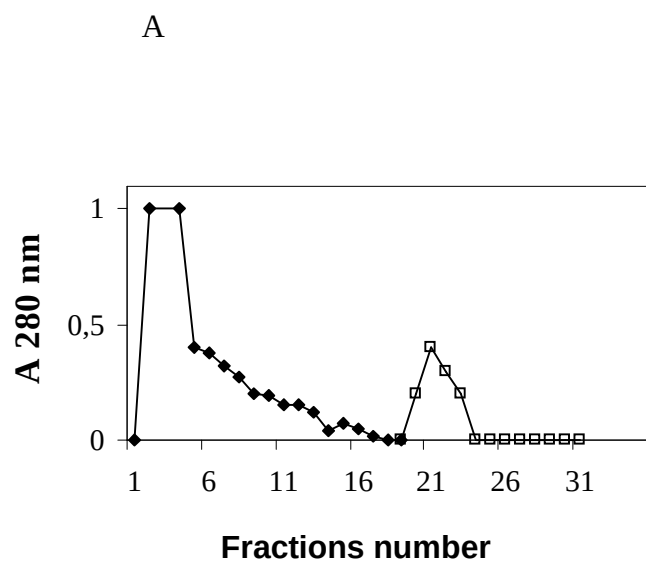


Figure 01

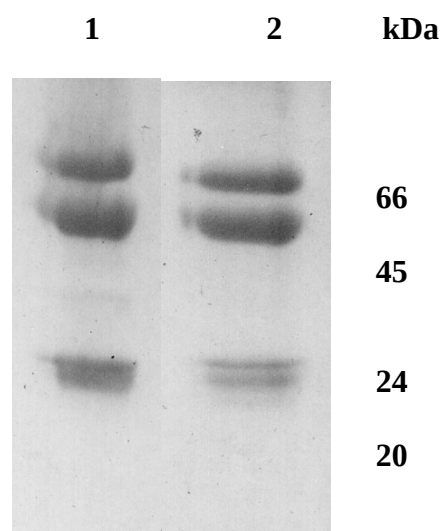


Figure 02

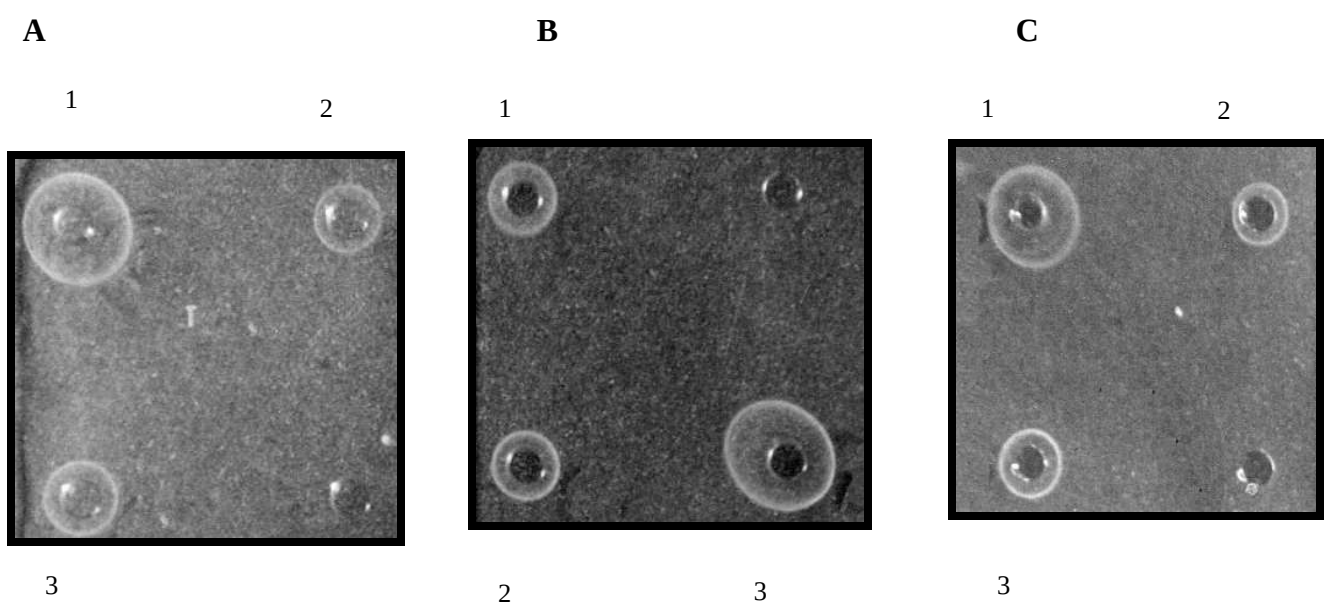


Figure 03

Figure 1. Cramoll 1,4-Sepharose affinity chromatography of: control IgAS (A) colostrum without casein (B) saliva preparation (C) and nasal secretion (D) eluted with PBS (◆) followed by 0.5 M methyl- α -D-mannopyranoside in PBS (□).

Figure 2. SDS-PAGE of purified IgAS on Cramoll 1,4-Sepharose. Colostrum without casein eluted from Cramoll 1,4-Sepharose columns with casein eluted from Cramoll 1,4-Sepharose columns with 0.5 M methyl- α -D-mannopyranoside in PBS (1) or 0.5 M D-glucose in PBS (2).

Figure 3. SRID of: (A) clarified colostrum without casein (1) chromatography fractions from colostrum eluted with D-glucose (2) and non-adsorbed chromatography fractions from colostrum (3); (B) non-adsorbed chromatography fractions from colostrum (1), chromatography fraction from colostrum eluted with methyl- α -D-mannopyranoside (2), IgAS from human serum (3); (C) Control IgAS (1), chromatography fraction from saliva (2) and nasal secretion (3) eluted with D-glucose.

CAPÍTULO 3

PURIFICAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS USANDO LECTINAS DE SEMENTES DE *Cratylia mollis* E DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra* IMOBILIZADAS EM DACRON FERROMAGNETIZADO

PURIFICAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS USANDO LECTINAS DE SEMENTES DE *Cratylia mollis* E DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra* IMOBILIZADAS EM DACRON FERROMAGNETIZADO

E.G. Santana ^a, I.P.G. Amaral ^{a,b}, M. B. R. Silva ^a, R.S. Bezerra ^{a,b}, Jr. L. B. Carvalho ^{a,b}, M.T.S. Correia ^a, L.C.B.B. Coelho ^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, CCB, UFPE, Brasil ^bLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Av., Moraes Rego, Recife-PE 50670-420, Brasil

Abstract

Lectins are proteins or glycoproteins that interact selectively and reversibly with carbohydrates and glycoconjugates. This special class of proteins immobilized to inert supports have been useful tools to purify mainly glycoproteins. Previously, a *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL), galactose specific, and a seed lectin preparation have been obtained and characterized from *Cratylia mollis* (Cramoll), containing two isoforms: Cramoll 1 and Cramoll 4 (Cramoll 1,4), glucose/mannose specific. In this work, BmoLL and Cramoll 1,4 immobilized to ferromagnetic Dacron were evaluated as affinity matrices to purify human colostrum proteins. Dacron was converted to ferromagnetic Dacron hydrazide (FDH). Dacron hydrazide (DH) was magnetized by reacting ferrous (Fe^{+2}) and ferric (Fe^{+3}) ions. Ferromagnetic Dacron hydrazide (FDH) was activated with glutaraldehyde (FDHG). FDHG was incubated with each lectins. FDHG was able to immobilize BmoLL (FDHG-BmoLL) and Cramoll 1,4 (FDHG-Cramoll 1,4). Human colostrum supernatant was obtained by centrifugation for 20 min and adjusted to pH 4.6 with glacial acetic acid to remove casein, followed by incubation with FHDG-BmoLL and FHDG-Cramoll 1,4. The materials were washed with Tris-HCl until A_{280} was less than 0.03. Bound proteins were eluted from FDHG-BmoLL and FDHG-Cramoll 1,4 with 0.5 M of galactose or glucose, respectively, and were submitted to SDS-PAGE. Samples showed heavy, light chains and secretory component. In conclusion, Cramoll 1,4 and BmoLL were able to bind FDHG. Proteins similar to IgAS from human colostrum were obtained by specific elution from the affinity matrices FDHG-Cramoll 1,4 and FDHG-BmoLL.

Key words: ferromagnetic dacron; lectin; *Bauhinia monandra*; *Cratylia mollis*; protein purification; human colostrum.

Resumo

Lectinas são proteínas que interagem seletiva e reversivelmente com carboidratos e glicoconjugados. Esta classe de proteínas imobilizada em suporte inerte tem sido um instrumento útil para purificar principalmente glycoproteínas. Previamente, foram obtidas e caracterizadas uma lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL), específica para galactose, e uma preparação de lectinas de sementes de *Cratylia mollis* contendo duas isoformas: Cramoll 1 e Cramoll 4 (Cramoll 1,4), glicose/manose específica. Neste trabalho, BmoLL e Cramoll 1,4 imobilizadas em Dacron ferromagnetizado foram avaliadas como matrizes de afinidade para purificar proteínas do colostro humano. Dacron foi convertido a Dacron hidrazida ferromagnetizado (DHF). O Dacron na forma hidrazida (DH), foi magnetizado através de reações com íons ferroso (Fe^{+2}) e férrico (Fe^{+3}). DHF foi ativado com glutaraldeído (DHFG). DHFG foi incubado com cada uma das lectinas. DHFG imobilizou a BmoLL (DHFG-BmoLL) e a Cramoll 1,4 (DHFG-Cramoll 1,4). O sobrenadante do colostro humano foi obtido por centrifugação e o pH foi ajustado com ácido acético glacial para remover a caseína e em seguida foi incubado com DHFG-BmoLL and DHFG-Cramoll 1,4. As proteínas adsorvidas aos suportes DHFG-BmoLL e DHFG-Cramoll 1,4 foram eluídas com galactose e glicose, respectivamente, sendo submetidas a SDS-PAGE. As amostras apresentaram cadeias pesadas, leves e componente secretor. Em conclusão Cramoll 1,4 e BmoLL foram capazes de ligar ao DHF. Proteínas similares a IgAS do colostro humano, foram obtidas pela eluição específica das matrizes de afinidade DHFG-Cramoll 1,4 and DHFG-BmoLL.

Palavras chave: Dacron ferromagnético; Lectina; *Bauhinia monandra* *Cratylia mollis*; purificação de glicoproteínas do colostro humano,

1. Introdução

Lectinas são proteínas ligantes a carboidratos, de origem não imune, que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados encontrando-se distribuídas tanto em vegetais como em animal (Banerjee et al., 2004; Ho et al., 2004). Essas proteínas podem ser purificadas por afinidade (Kajiva et al., 2003).

Devido a sua inerente especificidade biosseletiva para carboidratos, lectinas puras podem ser usadas como instrumentos valiosos nas pesquisas médica e bioquímica, na proliferação de linfócitos (Kilpatrick, 1999), na marcação de células transformadas (Okazaki et al., 2004) e como marcadores fluorescentes (Konska et al., 2003). Imobilizadas em suportes inertes têm sido usadas como matrizes de afinidade para purificação de glicoconjugados (Helmholz et al., 2003), como imunoglobulinas (Wang et al., 2004) e enzimas (Lima et al., 1997). Interações entre IgA e lectinas específicas para galactose (Huse et al., 2002) ou glicose/manose (Koppel & Beka, 2001) têm sido avaliadas. As condições brandas utilizadas na eluição da proteína de interesse (Satish & Suroliya, 2001) são geralmente feitas com solução de monossacarídeos (Coelho & Silva, 2000).

É comum o uso de agarose ativada e seus derivados como matrizes para imobilizações covalentes; entretanto, o interesse no uso de matrizes alternativas para imobilizar proteínas tem sido crescente (Fassina et al., 2001). Desta forma, o Dacron (polietilenotereftalato, PET) um poliéster de condensação sintetizado a partir do etilenoglicol e ácido tereftálico foi ferromagnetizado e usado como suporte sólido para a imobilização de albumina de soro humano em imunoensaios (Carneiro Leão et al., 1994), entre outras proteínas (Carneiro Leão et al., 1991). Esta mesma técnica também foi usada para imobilização covalente de enzimas (Carvalho et al., 1989). Dacron ferromagnetizado, ativado com azida e com glutaraldeído foi usado como fase-sólida em ensaios de quimiluminescência (Pinheiro et al., 1999).

Lectina de sementes de *Cratylia mollis* Mart. (Cramoll), glicose/manose específica (Correia & Coelho, 1995; De Souza et al 2003) e de folhas de *Bauhinia monandra*

(BmoLL), galactose específica (Coelho & Silva, 2000) têm sido purificadas por fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade. Uma preparação contendo as isoformas 1 e 4 (Cramoll 1,4) interagiu com células mamárias humanas transformadas e normais de formas diferenciadas (Beltrão et al., 1998) e apresentou atividade mitogênica em linfócitos humanos (Maciel et al., 2004) podendo ser usada em uma primeira etapa na purificação da enzima lecitina colesterol acil transferase, LCAT (Lima et al., 1997). BmoLL e Cramoll 1,4 foram purificadas em quantidades de miligramas.

Neste trabalho, Cramoll 1,4 e BmoLL imobilizadas em Dacron ferromagnetizado foram utilizadas como matrizes de afinidade para isolar glicoproteínas do colostro humano.

2 Métodos

2.1 Dacron-hidrazida ferromagnetizado (DHF)

Dacron foi convertido a Dacron hidrazida ferromagnetizado (DHF) de acordo com Carneiro Leão et al (1991). Fragmentos de Dacron foram incubados sob agitação suave, por 72 h a 40°C com hidrato de hidrazina, na presença de metanol. Na ocasião da magnetização o pH foi ajustado para 8,3. Neste experimento foi modificado o tempo de incubação do Dacron-hidrazida com $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ / $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, que foi realizado durante 30 min (Pinheiro *et al.*, 1999) a 100°C. Depois de seco, o material passou por um processo de tamisação.

2.2 Obtenção do Dacron - hidrazida ferromagnetizado ativado com glutaraldeído (DHFG)

DHF (100 mg; tamanho < 250 µm) foi incubado com 2 ml de glutaraldeído 12,5% (v/v), por 2 h, em temperatura ambiente, sob agitação suave. Em seguida o suporte foi dez vezes lavado com 2 ml de Tris-HCl, pH 7,0. Durante as lavagens, os sobrenadantes foram descartados com auxílio de uma placa magnética (6000 Oe).

2.3 Imobilização de Cramoll 1,4 e BmoLL em DHFG

Cada lectina (2 mg) foi incubada com uma alíquota (50 mg) de DHFG por 16 h a 4°C, sendo em seguida submetidas a lavagens como acima já descrito. Os sobrenadantes obtidos com o auxílio de uma placa magnética foram submetidos à dosagem protéica usando o método de Lowry et al., (1951). Cramoll 1,4 e BmoLL imobilizadas em DHFG constituíram os suportes DHFG-Cramoll 1,4 e DHFG-BmoLL, sendo incubados com glicina 0,1 M, durante 2 h. Em seguida foram lavados 10 vezes com 2 ml de Tris-HCl, pH 7,0. O material ficou armazenado a 4°C, em Tris-HCl até o uso.

2.4 Obtenção do colostro humano clarificado e descaseinado

Colostro de mulheres foi gentilmente cedido pelo Departamento de Microbiologia do Laboratório Central Doutor Milton Bezerra Sobral (LACEN) da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco.

Colostro clarificado livre de caseína (CCLC) foi obtido por centrifugação (20 min, 10,000 rpm) e precipitação com ácido acético glacial (Zaha, 1986), com modificações no tempo e velocidade de centrifugação. Para remover a caseína em seu ponto isoelétrico, o pH do sobrenadante foi ajustado à 4,6 com ácido acético glacial e centrifugado (20 min, 10,000 rpm).

2.5 Isolamento das glicoproteínas do colostro clarificado e livre de caseína

CCLC (1 mg) foi incubado (4 h a 4°C) com DHFG-Cramoll 1,4- ou DHFG-BmoLL, sob leve agitação. Os materiais foram lavados 10 vezes com Tris-HCl para remover as proteínas não imobilizadas. As frações (1 ml) foram eluídas com glicose ou galactose 0,5 M em Tris-HCl e as proteínas foram determinadas (A_{280}).

2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e redutoras

As amostras eluídas de DHFG-Cramoll 1,4 e DHFG-BmoLL foram submetidas a SDS-PAGE segundo a técnica de Laemmli (1970). As amostras (80 µg) foram misturadas com 30 µl do tampão redutor e foram incubadas por 5 min a 100° C, migrando concomitantemente com um padrão de peso molecular conhecido (SIGMA) em gel a 10% a 200 volts por 1 h. As proteínas foram coradas com azul de Coomassie (Merck) e descoradas com ácido acético a 10% (v/v).

3. Resultados e discussão

Lectinas são geralmente imobilizadas em Sepharose- CL 4B ativada com brometo de cianogênio (Huse et al., 2002), entretanto, suportes menos dispendiosos têm sido avaliados (Fassina et al., 2001). Enzimas podem ser ligadas covalentemente à forma hidrazida do Dacron ferromagnetizado previamente ativado com glutaraldeído (Carneiro Leão et al., 1991). Este método foi usado para imobilizar as lectinas Cramoll 1,4 e BmoLL para subsequente purificação de glicoproteínas do colostro humano.

O que determina o tamanho dos grânulos do polietilenotereftalato é o tempo de hidrazinólise. O tempo empregado por Carneiro Leão et al. (1991) para a magnetização dos grânulos polietilenotereftalato foi modificado de acordo com Pinheiro et al. (1999) para garantir a obtenção de um material magnetizado totalmente solúvel, evitando assim a

perda de ferro durante os processos de lavagem. A ativação do DHF com glutaraldeído foi proposta para ativar suportes que contêm grupos hidrazidas terminais. O glutaraldeído reagiu com um de seus grupos aldeídicos para formar ligações hidrazonas e o outro grupo aldeídico ficou livre para a imobilização covalente da lectina.

DHFG-BmoLL apresentou uma imobilização de 28 µg de proteínas por miligrama de suporte e DHFG-Cramoll 1,4 teve resultado similar (30 µg). DHFG-Cramoll 1,4 foi mais efetiva em reter proteínas do CCLC (8,2 mg/mg) que DHFG-BmoLL (3,8 mg/mg). Em secreções externas, embora ocorra a IgA₁ a predominância é bem maior da subclasse IgA₂ e os resíduos de aminoácidos da região flexível da IgA₁ que constituem os sítios para oligossacarídeos O-ligados (Carpenter e Proctor, 2000) não ocorrem na IgA₂ que possui na mesma região oligossacarídeos N-ligados (Baenzinger e Kornfeld, 1974). Jacalina, uma lectina galactose específica, já foi usada para isolar IgA₁ de IgA₂ (Gregory et al., 1987). As condições necessárias à eluição de IgA em colunas contendo anti-IgA provocam modificações nos resíduos de carboidratos desta imunoglobulina; assim, para o estudo da glicosilação de IgA a eluição com carboidratos em lectinas imobilizadas torna-se mais eficiente (Huse et al., 2002).

As frações bioespecificamente eluídas de DHFG-Cramoll 1,4 e DHFG-BmoLL (fig. 1) apresentaram apenas um pico. Em SDS-PAGE na presença de β-mercaptoetanol as bandas migraram similarmente às cadeias pesada e leve e componente secretor da IgAS (fig. 2). A cadeia J, de peso molecular entre 23 e 27 kDa, por ter fortes ligações covalentes (Zaha, 1986) não é bem resolvida em SDS-PAGE, parecendo migrar juntamente com a cadeia leve (Koshland, 1975).

O suporte DHF foi capaz de imobilizar via glutaraldeído as lectinas Cramoll 1,4 e BmoLL. DHFG-Cramoll 1,4 e DHFG-BmoLL foram eficientes na purificação de proteínas do CCLC de padrão eletroforético similar a IgAS. Os resultados obtidos indicam que DHFG pode ser usado como suporte para imobilização de lectinas e subsequente purificação de glicoproteínas de interesse biotecnológico do tipo IgAS.

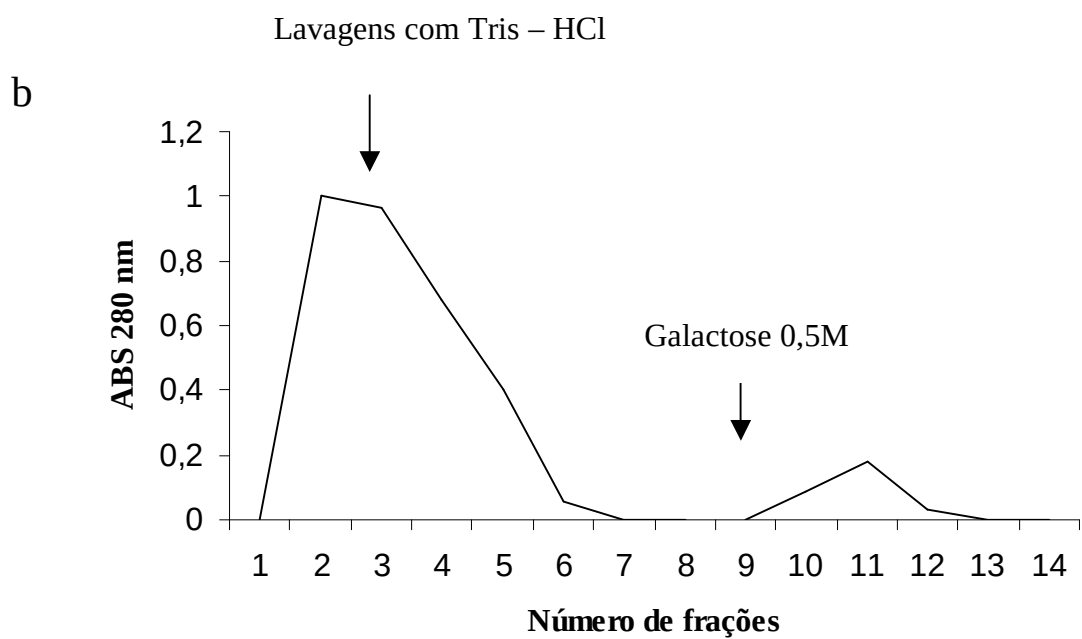
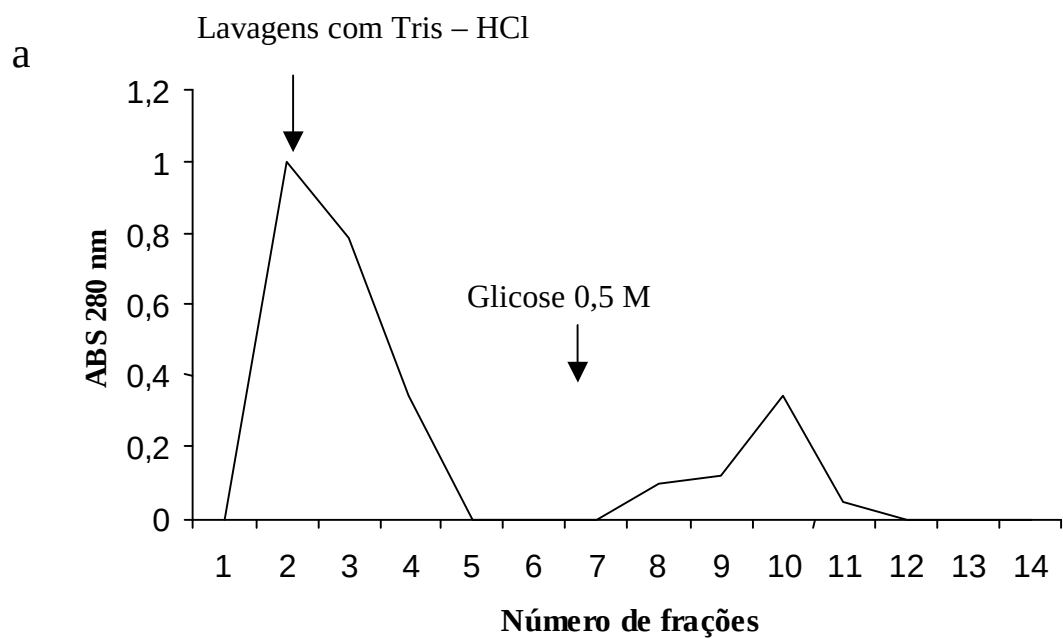


Fig. 1. Padrão de eluição do CCLC por afinidade em DHFG-Cramoll 14 (a) e em DHFG BmoLL (b).

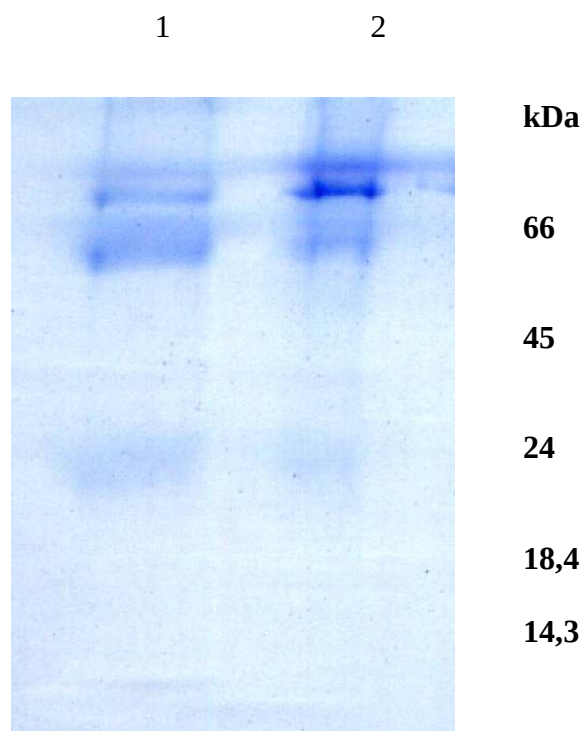


Fig. 2. SDS - PAGE a 10% de proteínas eluídas bioespecificamente de Cramoll 1,4-DHFG (1) de BmoLL-DHFG (2). Amostras contendo 80 μ g de proteínas eluídas com glicose 0,5 M (1) e galactose 0,5 M (2).

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro; ao Departamento de Microbiologia do Laboratório Central Doutor Milton Bezerra Sobral (LACEN) da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, por ceder gentilmente o colostro humano.

Referências

- Baenzinger, J., Kornfeld, S., 1974. Structure the carbohydrate units of IgA₁ immunoglobulin. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7270-7280.
- Beltrão, E.I., Correia, M.T., Figueredo-Silva, J., Coelho, L.C., 1998. Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 74 (3), 125-134.
- Banerjee, S., Chaki, S., Browal, J., Chatterjee., 2004. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular Archives of Biochemistry and biophysics 421, 125-134.
- Carneiro Leão, A.M., Carvalho, Jr. L.B., Malagueno, E., 1994. The use of ferromagnetic Dacron as solid-phase in enzyme immunoassays. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz* 89 (2), 189-193.
- Carneiro Leão, A.M.A., Oliveira, E.A., Carvalho, Jr.L.B., 1991. Immobilization of protein on ferromagnetic Dacron. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 31, 53-58.
- Carpenter, G.H., Proctor, G.B., 2000. Double Electrophoretic separation and lectin analyses of the component chains of secretory immunoglobulin a from human saliva. *Electrophoresis*. 21(8), 1446-1453.
- Carvalho, Jr.L.B., Lima, C.J., Melo, E.H.M., Kennedy, J.F., 1989. Determination of vitamin C by immobilized ascorbate oxidase Process. *Biochemistry* 4, 52-54.
- Coelho, L.C.B.B., Silva, M.B.R., 2000. Simple method to purify milligram quantities of galactose- specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*.11, 295-300.
- Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55, 261-273.
- De Souza, G.A., Oliveira, P.S.L., Trapani, S., Santos, A.C.O., Rosa, J.C., Laure, H.J., Faça, V.M., Correia, M.T.S., Tavaresm, G.A., Oliva, G., Coelho, L.C.B.B., Greene, L.J., 2003. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiology*. 13(12), 961-972.
- Fassina, G., Ruvo, M., Palombo, G., Verdoliva, A., Marino, M., 2001. Novel ligands for the affinity chromatographic purification of antibodies. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49, 481-490.

- Gregory, R.L, Rundegren, J., Arnold, R.R., 1987. Separation of human IgA₁ and IgA₂ using jacalin-agarose chromatography. *Journal of Immunological Methods*. 4, 99(1), 101-106.
- Helmholz, H., Cartellieri, S., He, L., Thiesen, P., Niemeyer, B., 2003. Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. *Journal chromatography A* 1006, 127-135.
- Ho, J.C., Sze, S.C., Shen, W.Z., Liu, W.K., 2004. Mitogenic activity of edible mushroom lectins. *Biochimica Biophysica Acta*. 17, 9-17.
- Huse, K., Böhme, H-J., Scholz, G.H., 2002. Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biochemical Methods*. 51, 217-231.
- Kajiya, A., Koyama, Y., Mita, T., Mega, T., Hase, S., Kawakami, T., Honda, E., Munakata, H., Isemura, M., 2003. Isolation of lectins by affinity chromatography with porcine plasma proteins immobilized on agarose. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67(9), 2051-2054.
- Konska, G., Zamorska, L., Pituch-Noworolska, A., Szmciarz, M., Guillot, J., 2003. Application of fluorescein-labelled lectins with different glycan-binding specificities to the studies of cellular glycoconjugates in human full-term placenta. *Folia Histochem. Cytobiol.* 41(3), 155-160.
- Koppel, R., Solomon, B., 2001. IgM diction via selective recognition by mannose-binding protein. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1(49), 641-647.
- Koshland, M.E., 1975. Structure and function of the J chain. *Advances immunology* 20, 41-46.
- Kilpatrick, D. C., 1999. Mechanisms and Assessment of lectin-mediated mutogenesis. *Molecular Biotechnology* 11, 55-65.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, (5259) 660-667.

- Lima, V.L.M., Correia, M.T.S., Cechinel, Y.M.N., Sampaio, C.A.M., Owen, J.S., Coelho L.C.B.B., 1997. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin cholesterol acyltransferase. Carbohydrate Polymers. 33, 27-32.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L., Randall, R.J., (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265.
- Maciel, E.V.M., Araújo-Filho, V.S., Nakazawa, M., Gomes, Y.M., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., 2004. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. Biologicals 32, 57-60.
- Okazaki, H., Mizuno M., Nasu, J., Makidono, C., Hiraoka, S., Yamamoto, K., Okada, H., Fujita, T., Tsuji, T., Shiratori, Y., 2004. Difference in *Ulex europaeus* agglutinin I-binding activity of decay-accelerating factor detected in the stools of patients with colorectal cancer and ulcerative colitis. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 143(3), 169-174.
- Pinheiro, S.M.B., Carvalho, Jr. L. B., Chaves, M.E.C., 1999. The use of ferromagnetic Dacron as solid-phase in chemiluminescent assays. Biotechnology Techniques 13, 919-922.
- Satish, P.R., Surolia, A., 2001. Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. Journal of Biochemical and Biophysical Methods .49, 625-640.
- Wang, Y., Zhao, M.H.Y., Zhang, Y.K., Li, X.M., Wang, H.Y., 2004. Binding capacity and pathophysiological effects of IgA₁ from patients with IgA nephropathy on human glomerular mesangial cells. Clinical and Experimental Immunology 136 (1), 168-175.
- Zaha, M..M., 1986. Purificação de IgA secretora (IgAS) de colostro humano e padronização de imunodifusão radial para a obtenção de valores “críticos” mínimos de IgAS na saliva de crianças brasileiras em diversos grupos etários. Revista Brasileira de Análises Clínicas 18, 67-86.

CAPÍTULO 4

DETECÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DE CARGAS ATRAVÉS DE VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS NA INTERAÇÃO DA LECTINA DE SEMENTES DE *Cratylia mollis* -CARBOIDRATO

Artigo a ser submetido ao periódico *Biologicals*

Detecção da transferência de cargas através de voltamogramas cíclicos na interação da lectina de sementes de *Cratylia mollis* - carboidrato

Santana, E.G.¹; Souza, S.R.^{2,4}; Souza, J.E.G.⁴; Silva, K.C.F.²; Correia, M.T.S.¹; Coelho, L.C.B.B.¹

¹Universidade Federal de Pernambuco-UFPE-PE. *Departamento de Bioquímica, CCB, Brasil,*

²Faculdade Frassinetti do Recife - FAFIRE-PE; ³Universidade Federal Rural de Pernambuco-

UFRPE-PE; ⁴Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP-PE.

Resumo

Voltamograma cíclico (CV) interessante na medida da atividade de proteínas através da transferência direta de elétrons. Neste trabalho, avaliamos os CV da atividade de interação de uma preparação de lectina da *Cratylia mollis* contendo as isoformas 1 e 4 (Cramoll 1,4) adsorvidas em contas de Nafion e concentrações de glicose. A resposta eletroquímica foi obtida com um sistema convencional de três eletrodos empregando um eletrodo de referência de calomelano saturado, um eletrodo de trabalho de platina e um fio de platina, usado como eletrodo auxiliar. CV foram efetuados com diferentes concentrações de glicose: 100, 200, 300 e 400 mM. Uma curva de calibração foi também efetuada. Pares de picos anódicos – catódicos foram observados próximos a 100 mV. A interação contas Nafion-Cramoll 1,4 carboidrato apresentou estados de oxi-redução bem definidos, em 100 mV, quando interagiu com glicose. Os picos de oxi-redução diminuíram devido o aumento da concentração do carboidrato. O sistema pode ser usado como um sensor para determinar

Palavras chave: Lectina de sementes de *Cratylia mollis*, contas de Nafion, voltamogramas cíclicos concentração de glicose (faixa entre 0 – 300 mM) em solução, a 100 mV.

Abstract

Cyclic voltammograms (CV) are interesting measurements of protein activity through direct electron transfer. The aim of this work was to evaluate CV interaction activity from *Cratylia mollis* seed lectin (Cramoll), containing Cramoll 1 and Cramoll 4 isoforms (Cramoll 1,4) adsorbed on Nafion beads and glucose concentrations. The electrochemical response was obtained with a conventional three-electrode system employing one saturated calomel reference electrode, one working platinum electrode and platinum wire as an auxiliary electrode. CV were performed with different glucose concentrations: 100, 200, 300 and 400 mM. A calibration curve was also performed. Cathodic-anodic peaks pairing near 100 mV were observed. Nafion beads-Cramoll 1,4 carbohydrate interaction revealed states of oxi-reduction well defined, at 100 mV, when interacted with glucose. Peaks of oxi-reduction decreased due to the increase of carbohydrate concentration. The system can be used as a calibration sensor to determine glucose concentration (range of 0-300 mM) in solution, at 100 mV.

Key words: *Cratylia mollis* Seed lectin, Nafion beads,. cyclic voltammograms.

1. INTRODUÇÃO

A caracterização de uma biomolécula pode ser realizada por métodos eletroquímicos, calorimétricos [1], eletromagnéticos [2] e ópticos [3]. Biossensores são sistemas analíticos que incorporam o material biologicamente ativo em contato íntimo com um elemento apropriado de transdução, com o objetivo de detectar seletivamente a concentração ou atividade do produto de interesse [4]. O elemento de transdução traduz em sinal elétrico, o sinal da reação ocorrida entre o analítico e o elemento biológico nele imobilizado [5]. Os transdutores eletroquímicos, classificados em amperométricos, potenciométricos e condutimétricos, têm sido usados para a caracterização de tecidos, microrganismos, enzimas, organelas, dentre outros materiais biológicos [6]. Estudos cinéticos e mecanísticos da interação de ligantes a proteínas podem ser realizados por métodos eletroquímicos [7]. Os sensores amperométricos são confiáveis, de baixo custo e podem fornecer alta sensibilidade (10^{-7} a 10^{-8} mol/L) por análise de espécies eletroativas presentes numa amostra biológica [1]. Atualmente é de grande interesse a avaliação de transferência de elétrons entre eletrodos e proteínas para aplicação em sistemas analíticos [8] e estudos fundamentais [9]. Esta técnica é fundamental para o estudo de cargas superficiais de macromoléculas [10] [11] [12] [8] [13] [9]. Imunossensor para a detecção de anticorpos de *Schistosoma japonicum* foi feito utilizando o Nafion para a imobilização do imuno-reagente [14]. Nafion é um polímero perfluossulfonado, que apresenta íons capazes de induzir interações eletrostáticas intermoleculares com um ligante [7]. Experimentos utilizando análise de dispersão de raios-X têm revelado agrupamento metálico nesses polímeros; as regiões hidrofóbicas do Nafion são compostas por polímeros de fluorcarbonatos e as regiões hidrofílicas pelos citados agrupamentos metálicos [15]. Métodos eletroquímicos já foram utilizados para avaliação da interação proteína-carboidrato [16] [6] [17]. Esta interação constitui o sinal inicial para respostas do tipo atividade mitogênica [18] ou selectinas e interações célula-célula [19].

Cratylia mollis é uma forrageira nativa da Região Semi-Árida do Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil de cujas sementes já foi purificada Cramoll, uma lectina específica para glicose e manose. Esta lectina já foi purificada para detectar ligações diferenciais a células mamárias humanas transformadas e normais [20] bem como atividade mitogênica sobre linfócitos humanos, que envolve sítios de ligação a carboidratos presentes na lectina e receptores celulares [18]. Proteínas adsorvidas sobre polímeros devem tornar disponíveis sítios de ligação que facilitam o ancoramento de ligantes afins. O objetivo deste trabalho foi obter voltamogramas cíclicos utilizando Cramoll 1,4 adsorvida ao Nafion, durante a interação desta lectina com diferentes concentrações de glicose.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação contendo Cramoll 1,4

Cramoll 1,4 foi isolada por extração em NaCl 0,15 M (10% p/v) e purificada por fracionamento com sulfato de amônio (F40–60%), por cromatografia de afinidade em Sephadex G-75, como descrito por [21].

2.2 Adsorção protéica

Para obtenção de uma camada de lectina adsorvida sobre o Nafion® NR50 (Aldrich), o Nafion, foi incubado com 3 ml de solução de Cramoll 1,4 e mantido em repouso a 4 °C durante 6 h. Em seguida, o sobrenadante foi retirado através de lavagens com NaCl 0,15 M (Nafion-Cramoll 1,4).

2.3 Interação lectina – carboidrato

As medidas voltamétricas para avaliação da interação de Nafion-Cramoll 1,4 (1g) com 0, 100, 200, 300 e 400 mM de glicose, em NaCl 0,15 M foram procedidas após repouso por 30 min. Para controle, as medidas foram igualmente efetuadas na ausência de glicose. Os experimentos foram realizados em 5 repetições.

2.4 Sistema eletroquímico

O sistema foi constituído por uma célula eletroquímica contendo um eletrodo de platina (como eletrodo de trabalho), $A = 2 \text{ cm}^2$, um eletrodo de referência de calomelano saturado e um fio de platina, como eletrodo auxiliar, (Figura 1).

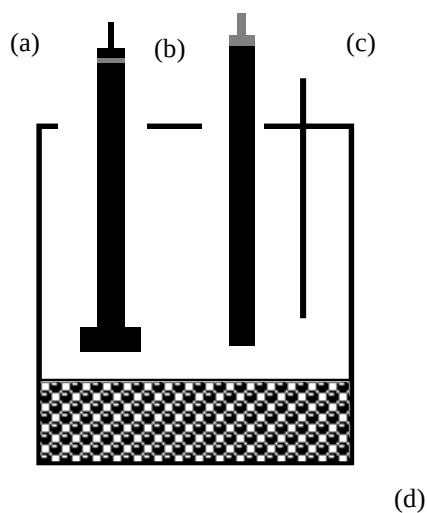


Figura 1: Representação esquemática do sistema eletroquímico. Eletrodo de platina (a); Eletrodo de calomelano saturado (b); Eletrodo auxiliar (c) e de Nafion-Cramoll 1,4 (d).

O eletrodo calomelano saturado foi utilizado por apresentar potencial estável em relação à temperatura (27°C), não apresentando variações devido a cargas presentes no meio. Para obtenção dos parâmetros eletroquímicos o sistema foi acoplado a um potenciostato PSAR modelo 175; contas de Nafion-Cramoll 1,4 dispostas em NaCl 0,15 M e solução contendo glicose foram utilizadas como meio de reação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A detecção da interação de um ligante a uma proteína adsorvida a uma superfície demonstra a capacidade de afinidade desta biomolécula como receptor redox; todo potencial de interação de um ligante é regido pelo estado de oxidação do seu receptor [22] Esta propriedade de interação é uma ferramenta básica para medidas eletroquímicas [23] [6]. A interação de uma lectina com um carboidrato resulta na transferência de elétrons. Nestas interações estão envolvidas ligações hidrofóbicas, forças de Van Der Waals, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas; a presença da molécula de água participa das mudanças conformacionais facilitando esta interação [24] [6]. Esses tipos de ligação também são responsáveis pela estabilidade estrutural e funcional de uma proteína [25].

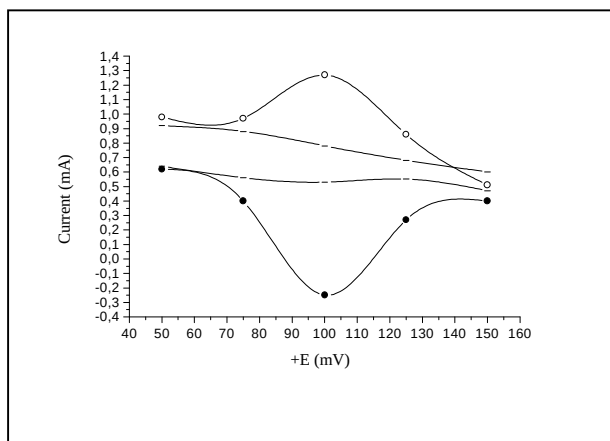
O Nafion tem sido amplamente aplicado à voltametria cíclica de proteínas presentes em fluidos extracelulares [26]. O Nafion pode ser aplicado em sistemas para análises voltamétricas, para avaliar mudanças anódicas e catódicas devido a interação de biomoléculas com os seus ligantes específicos [14]. Os resultados mostram picos de oxi-redução nas diferentes concentrações de glicose. Nafion-Cramoll 1,4 apresenta estados de oxi-redução bem definidos, em 100 mV. O aumento da concentração deste carboidrato seletivo para Cramoll 1,4 provoca variações nos picos de oxi-redução (Fig. 2). Os picos catódicos (de redução) e anódicos (de oxidação) indicam a ocorrência da transferência de elétrons devido às propriedades eletroativas do sítio de ligação da Cramoll 1,4 durante a interação com a glicose. Para o sistema Nafion-Cramoll 1,4, na ausência de glicose não ocorre pico redox. O carboidrato específico funciona como amplificador de sinais induzindo o aparecimento desses picos. CV não foram obtidos para a lectina em solução

interagindo ou não com seu ligante específico, confirmando os resultados similares obtidos por Yoshizumi et al., (1999). Resultados prévios mostram que a determinação do potencial eletroquímico da Cramoll 1,4 em solução de NaCl 0,15 M interagindo com glicose foi de 0,094 V [23]. No mesmo sistema, Cramoll 1,4 imobilizada sobre contas de vidro ativadas com 3-aminotrietoxisilano resultou em um potencial eletroquímico de 100 mV [23] [6]. A expressão de picos de oxi-redução a 100 mV mostrados nos CV indicam que a performance da Cramoll 1,4 não foi alterada pela adsorção sobre o filme de Nafion. Com base nos resultados obtidos pode-se deduzir que na superfície do eletrodo, Cramoll 1,4 e glicose são reagentes; o resultado da interação Cramoll 1,4 -glicose pode ser considerado como produto.

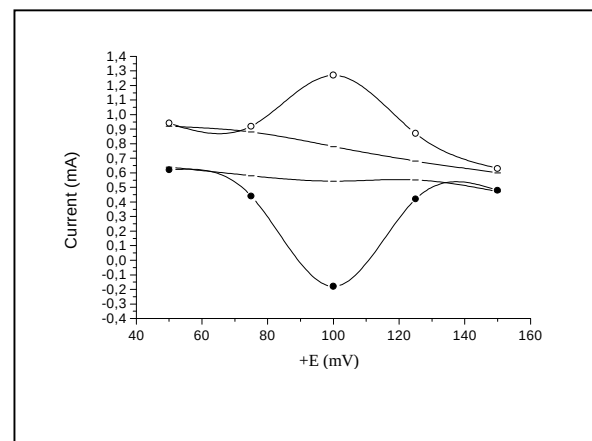
A voltametria cíclica tem sido bastante usada para estudos da transferência de elétrons em sistemas redox envolvendo proteínas [8]. Através de CV foram observadas interações de ligantes à hemoglobina envolvendo transferência de elétrons [10]. Alterações nos picos anódicos e catódicos, apresentados em um voltamograma cíclico para hemoglobina adsorvida sobre eletrodo de carbono quimicamente modificado, mostram a eletroatividade dos quatros grupos heme desta proteína [22]. Os resultados apresentados pelos CV indicam propriedades eletroativas nos sítios de ligação à carboidratos da Cramoll 1,4, que estão envolvidas em muito processos biológicos importantes incluindo sinalização, reconhecimento e catálise [27].

A Figura 3 mostra uma curva amperométrica *versus* concentração de glicose, com linearidade entre 100-300 mM indicando a capacidade do sistema. Respostas amperométricas, potencioestáticas, obtidas da interação de ligantes com proteínas adsorvidas sobre filmes condutores, podem ser afetadas pela concentração do ligantes no meio [9]. O aumento de corrente indica que ocorreu uma diminuição da repulsão eletrostática na superfície do eletrodo [28]. Transferência de elétrons envolvendo polímeros condutores e semicondutores têm sido utilizados para desenvolvimento de sensores químicos e para estudos fundamentais de biomoléculas [29]. Proteínas com sítios eletroativos como grupamento heme [16] [22] [9] e lectinas [23] [6] interagem com moléculas ou macromoléculas envolvendo transferência de elétrons. Geralmente

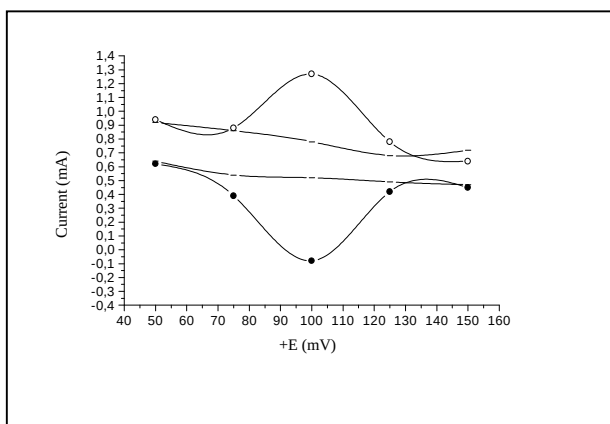
detecções eletroquímicas de glicose em solução são altamente sensíveis quando aplicado um potencial de 0,6 V *versus* eletrodo de calomelano saturado; semelhante potencial permite que substâncias freqüentemente presentes em amostras biológicas, tais como ácido ascórbico e acetaminofenol, sejam eletroquimicamente oxidadas interferindo nas respostas quantitativa da concentração do substrato [13]. Quando um sistema gera potenciais eletroquímicos negativos é necessária a utilização de mediadores químicos, como amplificadores de sinais, trabalhando em 100 e 200 mV, diminuindo a ação de interferentes em meios biológicos [11]. Estudos têm mostrado que há uma necessidade de sistemas eletroquímicos que trabalhem em potenciais positivos, sem adição de mediadores, na construção de dispositivos amperométricos para monitorar a concentração de glicose em diferentes meios [30]. Os CVs representam a faixa de potencial eletroquímico *versus* corrente amperométrica para expressar a dinâmica da interação lectina-carboidrato. No presente trabalho as medidas confirmam que ocorre a mudança do estado de oxidação devido a transferência de elétrons e estabilização protéica pela presença de um ligante específico. O método desenvolvido com a lectina em sistema eletroquímico é simples e sensível, detectando alterações moleculares decorrentes da interação lectina-carboidrato, não requerendo sistemas adicionais de segurança, ou mediadores químicos.



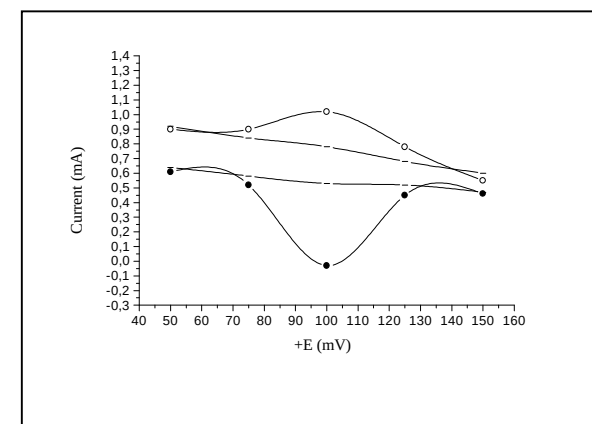
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2: Voltamogramas cíclicos de Cramoll 1,4 adsorvida em Nafion interagindo com glicose, 100 mM (a), 200 mM (b), 300 mM (c) e 400 mM (d). As curvas foram obtidas na ausência (---) e na presença de glicose com picos e anódicos ou de oxidação (O) e catódicos ou de redução (●). Velocidade de varredura de 20 mV/S

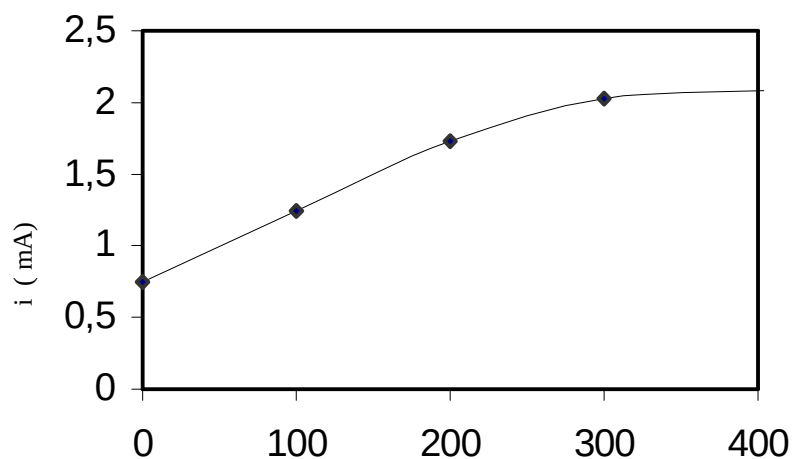


Figura 3: Calibração de Cramoll 1,4 adsorvida em contas de Nafion interagindo com glicose, a concentrações de 0 mM a 400 mM. Potencial do eletrodo: 0,1 V *versus* eletrodo de calomelano saturado. i = corrente elétrica.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] Chaubey A, Malhotra BD. Mediated biosensors. *Biosens Bioelectron* 2002;17: 441-456.
- [2] Skladal P. Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assay and characterization of affinity interactions. *J Braz chem Soc* 2003; 14: 491-502.
- [3] Sethi RS, Transducer aspects of biosensors. *Biosens Bioelectron* 1994; 9: 243-264.
- [4] Sigrist H, Gao H. Biosensors @ CSEM. *Chimia* 1999; 53: 81-86.
- [5] Pereira AC, Santos AS, Kubota LT. Tendências em modificações de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quím Nov* 2002; 25: 1012-1021.
- [6] Souza SR, Dutra RF, Correia MTS, Pessoa MMAJF, Lima-Filho JL, Coelho L C B.B, Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Bioresource Technol* 2003; 88: 255-258.
- [7] Yoshizumi A, Yukari NK, Maehara Y, Ide M, Kitano H. Self-assembled monolayer of sugar-carrying polymer Caín: sugar balls from 2-methacryloyloxyethyl D-glucopyranoside. *Langmuir* 1999; 15: 482-488.
- [8] Marinesco S, Carew TJ. Improved electrochemical detection of biogenic amines in *Aplysia* using base-hydrolyzed cellulose-coated carbon fiber microelectrodes. *J Neurosci Meth* 2002; 117: 87-97.
- [9] Nadzhafova OY, Zaitsev VN, Drozdova MV, Vazc A, Rusling, JF. Heme proteins sequestered in silica sol-gels using surfactants feature direct electron transfer and peroxidase activity. *Electr Commun* 2004; 6: 205-209.
- [10] Cohen Y, Levi S, Rubin S, Willner L. Modified monolayer electrodes for electrochemical and piezoelectric analysis of substrate-receptor interactions: novel immunosensor electrodes. *J Electroanal Chem* 1996; 417: 65-75.
- [11] Kobayashi Y, Anzai J. Preparation and optimization of bienzyme multilayer films using lectin and glyco-enzymes for biosensor applications. *J Electroanal Chem* 2001; 507: 250-255.

- [12] Yao T, Kotegawa K. Simultaneous flow-injection assay of creatinine and creatine in serum by the combined of a 16-way switching valve, some specific enzyme reactors and a highly selective hydrogen peroxide electrode. *Anal Chim Acta* 2002; 462: 283-291.
- [13] Tian F, Zhu G. Bionzymatic amperometric biosensor for glucose based on polypyrrole/ceramic carbon as electrode material. *Anal chim Acta* 2002; 451: 251-258.
- [14] Zhou Y-M, Wu Z-Y, Shen G-L, Yu R-Q. An amperometric Immunosensor based on nafion-modified electrode for the determination of *Schistosoma japonicum* antibody. *Sensor Actuat B Chemical* 2003; 89, 292-298.
- [15] Brookman PJ, Nicholson JW. in: *Developments in Ionic Polymers*. Elsevier Applied Science Publishers 1986; 2: 269-283.
- [16] Marken F, Chistopher AP, Asogan D. Direct cycochrome and electrochemistry at boron-doped diamond electrodes. *Electrochemistry comm* 2002; 4: 62 -66.
- [17] Sugawara K, Shirotori T, Hirabayashi G, Kuramitz H, Tanak S. voltammetric evaluation of lectin-sugar at a mannose/thionine-modified Au electrode. *J Electroanal Cheme* 2004; 568: 7-12.
- [18] Maciel EVM, Araújo-Filho VS, Nakazawa M, Gomes Y.M, Coelho LCBB, Correia M.T.S Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*. 2004; 32: 57-60
- [19] Cassie S, Masterson MF, Polukoshko A, Viskovic MM, Tibbles LA. Ischemia/reperfusion induces the recruitment of leukocytes from whole blood under flow conditions. *Free Radical Bio Med* 2004; 36: 1102-1111.
- [20] Beltrão E I C, Correia M T S, Silva J F, Coelho L C B B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl. Biochem. Biotechnol* 1998; 74: 125-134.

- [21] Correia MTS & Coelho LCBB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (amaruto bean). Appl Biochem Biotech 1995; 55 (3): 261-273.
- [22] Mimica D, Zagai JH. Electroreduction of nitrite by hemin, myoglobin and hemoglobin in surfactant films 2001; 497: 106 - 113.
- [23] Souza SR, Correia MTS, Pessoa MMA, Kennedy JF, Lima-Filho JL, Coelho LCBB. A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (amaruto bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. Carbohydr Polym 2001; 46: 191-193.
- [24] Sharon N, Lis H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. J Agr Food Chem 2002; 50: 6586 - 6591.
- [25] Zou Q, Habermann-Rottinghaus SM, Murphy KP. Urea effects on protein stability hydrogen bonding and the hydrophobic effect. Proteins: structure, function, and genetics 1998; 31: 107-115.
- [26] Stamford JA, Justice JBJr. Voltammetry comes of age. Anal Chem 1996; 68: 359-366.
- [27] Helmholtz H, Cartellieri S, He L, Thiesen P, Niemeyer B, Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. J. Chromatogr A 2003; 1006: 127-135.
- [28] Ito T. Ion-channel-mimetic sensor for trivalent cations based on self-assembled monolayers of thiol-derivatized 4-acyl-5-pyrazolones on gold. J Electroanal Chem 2001; 495: 87- 97.
- [29] Nassar A-EF, Willis WS, Rusling JF. Electron transfer from electrodes to myoglobin: facilitated in surfactant films and blocked by adsorbed biomacromolecules. Anal Chem 1995; 67: 2386-2392.
- [30] Matsumoto T, Furusawa M, Fujiwara H, Matsumoto Y, Ito N. A microplanar amperometric glucose sensor unsusceptible to interference species. Sensor Actuat B Chemical 1998; 49: 68-72.

CONCLUSÕES

IgAS foi purificada de diferentes secreções humanas empregando colunas de Cramoll 1,4 –Sepharose e utilizando glicose e metil- α -D-manopiranosídeo como eluente.

Dacron pode ser usado como suporte para imobilização de Cramoll 1,4 e BmoLL, e as matrizes sintetizadas podem ser subsequenteiramente usadas para purificar glicoproteínas de interesse biotecnológico.

A transferência de elétrons observada nos CV, devido às propriedades eletroativas de Cramoll 1,4 mostram que a interação de contas de Nafion-Cramoll 1,4 com glicose apresentou picos de oxi-redução bem definidos, em 100 mV, que mostraram redução com aumento da concentração do carboidrato.

PERSPECTIVAS

1. Utilizar Cramoll 1,4 imobilizada em Sepharose CL-4B, ou Dacron na forma hidrazida não ferromagnetizado, como colunas de cromatografia de afinidade, para purificação de IgAS, entre outras glicoproteínas de interesses biotecnológico.
2. Determinar por imunodifusão a subclasse da IgAS obtidas das colunas Cramoll 1,4 – Sepharose.
3. Caracterizar por imunodifusão as proteínas similares a IgAS obtidas dos suportes DHFG-Cramoll 1,4 e DHFG-BmoLL .
4. Utilizar Cramoll 1,4, adsorvida em contas de Nafion como sensor para avaliação de glicose ou outros carboidratos reconhecidos pela lectina.z