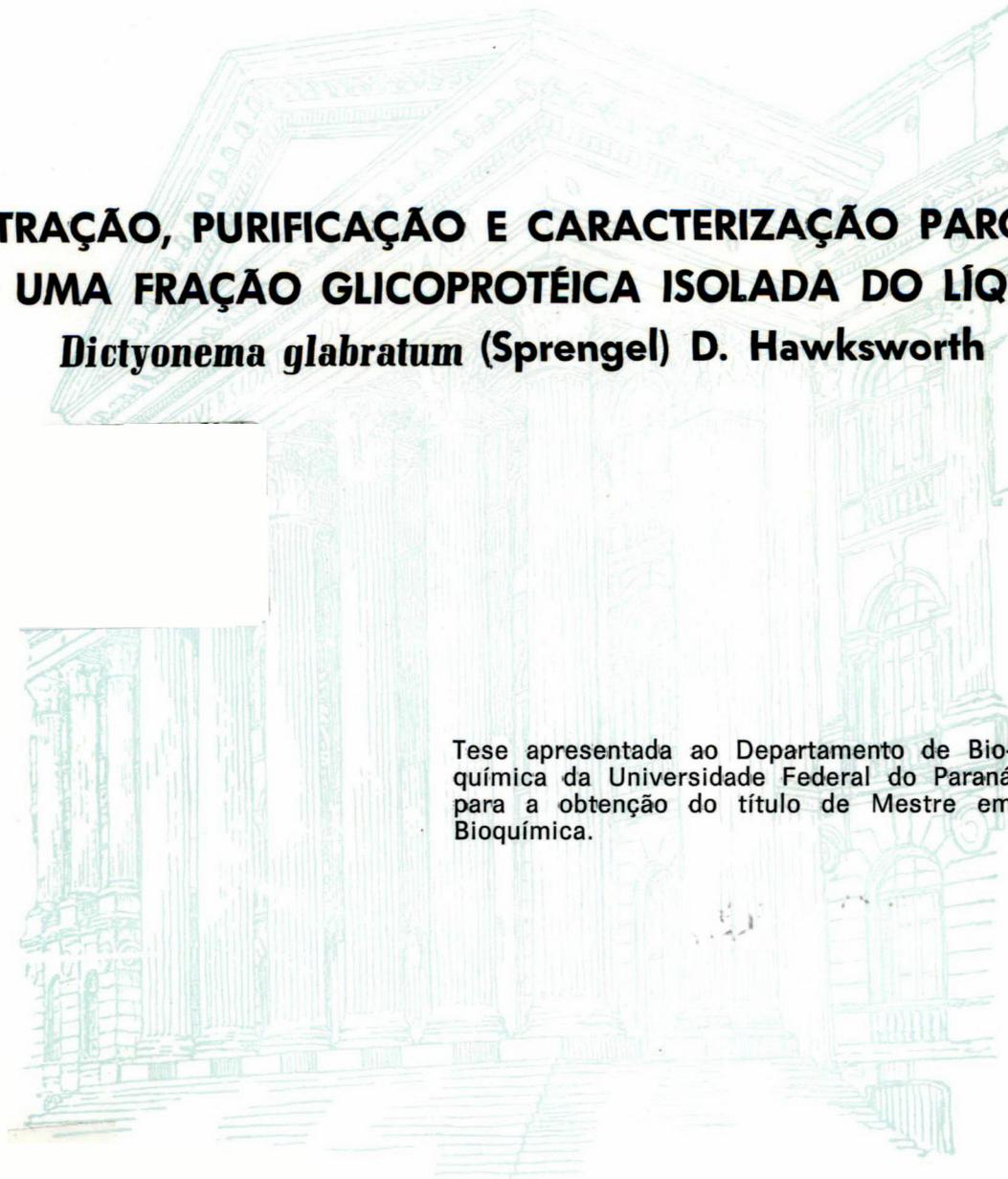


SELENE LOBO ELIFIO



**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DE UMA FRAÇÃO GLICOPROTÉICA ISOLADA DO LÍQUEN
Dictyonema glabratum (Sprengel) D. Hawksworth**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1996

SELENE LOBO ELIFIO

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DE UMA FRAÇÃO GLICOPROTÉICA ISOLADA DO LÍQUEN
Dictyonema glabratum (Sprengel) D. Hawksworth**

Tese apresentada ao Departamento de Bio-
química da Universidade Federal do Paraná
para a obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

CURITIBA
1996

SELENE LOBO ELIFIO

EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA FRAÇÃO
GLICOPROTÉICA ISOLADA DO LÍQUEN *Dictyonema glabratum* (Sprengel)

D. Hawksworth

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade
Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

Dr. Philip Albert James Gorin (Orientador)
Universidade Federal do Paraná

Dra. Fany Reicher
Universidade Federal do Paraná

Dra. Selma Faria Zawadzki Baggio
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 02 de dezembro de 1996

ORIENTADORES:

Dr. Philip Albert James Gorin

Dra. Maria de Lourdes Corradi C. da Silva

Para Casemiro, Antonia,
Fred e Gugu, com amor.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Philip Gorin, orientador desta tese, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Química de Carboidratos, e pela confiança e estímulo concedidos.

À professora Maria de Lourdes, pela orientação e discussões diárias que possibilitaram a realização deste trabalho e principalmente por me transmitir seu fascínio pelas glicoproteínas.

Ao professor Marcello Iacomini, pelo acompanhamento das atividades desenvolvidas, apoio e amizade dispensados.

Aos coordenadores que estiveram à frente do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, na pessoa da Dra. Maria Benigna Martinelli de Oliveira.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica da UFPR pelas contribuições feitas na forma de sugestões, empréstimo de reativos e/ou equipamentos.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Às bibliotecárias Izabella, Telma, Ruth e Mariza, pela assistência e esclarecimento constantes, sempre de forma gentil.

Aos pós-graduandos do curso de Bioquímica, em especial Carla, Clarice, Mareci, Sandro, Paulo, Tania Bonfim, Tania Bresolin, Fabiana e Luís Fernando pelo companheirismo ao longo desses anos.

Às amigas, companheiras de laboratório, Cíntia Mara, Patrícia Maria, Sandra Mara e Silvia Regina pela agradável convivência, troca de idéias e freqüentes gargalhadas. Ao Marcos Machado pelo carinho e apoio dispensados. À Juliana pelas fotos dos líquens e à Ana Maria pelas palavras de estímulo.

Aos alunos de iniciação científica; Cesar, pelas análises de GC e processamento das fotos em "scanner", e Letícia, pela indispensável colaboração na longa etapa de extração das glicoproteínas.

Ao Gianfranco, pela ajuda na coleta dos líquens e principalmente por sua presença carinhosa em todos os momentos.

Aos meus pais por poder contar sempre com eles.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | X |
| LISTA DE TABELAS | XI |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XII |
| RESUMO | XIII |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. GLICOPROTEÍNAS | 2 |
| 1.1.1. Aspectos Gerais | 2 |
| 1.1.2. Histórico | 2 |
| 1.1.3. Estrutura Química das Glicoproteínas | 4 |
| 1.1.3.1. Cadeias de Açúcar N-ligadas | 5 |
| 1.1.3.2. Cadeias de Açúcar O-ligadas | 6 |
| 1.1.3.3. Microheterogeneidade das Cadeias de Açúcar das Glicoproteínas | 7 |
| 1.1.4. Funções das Cadeias de Açúcar N- e O-ligadas | 9 |
| 1.2. LIQUENS | 11 |
| 1.2.1. Aspectos Gerais | 11 |
| 1.2.2. Importância Biológica e Aplicações dos Liquens | 14 |
| 1.2.3. O Líquen <i>Dictyonema glabratum</i> | 15 |
| 1.2.4. Glicoproteínas em Liquens | 18 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 3.1. EQUIPAMENTOS E METODOLOGIA GERAL | 22 |
| 3.1.1. Métodos Analíticos | 24 |
| 3.1.1.1. Método de Bradford | 24 |
| 3.1.1.2. Espectrofotometria Direta a 280 nm | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.1.3. Método do Fenol-Ácido Sulfúrico ----- | 25 |
| 3.2. COLETA DO LÍQUEN <i>Dictyonema glabratum</i> ----- | 26 |
| 3.3. EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DA GLICOPROTEÍNA DE <i>Dictyonema glabratum</i> ----- | 26 |
| 3.3.1. Estudos Preliminares ----- | 26 |
| 3.3.1.1. Escolha da Faixa de Fracionamento com Sulfato de Amônio ----- | 26 |
| 3.3.1.2. Escolha do Método de Extração ----- | 27 |
| 3.3.2. Procedimento Final ----- | 28 |
| 3.4. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA GLICOPROTEÍNA DE <i>D. glabratum</i> ----- | 29 |
| 3.4.1. Cromatografia de Gel Filtração em Coluna de Sepharose CL-6B ----- | 29 |
| 3.4.2. Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Sepharose ----- | 31 |
| 3.4.3. Cromatografia de Gel Filtração em Coluna de Sepharose CL-2B ----- | 32 |
| 3.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA ----- | 32 |
| 3.6. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS POR GLC ----- | 34 |
| 3.6.1. Derivatização e Análise de Açúcares Neutros ----- | 34 |
| 3.6.2. Derivatização e Análise de Açúcares Aminados ----- | 36 |
| 3.7. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS ----- | 37 |
| 3.8. ATIVIDADE BIOLÓGICA DA GLICOPROTEÍNA: ENSAIO COM ERITRÓCITOS HUMANOS ----- | 37 |
| 3.8.1. Suspensão de Eritrócitos Humanos ----- | 37 |
| 3.8.2. Reação de Hemaglutinação ----- | 37 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ----- | 39 |
| 4.1. EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DA GLICOPROTEÍNA DE <i>Dictyonema glabratum</i> ----- | 40 |
| 4.1.1. Estudos Preliminares ----- | 41 |
| 4.1.1.1. Escolha da Faixa de Fracionamento com Sulfato de Amônio ----- | 41 |
| 4.1.1.2. Escolha do Método de Extração ----- | 43 |

| | |
|---|----|
| 4.1.2. Procedimento Final ----- | 47 |
| 4.2. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO "50-70%" POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS----- | 49 |
| 4.2.1. Cromatografia de Gel Filtração em Coluna de Sepharose CL-6B ----- | 50 |
| 4.2.2. Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Sepharose ----- | 52 |
| 4.2.3. Cromatografia de Gel Filtração em Coluna de Sepharose CL-2B ----- | 52 |
| 4.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA ----- | 55 |
| 4.4. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS POR GLC----- | 58 |
| 4.5. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS ----- | 60 |
| 4.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FRAÇÃO GLICOPROTÉICA: ENSAIO COM ERI- TRÓCITOS HUMANOS ----- | 63 |
| 5. CONCLUSÕES ----- | 65 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----- | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1: Talos do líquen <i>Dictyonema glabratum</i> . | 17 |
| Figura 4.1: Dosagem de proteína e carboidrato das Frações 50-60% e 60-70% a partir da extração de 5 g de líquen, seguida de fracionamento com sulfato de amônio. Perfil de eluição de aproximadamente 1 mg de cada Fração em coluna de Sepharose 6B com tampão fosfato 100 mM. | 44 |
| Figura 4.2: Perfil de eluição, em coluna de Sepharose CL-6B (55 x 2 cm), de 1,5 mg da fração precipitada com 50-70% de saturação com sulfato de amônio após extração de 5 g de talos liquênicos armazenados por 60 dias a -20°C. Detecção de proteína a 280 nm. | 46 |
| Figura 4.3: Perfil de eluição da fração 50-70% em coluna de Sepharose CL-6B. | 51 |
| Figura 4.4: Perfil de eluição da fração 6B-I em coluna de troca iônica DEAE-Sepharose. | 53 |
| Figura 4.5: Perfil de eluição da fração DEAE-PP, em Sepharose CL-2B. | 53 |
| Figura 4.6: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (4-15%) da Fração DEAE-PP. | 57 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 4.1: Fracionamento do extrato salino de <i>D. glabratum</i> por precipitação com sulfato de amônio. Determinação de proteínas por detecção a 280 nm e de carboidratos pelo método do fenol-sulfúrico. | 42 |
| Tabela 4.2: Conteúdo de proteína e carboidrato total do Extrato Bruto, das frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio e do Sobrenadante Final. | 48 |
| Tabela 4.3: Teor, em porcentagem, de proteína e carboidrato do Extrato Bruto, das frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio e após procedimentos cromatográficos. Conteúdo de proteína recuperado em cada uma destas etapas, estimado em massa total e rendimento em relação ao Extrato Bruto. | 55 |
| Tabela 4.4: Porcentagem relativa de monossacarídeos, analisada por GLC, em cada etapa de purificação. | 60 |
| Tabela 4.5: Composição de aminoácidos da fração DEAE-PP. | 62 |
| Tabela 4.6: Título e fator de hemaglutinação do Extrato Bruto e Fração 50-70% com sangue humano dos grupos A, B, AB e O. | 64 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHAPS - (3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato

Da - Daltons

DEAE - Deoxiaminoetil

EDTA - Ácido etileno-diaminotetracético

GLC - Cromatografia líquida gasosa

GlcNAc - *N*-acetilglucosamina

KDa - Kilodaltons

Man α - unidade manopiranosil

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

PAS - Schiff-ácido periódico

PMSF - Fluoreto de fenil-metil-sulfóxido

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TFA - Ácido trifluoroacético

RESUMO

Uma fração glicoprotéica, contendo 14% de carboidrato, foi obtida do líquen *Dictyonema glabratum* através de extração aquosa em tampão fosfato, seguida por fracionamento com sulfato de amônio, na faixa de 50-70% de saturação, e purificação por métodos cromatográficos em colunas de filtração em gel (Sephacrose CL-6B) e troca iônica (DEAE-Sephacrose).

A homogeneidade desta fração foi analisada por filtração em gel em Sephacrose CL-2B e por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, mostrando que se trata de um composto homogêneo com massa molecular acima de 1.000 KDa.

O componente protéico apresentou alto teor de glicina e, em relação aos aminoácidos envolvidos em ligações glicosídicas, apenas serina e treonina foram detectados, enquanto que a porção carboidrato consistiu principalmente de resíduos de manose, xilose e arabinose.

Ensaio de hemaglutinação com eritrócitos humanos, apontou atividade apenas no extrato bruto e fração precipitada com sulfato de amônio, não havendo atividade na fração purificada pelos procedimentos cromatográficos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLICOPROTEÍNAS

1.1.1 Aspectos Gerais

Glicoproteínas são macromoléculas que consistem em uma cadeia peptídica a qual estão ligadas glicosidicamente uma ou mais cadeias de oligosacarídeos através de suas extremidades reductoras. Estas cadeias podem constituir menos de 1%, como em Ribonuclease B (PLUMMER e HIRS, 1964), a mais de 80% da massa molecular da glicoproteína, como em substâncias dos grupos sangüíneos (WATKINS, 1974).

O interesse de pesquisadores pela química de substâncias mucosas presentes em fluidos animais e extratos vegetais, deu início ao estudo das glicoproteínas. As primeiras a serem investigadas em detalhes foram aquelas derivadas de fluidos circulatórios ou secretados pelos tecidos de animais superiores, principalmente dos mamíferos (SPIRO, 1960).

1.1.2 Histórico

Gottschalk (1966) divide a história da descoberta e investigação das glicoproteínas em três fases. A primeira delas se caracteriza pelo início dos estudos e descoberta da existência de interação covalente entre cadeias de carboidrato e proteína. O ponto de partida foi uma série de experimentos que levou à distinção entre proteína e mucina: **Beccaria**, 1747 isolou do trigo uma substância gelatinosa (*gluten vegetabile*) que por muito tempo se acreditou se tratasse de um único composto. **Berzelius**, 1828, isolou três componentes extraindo o glúten com ál-

cool fervente, dois deles solúveis no álcool, *gliadina* e *schleimige materie* e o *albúmen vegetal*, insolúvel em álcool. O termo mucina foi introduzido por **de Saussure** em 1835, enquanto que **Mulder** poucos anos depois introduziu o termo proteína para albúmen. **Eichwald** em 1865, forneceu a primeira evidência da presença de carboidratos em mucinas. Sua primeira observação foi feita pela hidrólise de extratos de cistos ovarianos com ácido mineral, o que resultou numa substância redutora que ele assumiu como sendo glucose; até 1884, glucose, galactose, frutose e sorbose eram os únicos monossacarídeos redutores conhecidos. **Landwehr**, em 1882, isolou o primeiro polissacarídeo de mucina do molusco *Helix palmatia*, provando que a porção carboidrato de mucinas não era composta apenas por monossacarídeos. Por fim, **Hammersten** em 1888, trabalhando com mucinas da glândula submaxilar, mostrou que as unidades de carboidrato e proteína estavam ligadas por uma firme ligação química. Em seu trabalho de 1895, se refere ocasionalmente a mucina como glicoproteína.

O segundo período, entre 1900-1933, foi caracterizado pelo isolamento e identificação de carboidratos associados a proteínas. Vale ressaltar que o isolamento da hexosamina foi detectado primeiramente em cartilagem, por **Levene e La Forge**, em 1914 e posteriormente facilmente detectado em outros tecidos. O isolamento de açúcares neutros foi mais difícil e ocorreu muito depois.

O período compreendido entre 1933 e 1966 se caracterizou pelo desenvolvimento das técnicas de laboratório. Algumas delas, possibilitaram a identificação e quantificação de açúcares e aminoácidos em pequenas quantidades, a análise estrutural de oligo- e polissacarídeos, a separação eficiente e purificação

de proteínas, a obtenção da homogeneidade de macromoléculas e a determinação de suas massa moleculares.

Desta forma, foi realmente a partir dos anos 60 que o estudo das glicoproteínas evoluiu com grande velocidade. Até esta data, material não carboidrato encontrado em muitas preparações de polissacarídeos era considerado como uma impureza, e sua remoção era classificada como “purificação” (SHARON, 1966). Da mesma forma, na área das proteínas, muitas estruturas tiveram de ser revistas, uma vez que muitas destas, consideradas anteriormente não glicosiladas, estão na verdade, ligadas a cadeias de oligossacarídeos.

A história das glicoproteínas se confunde com a das proteoglicanas. De fato, a nomenclatura dos complexos proteína-carboidrato variou muito ao longo desse período, quando alguns termos como mucina, mucóide e mucoproteína foram largamente empregados. Somente em 1982, uma comissão conjunta de nomenclatura em bioquímica (IUB-IUPAC - JCBN, 1982) recomendou que o termo glicoproteína fosse utilizado para proteínas conjugadas a oligossacarídeos ou polissacarídeos de baixo peso molecular enquanto que proteoglicanas são proteínas ligadas a cadeias de polissacarídeos de alto peso molecular, altamente carregadas, contendo tanto ácidos carboxílicos como grupos ésteres sulfatados.

1.1.3 Estrutura Química de Glicoproteínas

A cadeia polipeptídica das glicoproteínas são sintetizadas sob controle genético, como todas as proteínas. No entanto, suas cadeias de açúcar, são geradas enzimaticamente e covalentemente ligadas ao polipeptídeo, sem o controle

de um molde determinado pelo genoma. Para elucidar a base molecular dos fenômenos biológicos no qual as glicoproteínas e principalmente, as suas cadeias de açúcar estão envolvidas, são indispensáveis informações exatas a respeito das suas estruturas químicas.

As cadeias de açúcar das glicoproteínas podem ser classificadas em dois grupos. Um contém um resíduo *N*-acetilgalactosamina na sua extremidade redutora, que está glicosidicamente ligado ao grupo hidroxila de um resíduo de serina ou treonina do polipeptídeo e é denominado cadeia de açúcar *O*-ligada ou Tipo-mucina. O outro, que é chamado Asparagina-ligado ou cadeia *N*-ligada, contém um resíduo de *N*-acetilglucosamina na sua extremidade redutora e está ligado ao grupo amida de um resíduo de asparagina na cadeia polipeptídica. Estes dois tipos principais de ligação carboidrato-proteína possuem propriedades químicas e são substratos de enzimas específicas, podendo ser encontrados separadamente ou juntos numa mesma cadeia peptídica (KENT, 1994).

1.1.3.1 Cadeias de açúcar *N*-ligadas

Estruturalmente, as cadeias de oligossacarídeos *N*-ligadas podem ser divididas em três subgrupos. Oligossacarídeos que contêm somente unidades de manose e *N*-acetilglucosamina foram classificados como **Tipo alta-manose**. Um heptassacarídeo central, $\alpha\text{-Man}_p\text{-(1}\rightarrow\text{6)-}(\alpha\text{-Man}_p\text{-(1}\rightarrow\text{3))}\text{-}\alpha\text{-Man}_p\text{-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-Man}_p\text{-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-Man}_p\text{-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-Glc}_p\text{NAc-(1}\rightarrow\text{4)-Glc}_p\text{NAc}$, caracteriza este subgrupo e variações são determinadas pelo número e localização de unidades $\alpha\text{-Man}_p\text{-}$

(1→2) ligados aos três resíduos terminais não-redutores de α -manosil da porção central (BERGER *et al.*, 1982).

Oligossacarídeos do **Tipo complexo**, contém um pentassacarídeo central $\alpha\text{-Manp-(1}\rightarrow\text{6)-}(\alpha\text{-Manp(1}\rightarrow\text{3)-})\beta\text{-Manp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-GlcPNAc-(1}\rightarrow\text{4)-GlcPNAc}$. As variações ocorrem devido a estrutura e tamanho de cadeias externas compostas de *N*-acetilglucosamina, galactose, fucose, ácidos siálicos e *N*-acetilgalactosamina, que se ligam às duas unidades α -manosil terminais do núcleo central através de uma unidade de *N*-acetilglucosamina redutora. A possível ligação de uma unidade α -fucosil ao núcleo central contribui para a variação estrutural desse tipo de cadeia (KOBATA, 1992).

O último grupo é denominado **Tipo híbrido** porque os oligossacarídeos têm características estruturais dos outros dois grupos. Uma ou duas unidades α -manosil estão ligadas ao braço $\alpha\text{-Manp-(1}\rightarrow\text{6)}$ do pentassacarídeo central, como ocorre nas cadeias do tipo alta manose, e as cadeias externas encontradas nas do tipo complexo estão ligadas ao braço $\alpha\text{-Manp-(1}\rightarrow\text{3)}$ do pentassacarídeo. A presença ou ausência de um resíduo α -fucosil e/ou GlcNAc ligados ao núcleo central também produzem variações estruturais nas cadeias de açúcar deste subgrupo (KOBATA, 1992).

1.1.3.2 Cadeias de açúcar O-ligadas

Em contraste às cadeias *N*-ligadas, as *O*-ligadas de glicoproteínas seguem poucas regras estruturais, tendo como elemento mais comum GalNAc liga-

do ao grupo hidroxila do resíduo de serina ou treonina (PAULSON, 1989). Na maioria das vezes, estas cadeias são compostas de ácido siálico, fucose, galactose, *N*-acetilgalactosamina e *N*-acetilglucosamina.

Em plantas foi registrado um tipo especial de ligação em glicoproteínas denominadas extensinas, onde ocorre a ligação entre L-arabinofuranose e 4-hidroxil-prolina (MONTREUIL *et al.*, 1994).

Algumas formas raras de ligação glicosídica em glicoproteínas também foram relatadas, como a β -ligação O-glicosídica entre glucose e tirosina em bactéria (MESSNER *et al.*, 1992) e entre glucose e serina no fator IX da coagulação sangüínea (HASE *et al.*, 1990).

1.1.3.3 Microheterogeneidade das cadeias de açúcar das glicoproteínas

Foi demonstrado que a habilidade de açúcares em formar múltiplas estruturas, ou isômeros a partir de um pequeno número de unidades de monossacarídeos, explica sua ampla distribuição em membranas celulares e seu envolvimento em interações intra e extracelulares (ANDERSON e GRIMES, 1982).

Além da multiplicidade estrutural, muitas glicoproteínas contêm mais de uma cadeia de açúcar em uma molécula, e estas se apresentam em vários estágios de alongação ou com pequenas modificações. Mesmo nos casos de glicoproteínas com apenas uma cadeia de açúcar, esta variação pode ocorrer entre moléculas numa suspensão, como observado em amostras purificadas de ovalbumina, de onde foram isoladas pelo menos 10 estruturas de oligossacarídeos

diferentes (CUNNINGHAM *et al.*, 1963; ATKINSON *et al.*, 1981; CORRADI DA SILVA *et al.*, 1995). Este fenômeno foi denominado microheterogeneidade.

As cadeias de açúcar das glicoproteínas são formadas pela ação sequencial de glicosiltransferases. Uma vez que não há um molde, como no caso da síntese de proteínas, incluído nesta reação de alongação, as estruturas finais das cadeias de açúcar produzidas são determinadas pela especificidade de cada glicosiltransferase por um açúcar nucleotídeo particular e um acceptor específico, assim como pela sua habilidade de sintetizar um certo tipo de ligação. Este mecanismo pode explicar a microheterogeneidade, já que a falta de alguns açúcares nucleotídeos, mudanças na atividade de glicosiltransferases (BERGER *et al.*, 1982) ou a ausência de algumas destas enzimas em mutantes (STANLEY e IOFFE, 1995) podem, teoricamente, induzir mudanças na estrutura das cadeias de açúcar. Os membros de subclasses de glicoproteínas diferindo apenas na variabilidade de seus oligossacarídeos ligados ao "core" protéico são denominadas glicoformas.

A heterogeneidade ocorre em particular nos pontos de ligação dos açúcares terminais de cadeia, ácido siálico e L-fucose ou na ausência destes dois componentes (KENT, 1994).

Observada em vários sistemas, a variação na estrutura dos oligossacarídeos pode causar diferenças nas propriedades biológicas de uma glicoproteína. Por exemplo, o estudo com α -fetoproteína de soro fetal bovino mostrou que esta molécula apresentava duas glicoformas majoritárias (bi- e triantenárias) com reatividade diferencial a concanavalina A (KRUSIUS e RUOSLAHTI, 1982); células animais resistentes a lectinas tóxicas de plantas apresentam alterações nos oligos-

sacarídeos de glicoconjugados de membrana, responsáveis pela ligação a essas lectinas (STANLEY e LOFFE, 1995); e por fim, glicoproteínas do soro sanguíneo que perderam resíduos de ácido siálico terminal, são rapidamente retiradas da circulação e degradadas nas células do fígado (ASHWELL e HARFORD, 1982). Desta forma, a microheterogeneidade parece ser uma resposta a um processo bioquímico positivo, e não um indicativo de biossíntese incompleta ou de um estágio parcial do metabolismo.

1.1.4 Funções das cadeias de açúcar *N*- e *O*- ligadas

As glicoproteínas são componentes universais, distribuídas em todas as formas de vida, onde estão envolvidas em diversos eventos biológicos. Sua síntese, através das modificações pós-traducionais de proteínas resulta em economia para a célula, uma vez que gera novas funções através da ação biossintética de glicosiltransferases extra-nucleares sem o recurso do genoma.

A enorme diversidade estrutural promovida pelas cadeias de açúcar de glicoproteínas faz com que estejam mediando eventos de reconhecimento específico ou promovendo a modulação de processos biológicos em diferentes localizações de um mesmo organismo, ou em diferentes tempos de sua ontogenia ou fase da vida. Assim, geram grande parte da diversidade funcional necessária para o desenvolvimento e diferenciação de organismos complexos, e para interações com outros organismos no meio ambiente (VARKI, 1993).

As glicoproteínas atuam como ligantes da superfície celular, promovendo vários tipos de interação celular, como anticorpo-receptor (AMIN *et al.*, 1991) e patógeno-célula hospedeira (BURLEIGH e ANDREWS, 1995).

A glicosilação de enzimas lisossomais promove a sinalização necessária para seu direcionamento do sítio de síntese no retículo endoplasmático rugoso até seu destino final em lisossomas (KORNFELD, 1987); mecanismo semelhante ocorre com glicoproteínas retiradas do plasma e direcionadas a tecidos específicos (LODISH, 1991).

As cadeias de açúcar também influenciam a atividade de enzimas, como da fosfatase ácida de levedura (RIEDERER e HINNEN, 1991); a ação de hormônios (STOCKELL HARTREE e RENWICK, 1992) e de moléculas do plasma, como imunoglobulinas (PAREKH *et al.*, 1985; WRIGHT *et al.*, 1990). São responsáveis pela indução e manutenção da conformação específica de muitas proteínas como as mucinas (JENTOFT, 1990) e receptores (FEUGEAS *et al.*, 1990; CARO *et al.*, 1984).

Em vegetais, muitas glicoproteínas foram caracterizadas como lectinas por promoverem aglutinação de carboidratos e células *in vitro*. São encontradas em diversos tecidos e órgãos vegetais, como por exemplo em folhas (WITTENBACH, 1983; HANKINS *et al.*, 1987; SAITO *et al.*, 1993) onde aparentemente desempenham importante papel na defesa contra fungos e bactérias por interagirem com várias α -mananas e galactomananas da parede celular desses microrganismos.

Em vegetais também, são encontradas as extensinas, ou glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas que, presentes na parede celular, determinam a anatomia dos indivíduos nas várias fases do desenvolvimento vegetal (KNOX, 1995).

Foram encontradas glicoproteínas na superfície celular de bactérias (LECHNER e WIELAND, 1989), e como constituinte principal de flagelos de halobactérias, neste caso são denominadas flagelina e são ricas em oligossacarídeos sulfatados (GERL e SUMPER, 1988).

Em vírus, ainda não existem evidências de que codifiquem no seu genoma as enzimas necessárias para a biossíntese de oligossacarídeos *N*-ligados, conseqüentemente, a glicosilação de proteínas do envelope viral, evento essencial para a infecção, parece ser dependente do aparato de glicosilação da célula hospedeira (RADEMACHER *et al.*, 1988). Foi demonstrado que o vírus HIV se liga diretamente ao receptor CD4 na superfície de linfócitos T através da glicoproteína gp120 do envelope (HAIDAR *et al.*, 1992). As cadeias de carboidrato também podem auxiliar os vírus a escapar, ou ser resistente ao sistema de defesa do hospedeiro por mascarar os epitopos polipeptídicos (SKEHEL *et al.*, 1984).

1.2 LÍQUENS

1.2.1 Aspectos Gerais

Líquen é a associação simbiótica entre um fungo, denominado micobionte e uma alga ou cianobactéria, o fotobionte (AHMADJIAN, 1993). O micobionte, na

grande maioria das vezes, é um ascomiceto ou, em menor freqüência, um fico-, basidio-, ou deuteromiceto. Já o fotobionte pode ser uma alga verde, cianobactéria ou ambos (HAWKSWORTH e HILL, 1984).

A formação de uma associação líquênica deve ser encarada como resultado da adaptação mútua dos biontes para suprir suas necessidades combinadas. Uma consequência disto é que algumas combinações de biontes serão preferíveis à outras, exibindo um máximo de eficiência e, conseqüentemente, maior vantagem competitiva. Ainda restam dúvidas com respeito à seletividade entre biontes, sendo provável que ocorra durante vários estágios do desenvolvimento do líquen (GALUN *et al.*, 1984).

Nessa simbiose, a alga contribui com a produção de açúcares através da fotossíntese e, no caso das cianofíceas, elaboração de aminoácidos a partir de gás carbônico e nitrogênio atmosféricos. O talo do micobionte, por sua vez, possui uma camada onde ficam alojadas as células do fotobionte, promovendo proteção contra luz excessiva e ressecamento e, ainda facilitando a troca de gases (AHMADJIAN, 1993).

As células das algas e as hifas dos fungos podem apresentar várias formas de associação e vários níveis de intimidade entre si, o que determina uma ampla variação da anatomia e da morfologia básicas desse grupo biológico. Tal variação pode ser interpretada como métodos desenvolvidos pelo micobionte para dispor do fotobionte de modo a capturar o máximo de irradiação e, assim, garantir uma melhor taxa de fotossíntese (HAWKSWORTH e HILL, 1984). As associações mais simples constituem-se apenas de um conjunto de hifas não organiza-

das que crescem por entre colônias de células de algas, porém, cada espécie tem um talo com forma definida podendo ser arbustivo, foliáceo, crustáceo, ou filamentososo (MARCELLI, 1995).

O tamanho do talo liquênico varia desde poucos milímetros nas espécies que habitam frestas de troncos e rochas, até metros de comprimento como é o caso das “barbas de velho” (*Ramalina usnea*) penduradas nos galhos de árvores.

A cor básica da maioria dos líquens portadores de algas verdes varia entre o branco e o cinza com um toque de verde claro dado pela clorofila, dependendo do grau de hidratação; quanto mais hidratados estiverem os talos, mais verdes. Alguns também produzem substâncias coloridas, como amarelo, laranja, rosa ou vermelho. Líquens portadores de cianobactérias apresentam cores que são variações do preto, marrom e cinza-chumbo (MARCELLI, 1995).

A reprodução nos líquens pode ocorrer por dois métodos básicos. Num deles, o método direto, ocorre a produção de estruturas (sorédios, isídios e outras) que contêm tanto o micobionte quanto o fotobionte e que se desenvolvem até um indivíduo adulto. O outro método, denominado indireto, se dá através da produção e liberação de esporos pelo micobionte, com ou sem sua reprodução sexuada. Esses esporos necessitam encontrar na natureza células da espécie adequada de fotobionte e se associar a elas, num processo de liquenização a fim de reconstituir um talo semelhante àquele que originou a célula reprodutora (MARCELLI, 1995).

Os líquens têm alta capacidade de monitorar as condições ambientais as quais estejam expostos e se adaptar a elas, em alguns casos incluindo a poluição atmosférica. Essa habilidade de se ajustar a diferentes condições de luz, temperatura, comprimento do dia e umidade permite a otimização de seus processos fisiológicos básicos (AHMADJIAN, 1993).

1.2.2 Importância Biológica e Aplicações dos Líquens

Os líquens dominam aproximadamente 8% da superfície terrestre. Devido a sua alta capacidade de adaptação a variações ambientais são colonizadores de rochas e outros substratos, ajudam a estabilizar o solo em áreas desertas e, em regiões onde há vegetação escassa, líquens contendo cianobactérias são os principais fixadores de nitrogênio para o ecossistema (AHMADJIAN, 1993).

Ainda, os líquens são utilizados como indicadores de poluição devido à sua sensibilidade a SO₂, NO₂ e ozônio e habilidade em absorver e acumular metais pesados (HAWKSWORTH e HILL, 1984).

Algumas de suas aplicações em alimentos, medicamentos, como corantes e na perfumaria são relacionados abaixo:

Alimentos: *Cetraria islandica* (Iceland moss) convertida em farinha para preparo de mingau (Ozenda e Clauzade, citados por GORIN *et al.*, 1993).

Aplicações medicinais: *Cetraria islandica*, vendida na forma de pastilhas para doenças respiratórias (XAVIER FILHO e RIZZINI, 1976); *Roccela montagnei* usada no tratamento de angina (HAWKSWORTH e HILL, 1984); ácido úsnico, extraí-

do de alguns líquens, como os do gênero *Cladonia* apresenta efeito ativo como antibiótico (BURKHOLDER *et al.*, 1944); *Cladonia miniata* var. *sanguínea* na cura de estomatites cremosas ou “sapinhos” (SILVA *et al.*, 1986).

Como corantes: *Lasallia pustulata* e *Roccella montagnei*, quando “fermentadas” com amônia são usadas como corante vermelho para fibras protéicas, como lã e seda; *Parmelia omphalodes* como corante marrom (HAWKSWORTH e HILL, 1984). Os líquens são usados também como pigmentos na preparação de “Litmus paper” (GORIN *et al.*, 1993).

Perfumaria: *Evernia prunastri* e *Pseudovernia furfuracea*, usados como fixadores na manufatura de perfumes (HAWKSWORTH e HILL, 1984).

1.2.3 O Líquen *Dictyonema glabratum*

O líquen *Dictyonema glabratum* (Sprengel) D. Hawksw., anteriormente denominado *Dictyonema pavonium* (Swartz) Parm., ou ainda *Cora pavonia* (Swartz) Fr. (HAWKSWORTH, 1988), pertence ao reino Fungi; divisão Eumycota; subdivisão Basidiomycotina; ordem Phanerochaetales; família Dictyonemataceae; gênero *Dictyonema* (MARCELLI, 1995). No Brasil é conhecido como “asa de papagaio” (IACOMINI *et al.*, 1987).

É um dos poucos basidiomicetos liquenizados e de distribuição principalmente tropical. Apresenta talo folhoso ou foliáceo. Sua biologia foi estudada principalmente nos Andes Venezuelanos, onde é encontrado em regiões entre 1000 a 4400 metros acima do nível do mar, exibindo diferenças na forma e tama-

nho do talo de um habitat para outro. A temperatura média varia de 1°C no ponto mais alto até 20°C no ponto mais baixo (LARCHER e VARESCHI, 1988).

Na região próxima a Curitiba, foi encontrado como colonizador nas encostas da rodovia BR 277 nos Km 47, 59 e 65. Foi coletado também por Iacomini (1987), na Estrada da Graciosa, Paraná, 1 Km após o posto da Polícia Florestal, na direção de Morretes, numa altitude de 900 m.

A grande parte das publicações referentes ao líquen *D. glabratum* dizem respeito à sua fisiologia, como taxa de fotossíntese (COXSON, 1987); taxa de fixação de nitrogênio (FRITZ-SHERIDAN e PORTECOP, 1987); desenvolvimento e crescimento do talo (LARCHER e VARESCHI, 1988).

Na primeira análise química deste líquen (ZANIN, 1987; IACOMINI *et al.*, 1987), foram investigados os seus componentes protéicos e glicídicos e comparados com os de ascomicetos. As análises mostraram uma alta dosagem de proteína (36%) e a presença de polissacarídeos típicos de basidiomicetos livres ou liquenizados. Foi isolada, dentre outros componentes, uma fração, com 5,1% de proteína, homogênea por eletroforese em Cellogel, mostrando banda única para carboidrato e proteína.

O extrato aquoso deste líquen foi testado, por Xavier Filho *et al.* (1980), com sangue humano dos grupos A, B, AB e O e também com sangue de cobaia, morcego, rato e camundongo, mostrando que a atividade hemaglutinante do extrato não era específica para nenhum tipo sangüíneo.

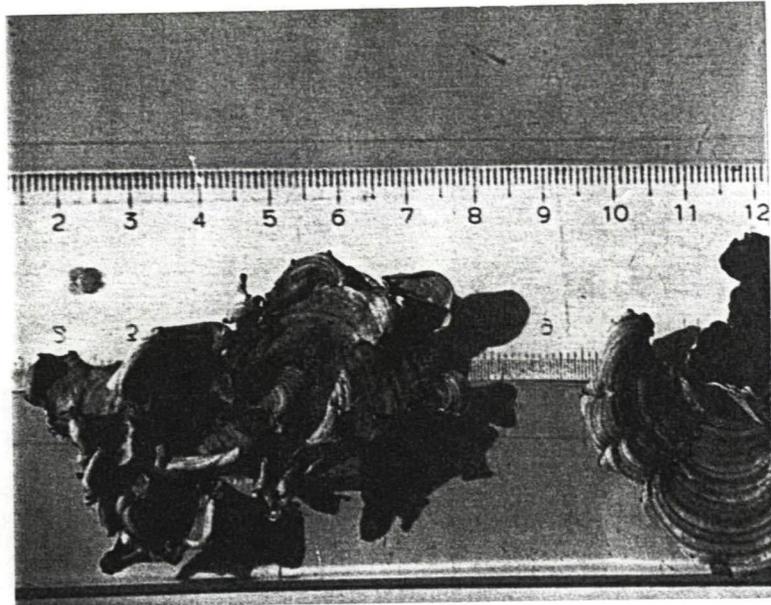


Figura 1.1: Talos do líquen *Dictyonema glabratum*

1.2.4 Glicoproteínas em Líquens

O estudo de glicoproteínas em líquens é praticamente inexistente, se restringindo a poucas publicações.

Glicopeptídeos foram encontrados em líquens dos gêneros *Lobaria* e *Sticta*. Corradi da Silva *et al.* (1993) identificaram e quantificaram um componente glicopeptídico do extrato aquoso do líquen *Sticta sp.* No entanto, o líquen *Evernia prunastri* foi o mais estudado em relação às glicoproteínas. Como exemplos, a purificação e investigação de algumas propriedades de uma arginase secretada pelo micobionte desse líquen (PLANELLES e LEGAZ, 1987) e a purificação e caracterização por SDS-PAGE, eletrofocalização e análise de aminoácidos de uma glicoproteína controladora da síntese de urease (Perez-Urria *et al.*, 1989).

Maiores investigações foram realizadas sobre lectinas encontradas em líquens (XAVIER FILHO *et al.*, 1980; INGRAM, 1982; PETIT, 1982 e PETIT *et al.*, 1983). Lectinas são proteínas, na grande maioria das vezes glicosiladas, que têm a propriedade de se ligarem não covalentemente a carboidratos. Nos exemplos citados, não houve a preocupação quanto à caracterização de uma provável porção carboidrato nessas moléculas, mas somente de isolamento de extratos protéicos e sua atividade hemaglutinante. Desta forma, é possível que as lectinas estudadas ocorram naturalmente glicosiladas.

De modo generalizado, não há citações na literatura de estudos de identificação do tipo de ligação envolvida na interação carboidrato-proteína de glicoproteínas de líquens, e nem da caracterização estrutural de oligossacarídeos isolados destas macromoléculas.

2 OBJETIVOS

Os objetivos específicos deste trabalho de tese foram:

1- Estabelecer métodos para extração e purificação de glicoproteínas do líquen

Dictyonema glabratum;

2- Selecionar a glicoproteína obtida em maior concentração pelos processos de purificação e caracterizá-la quanto à:

a) massa molecular;

b) composição de monossacarídeos;

c) composição de aminoácidos;

c) atividade hemaglutinante;

d) natureza da ligação carboidrato-proteína.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS E METODOLOGIA GERAL

Os principais equipamentos utilizados ao longo de todo trabalho foram:

- Moíno GENERAL ELECTRIC A-C Motor, com Peneiras de 2 Mm.
- Homogeneizador WARING COMMERCIAL BLENDOR.
- Centrífuga Refrigerada SORVALL SUPERSPEED RC 2-B.
- Centrífuga SORVALL T 6000.
- Potenciômetro MICRONAL, Modelo B 374.
- Liofilizador CRYOLISER - New Brunswick Scientific Co. Inc.
- Espectrofotômetro BECKMAN DU 7400.
- Espectrofotômetro TECNAL.
- PHAST SYSTEM, PHARMACIA.
- Cromatógrafo a Gás VARIAN, Modelo 3300 acoplado a um Espectrômetro de Massa FINNINGAN MAT munido com ITS-40.
- Estufa FANEM, Modelo 315 SE, mantida a 100°C.
- Evaporador Rotatório FISATON.
- Bomba Peristáltica PUMP P1, PHARMACIA.
- Coletor de Frações FRAC 100, PHARMACIA.

Os géis utilizados nas cromatografias líquidas foram: Sepharose CL-6B; Sepharose CL-2B e DEAE-Sepharose Fast Flow da PHARMACIA.

As diálises foram executadas em sacos com limite de exclusão de 12000-14000 Da, em sistema fechado, sob agitação, na temperatura de 4°C.

Os padrões utilizados para análise em GLC foram hidrocloreto de D-glucosamina, hidrocloreto de D-manosamina, *N*-acetil-D-galactosamina, α -D-ramnose, α -L-fucose, D-xilose e D-galactose da Sigma; D-manose da Calbiochem; D-arabinose da Merck e glucose anidra da Carlo Erba.

A análise de aminoácidos foi realizada no Alberta Peptide Institute, Universidade de Alberta, Canadá.

A quantidade de sulfato de amônio a ser adicionada em cada etapa do fracionamento foi calculada pela seguinte equação, onde uma solução com $S_1\%$ de saturação de sulfato de amônio para chegar a $S_2\%$ de saturação. Para 1 litro de solução (SEGEL, 1979):

$$g = \frac{533 (S_2 - S_1)}{100 - 0,3 S_2}$$

3.1.1 Métodos Analíticos

3.1.1.1 Método de Bradford

O método de Bradford (1976) foi utilizado para a determinação da concentração de proteínas em todas as etapas de purificação. O princípio do método se baseia na ligação do corante (Coomassie Brilliant Blue G-250) com a proteína, formando um complexo de cor azul. O corante reage preferencialmente com resíduos de arginina e, numa menor extensão, com resíduos de histidina, lisina, tirosina, triptofano e fenilalanina (COMPTON e JONES, 1985). Utilizou-se protocolo original do método, com algumas modificações, conforme descrito:

Solução estoque: 40 mg de Coomassie Blue G-250 foram dissolvidos em 20 mL de etanol absoluto. Foram adicionados 40 mL de ácido fosfórico 85% e água até volume de 100 mL.

Solução de uso: foi feita uma diluição (1:4, v/v) da solução estoque em água, seguida de filtração em papel de filtro.

Procedimento: adicionou-se 1ml do corante a 100µl da amostra. A leitura espectrofotométrica foi feita a 595 nm, num período de 2 a 20 minutos após início da reação.

Os cálculos de concentração foram feitos através de curva de calibração com albumina bovina (BSA), em faixas de concentração que variaram de acordo com o teor protéico estimado nas amostras a serem dosadas.

3.1.1.2 Espectrofotometria Direta a 280 nm

A detecção de proteínas pela leitura a 280 nm é feita através da absorção de prótons pelos anéis aromáticos dos aminoácidos fenilalanina, triptofano, histidina e tirosina, nesta faixa da luz ultra violeta (STOSCHECK, 1990). Este método foi utilizado para dosagem de proteínas nos estudos preliminares para obtenção do extrato bruto e, durante as etapas de purificação da glicoproteína por métodos cromatográficos para determinação do perfil de eluição dos componentes protéicos.

3.1.1.3 Método do Fenol-sulfúrico

O método do fenol-sulfúrico ou de Dubois *et al.* (1956) foi utilizado para a determinação da concentração e detecção de carboidrato total nas etapas de purificação da glicoproteína e frações cromatográficas, respectivamente. O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de ácido sulfúrico concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor amarela. Foi seguido protocolo original do método, conforme descrito:

Reagentes: fenol em água (5% p/v); ácido sulfúrico concentrado.

Procedimento: foi adicionado a 0,5 mL de amostra, 0,5 mL de solução de fenol e, rapidamente, 2,5 mL de ácido sulfúrico. A solução foi agitada após 10 minutos de repouso e realizada leitura espectrofotométrica a 490 nm após os 30 minutos seguintes.

3.2 COLETA DO LÍQUEN *Dictyonema glabratum*

Os líquens da espécie *Dictyonema glabratum* foram coletados nas encostas da rodovia BR 227, Km 47.

Logo após a coleta, os talos foram lavados com água destilada para retirada de terra e restos de vegetais e foram secos espontaneamente em temperatura ambiente.

3.3 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS GLICOPROTEÍNAS DE *Dictyonema glabratum*

3.3.1 Estudos Preliminares

Para obtenção de um extrato protéico de *D. glabratum*, contendo glicoproteínas íntegras, com manutenção de suas características conformacionais, alguns protocolos foram testados.

3.3.1.1 Escolha da Faixa de Fracionamento com Sulfato de Amônio

O protocolo descrito por Kawagishi *et al.* (1994) para isolamento de uma lectina do cogumelo *Hericium erinaceum* foi testado, seguindo algumas modificações. Neste, talos líquênicos moídos foram extraídos com acetona por 24 horas sob agitação. A suspensão resultante foi filtrada em papel de filtro e o resíduo, extraído com solução salina por 16 horas. O extrato foi então filtrado em tecido

sintético e centrifugado por 15 minutos a 10.000 x g, a 4°C. O sobrenadante resultante sofreu fracionamento em pequenos cortes ("short cuts"), ou seja, foi tratado a 0-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 e 90-100% de saturação com sulfato de amônio. A adição deste sal foi feita a 0°C por banho de gelo, lentamente, sob contínua agitação. As soluções foram deixadas em repouso por 1 hora a 4°C, após o que foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 x g. Os precipitados foram ressuspensos em pequeno volume de água destilada e dialisados por 20 horas, com 4 trocas, sob agitação branda a 4°C. As frações dialisadas foram submetidas a dosagens de proteína pela leitura espectrofotométrica a 280 nm e a dosagens de açúcar total e, então liofilizadas.

3.3.1.2 Escolha do Método de Extração

O método descrito por Petit (1982), para obtenção de fitolectinas do líquen *Peltigera horizontalis*, foi também testado. Neste protocolo, os talos liquênicos foram homogeneizados com NaCl 200 mM em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2, e extraídos nesta solução por 48 horas com auxílio de agitador mecânico. A suspensão foi submetida à filtração em 4 camadas de fralda de algodão e o filtrado foi centrifugado a 30.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante, foi então dialisado contra tampão fosfato 10 mM e o dialisado, fracionado a 0-50, 50-60, 60-70, 70-80 e 80-100% de saturação com sulfato de amônio, conforme descrito anteriormente. As frações foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e, então, dosadas para proteínas pelo método de Bradford e para carboidrato pelo método de Dübois.

Ainda, as Frações 50-60% e 60-70%, escolhidas por apresentarem os maiores valores de proteína, foram fracionadas em cromatografia de gel filtração. Para este procedimento, uma coluna de vidro (29 x 1,6 cm) foi preenchida com Sepharose 6B e lavada com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,2) na temperatura de 20°C. Este mesmo tampão foi utilizado para ressuspensão da amostra e eluição das frações.

Uma alíquota de amostra contendo 1 mg em 0,5 mL de tampão foi aplicada na coluna. As frações (2 mL) foram coletadas sob fluxo de 1 mL.min⁻¹ e analisadas a 280 nm. Cada uma delas foi ainda dialisada contra água destilada, liofilizada, e então, dissolvida em 0,5 mL de água para detecção de carboidrato.

3.3.2 Procedimento Final

Neste ítem será descrito, em detalhes, o método proposto e utilizado para extração e fracionamento de glicoproteínas para posterior purificação e caracterização.

Talos liquênicos inteiros (50 g) recém coletados foram homogeneizados com 1000 mL de NaCl 200 mM em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2, na presença de iodoacetamida 5 mM, EDTA 5 mM e PMSF 5 mM, e extraídos nesta solução por 48 horas com auxílio de agitador mecânico. A suspensão foi submetida à filtração em 4 camadas de fralda de algodão e o filtrado foi centrifugado a 30.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante (680 mL), denominado **Extra-**

to Bruto, seguiu processos de purificação. Todo procedimento ocorreu na temperatura de 0-4°C.

Uma alíquota de 40 mL do extrato bruto foi reservada para dosagens e ensaios posteriores. O restante (640 mL), foi fracionado por precipitação com sulfato de amônio, conforme descrito em “Estudos Preliminares”. Os precipitados obtidos foram denominados: **Fração 0-50%**, **Fração 50-70%** e **Fração 70-100%** e o sobrenadante (840 mL), “**Sobrenadante Final**”. Os precipitados obtidos, assim como a alíquota reservada do Extrato Bruto, foram dialisados por 20 horas, com 4 trocas, contra água destilada e, então liofilizados.

Os liofilizados foram pesados para cálculo do rendimento e então resus-pensos em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 para dosagens de proteína pelo método de Bradford, utilizando-se curva padrão de 10 a 50 µg de albumina bovina e para açúcar total, com curva padrão de 10-60 µg de glucose. Os ensaios colorimétricos foram realizados em triplicatas e lidos contra um branco utilizando-se tampão fosfato de potássio no lugar das amostras.

3.4 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA GLICOPROTEÍNA DE *D. glabratum* POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.4.1 Cromatografia de Gel Filtração em Coluna de Sepharose CL- 6B

Características da coluna: o gel Sepharose CL-6B é formado por agarose, numa concentração aproximada de 6%, estabilizado por pontes de hidrogênio.

Possui faixa de fracionamento de $10^4 - 4 \times 10^6$ para proteínas globulares e de $10^4 - 1 \times 10^6$ para polissacarídeos. A coluna de vidro utilizada (55 x 2 cm) apresentava volume do leito de 170 mL e volume morto de 64 mL, detectado pela eluição de Blue Dextran.

Preparo da amostra: uma alíquota da Fração 50-70%, obtida pelo fracionamento do Extrato Bruto com sulfato de amônio, foi ressuspensa em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,2, chegando à concentração 1,4 mg/mL de material total. Em cada corrida foram aplicados 4 mL da amostra, contendo aproximadamente 2 mg de proteína e 0,45 mg de carboidrato, que foram centrifugados antes da aplicação na coluna para retirada de possíveis precipitados.

Procedimento: a coluna foi equilibrada com tampão fosfato de potássio e mantida em fluxo contínuo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. A corrida ocorreu em temperatura ambiente e as frações coletadas (4 mL) foram sendo transferidas sucessivamente a temperatura de 4°C . Cada fração foi lida a 280 nm em espectrofotômetro para detecção de proteínas e, na primeira corrida, as frações foram dosadas, em triplicatas, pelo método do fenol-sulfúrico.

Após a determinação do perfil de eluição, as frações referentes a picos distintos foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas. Foram obtidas três frações protéicas, sendo que somente a eluída no volume morto apresentou alto teor de açúcar, com pico coincidente ao de proteína, foi denominada **Fração 6B-I**.

3.4.2 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Sepharose (Fast Flow)

Características da coluna: DEAE - Sepharose FF é um gel trocador aniônico fraco, muito estável que permite trabalhar em alto fluxo de eluição. A coluna de vidro utilizada (54 x 2 cm) apresentava volume de 172 mL.

Preparo da amostra: a Fração 6B - I foi liofilizada e ressuspensa em tampão fosfato. Em cada corrida foram aplicados 4 mL da amostra contendo aproximadamente 2 mg de proteína e 0,3 mg de carboidrato.

Procedimento: a coluna devidamente empacotada foi equilibrada com tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2. As corridas foram realizadas num fluxo de 2 mL.min⁻¹. As frações coletadas (4 mL) foram eluídas com gradiente linear de solução de NaCl 0,2 a 0,4 M em tampão fosfato de potássio, na temperatura ambiente; foram monitoradas pela leitura em 280 nm, após o que foram individualmente dialisadas na temperatura de 4°C e liofilizadas. Numa primeira corrida, utilizada como teste, cada liofilizado foi ressuspensa em 0,5 mL de água destilada e ensaiado pelo método do fenol-sulfúrico; nas corridas seguintes, a determinação de carboidrato ocorreu apenas em três frações escolhidas, mostrando a posição do pico de carboidrato.

Neste processo foi possível separar 4 frações protéicas, sendo que apenas uma apresentou pico coincidente para carboidrato e proteína, sendo eluído com aproximadamente NaCl 0,35 M. Esta fração denominada **DEAE - PP** (pico principal) foi reunida, dialisada contra água destilada e liofilizada.

3.4.3 Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sepharose CL-2B

Características da coluna: o gel de Sepharose CL-2B contém 2% de agarose. Permite a separação de proteínas globulares numa faixa de 7×10^4 a 4×10^7 e de polissacarídeos entre 1×10^5 e 2×10^7 . Foi montado em coluna de vidro (33,5 x 1,6 cm) com volume de 67 mL. O volume morto teórico correspondeu a aproximadamente 22 ml ou 33% do volume total do leito.

Procedimento: a homogeneidade da Fração DEAE-PP foi testada pela aplicação de 57 μ g de proteína e 11 μ g de carboidrato em 0,8 mL. A coluna foi equilibrada e as frações, eluídas com tampão fosfato de potássio num fluxo de 1 mL.min.⁻¹. Foram coletadas frações de 2 mL, monitoradas em 280 nm. Numa primeira corrida, as frações foram dializadas e liofilizadas individualmente para dosagem de carboidrato em cada uma delas, numa outra corrida, as frações correspondentes ao pico único foram reunidas, dialisadas e liofilizadas para dosagens de proteína e carboidrato.

3.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As análises eletroforéticas foram realizados em sistema "Phast system" (Pharmacia), utilizando Phast-Gel gradiente 4-15% de poliacrilamida. Este gel é designado para separação de proteínas de alto peso molecular. Tem uma zona de gel concentrador de 13 mm a 4,5% e uma zona de 32 mm de gradiente contínuo de poliacrilamida 5 a 15%. O sistema de tampão do gel é de acetato 0,112M;

Tris 0,112 M, pH 6,4. As tiras de tampão são feitas em agarose 3% e contém tricina 0,2M, Tris 0,2M, SDS 0,55%, pH 8,1.

Preparo das amostras: liofilizado da Fração DEAE-PP, contendo 20 µg de proteína e aproximadamente 4 µg de carboidrato foi ressuspenso em 25 µl de tampão de amostra (Tris/HCl 10mM; EDTA 1mM; pH 8,0; SDS 2,5%; 2-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,01%) e aquecido a 100°C, em banho-maria, por 5 minutos. Foram aplicados 4 µL de amostra em cada poço. Os marcadores de peso molecular (Sigma, MW-SDS-200 Kit) foram preparados da mesma forma e variavam de 29.000 a 205.000.

Condições de corrida: seguiram programação indicada pelo fabricante (Separation Technique File N. 130).

Os géis seguiram três métodos de coloração, visando a detecção de proteínas livres e/ou glicosiladas.

Coloração com Nitrato de Prata: foi realizada automaticamente no aparelho, seguindo instruções do fabricante (Development Technique File N. 210). A sensibilidade desta técnica é de 0,3 a 0,5 ng de proteína por banda.

Coloração com Coomassie Blue: coloração feita em solução contendo 0,02% Phast Gel Blue R em metanol 30% e ácido acético 10% em água destilada e descoloração feita em solução metanol 30% e ácido acético 10% em água destilada. A sensibilidade desta técnica é de aproximadamente 20 a 30 ng de proteína por banda.

Coloração pelo Método Ácido Periódico - Schiff (PAS): é um método específico para coloração de carboidrato, utilizado com grande eficiência na coloração de glicoproteínas. A sensibilidade da técnica é de aproximadamente 50 ng de carboidrato por banda. A técnica descrita por Carlsson (1993) consiste em: incubação do gel por 2 horas em solução ácido acético:metanol:água (10:35:55); incubação em solução de periodato (0,7% de ácido periódico em ácido acético 5%). Troca para solução de *meta*-bissulfito de sódio 0,2% em ácido acético 5% e, por fim, incubação em reagente de Schiff por até duas horas, no escuro, a 4°C.

Após a coloração, independentemente da técnica, os géis foram submersos em glicerol 10% em água destilada e então deixados secar espontaneamente na temperatura ambiente.

3.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS POR CROMATO- GRAFIA LÍQUIDA GASOSA (GLC)

3.6.1 Derivatização e Análise de Açúcares Neutros

Preparo da amostra: uma amostra de cada fração obtida após cada etapa de purificação, contendo de 10-800 µg de carboidrato, livre de sal, foi liofilizada em tubo de hidrólise.

Hidrólise: a hidrólise ácida foi feita pela adição de 500µl de TFA 2M à amostra seca, o tubo foi selado após jato de nitrogênio e aquecido a 100°C por 8

horas. O ácido foi então removido pela evaporação sob pressão reduzida, seguida da adição de 500µl de água deionizada e nova evaporação. Este procedimento foi repetido 5 vezes.

Redução: o hidrolisado foi dissolvido em 500µl de água deionizada e 10-50 µg de mio-inositol foram adicionados a cada amostra como padrão interno (MERKLE e POPPE, 1994). Foi adicionado boroidreto de sódio (WOLFROM e THOMPSON, 1963b) até pH alcalino e a mistura permaneceu em repouso por 4 horas na temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C (Fox *et al.*, 1990). A solução foi neutralizada pela adição de ácido acético 1M e evaporada até *secura*. O ácido bórico formado neste processo foi removido pela adição sucessiva de metanol seguida de evaporação (SLONECKER, 1972).

Acetilação: foi feita pela adição de 0,5 mL de anidrido acético e 0,5 mL de piridina. A reação foi acelerada à 100°C por 1 hora ou mantida *overnight* na temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). O processo de acetilação foi interrompido pela adição de gelo ao sistema. Os alditóis acetilados foram extraídos com clorofórmio (1 mL) e a fase aquosa foi removida com auxílio de uma pipeta Pasteur. A piridina residual na fase clorofórmica foi removida mediante sucessivas adições de solução de sulfato de cobre 2%. Por fim, a fração clorofórmica foi transferida para um tubo de hemólise e seca por evaporação espontânea.

Padrões: foi usada como padrão uma mistura contendo 1mg/mL de cada um dos seguintes monossacarídeos: D-manose; D-arabinose; α-L-ramnose; glucose anidra; α-L-fucose; D-xilose; D-galactose. A redução e acetilação desta mistura ocorreu como nas amostras.

Análise por GC-MS: foi realizada em coluna WCOT, OV-225 capilar com 30m x 0,25 mm. Temperatura do injetor a 250°C. Temperatura inicial: 50°C por um minuto, com aceleração de 4°C/min. até 220°C. Tempo de corrida de 25 minutos.

3.6.2 Derivatização e Análise de Açúcares Aminados

A derivatização de açúcares aminados difere do tratamento dado a açúcares neutros apenas nas condições de hidrólise ácida e de corrida no cromatógrafo. As modificações estão descritas a seguir:

Hidrólise: foi feita pela adição de 500µl de HCl 4M à amostra seca. O tubo foi selado após jato de nitrogênio e aquecido a 100°C por 6 horas (BIERMANN, 1990).

Padrão: foi utilizada uma mistura contendo 1 mg/mL: hidrocloreto de D-glucosamina; hidrocloreto de D-manosamina; *N*-acetil-D-galactosamina.

Análise por GC-MS: Coluna COAT DB-210 capilar com 30m x 0,25 mm, d.i. Condição de corrida igual à anterior, porém com 55 minutos de duração.

3.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Uma amostra correspondendo à Fração DEAE-PP, obtida após cromatografia de troca iônica, com 20 µg de proteína e aproximadamente 4µg de carboidrato foi analisada quanto à composição qualitativa de aminoácidos. A amostra foi submetida à hidrólise (HCl 6M; 160°C por 1h), após o que foi seca e ressuspensa em 150 µl de tampão. A análise foi feita pela injeção de 50 µL num analisador automático de aminoácidos .

3.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA GLICOPROTEÍNA: ENSAIO COM ERITRÓCITOS HUMANOS

3.8.1 Suspensão de Eritrócitos Humanos

Sangue humano, coletados no dia anterior, foram doados pelo Laboratório de Patologia Clínica de Curitiba - Santa Casa de Misericórdia. As hemácias foram lavadas com solução de NaCl 150 mM e centrifugadas a 200 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido três vezes. Uma suspensão de hemácias (1:10 v/v) em NaCl 150 mM foi preparada a fim de se obter uma concentração de aproximadamente $9,5 \times 10^6$ células/ mL.

3.8.2 Reação de Hemaglutinação

A atividade hemaglutinante foi testada de acordo com método padronizado por Duarte (1980). Foram preparadas diluições seriadas das frações obtidas

em cada estágio de purificação em solução de NaCl 150 mM. Os ensaios foram realizados na temperatura ambiente, por macrotécnica, em tubos de hemólise, colocando-se 0,1 mL de solução de NaCl 150 mM; 0,1 mL de solução de proteína e 0,02 mL de suspensão de eritrócitos humanos (grupos A, B, AB e O).

As leituras das reações foram realizadas após 1 e 3 horas do preparo do sistema e a aglutinação foi visualizada a olho nu. A concentração mínima (maior diluição da proteína) foi considerada como título final.

O fator hemaglutinante foi determinado, dividindo-se o inverso do título de hemaglutinação pela mínima quantidade de proteína capaz de promover tal aglutinação (SAMPAIO FILHO, 1973). O título de hemaglutinação é conceituado como sendo o número que corresponde à maior diluição em que se obtém uma aglutinação máxima, com uma determinada amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS GLICOPROTEÍNAS DE *Dictyonema glabratum*

O isolamento de glicoproteínas e sua caracterização quanto à estrutura química, assim como suas propriedades físicas e biológicas são essenciais para o entendimento da função destes compostos. As glicoproteínas são geralmente isoladas e purificadas pelas técnicas utilizadas em química de proteínas, com todos os esforços para obtenção de um material no estado nativo, não desnaturado, ainda que a glicosilação possa representar uma dificuldade a mais em todo processo (GERARD, 1990).

A preparação do extrato é um dos passos mais críticos, pois determina o rendimento e a qualidade da preparação protéica. Por essa razão, muita atenção deve ser dada na escolha do método de rompimento celular, tempo de extração, volume e tipo de solução na qual o material será suspenso (CULL e MCHENRY, 1990).

Muitos procedimentos já foram descritos e, em alguns deles, estão delineados cuidados específicos que devem ser tomados ao se trabalhar com um grupo ou outro de organismos, como procariontes, plantas, microrganismos e eucariontes superiores (SCOPES, 1987; CULL e MCHENRY, 1990). Os líquens diferem de todos estes pois consistem na associação de dois organismos, um fungo e uma alga, com diferenças anatômicas, morfológicas e metabólicas, além de apresentar, como no caso do *D. glabratum*, talos com textura semelhante a de tecido vegetal. Estes seres ainda são pouco estudados quanto à sua constituição química (Gorin *et al.*, 1993), conseqüentemente, existem poucos relatos e estudos a

respeito da obtenção de extratos glicoprotéicos liquênicos para subsequente purificação (PEREZ-URRIA *et al.*, 1989; PLANELLES e LEGAZ, 1987).

4.1.1 Estudos Preliminares

Esta etapa do trabalho envolve a sequência de estudos realizados com o objetivo de otimizar uma metodologia para obtenção do extrato protéico, tomando como modelo alguns protocolos descritos na literatura.

4.1.1.1 Escolha da Faixa de Fracionamento com Sulfato de Amônio

O método de precipitação com sulfato de amônio ("salting out") é o mais utilizado para precipitação de proteínas. Dentre as suas maiores vantagens estão: a propriedade de conferir molaridade suficientemente alta para a precipitação da maioria das proteínas; impedir ou limitar o crescimento de microrganismos; e, em solução, proteger muitas proteínas da desnaturação (ENGLARD e SEIFTER, 1990).

No presente trabalho, o primeiro protocolo testado foi descrito por Kawagishi *et al* (1994). Neste, talos liquênicos foram extraídos primeiramente com acetona por 24 horas a 4°C e depois com solução de NaCl 150 mM por 16 horas, na mesma temperatura. O extrato resultante, foi fracionado com sulfato de amônio e as frações obtidas foram dosadas para proteína e carboidrato. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Fracionamento do extrato salino de *D. glabratum* por precipitação com sulfato de amônio. Determinação de proteínas feita por detecção a 280 nm e de carboidratos pelo método do fenol-sulfúrico.

| Fração | Proteína % | Carboidrato % |
|---------|---------------|------------------|
| 0-30% | 6 | 2 |
| 30-40% | 6 | 1 |
| 40-50% | 8 | 1 |
| 50-60% | 20 | 0.3 |
| 60-70% | 24 | 0.7 |
| 70-80% | 4 | 0.2 |
| 80-90% | 7 | 0.4 |
| 90-100% | 2 | 0.1 |

A Tabela mostra que a maioria das proteínas do extrato precipitaram nas faixas de 50-60% e 60-70 % de saturação, correspondendo respectivamente a 20 e 24% da massa total dessas frações. A faixa de fracionamento com sulfato de amônio varia muito entre as preparações protéicas, pois depende da hidrofobicidade das moléculas em suspensão; quanto mais hidrofóbica a superfície molecular, menor quantidade de sal será necessária para fazê-la precipitar (Englard e Seiffter, 1990). De modo geral, a grande maioria das (glico)proteínas precipita em intervalos entre 30 e 80% de saturação.

Um inconveniente apresentado por esta extração foi a presença de cor forte variando do azul até o salmão em todas as frações, com exceção da 0-30%

sulfato de amônio e gel filtração em coluna (metodologia não descrita), indicando a presença de pigmentos fortemente ligados. A dosagem de carboidratos relativamente baixa talvez possa ser explicada pela interferência dessa pigmentação, uma vez que a dosagem foi feita através de um método colorimétrico. Por outro lado, não é provável que esta mesma interferência tenha ocorrido nas dosagens protéicas, realizadas pela leitura direta em U.V.

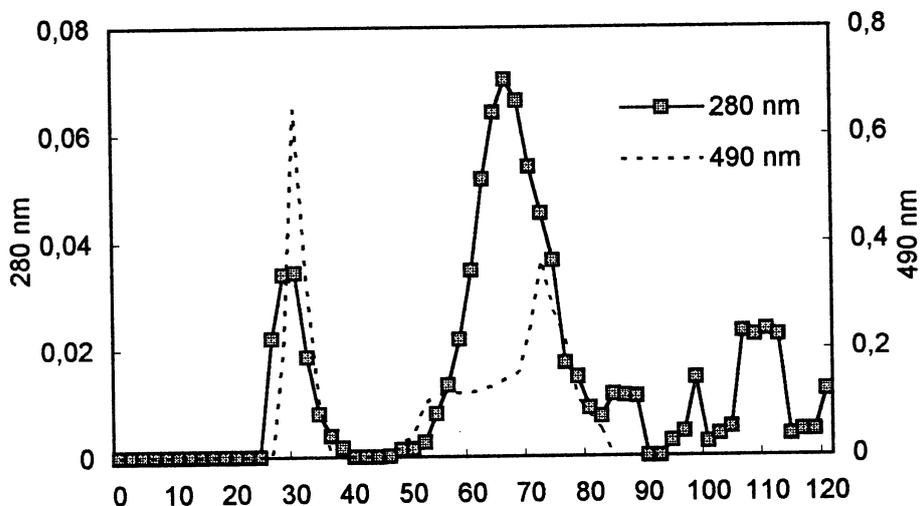
Na tentativa de retirar os pigmentos do extrato, a acetona foi substituída por duas misturas de solventes: clorofórmio-metanol (2:1, v/v) e acetona-metanol-acetato de etila-clorofórmio (4:1:1:2, v/v/v/v), no entanto não houve melhora significativa e por essa razão partiu-se para outro método de extração.

4.1.1.2 Escolha do Método de Extração

O método seguinte foi proposto por Petit (1982), onde os talos liquênicos recém coletados foram homogeneizados e extraídos por 48 horas com NaCl 200 mM em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,2. Após troca para tampão fosfato 10 mM através de diálise, a suspensão foi submetida a precipitação com sulfato de amônio a 50-60% e 60-70% de saturação. Estas frações foram dosadas para proteína e carboidrato e submetidas a gel filtração em coluna de Sepharose 6B, para comparação de seu comportamento e escolha da fração a ser purificada. Os resultados são mostrados na Figura 4.1.

A) Fração 50-60%

Proteína - 10 mg
Carboidrato - 3,2 mg



B) Fração 60-70%

Proteína - 16 mg
Carboidrato - 3,1 mg

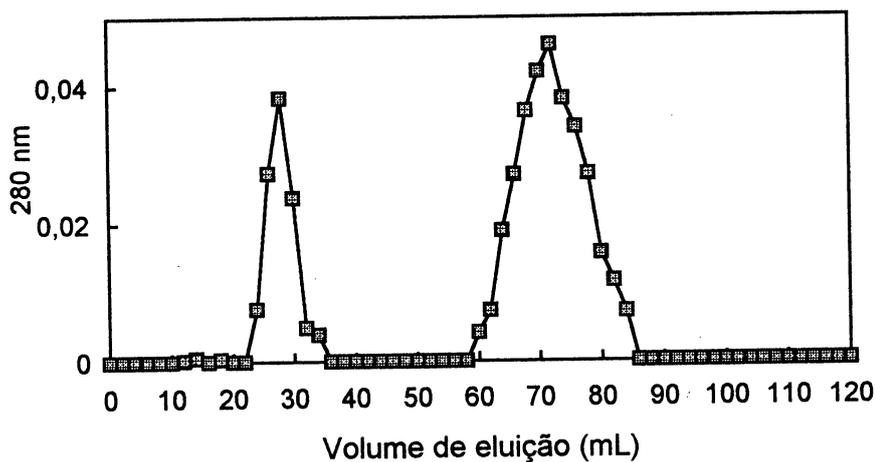


Figura 4.1: Dosagem de proteína e carboidrato das Frações 50-60% (A) e 60-70% (B) a partir da extração de 5g de líquen com NaCl, seguida de fracionamento com sulfato de amônio. Sob estes valores, é mostrado o perfil de eluição de 0,8 mg de cada fração em coluna de Sepharose 6B com tampão fosfato 100 mM pH 7,2. Detecção de proteínas a 280 nm (A e B) e carboidrato a 490 nm (A).

Observa-se que as duas frações apresentam rendimento de proteína e carboidrato próximos, além de perfil de eluição idêntico para as proteínas dos picos principais. Assim, finalmente, decidiu-se reunir as duas frações e adotar a condição de precipitação por sulfato de amônio na faixa de 50-70% de saturação.

Na tentativa de repetir as condições de extração descritas acima, utilizou-se uma amostra de líquens mantida por 60 dias na temperatura de -20°C . No entanto, a Figura 4.2 mostra que o conteúdo de proteínas e carboidrato recuperados na fração precipitada com sulfato de amônio a 50-70% de saturação (14 mg), caiu praticamente à metade do encontrado na extração anterior (10 e 16 mg; Figura 4.1), se considerarmos que estes últimos devem ser somados para corresponderem a uma faixa de fracionamento equivalente. A mesma figura apresenta o perfil cromatográfico dessa fração em Sepharose 6B indicando um decréscimo muito acentuado de proteínas de alto peso molecular.

A explicação mais provável para a diferença nos resultados, seria a degradação pelo ataque de proteases durante o período de armazenamento. Segundo Scopes (1987), no primeiro momento do congelamento, os cristais de gelo formados destroem membranas e organelas, mas normalmente não afetam diretamente as proteínas. Em temperaturas entre -15 e -25°C , proteases liberadas dos lisossomos podem atuar, vagarosamente devido à baixa temperatura, causando danos no material armazenado por algumas semanas.

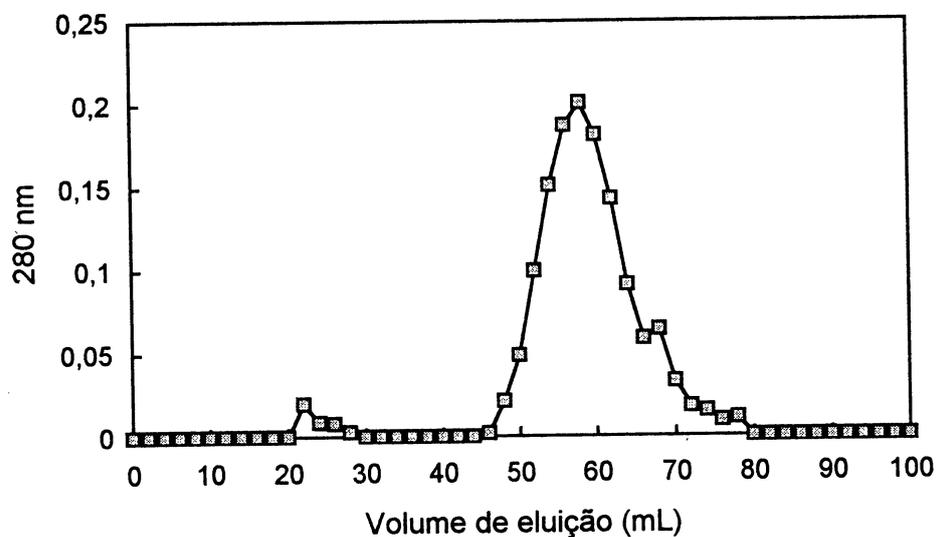


Figura 4.2: Perfil de eluição, em coluna de Sepharose 6B, de 1,5 g da fração precipitada com sulfato de amônio, na faixa de 50-70% de saturação, após extração de 5 g de talos liquênicos armazenados por 60 dias a -20°C . Detecção de proteína a 280 nm. Acima, as dosagens de proteína e carboidrato recuperados após a precipitação.

Como no estudo de líquens, assim como de vegetais e fungos macroscópicos, é interessante a utilização de material biológico oriundo de um mesma coleta, que diminui as diferenças marcantes na composição e proteínas e carboidratos provocados, além de outros fatores, pela sazonalidade, idade do material e condições climáticas, o congelamento é muitas vezes necessário. O congelamento ideal deve ocorrer rapidamente e o material, de preferência, deve ser armazenado em temperatura abaixo de -25°C (SCOPES, 1987).

Aparentemente, a reutilização de líquens frescos seria suficiente para a obtenção de resultado semelhante ao apresentado na Figura 4.1, mesmo assim, decidiu-se utilizar um coquetel de inibidores de proteases durante o período de extração de 48 horas, que é relativamente prolongado, com o objetivo de reduzir ou mesmo eliminar a degradação pela ação dessas enzimas durante este procedimento experimental.

Os inibidores de proteases utilizados no coquetel foram: iodoacetamida que reduz pontes dissulfeto, inibindo enzimas que necessitam destas ligações para manutenção de sua conformação ativa; PMSF, inibidor de serina proteases e EDTA, inibidor de metaloproteases.

4.1.2 Procedimento Final

Nesta etapa, foram realizados os procedimentos para a extração e fracionamento de glicoproteínas visando sua subsequente purificação de caracterização. A metodologia escolhida se baseou nos resultados e observações obtidos durante os estudos preliminares.

A Tabela 4.2 mostra a massa e as dosagens de todas as frações obtidas durante a extração e fracionamento de *D. glabratum* pelo procedimento escolhido após a conclusão dos estudos preliminares.

Os valores apresentados para o Extrato Bruto foram calculados a partir de uma alíquota de 40 mL, retiradas antes do tratamento com sulfato de amônio. A massa do Sobrenadante Final não pôde ser estimada devido à grande quantidade de sal neste material. As dosagens de proteínas e carboidrato estão apresentados na forma de massa total e porcentagem em relação à massa da fração e em relação ao extrato bruto.

Tabela 4.2: Conteúdo de proteína e carboidrato total do Extrato Bruto, das frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio e do Sobrenadante Final.

| Fração | Massa (mg) | Proteína | | | Carboidrato | | |
|----------|------------|------------|------------------------|-------------------------|-------------|------------------------|-------------------------|
| | | Total (mg) | Amostra % [#] | E. Bruto % ⁺ | Total (mg) | Amostra % [#] | E. Bruto % ⁺ |
| E. Bruto | 1060 | 235,3 | 22 | 100 | 286,0 | 27 | 100 |
| 0-50% | 360 | 31,8 | 9 | 14 | 33,4 | 9 | 12 |
| 50-70% | 346 | 123,0 | 36 | 52 | 26,4 | 8 | 9 |
| 70-100% | 468 | 69,0 | 15 | 29 | 28,0 | 6 | 10 |
| S. Final | n.d. | — | — | — | 209,0 | n.d. | 73 |

[#]Porcentagem na amostra.

⁺ Porcentagem em relação ao extrato bruto.

n.d.: não determinado

—: não detectado

A tabela mostra que uma grande quantidade de carboidrato é extraída, maior do que a quantidade de proteínas. No entanto, após precipitação com sulfato de amônio, a maior parte do carboidrato permaneceu no Sobrenadante Final (73%), possivelmente correspondendo às cadeias livres, enquanto que todas as proteínas precipitaram ao longo das etapas do fracionamento, não restando conteúdo detectável no Sobrenadante Final. As cadeias de açúcar detectadas nas frações precipitadas devem estar associadas às de polipeptídeos.

A massa de cada fração foi obtida após diálise exaustiva para eliminação completa do sulfato de amônio seguida de liofilização. Entretanto, é provável que a diálise não tenha sido totalmente eficiente na eliminação do sal, uma vez que a soma da massa de todas as frações é maior do que a do Extrato Bruto. Esse valor superestimado compromete ainda o cálculo das porcentagens relativas de proteínas e carboidrato das frações.

A Fração 50-70%, contendo o maior teor de proteínas, porém com o menor conteúdo de carboidrato dentre todas as frações foi selecionado para dar prosseguimento ao processo de purificação.

4.2 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO “50-70% POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

As técnicas de cromatografia em colunas têm sido usadas nas mais diversas combinações na purificação de glicoproteínas, que incluem a cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Além destas, cromatografias de afinidade

utilizando lectinas de origem vegetal mobilizadas têm sido cada vez mais utilizadas em associação aos demais métodos citados (GERARD, 1990).

4.2.1 Cromatografia de Gel Filtração em Coluna de Sepharose CL-6B

A filtração em gel é a única técnica cromatográfica cujo fracionamento é baseado no tamanho relativo das moléculas protéicas e tem como resultado a eluição das proteínas em ordem decrescente de seu peso molecular (STELLWAGEN, 1990).

Com base nos resultados cromatográficos obtidos nos estudos preliminares deste trabalho (Figura 4.1 A), que mostraram eluição coincidente para proteína e carboidrato em coluna de filtração em gel de Sepharose 6B decidiu-se utilizar o gel Sepharose CL-6B como procedimento inicial de purificação. Os dois géis citados contêm as mesmas características de fracionamento, porém o segundo, CL-6B, apresenta um suporte mais estável a variações de pH e de força iônica, além de permitir fluxo de eluição mais rápido.

A Fração 50-70% obtida no item 4.1.2 foi cromatografada, conforme descrito em Materiais e Métodos. A Figura 4.3 mostra o perfil de eluição onde se observa três frações protéicas, denominadas: **6B-I**, eluída no volume morto da coluna e com pico coincidente para açúcar; **6B-II**, eluída no volume de 160 mL e com baixo teor de açúcar; e por fim, **6B-III**, eluída em 220 mL e livre de açúcar.

A fração 6B-I foi selecionada por conter a maior concentração de carboidrato, ainda que esta tenha sido eluída no volume morto da coluna, apresentando

portanto peso molecular superior a 1.000.000. Decidiu-se por manter este procedimento como etapa inicial de purificação, considerando o isolamento da fração de interesse em relação às outras, com menor grau de glicosilação e peso molecular menor.

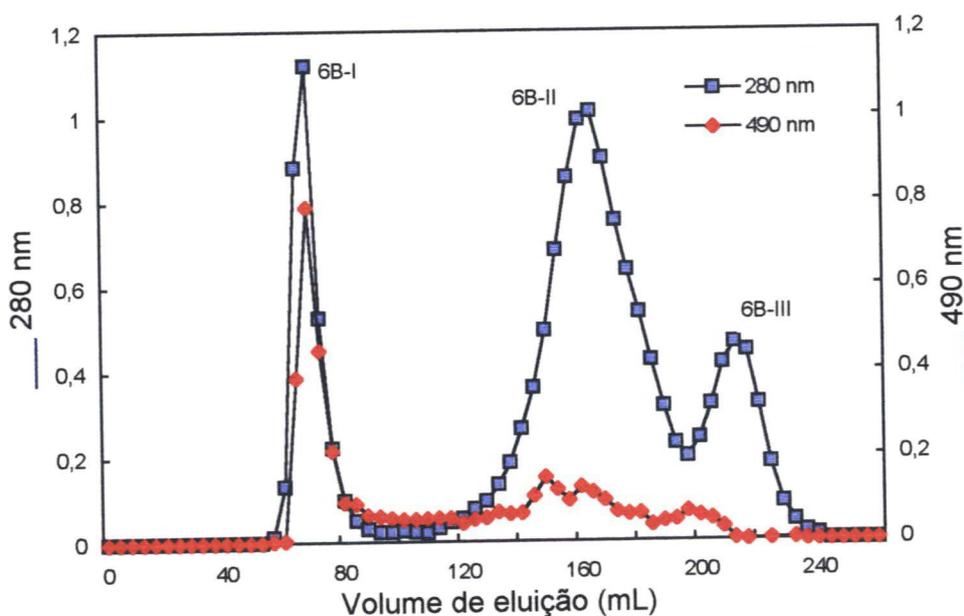


Figura 4.3: Perfil de eluição da fração obtida pela precipitação do extrato bruto na faixa de 50-70% de saturação de sulfato de amônio em coluna de Sepharose CL-6B (55 x 2 cm). Total de proteína aplicado: 2 mg; fluxo: 1 ml/min.; eluente: tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,2. Proteínas detectadas a 280 nm e carboidrato pelo método do fenol-sulfúrico, com leitura a 490 nm.

4.2.2 Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Sepharose

A cromatografia de troca iônica, técnica escolhida como etapa seguinte de purificação, se baseia na ligação das proteínas aos grupos carregados do gel através de forças eletrostáticas (ROSSOMANDO, 1990)

A Fração 6B-I, obtida na cromatografia de gel filtração, foi fracionada em coluna de troca aniônica DEAE-Sepharose. A Figura 4.4 mostra o perfil de eluição desta fração em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,2 associado a um gradiente de NaCl 0,2 a 0,4 M, onde somente uma fração protéica, eluída na concentração de NaCl 0,35 M, apresentou perfil coincidente na eluição de carboidrato. Este material foi denominado DEAE-PP (Pico Principal).

O alto peso molecular desta fração e a necessidade de NaCl naquela concentração para sua eluição da coluna, sugere que esta fração glicoprotéica apresente densidade de carga negativa relativamente alta

4.2.3 Cromatografia de Filtração em Gel em Coluna de Sepharose CL-2B

Para verificar sua homogeneidade e ter maiores informações a respeito de seu peso molecular, a Fração DEAE-PP foi submetida a cromatografia em Sepharose CL-2B e o perfil de eluição está mostrado na Figura 4.5.

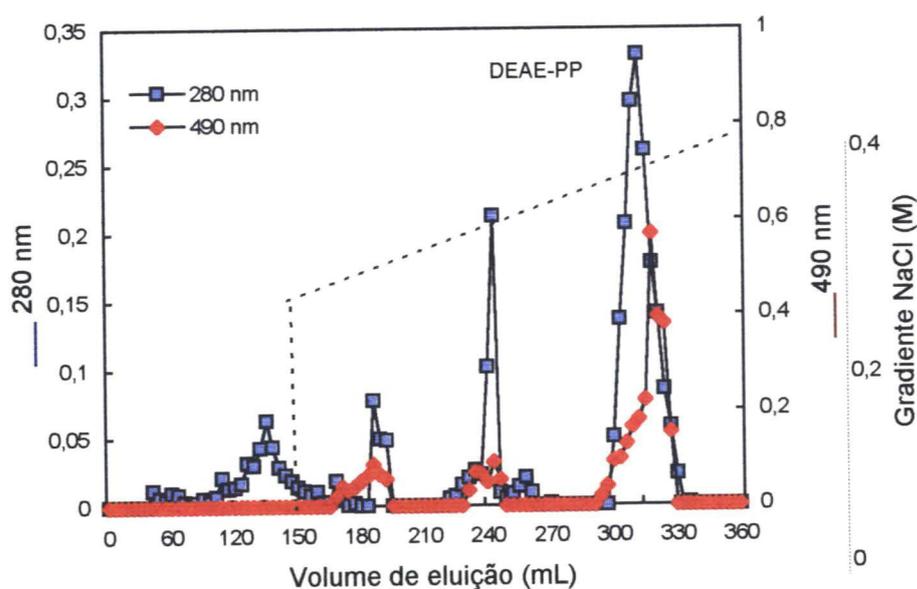


Figura 4.4: Perfil de eluição da fração 6B-I em coluna de DEAE-Sepharose. Total de proteína aplicado: 2 mg; fluxo: 2 ml/min.; eluente: tampão fosfato de potássio 100 mM associado a gradiente linear de NaCl de 0,2 a 0,4 M (---). Proteína: leitura a 280 nm e carboidrato: detecção a 490 nm.

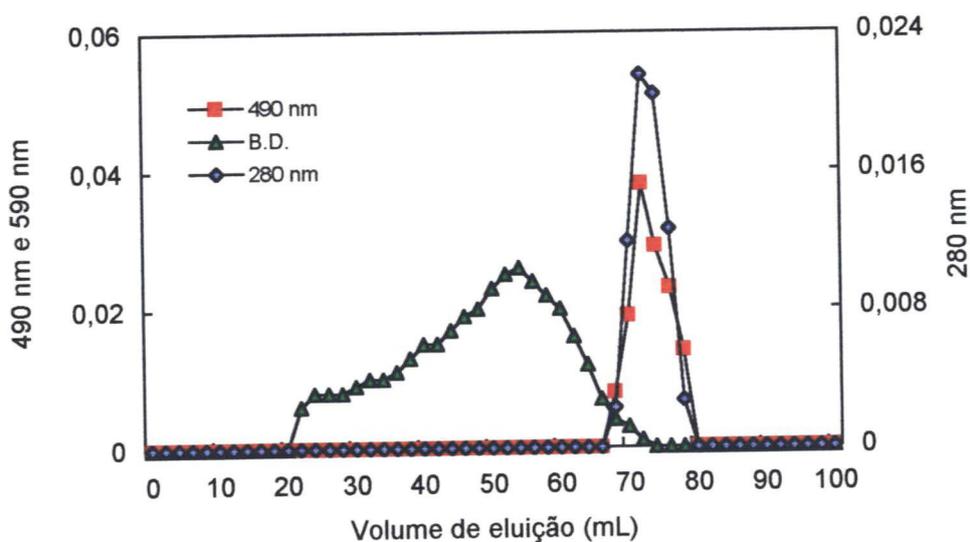


Figura 4.5: Perfil de eluição da fração DEAE-PP em coluna de Sepharose CL-2B. Total de proteína aplicado: 0,048 mg; fluxo: 1 mL/min.; eluente: tampão fosfato 100 mM. Proteínas detectadas a 280 nm, carboidrato da fração detectado pelo método do fenol-sulfúrico e Blue Dextran (B.D.) por leitura a 590 nm.

A figura mostra que o material eluiu num único pico, correspondendo a uma fração glicoprotéica homogênea. É mostrado também o perfil de eluição do Blue Dextran que possui massa molecular de 2.000 KDa, eluindo próximo à amostra, indicando que esta apresenta massa molecular elevada, podendo estar num forte estado de agregação intermolecular.

Nos três procedimentos cromatográficos apresentados, foram selecionadas frações que mostravam pico coincidente para proteína e carboidrato, como indicativo da glicosilação das proteínas. Observa-se que o perfil de eluição de carboidratos se mostrou deslocado em relação ao de proteína. Tal resultado poderia ser causado pela polidispersão provocada pela microheterogeneidade das cadeias de açúcar.

A Tabela 4.3 apresenta o teor de proteína e carboidrato após cada tratamento sofrido pelo Extrato Bruto. Como já discutido anteriormente, o processo de extração recuperou mais carboidrato do que proteína, mas após o fracionamento com sulfato de amônio, esta relação se inverteu, mantendo-se praticamente a mesma após as etapas cromatográficas, indicando o isolamento de uma fração glicoprotéica. O conteúdo protéico caiu consideravelmente em todos os processos, resultando num rendimento final de 1,6%. A Fração 2B (Sephrose 2B) não foi registrada pois não foi considerada como uma etapa de purificação.

Tabela 4.3: Teor de proteína e carboidrato, em porcentagem, do Extrato Bruto, após fracionamento com sulfato de amônio e procedimentos cromatográficos. Conteúdo de proteína recuperado em cada uma dessas etapas, estimados em massa total e rendimento em relação ao Extrato Bruto.

| Fração | Proteína + Carboidrato | | Rendimento | |
|---------------|------------------------|-----------------|---------------|---------------|
| | Proteína (%) | Carboidrato (%) | Proteína (mg) | Proteína (%)* |
| Extrato Bruto | 45 | 55 | 235 | 100 |
| 50-70% | 83 | 17 | 123 | 52 |
| 6B-I | 87 | 13 | 23 | 10 |
| DEAE-PP | 86 | 14 | 3,7 | 1,6 |
| 2B | 87 | 13 | — | — |

* recuperação das proteínas em relação ao extrato bruto.
 Dosagem de proteína pelo método de Bradford e de carboidrato pelo método do fenol-sulfúrico

4.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para confirmar o comportamento homogêneo da fração glicoprotéica apresentado pela cromatografia em Sepharose CL-2B, a fração DEAE-PP foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

SDS-PAGE consiste numa técnica analítica de separação de alta resolução, onde as proteínas são separadas de acordo com seu tamanho, uma vez que o tratamento com SDS resulta em proteínas com a mesma densidade de carga superficial, facilitando a estimativa do peso molecular (HAMES, 1990).

Nos primeiros ensaios eletroforéticos foi verificado que, após a adição do tampão de amostra, contendo SDS, formava-se um precipitado leitoso que se desfazia somente enquanto a amostra permanecia em alta temperatura (até 60°C), o que praticamente impedia a sua aplicação no gel. Foi verificado que este comportamento se tratava da precipitação do SDS na presença de potássio, proveniente do tampão utilizado durante todo estudo das glicoproteínas, mesmo após diálise exaustiva contra água destilada. Assim, todo processo de extração e purificação foi repetido trocando o tampão fosfato de potássio por fosfato de sódio. A troca não alterou as dosagens nem os perfis cromatográficos e evitou a precipitação com o SDS.

A Figura 4.6 mostra, que a fração analisada corresponde a um composto homogêneo de alto peso molecular, consistente com o resultado apresentado pela cromatografia. O gel gradiente utilizado permite a separação de proteínas de até 1.000 KDa.

No gel corado com nitrato de prata (4.6-A), a maior parte do material permaneceu na origem, sem ao menos entrar no gel, enquanto que apenas uma banda é percebida no início do gel separador, da mesma forma que o marcador de peso molecular igual a 205.000. O gel corado com Coomassie Blue (4.6-B-CB) apresentou uma fraca coloração apenas no poço de aplicação. A mesma região foi revelada pela coloração com PAS (4.6 B-PAS), apresentando forte coloração vermelha, sugerindo que a fração protéica retida no gel esteja fortemente glicosilada.

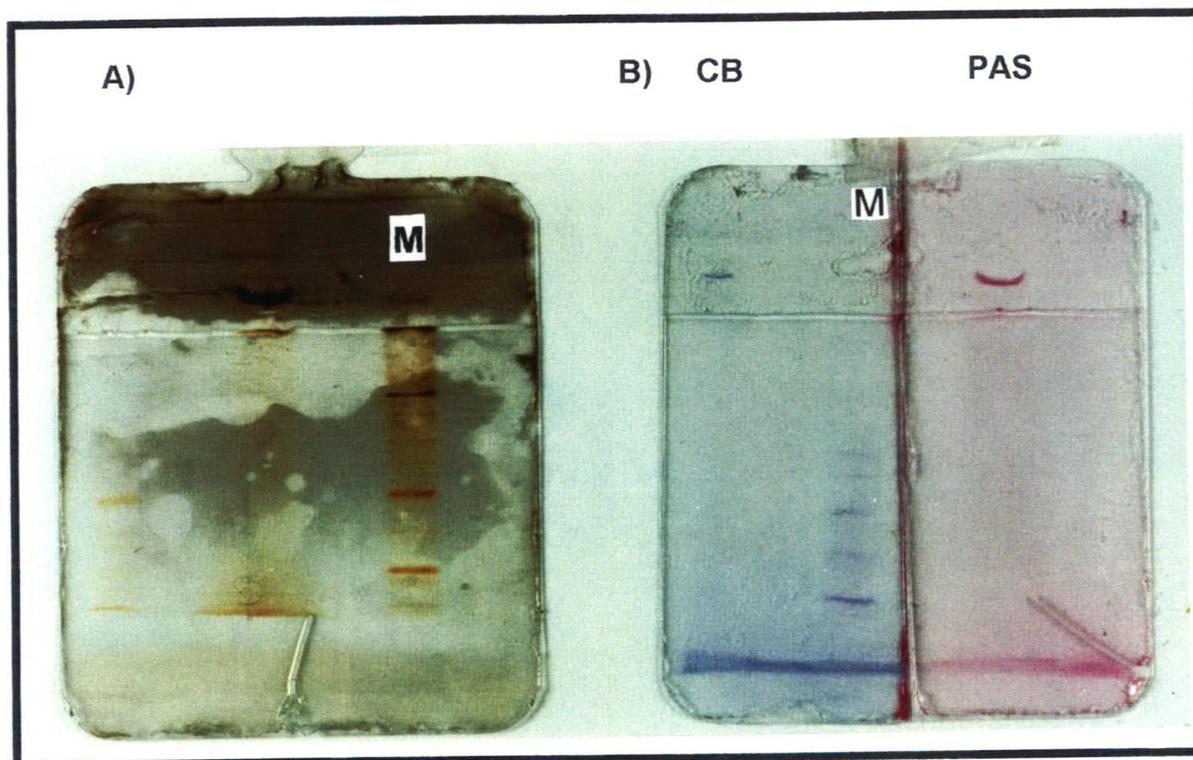


Figura 4.6: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (4-15%) da Fração DE-AE-PP. Em cada poço, foram aplicados 3 μg de amostra. Os géis foram corados com A) Prata; B) Coomassie Blue (CB) e Periodato-Schiff (PAS). M: Marcadores de peso molecular.

O alto peso molecular da fração DEAE-PP pode ser devido à interações intermoleculares, resultando na formação de agregados, assim como a um componente semelhante a mucinas, glicoproteínas contendo ligações do tipo O-glicosídicas, presentes em secreções mucosas e glicocálix, que apresentam peso molecular aparente de aproximadamente 1×10^7 (Jentoft, 1990). Considerando o comportamento homogêneo desta fração por filtração em gel e SDS-PAGE, uma caracterização parcial das porções carboidrato e proteína é proposta a seguir.

4.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS POR GLC

Cromatografia líquida gasosa é uma técnica sensível na quantificação dos componentes de uma mistura de monossacarídeos. Para esta análise, é fundamental que as unidades de açúcar estejam na forma de derivados voláteis, onde a acetilação é uma das formas mais comuns de derivatização (Chaplin, 1994).

A Tabela 4.4 apresenta a composição, em porcentagem relativa, dos monossacarídeos nos vários estágios de purificação. Manose e glucose são os componentes majoritários em todas as frações, exceto pela DEAE-PP, onde glucose não foi detectada, o que era presumível, considerando que maioria das glicoproteínas não apresentam glucose nas suas cadeias oligossacarídicas. De fato, este monossacarídeo é encontrado como componente do precursor de oligossacarídeos dos tipos alta manose e complexo, sendo retirados após a ligação destes à cadeia peptídica (BERGER *et al.*, 1982).

A presença de manose como principal componente da fração glicoprotéica (56%), torna-se indicativo da presença de glicoproteína. As unidades de manose nas cadeias de oligossacarídeos de glicoproteínas, geralmente fazem parte do núcleo central das cadeias *N*-ligadas. Porém, foi relatada a presença de glicoproteínas ricas em manose na parede celular de leveduras podendo estar *O*-ligadas (Yamada *et al.*, 1983) ou *N*-ligadas (Tsai *et al.*, 1984).

A quantificação dos demais componentes mostra diferenças significativas durante a purificação. Fucose, galactose, xilose e arabinose também foram detectados no complexo purificado, sendo os três primeiros componentes relativamente comuns em glicoproteínas (SPIRO, 1970; DWEK *et al.*, 1993), enquanto existem apenas poucos relatos da presença de arabinose em glicoproteínas de animais inferiores (MEIKLE *et al.*, 1987; MOLCHANOVA *et al.*, 1985) e vegetais (GAMMON *et al.*, 1986).

Os monossacarídeos aminados também foram detectados, porém a separação de glucosamina e galactosamina não foi possível tanto na coluna DB-210 quanto na OV-225, nas condições de análise utilizadas, por essa razão a Tabela 4.4 traz apenas a indicação da presença destas unidades. Manosamina não foi detectada.

Tabela 4.4: Porcentagem relativa de monossacarídeos, analisada por GLC, em cada etapa de purificação..

| | Extrato Bruto | 50-70% | 6B-I | DEAE-PP |
|-------------|---------------|--------|------|---------|
| Fucose | 3,7 | 4,1 | 4,5 | 1,4 |
| Ramnose | 6,3 | 3,2 | 6,0 | — |
| Arabinose | 1,2 | 20,6 | 9,3 | 12,6 |
| Xilose | 3,1 | 15,4 | 9,4 | 20,6 |
| Manose | 28,6 | 24,9 | 20,3 | 56,8 |
| Galactose | 27,7 | 9,3 | 21,5 | 8,6 |
| Glucose | 29,4 | 22,5 | 29 | — |
| Hexosaminas | + | + | + | + |

+: presença de hexosaminas

4.5 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

A composição (razão molar entre os aminoácidos) oferece informações úteis a respeito das propriedades das glicoproteínas.

A Tabela 4.5 apresenta a composição de aminoácidos da Fração DEAE-PP após hidrólise ácida com HCl 6M por 1h a 160°C. Observa-se uma grande mistura de componentes, rica em glicina e ausência de histidina e ácido aspártico/asparagina. Os aminoácido cisteína, triptofano e metionina não foram detectados nas condições de análise.

A ausência de asparagina pode indicar a inexistência de ligações glicosídicas do tipo *N* na fração DEAE-PP. Por outro lado, serina (10,5%) e treonina

(7,2%), aminoácidos envolvidos nas ligações do tipo O-glicosídicas, apresentam teor relativamente baixo se comparado com algumas mucinas, como do coral *Acropora formosa* que apresenta na composição de seus aminoácidos, 77% destes aminoácidos (MEIKLE *et al.*, 1987), mas semelhante ao teor encontrado na glicoproteína purificada do líquen *Evernia prunastri*, onde somam 21,1% (PEREZ-URRIA *et al.*, 1989).

Embora as análises da composição dos componentes protéicos e glicídicos, presentes na fração glicoproteica purificada, possam sugerir o tipo de interação entre as porções carboidrato e proteína, conclusões finais só poderão ser obtidas após uma investigação mais aprofundada. Métodos químicos e enzimáticos podem ser utilizados para a liberação e determinação do tipo de ligação entre oligossacarídeos e cadeias polipeptídicas.

Exemplos de métodos químicos incluem a β -eliminação (DOWNS e PIGMAN, 1976), onde as cadeias de açúcar O-ligadas podem ser liberadas na forma de álcoois pelo aquecimento, numa solução alcalina na presença de borohidreto de sódio (NaBH_4); e também a hidrazinólise (TAKASAKI *et al.*, 1982 e KOBATA e ENDO, 1993), técnica padrão para a remoção de cadeias de oligossacarídeos N-ligados que cliva a ligação entre os resíduos de N-acetilglucosamina e asparagina, pelo uso de hidrazina anidra a quente.

Quanto aos métodos enzimáticos, as endoglicosidases são amplamente utilizadas. Estas enzimas clivam sítios definidos nas cadeias oligossacarídicas, análogas às enzimas de restrição que atuam em ácidos nucleicos, e são eficientes na separação de cadeias de oligossacarídeos e proteínas intactas sob condi-

ções suaves. Exemplos incluem endo- β -*N*-acetilglucosaminidase, que libera oligossacarídeos asparagina-ligados de várias glicoproteínas; e endo- α -*N*-acetilgalactosaminidase que hidrolisa ligações O-glicosídicas (YAMAMOTO, 1994).

Tabela 4.5: Composição de aminoácidos da fração DEAE-PP.

| Composto | η moles | % |
|-----------------------------------|--------------|----------|
| Glicina | 13,2 | 17.6 |
| Alanina | 9,4 | 12.5 |
| Arginina | 8,7 | 11.6 |
| Serina | 7,9 | 10.5 |
| Ácido glutâmico/glutamina | 7,8 | 10.4 |
| Treonina | 5,4 | 7.2 |
| Lisina | 4,4 | 5.9 |
| Valina | 3,7 | 4.9 |
| Fenilalanina | 3,5 | 4.7 |
| Leucina | 3,1 | 4.1 |
| Prolina | 3,1 | 4.1 |
| Tirosina | 3,0 | 4 |
| Isoleucina | 2,2 | 2.9 |
| Ácido aspártico/asparagina | n.d. | — |
| Cisteína | n.r. | — |
| Histidina | n.d. | — |
| Metionina | n.r. | — |
| Triptofano | n.r. | — |
| Amônia | 23,1 | — |

n.r.: não relatado na análise

n.d.: não detectado

4.6. ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FRAÇÃO GLICOPROTÉICA: ENSAIO COM ERITRÓCITOS HUMANOS

Lectinas (hemaglutininas) são definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que têm a habilidade de se ligar especificamente a carboidratos e aglutinar células (GOLDSTEIN *et al.*, 1980). Devido a essas propriedades, as lectinas têm sido consideradas como moléculas-chave no reconhecimento entre organismos distintos, como o reconhecimento entre a alga e o fungo numa simbiose líquênica (PETIT *et al.*, 1983). Lectinas foram isoladas de uma série de líquens, inclusive de *Dictyonema glabratum*, então denominado *Cora pavonia* (XAVIER FILHO *et al.*, 1980); e testadas com sangue humano, apresentando atividade hemaglutinante inespecífica com os quatro tipos sanguíneos.

No presente trabalho, o Extrato Bruto e as frações obtidas pelo fracionamento com sulfato de amônio e após procedimentos cromatográficos foram testadas contra eritrócitos humanos dos grupos A, B, AB e O, com o objetivo de avaliar a manutenção da atividade biológica destas proteínas ao longo dos procedimentos propostos. Os resultados (Figura 4.6) mostram que o Extrato Bruto e a Fração "50-70%" promoveram aglutinação dos eritrócitos dos grupos A, B e O, com ligação maior aos eritrócitos do grupo A, onde a concentração mínima requerida foi de 37,5 e 12,5 μg de proteína/mL, respectivamente. Observa-se que com o fracionamento, a eficiência de hemaglutinação aumentou em 3 vezes e é provável que esta relação aumente com uma maior purificação. Vale ressaltar que essas frações mostraram eficiência de aglutinação maior do que Concanavina A que requer 140 μg de proteína/mL (Petit, 1982).

As amostras obtidas após Sepharose CL-6B e DEAE-Sepharose também foram ensaiadas por esta técnica, mas não apresentaram propriedades hemaglutinantes, numa concentração aproximada de 300 $\mu\text{g/mL}$. É possível que as proteínas responsáveis pela hemaglutinação não estejam presentes na fração 6B-I, e sim em 6B-II ou 6B-III, por se tratar de frações com menor peso molecular.

Tabela 4.6: Título e fator de hemaglutinação do Extrato Bruto e Fração 50-70% com sangue humano dos grupos A, B, AB e O.

| Fração | Tipo Sanguíneo | Título | Proteína (mg.mL^{-1}) | Fator |
|---------------|----------------|--------|----------------------------------|-------|
| Extrato Bruto | A | 1/16 | 0,6 | 267 |
| | B | 1/4 | | 67 |
| | AB | — | | — |
| | O | 1/4 | | 67 |
| 50-70% | A | 1/16 | 0,2 | 800 |
| | B | 1/8 | | 400 |
| | AB | — | | — |
| | O | 1/4 | | 200 |

5 CONCLUSÕES

De acordo com a análise dos resultados apresentados na seção anterior, é possível concluir que:

1. Uma fração glicoprotéica, contendo 83% de proteína e 17% de carboidrato foi obtida a partir da extração de talos do líquen *Dictyonema glabratum* em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 na presença de NaCl 200 mM, seguida de fracionamento com sulfato de amônio, precipitando na faixa de 50-70% de saturação. O tempo de coleta e armazenamento dos talos afetou quantitativa e qualitativamente o conteúdo protéico da preparação.

2. A purificação deste material em cromatografia de gel filtração em coluna de Sepharose CL-6B e de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose, resultou numa fração glicoprotéica com 86% de proteína e 14% de carboidrato, correspondendo a um rendimento de 1,6% em relação ao extrato bruto.

3. A fração purificada apresentou homogeneidade, por análises de filtração em gel em coluna de Sepharose CL-2B e alta massa molecular (~ 1.000 Kda) pela mesma técnica e por SDS- PAGE.

4. Análises da composição dessa fração revelaram alto teor de manose (56%) e presença, em menor escala, de xilose, arabinose, galactose e fucose. A composição de aminoácidos consistiu principalmente de glicina e alanina, enquanto serina e treonina representaram aproximadamente 18% do total; asparagina não foi encontrado.

Esta análises isoladas não foram suficientes para a sugestão do tipo de ligação envolvendo a porção protéica e glicídica da fração glicoprotéica purificada.

5. Ensaio com eritrócitos humanos dos grupos A, B e O, indicaram atividade hemaglutinante somente no Extrato Bruto e na fração precipitada em solução de sulfato de amônio 50-70% saturada.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADJIAN, V. **The lichen symbiosis**. Nova Iorque, NY. John Wiley and Sons, 1993.
- AMIN, A.R.; LAKSHMI, S.M.; OPPENHEIM, J.D.; FINKELMAN, F.D.; KIEDA, C.; COICO, R.F.; THORBECKE, G.J. Specificity of the murine IgD receptor on T cells is for N-linked glycans on IgD molecules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 20, p. 9238-9242, 1991.
- ANDERSON, D.R.; GRIMES, W.J. Heterogeneity of asparagine-linked oligosaccharides of five glycosylation sites on Immunoglobulin M heavy chain from mineral oil plasmacytoma 104E. **J. Biol. Chem.**, v.257, n. 24, p. 14858-14864, 1982.
- ASHWELL, G.; HARFORD, J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. **Ann. Rev. Biochem.**, v.51, p.531-554, 1982.
- ATKINSON, P.H.; GREY, A.; CARVER, J.P.; HAKIMI, J.; CECCARINI, C. Demonstration of heterogeneity of chick ovalbumin glycopeptides using 360-MHz proton MRS. **Biochemistry**, v. 20, p. 3979-3986, 1981.
- BERGER, E.G.; BUDDECKE, E.; KAMERLING, J.P.; KOBATA, A.; PAULSON, J.C.; VLIEGENTHART, J.F.G. Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein glycans. **Experientia**, v.38, n.10, p. 1129-1258, 1982.
- BIERMANN, C. J. Hydrolysis and other cleavages of glycosidic linkages. In: **Analysis of carbohydrate by GLC-MS**. p. 27-41. CRC Press, Boca Raton, 1990.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BURKHOLDER, P.R.; EVANS, A.W.; McVEIGH, J.; THORTON, H.K. Antibiotic activity of lichens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 30, p. 250-255, 1944.

- BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 175-200, 1995.
- CARLSSON, S.R. Isolation and characterization of glycoproteins. In: **Glycobiology**. A practical approach. pp.1-26. Fukuda, M.; Kobata, A. (Eds.), IRL Press, Oxford, U.K., 1993
- CARO, J.F.; CECCHIN, F.; SINHA, M.K. Is glycosylation in the liver needed for insulin binding, processing and action? **J. Biol. Chem.**, v. 259, n. 20, p. 12810-12816, 1984.
- CHAPLIN, M.F. Monosaccharides. In: **Carbohydrate analysis. A practical approach**. pp. 1-42. Chaplin, M.F.; Kennedy, J.F. (Eds.) IRL Press, Oxford, U.K., 1994.
- COMPTON, S.J.; JONES, C.G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Anal. Biochem.**, v.151, p. 369-374, 1985.
- CORRADI DA SILVA, M.L.C.; IACOMINI, M.; JABLONSKI, E.; GORIN, P.A.J. Carbohydrate, glycopeptide and protein components of the lichen *Sticta sp* and effect of storage. **Phytochem.**, v.33, n. 3, p. 547-552, 1993.
- CORRADI DA SILVA, M.L.C.; STUBBS, H.J.; TAMURA, T.; RICE, K.G. ¹H NMR Characterization of a hen ovalbumin tyrosinamide *N*-linked oligosaccharide library. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 318, n. 2, p. 465-475, 1995.
- COXSON, D.S. Effects of dessication on net photosynthetic activity in the basidiomycete lichen *Cora pavonia* E. Fries from the cloud/mist zone of the tropical volcano La Soufrière (Guadeloupe). **Bryologist**, v.90, n. 3, p. 241-245, 1987.
- CULL, M.; McHENRY, C.S. Preparation of extracts from prokaryotes. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 147-153, 1990.

- CUNNINGHAM, L.W.; CLOUSE, R.W.; FORD, J.D. Heterogeneity of the carbohydrate moiety of crystalline ovalbumin. **Biochim. Biophys. Acta**, v.78, p. 379-381, 1963.
- DOWNS, F; PIGMAN, W. Determination of O-glycosidic linkages to L-serine and L-threonine residues of glycoproteins. **Methods Carbohydr. Chem.**, v.7, p. 200-204, 1976.
- DWEK, R.A.; EDGE, C.J.; HARVEY, D.J.; WORMALD, M.R.; PAREKH, R.B. Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 62, p. 65-100, 1993.
- DUARTE, M. E. R. **Lectinas de massas de ovos de moluscos do gênero *Biomphalaria***. Curitiba, 1980. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- DÜBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 285-300, 1990.
- FEUGEAS, J.P.; NÉEL, D.; PAVIA, A.A.; LAHAM, A. GOUSSAULT, Y.; DERAPPE, C. Glycosylation of the human erythrocyte glucose transporter is essential for glucose transport activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1030, n. 1, p. 60-64, 1990.
- FOX, A.; MORGAN, S. L.; GILBART, J. Preparation of alditol acetates and their analysis by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS). In: **Analysis of Carbohydrates by GLC-MS**. p. 87-117. CRC Press, Boca Raton, 1990.
- FRITZ-SHERIDAN, R.P.; PORTECOP, J. Nitrogen fixation on the tropical volcano La Soufrière (Guadeloupe): I. A survey of nitrogen fixation by blue-green al-

- gal microepiphytes and lichen endophytes. **Biotropica**, v.19, n. 3, p. 194-199, 1987.
- GALUN, M.; BUBRICK, P.; FRENSDORFF, A. Initial stages in fungus-alga interaction. **Lichenologist**, v.16, n. 2, p. 103-110, 1984.
- GAMMON, D.W.; STEPHEN, A.M.; CHURMS, S.C. The glycoproteins of *Acacia erioloba* Exudates. **Carbohydr. Res.**, v. 158, p.157-171, 1986.
- GERARD, C. Purification of glycoprotein. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 529-539, 1990.
- GERL, L.; SUMPER, M. Halobacterial flagellins are encoded by a multigene family. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 26, p. 13246-13251, 1988.
- GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.
- GORIN, P.A.J.; BARON, M.; CORRADI DA SILVA, M.L.C.; TEIXEIRA, A.Z.A.; IACOMINI, M. Lichen carbohydrates. **Ciência e Cultura**, v.45, p. 27-36, 1993.
- GOTTSCHALK, A. **Glycoproteins, their composition, structure and function.** BBA Library, v. 5, Elsevier Publishing Co. Amsterdam, 1966.
- H Aidar, M.; SEDDIKI, N.; GLUCKMAN, J.C.; GATTEGNO, L. Carbohydrate binding properties of envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1. **Glycoconj. J.**, v. 9, p. 315-323, 1992.
- HAMES, B.D. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: **Gel electrophoresis of proteins. A practical approach.** p. 1-148. Hames, B.D.; Rickwood, D. (Eds.). IRL Press, Oxford, U.K., 1990.
- HANKINS, C.N.; KINDINGER, J. e SHANNON, L.M. The lectins of *Sophora japonica*. **Plant Physiol.**, v. 83, p. 825-829, 1987.

- HASE, S.; NISHIMURA, H.; KAWABATA, S.; IWANAGA, S.; IKENAKA, T. The structure of (xylose)₂glucose-O-serine 53 found in the first epidermal growth factor-like domain of Bovine Blood Clotting Factor IX. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 4, p. 1858-1861, 1990.
- HAWKSWORTH, D.L. A new name for *Dictyonema pavonium* (Swartz) Parmasto. **Lichenologist**, v. 20, n. 1, p. 101, 1988.
- HAWKSWORTH, D.L.; HILL, D.J. **The lichen-forming fungi**. Blackie & sons, Ltda, Glasgow, 1984.
- IACOMINI, M.; ZANIN, S.M.W.; FONTANA, J.D.; HOGGE, L.; GORIN, P.A.J. Isolation and characterization of β -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. **Carbohydr. Res.**, v. 168, p. 55-65, 1987.
- INGRAM, G.A. Haemagglutinins and haemolysins in selected lichen species. **Bryologist**, v. 85, p. 389-393, 1982.
- IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Polysaccharide nomenclature. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 7, p. 3352-3354, 1982.
- JENTOFT, N. Why are glycoproteins O-glycosylated? **Trends Biochem. Sci.**, v. 15, p. 291-294, 1990.
- KAWAGISHI, H.; MORI, H.; UNO, A.; CHIBA, S. A sialic acid-binding lectin from the mushroom *Hericium erinaceum*. **FEBS Letters**, v. 340, p. 56-58, 1994.
- KENT, P.W. Exploration of glycoprotein structures: sequences and consequences. **Pestic. Sci.**, v. 41, p. 209-228, 1994.
- KNOX, J.P. Developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. **FASEB J.**, v. 9, n. 11p. 1004-1012, 1995.
- KOBATA, A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. **Eur. J. Biochem.**, v. 209, p. 483-501, 1992.

- KOBATA, A.; ENDO, T. Isolation and fractionation of N-linked oligosaccharides from glycoproteins. In: **Glycobiology - a practical approach**. IRL Press, 1993.
- KORNFELD, S. Trafficking of lysosomal enzymes. **FASEB J.**, v. 1, p. 462-468, 1987.
- KRUSIUS, T.; RUOSLAHTI, E. Carbohydrate structure of the Concanavalin A molecular variants of α -fetoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 7, p. 3453-3457, 1982.
- LARCHER, W.; VARESCHI, V. Variation in morphology and functional traits of *Dictyonema glabratum* from contrasting habitats in the Venezuelan Andes. **Lichenologist**, v. 20, n. 3, p. 269-277, 1988.
- LECHNER, J.; WIELAND, F. Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 173-194, 1989.
- LLOYD, K.O. Isolation, characterization and partial structure of peptido galactomannans from the yeast form of *Cladosporium werneckii*. **Biochemistry**, v. 9, n. 17, p. 3446-3452, 1970.
- LODISH, H.F. Recognition of complex oligosaccharides by the multi-subunit asialoglycoprotein receptor. **Trends Biochem. Sci.**, v. 16, p. 374-377, 1991.
- MARCELLI, M.P. **Fungos liquenizados: taxonomia e características de importância taxonômica**. Seção de micologia e liquenologia. Instituto de Botânica - Universidade de São Paulo, 1995.
- MEIKLE, P.; RICHARDS, G.N.; YELLOWLEES, D. Structural determination of the oligosaccharide side chain from a glycoprotein isolated from the mucus of the coral *Acropora formosa*. **J. Biol. Chem.**, v.262, n. 35, p. 16941-16947, 1987.

- MERKLE, R.K.; POPPE, I. Carbohydrate composition analysis of glycoconjugates by GLC/MS. **Methods Enzymol.**, v. 230, p. 1-15, 1994.
- MESSNER, P.; CHRISTIAN, R.; KOLBE, J.; SCHULTZ, G.; SLEYTR, U.B. Analysis of a novel linkage unit of O-linked carbohydrates from the crystalline surface layer glycoprotein of *Clostridium thermohydrosulfuricum* S102-70. **J. Bacteriol.**, v.174, n. 7, p. 2236-2240, 1992.
- MOLCHANOVA, V.I.; OVODOVA, R.G.; OVODOV, Y.S.; ELKIN, Y.N. Studies of the polysaccharide moiety of Corallan, a glycoprotein from *Pseudopterogorgia americana*. **Carbohydr. Res.**, v. 141, n. 2, p. 289-293, 1985.
- MONTREUIL, J.; BOUQUELET, S.; DEBRAY, H.; LEMOINE, J.; MICHALSKI, J.C.; SPIK, G.; STRECKER, G. Glycoproteins. In: **Carbohydrate analysis. A practical approach**. p. 181-294. Chaplin, M.F.; Kennedy, J.F. (Eds.) IRL Press, Oxford, U.K., 1994.
- PAREKH, R.B.; DWEK, R.A.; SUTTON, B.J.; FERNANDES, D.L.; LEUNG, A.; STANWORTH, D.; RADEMACHER, T.W. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation patterns of total serum IgG. **Nature**, v. 316, p. 452-457, 1985.
- PAULSON, J.C. Glycoproteins: what are the sugar chains for? **Trends Biochem. Sci.**, v.14, p. 272-276, 1989.
- PEREZ-URRIA, E.; RODRIGUEZ, M.; VICENTE, C. Algal partner regulates fungal urease in the lichen *Evernia prunastri* by producing a protein which inhibits urease synthesis. **Plant Mol. Biol.**, v.13, p. 665-672, 1989.
- PETIT, P. Phytolectins from the nitrogen-fixing lichen *Peltigera horizontalis*: the binding pattern of primary protein extract. **New Phytol.**, v.91, p. 705-710, 1982.

- PETIT, P.; LALLEMANT, R.; SAVOYE, D. Purified phytolectin from the lichen *Peltigera canina* var. *canina* which binds to the phycobiont cell wall and its use as cytochemical marker *in situ*. **New Phytol.**, v. 94, p. 103-110, 1983.
- PLANELLES, V.; LEGAZ, E. Purification and some properties of the secreted arginase of the lichen *Evernia prunastri* and its regulation by usnic acid. **Plant Sci.**, v. 51, p. 9-16, 1987.
- PLUMMER T.H.; HIRS, C.H.W. On the structure of bovine pancreatic Ribonuclease B. **J. Biol. Chem.**, v. 239, n. 8, p. 2530-2538, 1964.
- RADEMACHER, T.W.; PAREKH, R.B. e DWEK, R.A. Glycobiology. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 785-838, 1988.
- RIEDERER, M.A.; HINNEN, A. Removal of N-glycosylation sites of the yeast acid phosphatase severely affects protein folding. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 11, p. 3539-3546, 1991.
- ROSSOMANDO, E.F. Ion-exchange chromatography. **Methods Enzymol.**, v. 182, p.309-317, 1990.
- SAITO, K.; KOMAE, A.; KAKUTA, M.; van DAMME, J.M.; PEUMANS, W.I.; GOLDSTEIN, I.J.; MISAKI, A. The α -mannosyl-binding lectin from leaves of the orchid twayblade (*Listera ovata*). **Eur. J. Biochem.**, v. 217, n. 2, p. 677-681, 1993.
- SAMPAIO FILHO, J.C. **Estudo sobre hemaglutininas de glândulas de albumen de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila***. Curitiba, 1973. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- SCOPES, R.K. **Protein purification. Principles and practice**. Springer-Verlag, N.Y., 1987.

- SEGEL, I.H. **Bioquímica. Teoria e problemas.** Apêndice 1. Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 1979.
- SHARON, N. Polysaccharides. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 35, n. 2, p. 485-520, 1966.
- SILVA, J.O.; LEITE, J.E.M.; PAULO, M.Q.; XAVIER FILHO, L. Atividade antimicrobiana de líquens brasileiros - I. **Bol. Soc. Broteriana**, ser. 2, v. 59, p.87-96, 1986.
- SKEHEL, J.; STEVENS, D.J.; DANIELS, R.S.; DOUGLAS, A.R.; KNOSSOW, M.; WILSON, I.A.; WILEY, D.C. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza virus inhibits recognition by a monoclonal antibody. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, n. 6, p. 1779-1783, 1984.
- SLONECKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 6, p. 20-24, 1972.
- SPIRO, R.G. Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. **J. Biol. Chem.**, v. 235, n. 10, p. 2860-2869, 1960.
- _____ Glycoproteins. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 39, p. 599-638, 1970.
- STANLEY, P.; IOFFE, E. Glycosyltransferase mutants: key to new insights in glycobiology. **FASEB J.**, v.9, n. 14, p. 1436-1444, 1995.
- STELLWAGEN, E. Gel filtration. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 317-328, 1990.
- STOCKELL HARTREE, A.S. e RENWICK, A.G.C. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. **Biochem. J.**, v. 287, p. 665-679, 1992.
- STOSCHECK, C.M. Quantitation of protein. **Methods Enzymol.**, v. 182, p.50-68, 1990.

- TAKASAKI, S.; MIZOUCHI, T.; KOBATA, A. Hydrazinolysis of asparagine-linked sugar chains to produce free oligosaccharides. **Methods Enzymol.**, v. 83, p. 263-268, 1982.
- TEIXEIRA, A.Z.A.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J. Chemotypes of mannose-containing polysaccharides of lichen mycobionts: a possible aid in classification and identification. **Carbohydr. Res.**, v. 266, p. 309-314, 1995.
- TSAI, P.K.; FREVERT, J.; BALLOU, C.E. Carbohydrate structure of *Saccharomyces cerevisiae* mnn9 mannoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 259, n. 6, p. 3805-3811, 1984.
- VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**, v. 3, n. 2, p. 97-130, 1993.
- WATKINS, W.M. Genetic regulation of the structure of blood-group-specific glycoproteins. In: **The metabolism and function of glycoproteins** R.M.S. Smellie; I.G. Beeley (Eds.). Biochem. Soc. Symp., n. 40, p. 125-146, 1974.
- WITTENBACH, V.A. Purification and characterization of a soybean leaf storage glycoprotein. **Plant Physiol.**, v. 73, p. 125-129, 1983.
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963(a).
- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 2 p. 65-68, 1963(b).
- WORANOVICZ, S.M. **Estudo comparativo de heteropolissacarídeos isolados dos líquens *Cladonia signata* (Eschw.) Vainio, *Cladonia furcata* (Hudson) Schrader e *Cladia aggregata* (Sw.) Nyl.** Curitiba, 1995. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

- WRIGHT, J.F.; SHULMAN, M.J.; ISENMAN, D.E.; PAINTER, R.H. C1 binding by mouse IgM. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 18, p. 10506-10513, 1990.
- XAVIER FILHO, L.; MENDES, L.C.G.; VASCONCELOS, C.A.F.; COSTA, A.C. Fitohemaglutinina (lectinas) em basidiolíquens. **Boletim Soc. Broteriana**, ser. 2, v. 54, p. 41-46, 1980.
- XAVIER FILHO, L.; RIZZINI, C.T. **Manual de liquenologia brasileira**. UFPe, Recife, Brasil, 1976.
- YAMADA, H.; HIRAIWA, M.; MIYAZAKI, T. Characterization of mannoproteins from yeast and mycelial forms of *Mucor rouxii*. **Carbohydr. Res.**, v. 119, p. 129-140, 1983.
- YAMAMOTO, K. Microbial endoglycosidases for analysis of oligosaccharide chains in glycoproteins. **J. Biochem.**, v. 116, p. 229-235, 1994.
- ZANIN, S.M.W. **Isolamento e caracterização de trealose, β -D-glucana e de um heteropolissacarídeo do basidiolíquen *Cora pavonia***. Curitiba, 1987. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.