

## FRACIONAMENTO DE GLICOPROTEÍNAS DO SORO DE PACIENTES COM NEOPLASIAS PROSTÁTICAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE MULTI-LECTINAS (M-LAC)

Anna Gabriella Pinto da Silva Moura<sup>1</sup> ; Luiz Bezerra de Carvalho Junior<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: annagabriellapinto@hotmail.com <sup>2</sup>Docente do Depto de Bioquímica – CCB – UFPE. E-mail: lbcj@hotlink.com.br

**Sumário:** Cromatografia de afinidade com lectinas (LAC) é eficaz para simplificar uma amostra complexa antes da análise proteômica e para alvejar certos tipos de glicoproteínas. As lectinas Concanavalina A, *Phaseolus vulgaris* aglutinina, *Maackia amurensis* foram imobilizadas à nanopartículas magnéticas de terra de diatomáceas revestidas com polianilina (MTD-PANI) para elaboração de uma coluna para cromatografia de afinidade multi-lectinas (M-LAC). O soro de pacientes voluntários foi coletado para testar a eficiência da coluna M-LAC. A amostra foi purificada utilizando a coluna M-LAC. Em seguida o perfil protéico foi analisado através de gel SDS-PAGE. Os resultados obtidos comprovaram a eficiência da imobilização das lectinas ao suporte MTD-PANI, sendo satisfatória a construção da coluna M-LAC.

**Palavras-chave:** cromatografia de afinidade; glicoproteínas; imobilização; lectinas, MTD-PANI;

### INTRODUÇÃO

É estimado que 70% de todas as proteínas das células dos mamíferos são glicosiladas (APWEILER et al., 1999). Deste modo, a glicosilação é uma das mais importantes modificações pós-traducionais (MPTs) das proteínas. Atualmente, sabe-se que alterações na estrutura de carboidratos de glicoproteínas encontradas em vários tumores são consideradas a base do comportamento anormal de células tumorais. A Cromatografia de Afinidade com Lectinas (LAC) é eficaz para simplificar uma amostra complexa antes da análise proteômica e para alvejar certos tipos de glicoproteínas. Esta técnica baseia-se na imobilização de lectinas (SHARON; LIS, 2004), proteínas capazes de reconhecer especificamente e reversivelmente carboidratos, em matrizes como agarose e sílica (LEE et al., 2012; MADERA et al., 2005). Apesar da existência de uma grande variedade de suportes, a utilização de lectinas imobilizadas tem exigido a elaboração de matrizes mais específicas para esta finalidade, as quais resultem em sistemas com alta capacidade de imobilização, elevada atividade e características adequadas ao uso (BONN; MONZO; GUTTMAN, 2007). Neste trabalho foram utilizadas nanopartículas magnéticas de terra de diatomáceas revestidas com polianilina (MTD-PANI). Terra de diatomáceas (TD) possuem diversas propriedades que fazem delas uma matriz de interesse para imobilização de proteínas. (CABRERA et al., 2014).

### MATERIAIS E MÉTODOS

Terra de diatomáceas (2 g) foram incubadas com soluções de FeCl<sub>2</sub> 0,6 M e FeCl<sub>3</sub> 1,1 M em 100 mL de água destilada. O material obtido foi seco a 50 °C e macerado e tamizado. A terra de diatomáceas magnética (mTD) foi tratada com o 3-aminopropiltriétoxissilano

(APTES) 2,5% v/v em acetona por 2 horas a temperatura ambiente. A polimerização oxidativa da anilina foi realizada na presença da terra de diatomácea magnética (10 mg) pelo tratamento com solução de  $\text{KMnO}_4$  a 25 °C por 12 h. Logo após, as partículas foram lavadas com água destilada e incubadas em solução de anilina 0,25 M preparada em HCl 2 M. Após a polimerização, as partículas foram sucessivamente lavadas com água destilada, ácido cítrico 0,1M. Para construção da coluna M-LAC foram utilizadas soluções de quatro lectinas, Concanavalina A, *Phaseolus vulgaris* aglutinina, *Maackia amurensis* na concentração de 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As mesmas foram incubadas, simultaneamente, com 152 mg do suporte, por 12 horas a 8°C, sob suave agitação. O conteúdo protéico foi quantificado pelo método de Lowry (1951). Em seguida, o derivado imobilizado contendo as lectinas foi empacotado em coluna de dessalinização comercial previamente esvaziada. A coleta foi realizada em pacientes voluntários. O soro foi diluído 1:5 e filtrado utilizando filtros milipore com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A amostra (1 mL) foi aplicada na coluna com um fluxo de 0,25mL/min durante 40 min de incubação. As proteínas não ligadas às lectinas foram eluídas com 10mL do tampão de ligação (tris 2,5 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MnCl}_2$  1mM pH 7,2) e, logo após, foi adicionado 12mL do tampão de eluição (tris 0,02 M, NaCl 0,5 mM, metil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo 0,17 M, N-acetilglicosamina 0,17 M, galactose 0,17 M, D-fucose 0,3 M pH 7,2), com o mesmo fluxo e tempo de incubação. Foram coletadas 110 frações (1 mL) e suas absorbâncias quantificadas a 280nm. As frações eluídas da coluna M-LAC foram quantificadas de acordo com o método de Lowry et al. (1951).

## RESULTADOS

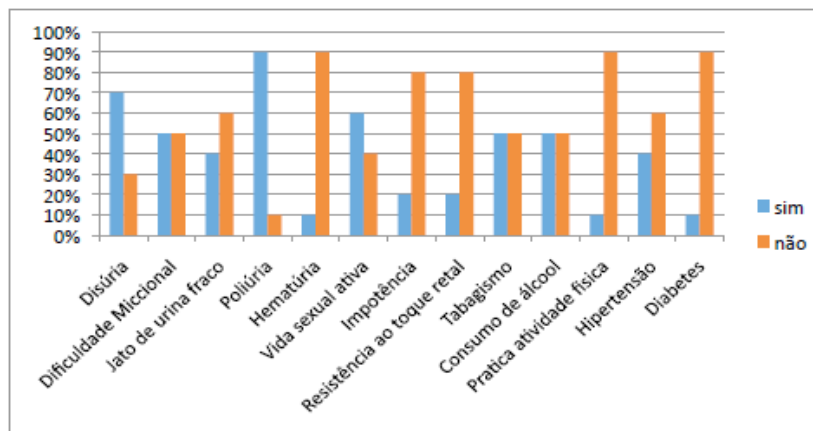


Figura 1. Dados estatísticos de 10 pacientes do Hospital das Clínicas, onde 4 foram diagnosticados com hiperplasia benigna prostática e 6 com adenocarcinoma prostático.

Foram avaliados os principais aspectos clínicos e sociais do paciente.

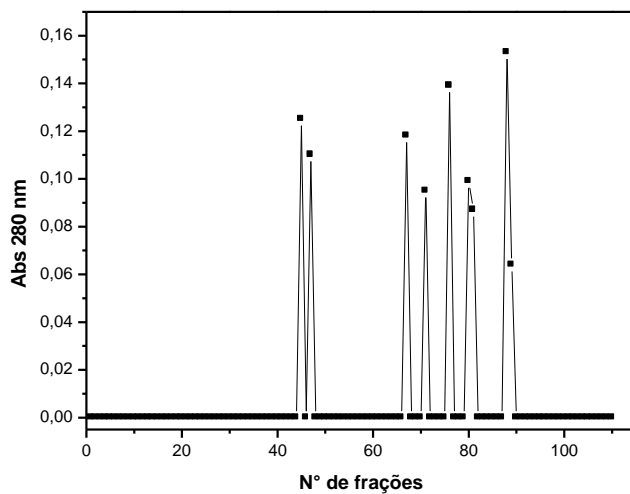


Figura 2. Perfil de eluição do soro de paciente diagnosticado com HPB. A eluição das glicoproteínas foi realizada com tampão contendo os carboidratos metil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo (0,17 M) N-acetilglicosamina (0,17 M) galactose (0,17 M) e ácido siálico (0,3 M), pH 7,2.

## DISCUSSÃO

As coletas de amostras séricas foram realizadas no setor de Urologia do Hospital das Clínicas, sob aprovação do comitê de ética em pesquisa CCS/UFPE nºCAAE 06586612.9.0000.5208. Durante a coleta, o paciente assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e respondeu às perguntas contidas no questionário sócio econômico. As condições para coleta das amostras deveriam ser que os pacientes diagnosticados ainda não estejam em tratamento. A partir deste questionário foram avaliados os principais dados clínicos e sociais dos voluntários (Tabela 1). Avaliamos os dados clínicos, e os sintomas mais comuns foram poliúria, disúria e dificuldade miccional. A maioria dos pacientes apresentou idade acima de 50 anos, baixo grau de instrução e residentes no interior do estado. Eles admitem não apresentar resistência ao exame de toque retal. Noventa por cento não praticam atividade física, e metade consome bebida alcoólica, fumam ou já fumaram ao longo da vida (Figura 1). O valor do PSA varia bastante entre os pacientes com adenocarcinoma prostático e hiperplasia benigna prostática (entre 0,88 e 100 ng/mL). Neste trabalho observou-se que a coluna de Cromatografia de Afinidade Multilectinas (M-LAC), utilizando lectinas imobilizadas em nanopartículas de MTD-PANI, foi eficiente para o fracionamento de glicoproteínas séricas. A figura 2 ilustra o perfil de eluição das amostras. As leituras de absorbâncias a 280 nm comprovam a presença de proteínas eluídas da coluna quando o tampão, contendo os carboidratos específicos (N-acetilgalactosamina, ácido siálico, metil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo, galactose) para cada lectina, foi aplicado à mesma.

## CONCLUSÕES

Com os estudos realizados, pode-se avaliar a eficiência da imobilização das lectinas ao suporte MTD-PANI. A construção da coluna M-LAC foi eficaz para o fracionamento das glicoproteínas do soro. Tais proteínas foram detectadas através de espectrofotometria UV (280 nm), quando as mesmas foram eluídas com o tampão contendo os carboidratos específicos. Estudos complementares fazem-se necessários para confirmar a presença das

glicoproteínas séricas, através de técnicas que permitam identificá-las, tais como lectin blotting e espectrometria de massa.

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro, ao prof. José Luiz, ao meu orientador, prof. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, à minha co-orientadora, Luiza Rayanna Amorim de Lima, pela atenção e dedicação com o projeto, e à Mariana Cabrera e Gabriela Ayres.

#### **REFERÊNCIAS**

- APWEILER, R.; HERMJAKOB, H.; SHARON, N: On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. **Biochim Biophys Acta**, v. 1473, p. 4-8, 1999.
- BELTRÃO E.I.C.; CORREIA M.T.S.; SILVA J.F.; COELHO L.C.B.B. Binding evaluation of Isoform 1 from Cratylid lectin to human mammary tissues. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 74, p. 125-134, 1998.
- BONN, G. K.; MONZO, A.; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trends in Analytical Chemistry. Elsevier Ltd.** v. 26, n. 5, p. 423 - 432, 2007.
- DWEK, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. **Chem Rev**, v. 96, p. 683-720, 1996