UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ESTUDO DA EQUIVALÊNCIA ENTRE A LECTINA ARTIN M OBTIDA A PARTIR DA
SEMENTE DA JACA E A SUA FORMA RECOMBINANTE NA AFINIDADE POR
GLICANAS

NAIRA CANEVAROLO PESQUERO

Dissertação de Mestrado

NAIRA CANEVAROLO PESQUERO

ESTUDO DA EQUIVALÊNCIA ENTRE A LECTINA ARTIN M OBTIDA A PARTIR DA
SEMENTE DA JACA E A SUA FORMA RECOMBINANTE NA AFINIDADE POR
GLICANAS

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia

Orientador: Dr. Paulo Roberto Bueno

Araraquara

2010

NAIRA CANEVAROLO PESQUERO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 25 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Marcelo Mulato
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto

Prof.ª Dr.ª Maria Cristina Roque Antunes Barreira
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto

*À minha mãe Elisabete, ao meu irmão
Lucas e aos meus avós, Basilina e Antônio, por
todo o apoio em todos os momentos de aflição,
pelo imenso amor, carinho, preocupação e,
principalmente pela paciência.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno pela orientação, pela amizade, pelo apoio, e principalmente pela formação profissional passada a mim durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria pela amizade e paciência, e por todas as discussões, as quais foram fundamentais para a finalização e concretização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque-Barreira pela amizade e preocupação durante a minha estada em seu laboratório, pelas discussões e, principalmente pelo apoio em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

À Sandra Maria de Oliveira Thomaz pela amizade, por toda a ajuda, mas principalmente pelo acolhimento durante a minha estada em Ribeirão Preto.

À D. Maria do Carmo Luiz pela amizade, paciência e pelo auxílio fornecido em todos os momentos em que foram solicitados.

À administradora do LIEC, Rose pela amizade e, principalmente por todo o apoio e conhecimentos técnico e burocrático a mim concedido.

À amiga Mariele Mucio Pedroso pela amizade e carinho, pela força em todos os momentos difíceis e, principalmente, pelas discussões e pela imensurável ajuda durante toda a execução deste trabalho, e sem a qual, ele não se concretizaria.

Ao amigo Ailton Massaiti Watanabe pela amizade, pela força e paciência e, principalmente, pelas discussões e pela ajuda em todos os momentos em que dela necessitei.

Ao amigo Josiel José da Silva pela amizade, pela ajuda na finalização deste trabalho e também por ensinar muito mais do que consegui ensiná-lo.

À Fernanda Carvalho pela amizade e pelo total apoio e dedicação durante o tempo em que trabalhamos juntas.

Aos demais amigos Elaine Muniz, Carol Rabal, Marcos Foguel, Márcio Goes, Elsa, Grazielle Setti, Adriano, Carla e Márcio Santos, pela amizade, apoio e carinho, e também por todos os momentos felizes de comemoração e por àqueles não tão felizes, mas que também ajudaram a me tornar uma pessoa melhor.

À todos os alunos da Prof. Maria Cristina Roque-Barreira pela amizade, acolhimento e auxílio durante a minha estada em seu laboratório.

À todos a minha imensa e eterna gratidão!

RESUMO

No presente trabalho foi avaliada a equivalência entre as formas nativa e recombinante da lectina Artin M utilizando como ligante a peroxidase de raiz forte (HRP) por meio da técnica de microbalança a cristal de quartzo. Para tal foi preparado um biossensor por meio da imobilização da lectina, tanto nativa como recombinante, na superfície do cristal de quartzo piezelétrico. A imobilização das lectinas foi realizada por meio da construção de uma monocamada auto organizada utilizando dois alcanotióis, ácido 11-mercaptoundecanóico e o 2-mercaptoetanol. Para o acoplamento das proteínas foram utilizados N-etil-N-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidoxisuccinimida (NHS) que formam com os grupamentos carboxílicos um intermediário reativo. Após a preparação do biossensor foi utilizado um sistema de injeção em fluxo acoplado à microbalança de cristal a quartzo para o estudo da interação lectina-glicoconjugado. Desta forma, as interações da Artin M nativa e recombinante com a glicoproteína peroxidase de raiz forte foram estudadas por meio da determinação das suas constantes de afinidade aparente e de associação cinética, sendo que foram encontrados os valores de constante de afinidade aparente $(4,6 \pm 0,9) \times 10^3$ e $(2,6 \pm 0,5) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ para as interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP, e os valores de constante cinética $(7 \pm 3) \times 10^3$ e $(7 \pm 2) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ para as interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP. Os valores das constantes de interação obtidos evidenciaram a equivalência entre ambas as formas da lectina Artin M.

Neste trabalho também foi determinada a constante de associação cinética da interação entre a lectina Artin M recombinante e linhagens celulares de leucemia mielóide aguda humana (NB4, K562 e U937), no intuito de melhor entender a diferença na citotoxicidade observada da Artin M sobre estas células. Sendo assim, foram encontrados os valores de constante de associação cinética $(0,3 \pm 0,1) \times 10^{-7}$, $(0,9 \pm 0,1) \times 10^{-7}$ e $(2,7 \pm 0,3) \times 10^{-7} \text{ mL cel}^{-1}$ para as interações da lectina com a linhagem NB4, K562 e U937, respectivamente.

Palavras-chave: lectina, *Artocarpus integrifolia*, proteína recombinante, biossensor, microbalança a cristal de quartzo.

ABSTRACT

In the present work was evaluated the equivalence between the native and recombinant forms of Artin M using horseradish peroxidase as ligand by means the quartz crystal microbalance technique. In this way, a biosensor was prepared immobilizing the lectin, native and recombinant forms, on piezoelectric quartz crystal surface. Lectins immobilization was realized constructing self assembled monolayers using the alkanethiols 11-mercaptopundecanoic acid and 2-mercaptoethanol. To the binding of proteins was used N-ethyl-N-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS), which form with carboxylic groups a reactive intermediary. After biosensor preparation was utilized a flow injection system coupled to quartz crystal microbalance to study the lectin-glycoconjugated interaction. Thus the native Artin M and recombinant Artin M interaction with horseradish peroxidase glycoprotein were studied by determining its apparent affinity constant and association kinetic constants. The values obtained to apparent affinity constant were $(4,6 \pm 0,9) \times 10^3$ e $(2,6 \pm 0,5) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ to jArtinM-HRP e rArtinM-HRP interactions, and the values obtained to association kinetic constant were $(7 \pm 3) \times 10^3$ e $(7 \pm 2) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ to jArtinM-HRP e rArtinM-HRP interactions. These constant values evidence the equivalence between native and recombinant forms of Artin M lectin.

During this work were also determined the association kinetic constant of the interaction between recombinant Artin M and leukemic lineages from human acute myeloid leukemia (NB4, K562 and U937), with the purpose of a better understanding in the different cytotoxic effect of Artin M on these cells. In this way the values of association kinetic constant obtained was $(0,3 \pm 0,1) \times 10^{-7}$, $(0,9 \pm 0,1) \times 10^{-7}$ e $(2,7 \pm 0,3) \times 10^{-7} \text{ mL cel}^{-1}$ to the interactions between Artin M and NB4, K562 and U937, respectively.

Keywords: lectin, *Artocarpus integrifolia*, recombinant protein, biosensor, quartz crystal microbalance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática da estrutura quaternária da lectina Artin M, com seus monômeros diferenciados por cores (Rosa, De Oliveira et al., 1999). 17
- Figura 2. Ilustração das barreiras naturais do organismo, na qual podem ser visualizadas barreiras mecânicas, como a pele e sua contínua descamação, variações de pH ao longo do organismo, movimentos peristálticos, presença de muco e o fluxo constante de saliva nas vias aéreas e de urina no trato genitourinário, dificultando a instalação e sobrevivência de agentes patogênicos. 18
- Figura 3. O processo de quimiotaxia. As quimiocinas controlam o processo de migração celular por meio da ativação das células circulantes, promovendo sua ligação ao endotélio e iniciando a migração dos leucócitos através do endotélio. Tal migração ocorre ativamente mediante gradientes de concentração das quimiocinas. 20
- Figura 4. Subpopulações de linfócitos T. As células T CD4+, ou auxiliares, do tipo 1 (Ta¹) liberam citocinas que induzem a destruição dos microorganismos internalizados e apresentados pelos macrófagos. As células T auxiliares do tipo 2 (Ta²) liberam citocinas responsáveis pela ativação os linfócitos B, por meio da apresentação de antígeno pelas mesmas, induzindo sua divisão e diferenciação. As células T CD8+, ou citotóxicas (Tc) e as células NK (do inglês, *natural killers*) reconhecem e destroem as células infectadas por vírus. 21
- Figura 5. Funções do sistema complemento: (1) lise de bactérias, (2) Atração de fagócitos até o local da infecção e (3) e opsonização de microorganismos para facilitar seu reconhecimento pelas células do sistema imune. 23
- Figura 6: (a) Ilustração do rábano silvestre, da raiz do qual é extraída a enzima peroxidase e a (b) estrutura da enzima (VEITCH, 2004). 26
- Figura 7: Estrutura do heptassacarídeo presente na HRP, pelo qual a lectina Artin M possui alta afinidade (VEITCH, 2004). 27
- Figura 8: Representação do reconhecimento da glicana (heptassacarídeo) presenta na estrutura da HRP por um dos CRDs da lectina Artin M. 27
- Figura 9. Diagrama esquemático do cristal de quartzo de corte AT, no qual são depositados os eletrodos metálicos, e a visão final do cristal com modo de cisalhamento de espessura de vibração (MARX, 2003). 31
- Figura 10. Foto do cristal de quartzo piezelétrico de 5 MHz com eletrodos de ouro em ambos os lados 38
- Figura 11. Foto da (a) microbalança a cristal de quartzo, (b) plataforma onde são conectadas as células, (c) célula de medida conectada em fluxo e (d) célula aberta com o cristal de quartzo piezelétrico. 39
- Figura 12. Ativação dos grupamentos carboxílicos por meio da reação com EDC/NHS. 41

- Figura 13. Diagrama esquemático da superfície do cristal de quartzo piezelétrico funcionalizado. 42
- Figura 14. Estrutura química dos alcanotóis utilizados na construção das monocamadas auto-organizadas, para posterior imobilização das lectinas (recombinante e nativa). 47
- Figura 15. Curvas da variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a adição de peroxidase (a) 0,15 mmol L⁻¹ e (b) 1,50 mmol L⁻¹ em jArtinM e rArtinM imobilizadas. 49
- Figura 16. Curvas de saturação da (■) jArtinM e (▲) rArtinM com adições crescentes de HRP, em diferentes cristais de quartzo modificados. 51
- Figura 17: Ajuste exponencial realizado nas curvas de saturação de ambas as formas da lectina Artin M (■) nativa e (▽) recombinante. 52
- Figura 18. Curva da variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo referente à adição de HRP 1,0 mmol L⁻¹ em BSA imobilizada no transdutor. 53
- Figura 19. Reação de redução do H₂O₂ na superfície do eletrodo em meio contendo hidroquinona. 54
- Figura 20. Voltametria cíclica do eletrodo de ouro modificado com HRP 1,00 mmol L⁻¹ (■) em PBS 0,1 mol L⁻¹ e (○) em hidroquinona 0,25 μmol L⁻¹ e H₂O₂ 850 μmol L⁻¹ em PBS. 55
- Figura 21. Voltametria cíclica (a) do eletrodo de ouro modificado com jArtinM após 30 min de interação com HRP 0,5 mmol L⁻¹ (■) em 0,1 mol L⁻¹ PBS e (○) em hidroquinona 0,25 μmol L⁻¹ e H₂O₂ 850 μmol L⁻¹ em PBS, (b) do eletrodo de ouro modificado com rArtinM após 30 min de interação com HRP 0,5 mmol L⁻¹ (■) em PBS e (○) em hidroquinona 0,25 μmol L⁻¹ e H₂O₂ 850 μmol L⁻¹ em PBS e (c) sobreposição das voltametrias cíclicas dos eletrodos modificados com (■) jArtinM e (○) rArtinM. 56
- Figura 22. Isotermas de Langmuir obtidas para a (a) jArtinM para o cálculo da constante de afinidade aparente da interação jArtin M-HRP. Isoterma de Langmuir obtida para a e (b) rArtinM. 61
- Figura 23. Médias das curvas da variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para as adições de HRP, (a) 0,15; (b) 0,22; (c) 0,30; (d) 0,40; (e) 0,50; (f) 0,65; (g) 0,75; (h) 1,00 e (i) 1,50 mmol L⁻¹, em (1) jArtinM e (2) rArtinM. 66
- Figura 24: Ajuste realizado em uma curva Δ*f* vs. tempo, para a adição de HRP 0,5 mmol L⁻¹ em jArtinM, utilizando a Equação 26. 67
- Figura 25. Constante de relaxação em função da concentração da HRP adicionada aos cristais de quartzo modificados com (a) jArtinM e (b) rArtinM. 69

Figura 26. Curvas da constante de relaxação em função da concentração de células da linhagem (∇) NB4, ($\bullet$) K562 e ($\square$) U937 adicionadas aos cristais contendo rArtinM imobilizada.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Aplicações das lectinas de plantas nas áreas da medicina, bioquímica e biologia celular. Podemos destacar as aplicações bioquímicas, as quais foram exploradas durante esse trabalho, e a indução de regeneração celular, pois Artin M, lectina alvo de estudo deste trabalho, encontrou aplicação por possuir tal propriedade. Extraído de Pedroso (PEDROSO, 2006). 15
- Tabela 2. Principais aplicações das SAMs, entre as quais podemos destacar as aplicações biológicas, tais como a imobilização de proteínas e o estudo de interações biológicas (incluindo interações lectina-carboidrato), as quais foram exploradas no presente trabalho (adaptado de (FREIRE, 2003)). 33
- Tabela 3. Resultados do ajuste realizado nas curvas de saturação de ambas as formas da lectina ArtinM, utilizando a Equação 8. 52
- Tabela 4. Resultados obtidos por meio dos experimentos realizados na QCM e utilizados na determinação da constante de afinidade aparente das interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP, por meio da Equação 14. 60
- Tabela 5. Resultados obtidos para as interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP por meio do ajuste das curvas Δf vs. t realizados com a utilização da Equação 27. 68
- Tabela 6. Valores das constantes de associação, dissociação e de associação cinética das interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP. 68
- Tabela 7. Resultados obtidos para a interação da rArtinM com as linhagens de células leucêmicas, por meio do ajuste das curvas Δf vs. t realizados com a utilização da Equação 27. 73
- Tabela 8. Valores das constantes de associação, dissociação e de equilíbrio cinética das interações entre a forma recombinante da lectina Artin M e as linhagens de células leucêmicas. 74

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1.1. Lectinas.....	14
1.1.1. A Lectina Artin M	16
1.1.2. Artin M e o Sistema Imunológico	17
1.1.3. A Artin M Recombinante (rArtinM)	24
1.2. O Ligante: Peroxidase de Raiz Forte (HRP)	25
1.3. Reconhecimento Molecular e Biossensor.....	27
1.4. Microbalança a Cristal de Quartzo	29
1.4.1. Fundamentos da Técnica QCM	30
1.5. Estratégia de Funcionalização do Transdutor.....	32
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	37
3.1. Instrumentação.....	38
3.1.1. CRISTAIS DE QUARTZO PIEZELÉTRICOS	38
3.1.2. MICROBALANÇA A CRISTAL DE QUARTZO.....	38
3.1.3. VOLTAMETRIA CÍCLICA	39
3.2. Materiais e Métodos	40
3.2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	40
3.2.2. LIMPEZA DOS CRISTAIS	41
3.2.3. FUNCIONALIZAÇÃO DO TRANSDUTOR	41
3.2.4. AVALIAÇÃO PIEZELÉTRICA.....	43
3.2.5. PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	43
3.2.6. AVALIAÇÃO VOLTAMÉTRICA.....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. A Funcionalização do Transdutor	47
4.2. Estudo das Interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP	48
4.2. Avaliação da Especificidade.....	53
4.3. Determinação da Constante de Afinidade Aparente das Interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP.....	57
4.4. Determinação da Constante de Associação Cinética para as Interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP.....	63
Avaliação da Interação entre a Artin M e Linhagens Leucêmicas	71
CONCLUSÕES	76
SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	78
APÊNDICE	87

INTRODUÇÃO

1.1. Lectinas

Moléculas, células e organismos revelam informações a seu respeito na forma de glicoconjugados, sendo que tal informação é decodificada por proteínas altamente específicas em sua ligação com carboidratos, denominadas lectinas (MISQUITH, 1994). O termo “lectina” foi primeiramente utilizado em 1954 por William C. Boyd para descrever aglutininas de plantas que possuíam especificidade de ligação por um determinado grupo sanguíneo. A palavra lectina é derivada do passado particípio do verbo latino *legere*, que significa selecionar, unir ou ler (NILSSON, 2007). Portanto, uma definição atual de lectinas afirma que elas são proteínas de origem não imune, sem atividade catalítica, capazes de reconhecer e se ligar, específica e reversivelmente, a carboidratos sem modificá-los (SHARON, 1998; NILSSON, 2007).

As lectinas foram, primeiramente, denominadas como hemaglutininas, ou fitoaglutininas, devido ao fato de possuírem a habilidade de aglutinar eritrócitos e por serem encontradas originalmente em extratos de plantas (SHARON, 2004). As lectinas vêm sendo estudadas desde 1860, quando S. Weir Mitchell observou no veneno da cobra cascavel a presença de atividade lectínica, devido a sua capacidade de aglutinar células sanguíneas (KILPATRICK, 2002). A atividade lectínica dessas proteínas é devido à presença de um segmento polipeptídico limitado, denominado de Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD, do inglês *Carbohydrate Recognition Domain*) (SHARON, 2004). Geralmente cada molécula de lectina apresenta, pelo menos, dois sítios de ligação a carboidrato em sua estrutura, o que permite ligações cruzadas entre as células ou entre açúcares contidos nas macromoléculas, justificando suas propriedades de aglutinar partículas e precipitar glicoconjugados (PEI, 2005; PEDROSO, 2006).

As lectinas, por serem as tradutoras do código dos açúcares, estão presentes em ambientes biológicos importantes e devido a sua grande versatilidade e diversidade na ligação com carboidratos, possuem a função de mediadoras do reconhecimento celular em uma ampla variedade de sistemas biológicos (SILVA, 2006; NILSSON, 2007). As interações lectina-carboidrato estão envolvidas em processos inflamatórios/infecciosos e no reconhecimento celular, incluindo a adesão de agentes infecciosos e a ativação da resposta imune, podendo, portanto, serem utilizadas como ferramentas analíticas no estudo de uma ampla diversidade de organismos (PEI, 2005; WILCZEWSKI, 2008).

Muitos dos princípios fundamentais da imunologia foram estabelecidos por Paul Ehrlich, em 1890, utilizando somente duas lectinas altamente tóxicas, a ricina e a abrina como antígenos modelo, as quais são isoladas das sementes da mamona (*Ricinus communis*) e do extrato de *Abrus precatorius*, respectivamente. Ehrlich também demonstrou que a imunidade à toxina era transferida da mãe para sua prole pelo sangue durante a gestação, e pelo leite após o nascimento (SHARON, 2004). A identificação e a caracterização de lectinas a partir de 1900 foram aceleradas graças a cientistas que trabalhavam na área, tais como Nathan Sharon e muitos outros (NILSSON, 2007).

Tabela 1. Aplicações das lectinas de plantas nas áreas da medicina, bioquímica e biologia celular. Podemos destacar as aplicações bioquímicas, as quais foram exploradas durante esse trabalho, e a indução de regeneração celular, pois Artin M, lectina alvo de estudo deste trabalho, encontrou aplicação por possuir tal propriedade. Extraído de Pedroso (PEDROSO, 2006).

ÁREAS	APLICAÇÕES
Medicina	- Identificação de grupos sanguíneos (ABO humano)
	- Marcador celular para diagnóstico de agentes infecciosos
	- Indutores de regeneração celular (agentes mitogênicos)
Bioquímica	- Purificação de glicoconjugados por cromatografia de afinidade
	- Quantificação e análise de glicoconjugados
Biologia Celular	- Investigação da superfície celular durante sua divisão e diferenciação, auxiliando o estudo de alguns tumores
	- Análise de mecanismos envolvidos na glicosilação das proteínas

As lectinas estão presentes em quase todas as formas de vida, desde vírus e bactérias até plantas e animais, porém aquelas existentes em plantas são as mais profundamente caracterizadas entre os membros da família. As lectinas de plantas contam com metade das lectinas de estrutura tridimensional conhecidas. Entre elas as lectinas de legumes constituem a

família mais profundamente estudada (PRATAP, 2002; JEYAPRAKASH, 2004). Por conta de suas propriedades biológicas importantes e seu uso na pesquisa e na medicina, estudos estruturais das lectinas têm ganhado impulso recentemente (PRATAP, 2002). A Tabela 1 apresenta algumas aplicações das lectinas de plantas.

1.1.1. A Lectina Artin M

As lectinas das plantas têm sido utilizadas em aplicações biotecnológicas diversas, incluindo a produção de proteínas recombinantes com propósito terapêutico ou para a liberação de drogas endereçadas (SILVA, 2005). As sementes da jaca da espécie *Artocarpus integrifolia* são conhecidas por conterem duas lectinas – jacalina e Artin M – que possuem especificidades de ligação com carboidratos, significativamente diferentes, apesar de sua alta similaridade estrutural. A jacalina, a primeira das lectinas a ser isolada, é uma proteína homotetramérica formada por quatro monômeros idênticos que consistem de uma cadeia leve e uma pesada, compostas por 20 e 133 resíduos de aminoácidos, respectivamente (BOURNE, 2002). Esta lectina, com massa molecular de 66 kDa (JEYAPRAKASH, 2005), liga-se a D-galactose e a seu derivado Gal β 1-3GalNAc, tal especificidade permite sua ampla aplicação como ferramenta na identificação e no isolamento de proteínas *O-glicosiladas* de mamíferos. A jacalina também interage seletivamente com a Imunoglobulina A do tipo 1 (IgA₁) do soro humano, o que viabiliza seu uso no estudo da nefropatia (HIKI, 1996; BOURNE, 2002; WU, 2003; BARRE, 2004; JEYAPRAKASH, 2005; SILVA, 2005).

No início da década passada, uma segunda lectina foi identificada nas sementes da jaca como sendo responsável pelos efeitos que o extrato cru das sementes possuem na proliferação das células T e na ativação policlonal das células B. A nova lectina, denominada Artin M, também conhecida como KM⁺ ou artocarpina (SILVA, 2008), possui massa molecular de 65 kDa e está presente nas sementes da jaca na concentração de traços, pois representa somente 0,5% das proteínas totais da semente (FUNDAÇÃO..., 2003). A Artin M é uma proteína homotetramérica, como mostrado na Figura 1, sendo que sua estrutura primária foi determinada por Rosa e colaboradores (ROSA, 1999) como sendo uma cadeia polipeptídica composta por 149 resíduos de aminoácidos, tendo 52% de identidade com a seqüência da jacalina. A diferença entre a jacalina e a Artin M é principalmente atribuída ao fato de a Artin M não sofrer clivagem pós-traducional interna, preservando uma curta seqüência de ligação rica em glicina, que incluem regiões análogas às cadeias α e β da

jacalina. Estudos realizados por Barre e colaboradores mostraram que a lectina Artin M possui uma atividade aglutinante acentuadamente menor do que a jacalina (BARRE, 2004).

Figura 1. Representação esquemática da estrutura quaternária da lectina Artin M, com seus monômeros diferenciados por cores (ROSA, 1999).

Uma recente investigação das propriedades de ligação a carboidrato da lectina Artin M revelou seu inesperado comportamento como uma lectina poliespecífica que interage com uma quantidade diversificada de monossacarídeos, possuindo, entretanto, afinidade preferencial por D-manose. Sendo assim, os melhores ligantes para a Artin M são todos aqueles com glicanas *N-ligadas* contendo o coração trimanosídico $\text{Man}\alpha 1-3[\text{Man}\alpha 1-6]\text{Man}$, tal como a glicoproteína peroxidase de raiz forte (HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*). (SILVA, 2005).

A lectina Artin M tem sido amplamente estudada, pois devido à sua forte atuação na ativação do sistema imunológico, possui grande potencial de aplicação na área médica, principalmente no desenvolvimento de fármacos e vacinas.

1.1.2. Artin M e o Sistema Imunológico

A função básica do sistema imunológico consiste em interagir com o que é estranho e o que é próprio, e em seguida eliminar os agentes infecciosos e minimizar os danos que eles podem causar ao organismo. Isto devido à existência de uma grande variedade de agentes infecciosos tais como, vírus, bactérias, fungos, protozoários e parasitas multicelulares, no

meio ambiente que podem causar doenças e, se sofrerem multiplicação descontrolada, podem levar o hospedeiro à morte. Como os microorganismos apresentam-se de formas muito diferentes, há a necessidade de uma ampla variedade de respostas imunes para controlar cada tipo de infecção (CALICH, 2001; ROITT, 2003).

A maioria dos agentes infecciosos com os quais um indivíduo se defronta não penetra a superfície corporal, pois tem sua entrada dificultada por uma variedade de barreiras físicas e bioquímicas, denominadas de barreiras naturais. As barreiras naturais do organismo, em um primeiro momento, se apresentam como uma defesa eficiente contra a maioria dos microorganismos agressores dificultando sua instalação nos tecidos (CALICH, 2001; ROITT, 2003). Na Figura 2 são apresentadas, resumidamente, as barreiras naturais do organismo.

Figura 2. Ilustração das barreiras naturais do organismo, na qual podem ser visualizadas barreiras mecânicas, como a pele e sua contínua descamação, variações de pH ao longo do organismo, movimentos peristálticos, presença de muco e o fluxo constante de saliva nas vias aéreas e de urina no trato genitourinário, dificultando a instalação e sobrevivência de agentes patogênicos.

A perda da continuidade da pele por cortes ou queimaduras ou, ainda, alterações metabólicas, nutricionais, hormonais e/ou genéticas, podem favorecer a instalação de microorganismos. Alguns são introduzidos diretamente por picadas de vetores, outros penetram ativamente. Como consequência, tem início um conjunto de alterações bioquímicas, vasculares e celulares denominado de reação inflamatória.

A inflamação é um mecanismo de defesa do organismo contra agressões, e é caracterizada pelo acúmulo e ativação de células fagocitárias no local da injúria, o que contribui para a eliminação dos microorganismos e reparação tecidual (CALICH, 2001; ROITT, 2003). Durante um processo inflamatório, para que os mediadores solúveis da

imunidade atinjam o local da infecção, ocorre um aumento na permeabilidade capilar, como consequência da liberação de mediadores inflamatórios, tais como histamina, prostaglandinas e leucotrienos. Esses mediadores são secretados por macrófagos e mastócitos ativados presentes no local da inflamação. A Artin M, por meio da interação com glicoproteínas presentes nas membranas destas células é capaz de induzir a degranulação de mastócitos, evento fundamental para a liberação de histamina no local da inflamação (CALICH, 2001).

O local da infecção e o tipo de patógeno são os fatores determinantes do tipo de resposta imune a ser elaborada. Qualquer resposta imune envolve, primeiramente, o reconhecimento do patógeno ou de um outro material estranho e, em seguida a elaboração de uma reação, com a finalidade de eliminá-lo do organismo. A distinção mais importante a ser realizada é entre patógenos intracelulares e extracelulares. De uma maneira mais ampla, os diferentes tipos de resposta imune enquadram-se em duas categorias: respostas imunes inatas (ou não adaptativas) e respostas imunes adaptativas (CALICH, 2001; ROITT, 2003).

O sistema inato é composto por todos os mecanismos que defendem o organismo de forma não específica, respondendo da mesma forma, qualquer que seja o invasor. A resposta imune inata não se altera mediante a exposição repetida a um dado agente infeccioso. As células responsáveis pelas respostas imunes inatas são os fagócitos (utilizam de sistemas de reconhecimento primitivos e inespecíficos), os quais agem como a primeira linha de defesa contra as infecções. As células fagocitárias compreendem os monócitos, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares, e são responsáveis pela degradação de antígenos e microorganismos patogênicos (CALICH, 2001).

Os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa do organismo contra infecções, pois migram rapidamente para os tecidos inflamados e/ou infectados, e dispõem de mecanismos microbicidas extremamente eficientes, porém morrem depois de terem fagocitado. A migração de neutrófilos é um evento fundamental da reação inflamatória e de defesa do organismo contra agentes infecciosos, e, normalmente ocorre por quimiotaxia, como demonstrado na Figura 3. Porém as condições de fluxo sanguíneo não favorecem a manutenção de um gradiente de substâncias solúveis, uma vez que tal gradiente difundiria e teria que ser constantemente repostado (GANIKO, 2001). A lectina Artin M pode ser uma forma de contornar tal problema, pois esta possui a capacidade de induzir a migração de neutrófilos até o local da inflamação por haptotaxia, pois por possuir quatro sítios de ligação, permite que ocorra a formação de um gradiente de quimioatraentes ligado à superfície do endotélio e à matriz extracelular (gradiente haptotático) (GANIKO, 2001).

Figura 3. O processo de quimiotaxia. As quimiocinas controlam o processo de migração celular por meio da ativação das células circulantes, promovendo sua ligação ao endotélio e iniciando a migração dos leucócitos através do endotélio. Tal migração ocorre ativamente mediante gradientes de concentração das quimiocinas.

Numa infecção, os macrófagos também migram para o local, porém esta migração ocorre mais tardiamente que a migração dos neutrófilos. Os macrófagos fagocitam e matam um grande número de microorganismos, além de removerem restos celulares e resíduos provenientes de tecidos lesados, sendo, portanto, essenciais para a reparação tecidual. Os macrófagos também são as células de ligação da imunidade inata com a imunidade adaptativa, pois eles possuem a capacidade de fagocitar, processar e apresentar os antígenos de forma que estes possam ser reconhecidos pelos linfócitos. Esta capacidade dos macrófagos é fundamental para iniciar a resposta imune adaptativa (CALICH, 2001; ROITT, 2003).

A resposta imune adaptativa é altamente específica para um dado patógeno, e torna-se mais eficiente após cada encontro sucessivo com o mesmo patógeno. Na verdade o sistema imune adaptativo “memoriza” o agente infeccioso evitando, desta forma, que este mesmo patógeno venha posteriormente causar a doença. Sendo assim, as duas principais características de uma resposta imune adaptativa são: a memória e a especificidade. Os linfócitos são as células centrais da resposta imune adaptativa. Essas células reconhecem, especificamente, patógenos individuais, quer eles estejam localizados no interior das células do hospedeiro, nos fluidos teciduais ou no sangue. Os linfócitos podem ser enquadrados em duas categorias básicas: linfócitos T e linfócitos B. Entre as propriedades da lectina Artin M, também podemos citar o seu efeito mitogênico sobre os linfócitos B e T, sendo, portanto uma ferramenta imunológica extremamente útil para o entendimento dos mecanismos de regulação e ativação da resposta imune (BUNN-MORENO, 1981; CALICH, 2001).

Os linfócitos B combatem patógenos extracelulares e seus produtos por meio da liberação de anticorpos, os quais constituem moléculas que reconhecem e se ligam especificamente a uma determinada molécula-alvo, chamada antígeno. Este, por sua vez, pode ser uma molécula na superfície de um patógeno ou uma toxina por ele produzida. Já os linfócitos T possuem uma ampla variedade de atividades, pois constituem várias sub-populações, como ilustrado na Figura 4 (CALICH, 2001).

A expansão das células T CD4⁺ do tipo Ta¹ promove a imunização do hospedeiro contra os parasitas intracelulares *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, causadores da leishmaniose cutânea. Estas células quando ativadas secretam interferon γ (IFN- γ), o qual ativa os macrófagos que são as células responsáveis pela defesa do organismo contra estes protozoários. A ativação das células T CD4⁺ do tipo Ta¹ é induzida pela interleucina-12 p40 secretada pelos macrófagos. A lectina Artin M é capaz de induzir a produção desta interleucina pelos macrófagos, controlar a infecção por *Leishmania*, e promover, desta forma, a imunização de ratos da linhagem BALB/c contra tais parasitas (TEIXEIRA, 2006). Pelo mesmo mecanismo de indução da produção de IL-12 p40 pelos macrófagos, a Artin M também é capaz de promover a imunização, desta mesma linhagem de ratos, contra o fungo *Paracoccidioides braziliensis*, o qual é causador da doença pulmonar conhecida como paracoccidiomicose (COLTRI, 2008).

Figura 4. Subpopulações de linfócitos T. As células T CD4⁺, ou auxiliares, do tipo 1 (Ta¹) liberam citocinas que induzem a destruição dos microorganismos internalizados e apresentados pelos macrófagos. As células T auxiliares do tipo 2 (Ta²) liberam citocinas responsáveis pela ativação dos linfócitos B, por meio da apresentação de antígeno pelas mesmas, induzindo sua divisão e diferenciação. As células T CD8⁺, ou citotóxicas (Tc) e as células NK (do inglês, *natural killers*) reconhecem e destroem as células infectadas por vírus.

As células do sistema imunológico podem ser estimuladas tanto pela proximidade, pelo contato célula-célula (sinapse imunológica) como a distância pela ação das citocinas, as quais são proteínas formadoras do sistema complemento. As citocinas são proteínas,

polipeptídeos ou glicoproteínas, envolvidos na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes, ou seja, elas controlam o processo inflamatório por meio de interações entre si e com outros elementos do sistema imune (CALICH, 2001; ROITT, 2003). Cada grupo de células libera um conjunto particular de citocinas, dependendo do tipo celular e do seu estado de ativação ou inativação. Os principais grupos de citocinas são:

- Interferons (*IFNs*): importantes na limitação da propagação de determinadas infecções. Este grupo é composto pelos *IFN α* , *IFN β* e *IFN γ* , os quais induzem um estado de resistência antiviral em células teciduais não infectadas. Eles são produzidos na fase inicial da infecção e constituem a primeira linha de resistência a muitos vírus.
- Interleucinas (*ILs*): são citocinas (*IL-1* a *IL-22*) produzidas principalmente por células T, embora algumas sejam produzidas por fagócitos mononucleares e células teciduais. Possuem uma variedade de funções, mas a maioria delas está envolvida na indução de divisão e diferenciação de outras células.
- Quimiocinas: são citocinas quimiotáticas, ou seja, responsáveis pelo direcionamento da movimentação das células pelo organismo partindo da circulação sanguínea até o local da infecção.
- Outras citocinas: neste grupo, os fatores de necrose tumoral (*TNF α* e *TNF β*) e o fator β de transformação de crescimento (*TGF β*) possuem uma variedade de funções, mas são particularmente importantes nas reações inflamatórias e citotóxicas.

A ativação do complemento é uma reação em cascata, que leva ao aparecimento de peptídeos que possuem as seguintes funções:

- Revestir o alvo, como uma bactéria, por exemplo, com proteínas do complemento, permitindo, desta forma, o reconhecimento e a internalização das bactérias pelos fagócitos. Tal processo é denominado opsonização.
- Atrair os fagócitos para o local da infecção, sendo que tal migração ocorre ativamente mediante gradientes de concentração de determinadas moléculas, denominadas quimiocinas, esse processo de migração é conhecido como quimiotaxia. As quimiocinas controlam o processo de migração celular por meio da ativação das células circulantes, promovendo sua ligação ao endotélio e iniciando a migração dos leucócitos através do endotélio.
- Aumentar o fluxo sanguíneo no sítio de ativação e aumentar a permeabilidade capilar das moléculas plasmáticas.

- Lesionar as membranas plasmáticas das células, de bactérias Gram-negativas, os envelopes virais ou outros organismos que tenham induzido a ativação do complemento, levando à lise da célula ou do vírus, com conseqüente redução da infecção. As funções do sistema complemento encontram-se resumidas na Figura 5 (CALICH, 2001).

A ativação do sistema complemento pode ser iniciada por três vias diferentes: via alternativa, via das lectinas e via clássica. Todas as vias convergem para a ativação do terceiro componente, a proteína C3. A via clássica é ativada pelo anticorpo ligado ao antígeno e a via alternativa pela presença de vários patógenos microbianos. A via das lectinas, por sua vez é ativada pela ligação da proteína MBL (do inglês, *mannose binding lectin*) a resíduos de manose e de N-acetil-glicosamina encontrados em abundância na superfície de microorganismos. Recentemente, descobriu-se que outra lectina, conhecida como ficolina, também é capaz de ativar essa via (CALICH, 2001).

Figura 5. Funções do sistema complemento: (1) lise de bactérias, (2) Atração de fagócitos até o local da infecção e (3) e opsonização de microorganismos para facilitar seu reconhecimento pelas células do sistema imune.

É muito provável que outras proteínas capazes de se ligar aos resíduos de açúcares citados acima desempenhem esta mesma função (CALICH, 2001; ROITT, 2003). A lectina Artin M, proteína alvo de estudo do presente trabalho, devido a sua afinidade preferencial por

D-manose, também é capaz de induzir a ativação do sistema complemento, auxiliando, desta forma, no controle da inflamação causada por alguns microorganismos.

Quando um microorganismo não possui a habilidade intrínseca de ativar o complemento ou de se ligar aos fagócitos, o organismo fornece anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas, como moléculas adaptadoras flexíveis. O organismo pode produzir milhões de anticorpos diferentes, capazes de reconhecer uma ampla variedade de agentes infecciosos. Conseqüentemente, o anticorpo é importante como fator limitante da propagação da infecção e na prevenção da reinfecção pelo mesmo agente viral (CALICH, 2001).

Recentemente foi descoberto que além das propriedades previamente citadas, a Artin M também é capaz de atuar fortemente na aceleração da cicatrização de ferimentos na pele e na córnea (CHAHUD, 2009), propriedade que permitiu o desenvolvimento de uma pomada para o tratamento de queimaduras, pelo grupo do Departamento de Biologia Molecular e Celular e Bioagentes Patogênicos da Universidade de São Paulo, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque-Barreira (FUNDAÇÃO..., 2003).

1.1.3. A Artin M Recombinante (rArtinM)

Estudos mais profundos da ação biológica da Artin M e a sua aplicação no desenvolvimento de produtos na área farmacêutica são fortemente limitados pela safra da fruta e pela difícil tarefa de purificação desta lectina totalmente livre de jacalina, a qual está presente no extrato bruto das sementes da jaca em uma concentração 60 vezes maior. Sendo assim, o grupo coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Helena de Souza Goldman do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo desenvolveu uma metodologia para a clonagem de seu cDNA para a produção da proteína recombinante, rArtinM (SILVA, 2005).

Atualmente, muitas proteínas são produzidas por meio da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diversas doenças, tais como câncer, alergias, doenças auto-imunes e neurológicas, ataques cardíacos, infecções, ferimentos e doenças genéticas, assim como para fins mais triviais, como uso em detergentes e na produção de alimentos (WATSON, 1996). Um exemplo é a insulina humana expressa em células de *E. coli*, a qual foi a primeira proteína a ser produzida por engenharia genética e autorizada a ser comercializada como medicamento. A insulina é um importante hormônio normalmente produzido pelas células do pâncreas, e que regula o metabolismo dos açúcares, sendo que a

falta deste hormônio causa a diabetes. Anteriormente à produção da molécula recombinante, a insulina utilizada nos tratamentos de diabetes era obtida a partir do pâncreas de porcos e vacas. Essa insulina causava, em alguns pacientes, reações imunológicas, pois embora ela seja biologicamente ativa em humanos, sua seqüência de aminoácidos não é idêntica à da insulina humana (WATSON, 1996).

Outro dos grandes sucessos da medicina moderna foi o desenvolvimento e a aplicação de vacinas contra doenças infecciosas. Há alguns anos dois tipos de vacina eram utilizadas: as vacinas inativadas que eram compostas de derivados quimicamente mortos do agente infeccioso real e as vacinas atenuadas que eram compostas do vírus ou bactéria vivos, porém alterados para que não pudessem se multiplicar no organismo inoculado. Entretanto esses dois tipos de vacina são potencialmente perigosos, visto que elas podem ser contaminadas com organismos infecciosos. Portanto, uma das aplicações mais promissoras da tecnologia do DNA recombinante é a produção de subunidades de vacinas, consistindo somente de uma proteína de superfície à qual o sistema imune responda. A primeira subunidade de vacina bem sucedida produzida foi para o vírus da hepatite B, o qual infecta o fígado, danificando-o e em alguns casos evoluindo a um câncer. tecnologia do DNA recombinante vem fornecendo uma maneira segura de trabalhar e inocular crianças e adultos somente com partes não-infecciosas de agentes infecciosos (WATSON, 1996).

Assim também, a produção da lectina Artin M recombinante possui como intuito o desenvolvimento de medicamentos e/ou vacinas para os males citados na seção 1.1.2, visto que a utilização desta lectina na sua forma nativa possui como principal limitação a sua purificação, além da sua quantidade extremamente baixa nas sementes da jaca. Sendo assim, a verificação da equivalência entre as formas nativa e recombinante da lectina Artin M é de extrema importância, pois visa a sua aplicação em substituição da proteína nativa. Tal estudo é objetivo principal do presente trabalho.

1.2. O Ligante: Peroxidase de Raiz Forte (HRP)

A avaliação da equivalência entre as formas nativa e recombinante da lectina Artin M foi realizada por meio do monitoramento da interação destas com a peroxidase de raiz forte (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*).

A HRP é uma enzima extraída principalmente das raízes do rábano silvestre (raiz forte), Figura 6.a. A sua produção em larga escala está relacionada ao seu uso comercial em

kits de diagnóstico e em imunoensaaios como enzima repórter, devido à sua capacidade de oxidar diversos compostos orgânicos e inorgânicos utilizando como substrato o peróxido de hidrogênio (VEITCH, 2004; WUHRER, 2005).

Figura 6: (a) Ilustração do rábano silvestre, da raiz do qual é extraída a enzima peroxidase e a (b) estrutura da enzima (VEITCH, 2004).

A estrutura da HRP é formada por apenas uma cadeia polipeptídica composta por 308 resíduos de aminoácidos, e dois centros metálicos diferentes, uma proporfirina IX com um átomo de ferro (III), também denominado de grupo heme, (em vermelho na Fig. 6.b) e dois átomos de cálcio (em azul na Fig. 6.b). Ambos os centros metálicos são essenciais para a estrutura e integridade funcional da enzima (VEITCH, 2004; WUHRER, 2005).

A capacidade da Artin M em interagir com esta enzima é devido ao fato desta possuir em sua estrutura 9 sítios de *N-glicosilação*. O perfil de glicosilação da HRP é heterogêneo, e compõe 20 % de sua massa total. Porém a interação da Artin M com esta glicoproteína é devido à alta afinidade da lectina pelo heptassacarídeo ramificado composto por manose, glicose, fucose e xilose, cuja estrutura é apresentada na Figura 7. Este polissacarídeo compõe 75-80 % das glicanas presentes na estrutura da HRP (VEITCH, 2004).

Figura 7: Estrutura do heptassacarídeo presente na HRP, pelo qual a lectina Artin M possui alta afinidade (VEITCH, 2004).

A lectina Artin M reconhece e interage com esta glicana presente na estrutura da HRP por meio dos quatro domínios de reconhecimento de carboidrato presente em sua estrutura (Fig. 8), sendo que cada domínio é capaz de interagir com uma glicana presente em uma molécula de HRP.

Figura 8: Representação do reconhecimento da glicana (heptassacarídeo) presente na estrutura da HRP por um dos CRDs da lectina Artin M (JEPRAYAKASH, 2004).

1.3. Reconhecimento Molecular e Biossensor

O reconhecimento de moléculas presentes no meio celular e na membrana das células é imprescindível para o desencadeamento dos processos celulares adequados a cada situação. Por exemplo, a identificação de um patógeno por meio das moléculas presentes em sua membrana desencadeará um processo inflamatório necessário à defesa do organismo. Como

exemplo também se pode citar a identificação de uma fonte de carbono energeticamente mais vantajosa para o organismo, por meio da qual será ativada a via sintética das enzimas responsáveis pela sua degradação.

A mediação dos processos biológicos, pelas lectinas, ocorre por meio do reconhecimento molecular específico de açúcares ou glicoproteínas presentes no meio celular ou na membrana das células. A especificidade e eficiência das interações lectina-carboidrato são devido a eventos multivalentes conhecidos como “efeito do agrupamento de glicosídeos”. Efeito que é definido como um aumento da afinidade obtido por ligantes multivalentes o qual, é maior do que o aumento da afinidade esperado por um simples efeito do aumento da concentração, pois derivados de carboidratos multivalentes podem interagir simultaneamente com diversos sítios de ligação de uma mesma lectina (WILCZEWSKI, 2008).

Sendo assim, o reconhecimento de carboidratos pelas lectinas é importante de ser avaliado e estudado. Esta avaliação pode ocorrer por meio do desenvolvimento de biossensores, os quais são sensores biológicos capazes de transformar a informação de reconhecimento molecular em um sinal elétrico, reproduzindo os processos de reconhecimento molecular com alta especificidade em sinal elétrico. Desta maneira, esses dispositivos utilizam como princípio de funcionamento a incorporação de um elemento biologicamente ativo, tal como enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos ou proteínas a um transdutor, o qual é o elemento que reconhece o sinal biológico e o converte em uma resposta que é processada e revelada como um sinal digital (BUNDE, 1998; RICCI, 2007). Os biossensores podem ser utilizados tanto na detecção de moléculas pequenas como microorganismo patogênicos intactos (SKOTTRUP, 2008).

O método de detecção de patógenos mais bem estabelecido e utilizado, atualmente, é o ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Esse tipo de análise possui um custo reduzido, além de ser de fácil manipulação e oferecer alta seletividade e especificidade. Porém, para o ELISA são requeridos exaustivos processos de limpeza da amostra e purificação das biomoléculas, além da necessidade de uma molécula marcadora, por tratar-se de um método espectrofotométrico (GOODING, 1999; LAZCKA, 2007; RICCI, 2007; SKOTTRUP, 2008). Apesar de muito utilizado, o sistema ELISA de análise tem sido uma fonte de inspiração para o desenvolvimento de outros tipos de biossensores com a mesma eficiência, porém mais simples e com menor tempo de análise (GOODING, 1999; LAZCKA, 2007; RICCI, 2007).

Atualmente têm sido desenvolvidos biossensores utilizando-se de técnicas mais avançadas e que não necessitam de moléculas marcadoras, tais como a microbalança a cristal

de quartzo (QCM, do inglês, *Quartz Crystal Microbalance*) e a ressonância de superfície plasmônica (SPR, do inglês, *Surface Plasmon Resonance*) (GOODING, 1999; LAZCKA, 2007; RICCI, 2007). Essas técnicas permitem a detecção direta e em tempo real de uma interação, não necessitando, desta forma, da adição de moléculas marcadoras (KOSSLINGER, 1995; DAMOS, 2004; LAZCKA, 2007; BOUNJDAY, 2009).

À primeira vista a técnica de SPR chama atenção devido a sua capacidade de detecção altamente específica, permitindo, desta forma, a determinação de propriedades dielétricas, cinética de associação e dissociação e constantes de afinidades em interações específicas. Esta técnica possui como princípio o monitoramento as variações no índice de refração devidas às interações, ligações e dissociações, entre moléculas, próximas à superfície do sensor (DAMOS, 2004; LARICCHIA-ROBBIO, 2004; LAZCKA, 2007; RICCI, 2007). Apesar de ser uma técnica poderosa no estudo dos mecanismos das interações biológicas, a técnica de SPR requer equipamentos complexos e extremamente caros, o que limita a sua utilização a laboratórios de pesquisa com fortes investimentos de companhias privadas (LAZCKA, 2007; RICCI, 2007).

A melhor técnica alternativa a SPR é a QCM, pois além de também ser uma poderosa técnica de detecção altamente específica, requer equipamentos muito mais baratos e de fácil manipulação (LARICCHIA-ROBBIO, 2004; RICCI, 2007). A técnica de QCM será descrita com mais detalhes na próxima seção, sendo que será também a técnica primordial utilizada nesta dissertação.

1.4. Microbalança a Cristal de Quartzo

A técnica de microbalança a cristal de quartzo (QCM, do inglês *quartz crystal microbalance*) tem sido amplamente utilizada no estudo de processos biológicos fundamentais, no desenvolvimento de biossensores e de sistemas biomoleculares mais complexos, incluindo estudos com células vivas (MARX, 2003). A ampla aplicação da QCM é devido, principalmente, a sua capacidade em medir variações de massa da ordem de nanogramas, de sua fácil manipulação e obtenção de resultados em tempo real (PEI, 2005; PEDROSO, 2006; PEDROSO, 2008). Além disso, os experimentos podem ser realizados utilizando moléculas biológicas nativas sem qualquer tipo de marcador (PEI, 2005).

O estudo de reconhecimento de carboidratos por meio de QCM é recente, porém os resultados demonstram que esta técnica é adequada para a análise de tais sistemas moleculares

(BUNDE, 1998; MARX, 2003; PEI, 2005; PEDROSO, 2008). A confiabilidade dos resultados da QCM tem sido verificada por diferentes métodos complementares tais como: espectroscopia de impedância eletroquímica (BUTTRY, 1992), análises de impedância piezelétrica (KIM, 2003; CHO, 2004), espectroscopia de fluorescência (KIM, 2003; CHO, 2004), ressonância de superfície plasmônica (OKAHATA, 2000; CHO, 2004; LARICCHIA-ROBBIO, 2004), microscopia de força atômica (CARUSO, 1996; COFFEY, 2001; CHO, 2004) e espectroscopia de fotoelétrons (KRISTENSEN, 2003).

1.4.1. Fundamentos da Técnica QCM

A QCM é uma técnica eletrogravimétrica extremamente sensível que possui como princípio de funcionamento o comportamento ressonante de alguns materiais cristalinos piezeletricos. O termo piezeletricidade é derivado do grego “piezein-elektro” ou “pressão-eletricidade”, ou seja, trata-se do acoplamento das características elétricas e mecânicas apresentada por alguns materiais (COOPER, 2007). Portanto, o fenômeno da piezeletricidade, originalmente descoberto por Pierre e Jacques Curie em 1880, é caracterizado pela capacidade de geração de um campo elétrico por um material quando este é submetido a um estresse mecânico. E reciprocamente, a indução de deformação mecânica quando um material é submetido a uma diferença de potencial, sendo que a direção e a magnitude do estresse induzido são diretamente dependentes da direção do campo elétrico aplicado relativo ao eixo do cristal (EDVARDSSON, 2005; COOPER, 2007).

O material mais comumente utilizado é o quartzo α , que consiste de uma forma cristalina específica do dióxido de silício (SiO_2), na forma de discos com corte AT, como mostrado na Figura 9. Esta geometria fornece ao cristal uma oscilação estável sem influências da variação da temperatura (entre 10 e 50 °C) na frequência fundamental do cristal. Esses discos, normalmente, são circulares e possuem eletrodos metálicos, geralmente ouro ou prata, depositados em ambos os lados do cristal por evaporação térmica (LIN, 1995; BUNDE, 1998; MARX, 2003).

Quando uma diferença de potencial AC é aplicada nos eletrodos depositados no cristal, este oscila em sua frequência de ressonância fundamental (f). A espessura do cristal determina a sua frequência ressonante, a qual, por sua vez, determina a sensibilidade de massa. Cristais mais finos ressonam em frequências mais altas e são mais sensíveis, mas tendem, entretanto, a serem mais frágeis.

Figura 9. Diagrama esquemático do cristal de quartzo de corte AT, no qual são depositados os eletrodos metálicos, e a visão final do cristal com modo de cisalhamento de espessura de vibração (MARX, 2003).

A adsorção de uma determinada massa, em um dos lados (ou em ambos) do eletrodo metálico, pequena quando comparada à massa do cristal de quartzo (10% da massa do cristal), causa um decréscimo na frequência de oscilação do cristal de quartzo proporcional à massa do filme depositado. As variações na frequência ressonante do cristal de quartzo são relacionadas à massa acumulada no cristal pela relação, demonstrada por Sauerbrey em 1959, apresentada na Equação 1 (BUNDE, 1998).

$$\Delta F = \frac{-2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\mu_q \rho_q}} = -C\Delta m \quad (1)$$

onde, ΔF é a variação de frequência medida em Hz, f_0 é a frequência fundamental em Hz, Δm é a variação de massa em gramas, A é a área piezoelectricamente ativa (área superficial do eletrodo) em cm^2 ; μ_q é o modo de cisalhamento do quartzo ($2,947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-2}$), ρ_q é a densidade do quartzo ($2,648 \text{ g cm}^{-3}$), e C é a constante de sensibilidade de massa (baseada no tipo de uso do cristal) em $(\text{sg})^{-1}$ (BUNDE, 1998). Entretanto, a equação de Sauerbrey é válida, somente, para o monitoramento da variação da frequência durante a deposição de filmes finos sólidos na superfície do transdutor, quando este se encontra em meio de ar ou vácuo.

Em 1985, Kanazawa e colaboradores (KANAZAWA, 1985) demonstraram que, quando o cristal de quartzo piezelétrico encontra-se com uma de suas faces em contato com um meio líquido, embora este consiga oscilar, a frequência de sua oscilação é influenciada pela densidade e viscosidade do líquido, sendo esta influência expressa pela Equação 2.

$$\Delta f = -\sqrt{f_0^3 \frac{\eta_1 \rho_1}{\pi \mu_q \rho_q}} \quad (2)$$

onde, η_1 é a viscosidade do líquido, ρ_1 é a densidade do líquido, μ_q é o módulo de cisalhamento do quartzo e ρ_q é a densidade do quartzo. Por fim, estabeleceram que a variação da frequência de oscilação do cristal quando uma massa é depositada sobre sua superfície e quando imerso em meio líquido é dada pela relação expressa na Equação 3.

$$\Delta F = -f_0^2 \left(\frac{\Delta m}{F_q \rho_q A_{el}} + \sqrt{\frac{\eta_1 \rho_1}{f_0 \pi \mu_q \rho_q}} \right) \quad (3)$$

Desde então, a QCM vem sendo amplamente utilizada no desenvolvimento de sensores biológicos para o estudo dos mecanismos de reconhecimento molecular (WINK, 1997; DAMOS, 2004; TLILI, 2004; PEI, 2005; PEDROSO, 2008; BOUJDAY, 2009) através da detecção da massa durante ligações específicas do analito com o transdutor.

1.5. Estratégia de Funcionalização do Transdutor

A camada biológica incorporada à superfície do transdutor, o cristal de quartzo piezolétrico, em conjunto com as condições ambientais da análise ditam a aplicabilidade geral e a sensibilidade do sistema biossensor (BUNDE, 1998; SKOTTRUP, 2008). Portanto, o procedimento utilizado para a imobilização da lectina no transdutor é extremamente importante, pois este deve manter a biomolécula próxima à superfície do transdutor sem que ocorra a perda de sua atividade biológica (GOODING, 1999; LAZCKA, 2007). Os métodos de imobilização mais empregados, por exemplo, os procedimentos de adsorção, ligação cruzada, ligação covalente e aprisionamento em géis ou membranas produzem uma superfície altamente desorganizada, com as biomoléculas orientadas randomicamente, provocando mudanças conformacionais que afetam sua atividade funcional com conseqüente baixa reprodutibilidade (COSNIER, 1999; FREIRE, 2003).

A formação de monocamadas auto-organizadas (SAM, do inglês, *self-assembled monolayer*) induzida por uma forte quimiossorção entre o substrato e o grupo localizado em uma das extremidades de moléculas orgânicas selecionadas, consiste em um dos mais

elegantes métodos para a obtenção de filmes orgânicos ultrafinos de espessura controlada (CHAKI, 2002). As SAMs consistem em monocamadas formadas por uma ligação covalente extremamente forte entre moléculas orgânicas, a partir de uma solução ou de uma fase gasosa, e superfícies metálicas, tais como ouro, prata, platina e cobre. Dentre estes metais, o ouro é o mais comumente utilizado devido à superior afinidade dos grupamentos tíois por este metal (GOODING, 1999; FREIRE, 2003).

Tabela 2. Principais aplicações das SAMs, entre as quais podemos destacar as aplicações biológicas, tais como a imobilização de proteínas e o estudo de interações biológicas (incluindo interações lectina-carboidrato), as quais foram exploradas no presente trabalho (adaptado de (FREIRE, 2003)).

BIOLÓGICA	- Estudo de interações biológicas
	- Biorreatores
	- Imobilização / Adsorção de proteínas
	- Estudos de biocompatibilidade
	- Modelos de membranas biológicas
	- Acompanhamento e/ou escolha de drogas
FÍSICAS	- Ótica não-linear
	- Planejamento de superfície
	- Dispositivos com alta densidade de memória
	- Miniaturização (nanotecnologia)
QUÍMICAS	- Fotolitografia
	- Transferência eletrônica
	- Catálise
	- Estudos de fenômenos de interface
	- Corrosão
	- Desenvolvimento de novos materiais
	- Sensores: ópticos, eletroquímicos e piezoelétricos

Os grupos funcionais na outra extremidade da molécula controlam as propriedades de superfície do transdutor, e podem ser amplamente variados, tais como grupamentos metila ($-\text{CH}_3$), carboxila ($-\text{COOH}$), amina ($-\text{NH}_2$), hidroxila ($-\text{OH}$) ou até uma mistura desses (EDVARDSSON, 2005). O transdutor funcionalizado por meio das SAMs possui uma grande variedade de aplicações, como mostra a Tabela 2.

Desta forma, as SAMs de alcanotióis, procedimento utilizado no presente trabalho para a funcionalização do transdutor, constituem em uma camada base, na qual qualquer proteína pode ser quimicamente ligada via um grupo funcional adequado, como ácido carboxílico ou amina (BRIAND, 2007).

Misturas contendo diferentes tióis resultam em uma monocamada homogênea de ambos os componentes. A formação de monocamadas homogêneas a partir de misturas de alcanotióis é importante na construção de sensores com elementos de reconhecimento grandes, os quais podem ser espaçados uns dos outros, evitando, desta forma problemas de impedimento estérico na interação destes com o ligante (GOODING, 1999).

Sendo assim, no presente trabalho foram utilizadas as SAMs formadas a partir de uma mistura de dois alcanotióis diferentes, o ácido 11-mercaptoundecanóico, alcanotiól de cadeia longa, em menor proporção, no qual a biomolécula foi ligada a partir de uma reação entre um grupamento carboxílico terminal do alcanotiól e um grupamento amina presente na estrutura da lectina. O 2-mercaptoetanol, alcanotiól de cadeia curta, foi utilizado em maior proporção com o intuito de promover um bom espaçamento entre as moléculas de lectina imobilizada, para que estas pudessem interagir livremente com o ligante sem que ocorressem problemas de impedimento estérico, pois além da molécula de lectina possuir um volume considerável, o ligante utilizado, por ser uma enzima, também é uma molécula de grande volume.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biossensor para o estudo da equivalência entre a forma nativa e recombinante da lectina Artin M em sua afinidade por glicanas. Este estudo de equivalência foi realizado pela determinação das constantes de afinidade aparente e de associação cinética das interações lectina-carboidrato, por meio da técnica de microbalança a cristal de quartzo.

Após a avaliação da equivalência entre as formas nativa e recombinante da lectina Artin M, também se objetivou determinar a constante de associação cinética da interação entre esta lectina e três diferentes linhagens de células leucêmicas.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação

3.1.1. CRISTAIS DE QUARTZO PIEZELÉTRICOS

Foram utilizados neste trabalho cristais de quartzo piezelétricos de corte AT com frequência fundamental de 5 MHz e com 16 mm de diâmetro, contendo eletrodos de ouro concêntricos depositados em ambos os lados do cristal, tal como ilustrado na Figura 10.

Figura 10. Foto do cristal de quartzo piezelétrico de 5 MHz com eletrodos de ouro em ambos os lados

3.1.2. MICROBALANÇA A CRISTAL DE QUARTZO

O monitoramento da variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo foi realizado utilizando uma microbalança da Q-sense (QCM-D) modelo E4, como ilustrado na Figura 11. A QCM-D possui uma sensibilidade de $1,8 \text{ ng cm}^{-2}$ os quais correspondem a 0,1 Hz quando o cristal está imerso em meio líquido.

As medidas foram realizadas em uma célula de fluxo paralelo contínuo, sendo 40 μL o volume da câmara onde foi fixado o cristal de quartzo. A célula de medidas também possui controle de temperatura, podendo este variar entre 18 e 50 $^{\circ}\text{C}$ com uma estabilidade de 0,02 $^{\circ}\text{C}$.

Figura 11. Foto da (a) microbalança a cristal de quartzo, (b) plataforma onde são conectadas as células, (c) célula de medida conectada em fluxo e (d) célula aberta com o cristal de quartzo piezelétrico.

3.1.3. VOLTAMETRIA CÍCLICA

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas utilizando-se um potenciostato modelo PGSTAT 30 da Autolab, interfaceado a um computador e controlado pelo software GPES. As voltametrias foram realizadas em uma célula convencional de três eletrodos à temperatura ambiente, utilizando um eletrodo de ouro modificado (com área de $7,1 \text{ mm}^2$), um eletrodo platina e um eletrodo de calomelano saturado como eletrodo de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência, respectivamente.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Para a construção das monocamadas auto-organizadas foram utilizados o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) (Sigma-Aldrich), 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), N-etil-N-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Fluka) e N-hidroxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich). A solução contendo os alcanotióis foi preparada em etanol (Chemis) e a solução de EDC/NHS foi preparada em solução tampão fosfato salina 0,1 mol L⁻¹ com pH 7,0 (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*).

A lectina Artin M nativa utilizada neste trabalho foi extraída e purificada das sementes da jaca da espécie *Artocarpus integrifolia*. Esta lectina foi obtida em parceria com o Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Molecular e Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque-Barreira. A Artin M na sua forma recombinante, o reagente de bloqueio, gelatina, e a albumina de soro bovino (BSA) foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque-Barreira.

O analito utilizado para o estudo da interação lectina-carboidrato foi a glicoproteína peroxidase de raiz forte (HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*) (Sigma-Aldrich). As soluções das lectinas, dos analitos e de gelatina também foram preparadas em PBS.

Nos estudos da cinética de interação entre a lectina Artin M e as células leucêmicas, as linhagens de células humanas utilizadas, NB4 (leucemia promielocítica aguda), K562 (leucemia eritromegacarioblástica) e U937 (leucemia monocítica), foram gentilmente preparadas e cedidas pela Fernanda C. Carvalho, pesquisadora do grupo da Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque-Barreira.

Na realização dos experimentos de voltametria cíclica foram utilizados hidroquinona (Sigma) e H₂O₂ 30% (Synth), e HCl (Synth), KI (Chemco), KIO₃ (Synth), Na₂S₂O₃ (Chemco), CHCl₃ (Chemis) e amido solúvel (Reagen), foram utilizados para a padronização da solução de peróxido. Todas as soluções foram preparadas em água destilada.

3.2.2. LIMPEZA DOS CRISTAIS

Para a limpeza dos cristais de quartzo piezelétricos foi utilizada uma solução recém preparada de ácido sulfúrico concentrado, H_2SO_4 (Synth) e peróxido de hidrogênio, H_2O_2 30% (Synth) na proporção 7:3, respectivamente. Em seguida, os cristais foram enxaguados com água destilada e secos ao ar.

3.2.3. FUNCIONALIZAÇÃO DO TRANSDUTOR

A funcionalização do transdutor, o cristal de quartzo piezelétrico (Figura 7), foi realizada por meio da formação de monocamadas auto-organizadas de alcanotióis. Uma monocamada homogênea foi construída a partir de uma solução contendo dois alcanotióis, o ácido 11-mercaptoundecanóico e o 2-mercaptoetanol nas concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ e 10 mol L^{-1} , respectivamente. O MUA foi utilizado para a ligação da lectina, por meio de uma ligação entre um grupamento amina presente na estrutura da proteína e o grupamento carboxílico presente em uma das extremidades da molécula do alcanotiól. O 2-mercaptoetanol foi utilizado somente como espaçador entre as moléculas de proteína que foram, em seguida, imobilizadas. A mistura dos alcanotióis foi preparada em etanol (Chemis), e nesta solução, o transdutor foi imerso por um período de 3 h. Em seguida o cristal foi lavado com etanol e PBS. Subsequentemente o cristal foi imerso, por 2 h, em uma solução de EDC e NHS de concentração $1,0 \times 10^{-2}$ e $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, para a ativação dos grupamentos carboxílicos, como ilustrado na Figura 12.

Figura 12. Ativação dos grupamentos carboxílicos por meio da reação com EDC/NHS.

Novamente o cristal foi lavado com PBS e em seguida, mantido, também por 2 h, em uma solução $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$ da lectina Artin M (nativa ou recombinante). Após este período o cristal foi lavado com PBS e exposto a uma solução de gelatina 0,001 % por 2 h, para o bloqueio dos grupamentos carboxílicos remanescentes e novamente lavado com PBS e seco ao ar. Na Figura 13 é apresentado um diagrama esquemático do biossensor pronto para a realização de uma medida.

Após as etapas de funcionalização, o cristal de quartzo piezelétrico contendo a lectina imobilizada foi fixado na célula de fluxo da QCM (Figura 8.d), dentro da qual somente um dos lados do cristal permaneceu em contato com a solução. Foi utilizada uma bomba peristáltica Ismatec modelo IPC de quatro canais para manter um fluxo carreador, a uma vazão de $200 \mu\text{L min}^{-1}$.

Figura 13. Diagrama esquemático da superfície do cristal de quartzo piezelétrico funcionalizado.

A imobilização das lectinas no eletrodo de ouro, para as medidas de voltametria cíclica, foi realizada da mesma maneira.

3.2.4. AVALIAÇÃO PIEZELÉTRICA

Os cristais piezelétricos funcionalizados, ou seja, com a lectina (jArtinM ou rArtinM) imobilizada, foram fixados na célula de fluxo da QCM de modo que somente um dos lados dos cristais permanecesse em contato com a solução. PBS foi utilizado como fluxo carreador para a estabilização do sinal de variação da frequência fundamental de vibração dos cristais de quartzo. Realizada a estabilização, foi adicionada a HRP nas concentrações 0,15, 0,22, 0,30, 0,40, 0,50, 0,65, 0,75, 1,00 e 1,50 mmol L⁻¹. Cada concentração de HRP foi adicionada a um cristal de quartzo diferente e cada medida foi realizada em triplicata. Após a adição, o fluxo foi desligado e a HRP foi deixada em contato com a lectina imobilizada por 30 minutos, depois dos quais o fluxo foi religado e toda a HRP que não interagiu com a Artin M foi lavada. Desta forma, a variação da frequência fundamental de vibração do cristal de quartzo obtida, depois de religado o fluxo, é referente, somente, às HRP ligadas à lectina imobilizada na superfície do transdutor.

Os experimentos envolvendo as células leucêmicas foram realizados da mesma maneira, sendo que o tempo de fluxo desligado, para as linhagens NB4 e K563 foi de 35 minutos e para a linhagem U937 foi de 20 minutos. As concentrações das células adicionadas foram: 5,0, 7,5, 10,0, 12,5 e 15,0x10⁻⁶ cel mL⁻¹ para a linhagem NB4 e 1,25, 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0x10⁻⁶ cel mL⁻¹ para as linhagens K562 e U937. As células foram adicionadas aos cristais de quartzo contendo a lectina recombinante imobilizada, e as adições foram realizadas em cristais diferentes e também em triplicatas.

3.2.5. PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Primeiramente foi preparada uma solução 0,033 mol L⁻¹ de KIO₃, por meio da solubilização, em água destilada, do sal previamente seco à 100 °C por 30 minutos em estufa. Em seguida foi preparada uma solução 0,2 mol L⁻¹ de Na₂S₂O₃ por meio da solubilização do sal em água destilada previamente aquecida até a ebulição para a retirada do CO₂ para que este não reagisse com sulfeto do sal. Após a preparação da solução de Na₂S₂O₃, nesta foi acrescentado 1 mL de CHCl₃ para a conservação. A solução indicadora foi preparada por meio da dissolução de 1 g de amido em 100 mL de água destilada quente, e mantida em fervura por 1 minuto.

Prontas as soluções, foi realizada a padronização da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Em um erlenmeyer foi colocado 5 mL de KIO_3 , 0,125 g de KI, 0,75 mL de HCl e alguns cristais de molibdato de sódio (Na_2MoO_4) como catalisador da reação. Em seguida, com uma bureta, o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ foi adicionado na solução do erlenmeyer até a solução tornar-se amarela, e então foram adicionados 0,5 mL de solução de amido, e deu-se prosseguimento à adição de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ até que a coloração azul desaparecesse. As reações envolvidas na padronização do tiosulfato de sódio são apresentadas pelas Equações 4 e 5.

Após a padronização da solução de tiosulfato, esta foi utilizada para a padronização da solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Em um erlenmeyer colocou-se 5 mL da solução de peróxido de hidrogênio, 0,25 mL de HCl, 0,125 g KI e 0,5 mL de solução de amido. Em seguida, com uma bureta, foi acrescentada a solução de tiosulfato de sódio até o desaparecimento da coloração azul. As reações envolvidas na padronização da solução de peróxido são apresentadas nas Equações 6 e 7.

Após a padronização, a solução de peróxido foi utilizada nos experimentos de voltametria cíclica.

3.2.6. AVALIAÇÃO VOLTAMÉTRICA

No eletrodo funcionalizado, ou seja, com a lectina (rArtinM ou jArtinM) e a HRP imobilizadas, foram realizadas 6 varreduras a uma velocidade de 50 mV.s^{-1} entre -0,2 e 0,3 V. As condições de meio para a realização das medidas foram:

- (1) PBS (branco)
- (2) PBS, hidroquinona e H_2O_2 .

Para a realização dos experimentos de voltametria cíclica foi utilizada uma solução $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de hidroquinona e uma solução $850 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. A Funcionalização do Transdutor

A funcionalização do transdutor foi realizada por meio da construção de monocamadas auto-organizadas a partir de uma mistura de dois alcanotióis, um de cadeia longa, MUA, no qual a lectina foi ligada pela reação do grupamento amina da lectina com grupamento carboxílico presente na cadeia do alcanotiól, e um de cadeia curta, 2-mercaptoetanol, o qual possuiu como função promover o espaçamento entre as moléculas de lectina imobilizada. A estrutura dos alcanotióis utilizados na construção da SAM é apresentada na Figura 14.

ÁCIDO 11-MERCAPTOUNDECANÓICO

Figura 14. Estrutura química dos alcanotióis utilizados na construção das monocamadas auto-organizadas, para posterior imobilização das lectinas (recombinante e nativa).

O espaçamento, entre as cadeias de MUA na superfície sensora, promovido pelo 2-mercaptoetanol é de extrema importância, pois a determinação dos parâmetros cinéticos de interações lectina-carboidrato, estando a molécula de lectina imobilizada em uma superfície rígida, é altamente afetado pelo impedimento estérico. O impedimento estérico durante as interações lectina-carboidrato é uma consequência da proximidade entre as moléculas de lectina imobilizada na superfície do transdutor, sendo facilmente contornado por uma alta diluição do alcanotiól ao qual a lectina se ligará.

A imobilização da lectina na superfície do transdutor, ao invés do carboidrato ou glicoconjugado, também foi importante para que um modelo de interação monomolecular

simples pudesse ser aplicado na análise cinética, sendo que o efeito do transporte de massa pode ser, neste caso, desprezado. Caso a molécula imobilizada fosse à glicomolécula, a análise cinética seria mais complexa, visto que tal modelo não poderia ser utilizado, pois devido à presença de dois ou mais sítios de interação em sua estrutura, a lectina em solução poderia interagir com mais de uma glicomolécula imobilizada, por meio de ligações cruzadas, o que levaria a um valor de afinidade aparente maior e a uma cinética de interação mais complexa (NILSSON, 2007). Desta forma, a lectina Artin M, tanto nativa quanto recombinante, foi imobilizada na superfície do transdutor por meio da construção de uma SAM a partir de uma mistura dos alcanotióis MUA e 2-mercaptoetanol na proporção de 1:100.000, respectivamente.

4.2. Estudo das Interações *jArtinM*-HRP e *rArtinM*-HRP

Os cristais de quartzo contendo a lectina imobilizada foram colocados em uma célula de fluxo da QCM e um fluxo contínuo de PBS foi utilizado até a estabilização da resposta de frequência do sistema. Em diferentes cristais, modificados ora com a *jArtinM* e ora com a *rArtinM*, foi adicionada HRP em concentrações crescentes, até ser atingida a saturação dos sítios de interação presentes na superfície sensora. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados a seguir correspondem às médias. Na Figura 12 são apresentadas as curvas de variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo obtidas pela adição da concentração máxima e mínima de HRP à cristais modificados com *jArtinM* e *rArtinM*.

Pela análise das curvas apresentadas na Fig. 15 nota-se que quando uma solução de HRP 0,15 mmol L⁻¹ é adicionada ao cristal de quartzo modificado, tanto com *jArtinM* como com *rArtinM*, a variação final da frequência fundamental (Δf) é a mesma, sendo que inicialmente pode ser observada uma variação na frequência fundamental maior do cristal de quartzo modificado com *rArtinM*. Para a adição de uma solução de HRP 1,50 mmol L⁻¹ observa-se uma pequena diferença de 2 Hz na variação final da frequência fundamental (Δf) dos cristais modificados com *jArtinM* e *rArtinM*, podendo ser um indicativo da ocorrência de uma saturação mais rápida dos sítios de interação presentes na superfície do transdutor. Entretanto, inicialmente, observa-se uma variação de frequência maior, pela adição de HRP, no cristal de quartzo modificado com *jArtinM*, o inverso do que ocorre quando HRP 0,15 mmol L⁻¹ é adicionada.

Figura 15. Curvas da variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para a adição de peroxidase (a) $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ e (b) $1,50 \text{ mmol L}^{-1}$ em jArtinM e rArtinM imobilizadas.

Carvalho (CARVALHO, 2008) estudando as propriedades biológicas da Artin M, nativa e recombinante, observou que, enquanto a lectina nativa possui uma estrutura tetramérica, o que implica na presença de quatro CRDs para interação com carboidrato, além de uma estrutura espacialmente maior, a sua forma recombinante está sendo expressa com uma estrutura monomérica, ou seja, com um único CRD presente em sua estrutura, sendo, portanto, espacialmente muito menor.

Com a imobilização dessas lectinas no cristal de quartzo, obtêm-se uma cobertura muito maior da superfície quando a lectina nativa é imobilizada, devido ao seu maior volume estrutural. Desta forma, com a adição de HRP $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$, devido a uma superfície muito mais exposta, a variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo quando este está modificado com a lectina recombinante é, inicialmente, maior, devido às interações inespecíficas da HRP com a superfície do transdutor. As variações da frequência de oscilação se igualam depois de religado o fluxo, quando as moléculas de HRP em interação inespecífica são removidas da superfície do transdutor.

A situação se inverte quando a concentração de HRP adicionada é $1,50 \text{ mmol L}^{-1}$, ou seja, a maior variação de frequência inicial é observada para o cristal de quartzo contendo a lectina nativa imobilizada. A superfície modificada com a lectina nativa possui um impedimento estérico maior para interações inespecíficas, porém esta possui mais sítios para interagir com a HRP adicionada. Desta forma quando a superfície sensora está modificada com a rArtinM a saturação ocorre mais rapidamente, sendo que um aumento na concentração de HRP adicionada não levará a um aumento na variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo. Por outro lado, quando a superfície sensora está modificada com a jArtinM, apesar das interações inespecíficas serem menores, devido ao maior número de sítios presentes em sua estrutura para interação com a HRP, a saturação leva um tempo maior para ocorrer e o aumento na concentração de HRP adicionada leva a uma maior variação inicial na frequência de oscilação do cristal de quartzo. Depois de religado o fluxo as variações na frequência não se igualam, restando uma diferença de 2 Hz entre elas, fato que corrobora com as diferenças na saturação da superfície sensora modificada com a lectina nativa e recombinante.

As curvas de saturação de ambas as lectinas foram construídas e são apresentadas na Figura 16. Observando-se as curvas de saturação dos sítios de interação presentes na superfície sensora, Fig.16, nota-se que quando o cristal de quartzo está modificado com a lectina recombinante, rArtinM, a saturação realmente ocorre mais rapidamente à uma concentração de $0,75 \text{ mmol L}^{-1}$ de HRP. Enquanto que, quando o cristal de quartzo está

modificado com a lectina nativa, jArtinM, a saturação dos sítios ocorre somente à concentração de 1,00 mmol L⁻¹ de HRP.

Figura 16. Curvas de saturação da (■) jArtinM e (▲) rArtinM com adições crescentes de HRP, em diferentes cristais de quartzo modificados.

A diferença observada na saturação das formas da Artin M se deve, provavelmente, à diferença estrutural existente entre elas, o que leva a uma diferença no número de sítios disponíveis para interação com HRP. No intuito de quantificar essa diferença foi realizado um ajuste exponencial nas curvas de saturação utilizando como modelo a Equação 8.

$$y = Ae^{-\frac{x}{t}} + y_0 \quad (8)$$

onde y é a variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo, x é a concentração de peroxidase adicionada, A é a amplitude e t é ao constante de decaimento. O ajuste realizado é apresentado na Figura 17. Os valores dos parâmetros, para ambas as formas da lectina, encontrados no ajuste estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados do ajuste realizado nas curvas de saturação de ambas as formas da lectina ArtinM, utilizando a Equação 8.

	jArtinM	rArtinM
A	-15 ± 1	-14 ± 1
t	$0,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$
y_0	18 ± 1	17 ± 2

A partir dos resultados do ajuste realizado, e utilizando a Equação 8, foram calculados os valores de variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo para cada uma das concentrações de HRP adicionadas ao transdutor funcionalizado tanto com a lectina nativa quanto com a recombinante. Por meio da diferença entre os valores encontrados para as interações jArtinM-HRP e para a rArtinM-HRP observou-se uma diferença de 7 % entre as formas nativa e recombinante da lectina.

Figura 17: Ajuste exponencial realizado nas curvas de saturação de ambas as formas da lectina Artin M (■) nativa e (▽) recombinante.

4.2. Avaliação da Especificidade

Para a confirmação da especificidade da interação entre a HRP e ambas as formas da Artin M foi realizado um teste negativo utilizando a BSA. Primeiramente a BSA foi imobilizada no transdutor, ao invés da lectina, e a este foi adicionada HRP 1,00 mmol L⁻¹, concentração na qual a superfície sensora modificada com ambas as lectinas já se encontra saturada. Esta medida foi realizada em triplicata e a variação média da frequência de oscilação do cristal de quartzo foi de (3 ± 2) Hz. Uma das medidas realizadas é apresentada na Figura 18.

Figura 18. Curva da variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo referente à adição de HRP 1,0 mmol L⁻¹ em BSA imobilizada no transdutor.

Comparando-se as variações na frequência de oscilação do cristal de quartzo funcionalizado com ambas as formas da lectina Artin M e com a BSA quando a HRP foi adicionada, é possível afirmar que a BSA não interage com a HRP. Este resultado já era esperado, pois se sabe que esta proteína apresenta-se inerte frente a carboidratos ou glicoproteínas, como a HRP, devido à ausência de um CRD em sua estrutura. Estes resultados corroboram para a confirmação da especificidade da interação lectina-glicoconjugado, neste caso jArtinM-HRP e rArtinM-HRP.

Para a confirmação da interação entre a HRP e a lectina também foram realizadas medidas de voltametria cíclica, devido à capacidade da HRP de reduzir o peróxido de hidrogênio à água por meio da reação ilustrada na Figura 19. Neste experimento duas condições de funcionalização do cristal de quartzo piezelétrico foram utilizadas, (1) o eletrodo de ouro com jArtinM imobilizada e (2) o eletrodo de ouro com rArtinM imobilizada. A imobilização de ambas as lectinas foi realizada por meio da formação de SAMs de alcanotióis, como descrito na seção 3.2.3.

Figura 19. Reação de redução do H_2O_2 na superfície do eletrodo em meio contendo hidroquinona.

Na Figura 20 estão apresentados os resultados de voltametria cíclica obtidos com o eletrodo de ouro contendo a HRP imobilizada em solução PBS e em solução PBS após a adição de H_2O_2 e hidroquinona ao meio reacional, na qual pode ser observado um aumento na corrente catódica após a adição de H_2O_2 e hidroquinona, o qual está relacionado à redução do peróxido de hidrogênio por esta enzima (MENDES, 2008).

Figura 20. Voltametria cíclica do eletrodo de ouro modificado com HRP 1,00 mmol L⁻¹ (■) em PBS 0,1 mol L⁻¹ e (○) em hidroquinona 0,25 μmol L⁻¹ e H₂O₂ 850 μmol L⁻¹ em PBS.

Os eletrodos foram, então, funcionalizados com a jArtinM e a rArtinM e imersos em uma solução 1,00 mmol L⁻¹ de HRP por 30 min. Em seguida, o eletrodo foi lavado com PBS e foi realizada a voltametria cíclica, em meio de PBS e após a adição de H₂O₂ e hidroquinona no meio reacional. Os voltamogramas cíclicos obtidos estão apresentados na Figura 21. Analisando-se os resultados é possível afirmar que ambas as formas da lectina estão interagindo com a HRP, pois se observa um aumento na corrente catódica relacionado à redução do peróxido de hidrogênio, assim como ocorreu quando no eletrodo de trabalho estava imobilizada somente a HRP (Fig. 20).

Figura 21. Voltametria cíclica (a) do eletrodo de ouro modificado com jArtinM após 30 min de interação com HRP $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (■) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS e (○) em hidroquinona $0,25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e H_2O_2 $850 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS, (b) do eletrodo de ouro modificado com rArtinM após 30 min de interação com HRP $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (■) em PBS e (○) em hidroquinona $0,25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e H_2O_2 $850 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS e (c) sobreposição das voltametrias cíclicas dos eletrodos modificados com (■) jArtinM e (○) rArtinM.

4.3. Determinação da Constante de Afinidade Aparente das Interações *jArtinM*-HRP e *rArtinM*-HRP

As lectinas, devido a sua capacidade de reconhecimento e ligação específica a carboidratos e glicoproteínas, exercem um papel fundamental como mediadoras de diversos processos biológicos. Desta forma, as lectinas são valiosas ferramentas para o estudo funcional e estrutural de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas, e para a análise de mudanças que ocorrem na superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos, da diferenciação celular ao câncer (SHARON, 1998). Portanto, o entendimento das propriedades e funções das lectinas, assim como o seu uso como ferramenta nas diversas áreas de estudo, depende da compreensão da sua especificidade em relação aos carboidratos. Uma maneira de analisar as interações lectina-carboidrato é por meio da determinação da afinidade entre a lectina e o carboidrato, o que vem sendo realizado por meio do modelo das isotermas de adsorção de Langmuir (LEBED, 2006; ZHANG, 2006; PEDROSO, 2008).

A adsorção é um processo, no qual ocorre o acúmulo de uma determinada substância em uma interface. Este processo pode ocorrer em todos os tipos de interface, tais como gás-sólido, solução-sólido e solução-gás (PEDROSO, 2006), sendo que a ligação entre o adsorbato e a superfície adsorvente pode ocorrer de duas maneiras. Na fisissorção, ou adsorção física, a interação entre o adsorbato e a superfície adsorvente é determinada por forças de van der Waals, as quais são forças fracas, porém de longo alcance e os valores típicos de entalpia para este tipo de adsorção estão na faixa de 20 kJ mol^{-1} . Contrastando com a fisissorção, a quimissorção, ou adsorção química, é resultado de forças de ligação muito mais intensas, comparáveis às que conduzem à formação de compostos químicos, desta forma, as moléculas (ou átomos) se ligam à superfície adsorvente por meio de ligações químicas (usualmente covalentes). Os valores de entalpia para os processos de quimissorção são superiores aos da fisissorção, e encontram-se na faixa de 200 kJ mol^{-1} . Exceto algumas exceções, os processos de quimissorção são exotérmicos, sendo que a uma temperatura constante a quantidade de substância adsorvida aumenta com a concentração do adsorbato, em solução ou na fase gasosa (MOORE, 1976; CASTELLAN, 2001; ATKINS, 2006; PEDROSO, 2006).

A primeira teoria quantitativa da adsorção de gases foi apresentada em 1916 por Irving Langmuir, que baseou seu modelo nas seguintes hipóteses:

- (1) A superfície sólida contém um número fixo de sítios de adsorção. No equilíbrio em qualquer temperatura e pressão de gás, uma fração θ de sítios é ocupada por moléculas adsorvidas e uma fração $1 - \theta$ não se encontra ocupada;
- (2) Cada sítio pode manter apenas uma molécula adsorvida.
- (3) O calor de adsorção é o mesmo para todos os sítios e não depende da fração coberta ;
- (4) Não existe interação entre moléculas situadas em sítios diferentes. A probabilidade de uma molécula condensar sobre um sítio não ocupado ou abandonar um sítio ocupado não depende de os sítios vizinhos estarem ou não ocupados (MOORE, 1976; ATKINS, 2006).

A isoterma de adsorção de Langmuir surge a partir da análise da cinética de condensação e evaporação de moléculas gasosas da superfície, sendo que o processo de adsorção pode ser representado pela reação química apresentada pela Equação 9.

Onde A é o adsorvato gasoso, M é um sítio vazio na superfície e AM representa a molécula de A adsorvido em um sítio na superfície. Considerando θ como a fração da área da superfície recoberta por moléculas adsorvidas (grau de recobrimento), a velocidade de modificação do grau de recobrimento provocado pela adsorção é proporcional à pressão parcial de A e do número de sítios vacantes $N(1 - \theta)$, e expressa pela Equação 10.

$$\frac{d\theta}{dt} = k_a p N (1 - \theta) \quad (10)$$

Onde k_a é a constante de velocidade de adsorção, p é a pressão parcial do gás e N é o número total de sítios. A velocidade de variação de θ durante o processo de dessorção é proporcional ao número de sítios ocupados, $N\theta$, e expressa pela Equação 11.

$$\frac{d\theta}{dt} = -k_d N \theta \quad (11)$$

No equilíbrio a velocidade de adsorção é igual à velocidade de dessorção. Resolvendo, portanto, esta relação de igualdade em relação a θ é obtida a expressão da isoterma de Langmuir, a qual é expressa pela Equação 12.

$$\theta = \frac{K'p}{1+K'p} \quad (12)$$

Onde K' é a constante de equilíbrio para o processo de adsorção, ou seja, a razão entre a constante a adsorção e dessorção. Esta constante de equilíbrio está relacionada com a energia envolvida no processo de adsorção, a qual corresponde à afinidade do sítio, presente na superfície, pelo adsorvato.

A Equação 12 também é válida quando se trata da adsorção de uma substância presente em uma solução, desde que a pressão parcial seja substituída pela concentração, C , da substância na solução. Desta forma, a quantidade de substância adsorvida, m , será proporcional a θ , portanto, $m = b\theta$, sendo b uma constante, que representa a máxima adsorção. Substituindo, então, θ na Equação 12, e rearranjando é obtida uma relação entre a massa do adsorvato adsorvido e a sua concentração na solução, a qual é expressa pela Equação 13.

$$m = \frac{bK'C}{1+K'C} \quad (13)$$

Um aumento de massa na superfície do cristal de quartzo gera uma diminuição na sua frequência fundamental de oscilação. Desta forma, a massa da Eq. 13 pode ser substituída pela variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo causada pela interação entre a HRP e a lectina imobilizada na superfície do sensor. A constante de adsorção máxima, b , é, então, substituída pela variação da frequência máxima, $\Delta f_{máx}$, referente à maior concentração de HRP capaz de interagir com a lectina na superfície do sensor, ou seja, a concentração de saturação.

Sendo assim, a relação entre a quantidade de substância adsorvida ($C/\Delta f$) e a concentração da mesma em solução (C) encontra-se expressa na Equação 14.

$$\frac{C}{\Delta f} = \frac{C}{\Delta f_{máx}} + \frac{1}{\Delta f_{máx}} \cdot \frac{1}{K'} \quad (14)$$

Onde Δf é a variação de frequência no equilíbrio, C é a concentração do ligante em solução, $\Delta f_{máx}$ é a variação de frequência quando a concentração do ligante é infinita (concentração de saturação dos sítios), e K' é a constante de afinidade aparente da interação entre a lectina e seu ligante (LEBED, 2006; ZHANG, 2006). Somente em concentrações muito baixas é que a quantidade de substância adsorvida é proporcional a concentração da mesma na solução (PEDROSO, 2006).

Os valores da razão entre a concentração de HRP adicionada aos cristais de quartzo modificados, tanto com a lectina nativa quanto com a recombinante, e a variação de frequência causada pela mesma encontram-se expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos por meio dos experimentos realizados na QCM e utilizados na determinação da constante de afinidade aparente das interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP, por meio da Equação 14.

[HRP] / mmol L⁻¹	jArtinM	rArtinM
	[HRP] / $\Delta f_{média}$	[HRP] / $\Delta f_{média}$
0,15	0,023 ± 0,011	0,023 ± 0,001
0,22	0,024 ± 0,002	0,026 ± 0,004
0,30	0,036 ± 0,005	0,038 ± 0,009
0,40	0,033 ± 0,003	0,044 ± 0,009
0,50	0,049 ± 0,008	0,056 ± 0,006
0,65	0,056 ± 0,006	0,051 ± 0,001
0,75	0,071 ± 0,007	0,066 ± 0,018
1,00	0,069 ± 0,007	0,072 ± 0,001
1,50	0,110 ± 0,027	0,098 ± 0,017

A partir dos resultados expressos na Tabela 4 foram construídas as isotermas de Langmuir para as interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP, as quais são apresentadas na Figura 22.

Figura 22. Isotermas de Langmuir obtidas para a (a) jArtinM para o cálculo da constante de afinidade aparente da interação jArtin M-HRP. Isoterma de Langmuir obtida para a e (b) rArtinM.

Pela razão entre o coeficiente angular e o linear das isothermas de Langmuir foram determinadas as constantes de afinidade aparente para a interação das lectinas nativa e recombinante com a glicoproteína HRP. Os valores das constantes de afinidade aparente obtidos foram $(4,6 \pm 0,9) \times 10^3$ e $(2,6 \pm 0,5) \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ para as interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP, respectivamente. Analisando estes resultados nota-se que existe uma diferença entre as afinidades da lectina nativa e recombinante pela HRP, como já evidenciado, anteriormente, pelas curvas de saturação. Tal diferença é devido às diferenças nas estruturas das lectina, pois a nativa é tetramérica e a recombinante é monomérica.

Apesar dos valores das constantes de afinidade aparente ser um pouco diferentes, a ordem de grandeza de ambos é a mesma. Desta forma, para as condições utilizadas, ou seja, de alta diluição da lectina imobilizada, pode-se afirmar que, apesar da estrutura quaternária das lectinas ser diferentes, a afinidade delas pela HRP é equivalente. Portanto, tal resultado mostra que os sítios de interação da lectina nativa interagem com a glicoproteína HRP de forma independente e com igual afinidade, de tal forma que sendo a lectina recombinante monomérica, e com somente um sítio para interação, possui afinidade equivalente pela HRP.

4.4. Determinação da Constante de Associação Cinética para as Interações *jArtinM-HRP* e *rArtinM-HRP*

As interações lectina-carboidrato também podem ser avaliadas por meio de sua cinética de interação. Neste trabalho tal estudo foi realizado utilizando a lectina imobilizada na superfície de um transdutor de modo a simplificar a análise cinética, pois desta forma o efeito do transporte de massa pode ser desprezado e um modelo simples de interação monomolecular pode ser aplicado (NILSSON, 2007). A reação de interação entre a lectina e seu ligante pode ser descrita como uma ligação receptor-ligante, sendo que um sistema binário de interação é descrito pela Equação 15 (MAO, 2002; NILSSON, 2007).

Onde $[L]_i$ corresponde à concentração de lectina imobilizada na superfície do transdutor e $[C]_l$ a concentração de carboidrato ou glicoproteína em solução. E k_1 e k_{-1} são, respectivamente, as constantes de velocidade de formação e dissociação do complexo receptor-ligante, $[L-C]$. As velocidades de formação e dissociação do complexo receptor-ligante r_+ e r_- são definidas pelas Equações 16 e 17.

$$r_+ = \frac{d[L-C]}{dt} = k_1 \theta_1 [C] \quad (16)$$

$$r_- = -\frac{d[L-C]}{dt} = k_{-1} \theta_2 \quad (17)$$

Onde θ_1 e θ_2 correspondem a percentagem de sítios ligantes livres (lectina imobilizada não ligada ao carboidrato) e de carboidrato ligada à lectina na superfície do sensor em um tempo t , respectivamente, e $[C]$ a concentração de carboidrato em solução. No equilíbrio as velocidades de formação e dissociação do complexo receptor-ligante são iguais, $r_+ = r_- = r_e$, sendo r_e descrito pela Equação 18.

$$r_e = k_1 \theta_{1,e} [C]_e = k_{-1} \theta_{2,e} \quad (18)$$

Onde o subscrito e corresponde às quantidades no equilíbrio. E as constantes de associação, K_A , e dissociação, K_D , são descritas pelas Equações 19 e 20 (MAO, 2002; NILSSON, 2007).

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{\theta_2}{\theta_1 [C]} \quad (19)$$

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{\theta_1 [C]}{\theta_2} \quad (20)$$

Definindo-se uma variável de relaxação do sistema em equilíbrio como δ , e sendo esta descrita pela Equação 21.

$$\delta = \theta_1 - \theta_{1,e} = [C] - [C]_e = \theta_{2,e} - \theta_2 \quad (21)$$

um desvio do equilíbrio corresponde à derivada da velocidade da reação, sendo descrito pela Equação 22.

$$-\frac{d\delta}{dt} = k_1 (\theta_{1,e} + \delta) ([C]_e + \delta) - k_{-1} (\theta_{2,e} - \delta) \quad (22)$$

O termo δ^2 pode ser desprezado, pois δ corresponde, freqüentemente, a um termo muito pequeno. Sendo assim, a Equação 22 pode ser simplificada como demonstrado na Equação 23 (MAO, 2002).

$$-\frac{d\delta}{dt} = \left(\frac{1}{\tau} \right) \delta \quad (23)$$

Onde o termo $(1/\tau)$ corresponde à constante descrita na Equação 24.

$$\frac{1}{\tau} = r_e \left(\frac{1}{\theta_{1,e}} + \frac{1}{[C]_e} + \frac{1}{\theta_{2,e}} \right) \quad (24)$$

Esta constante corresponde à constante de relaxação da velocidade da reação, e o termo τ é conhecido como o tempo de relaxação da reação. Combinando as soluções das Equações 21 e 23 é possível a obtenção da percentagem máxima de sítios ativos ligados ao carboidrato, $\theta_{2,e}$, a qual é descrita pela Equação 25 (MAO, 2002; LEBED, 2006).

$$\theta_2 = \theta_{2,e} \left(1 - e^{-(1/\tau)t}\right) \quad (25)$$

Um aumento em θ_2 corresponde a um aumento de massa na superfície do sensor, sendo assim o valor de θ_2 é proporcional a um aumento de massa Δm . Portanto, a variação de massa pode ser descrita pela Equação 26 (MAO, 2002; LEBED, 2006).

$$\Delta m_t = \Delta m_{máx} \left(1 - e^{-(1/\tau)t}\right) \quad (26)$$

Onde Δm_t e $\Delta m_{máx}$ correspondem à variação de massa em um tempo t e no tempo $t \rightarrow \infty$ (no equilíbrio), respectivamente. Uma queda na frequência de vibração do cristal de quartzo pode ser relacionada a um aumento de massa na superfície do sensor, resultante da ligação entre a lectina e o carboidrato. Embora a equação de Sauerbrey (Eq. 1) não possa ser utilizada para descrever a relação entre Δf_t e Δm quando o sensor encontra-se em meio de solução, existe uma clara relação entre esses dois parâmetros. Além disso, quando os valores de Δf_t resultantes da ligação não forem muito grandes, é razoável assumir que Δm é proporcional a Δf_t . Portanto, tal relação pode ser expressa pela Equação 27 (MAO, 2002; LEBED, 2006).

$$\Delta f_t = \Delta f_{máx} \left(1 - e^{-(1/\tau)t}\right) \quad (27)$$

A relação expressa pela Eq. 27 é utilizada para a determinação, em dois passos, dos parâmetros cinéticos que descrevem o processo de interação entre as lectinas e a HRP.

Primeiramente, a variação da frequência foi registrada em função do tempo para diferentes concentrações de HRP adicionada à diferentes cristais de quartzo funcionalizados. A média das replicatas obtidas para cada uma das concentrações de HRP adicionada é apresentada na Figura 23.

Figura 23. Médias das curvas da variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo em função do tempo para as adições de HRP, (a) 0,15; (b) 0,22; (c) 0,30; (d) 0,40; (e) 0,50; (f) 0,65; (g) 0,75; (h) 1,00 e (i) 1,50 mmol L⁻¹, em (1) jArtinM e (2) rArtinM.

A partir das curvas apresentadas na Fig. 23, por meio do ajuste realizado utilizando-se a Eq. 27 foram obtidos os tempos de relaxação, τ , correspondentes a cada uma das adições de HRP a cada uma das lectinas. Na Figura 24 é apresentado um dos ajustes realizados.

Figura 24: Ajuste realizado em uma curva Δf vs. tempo, para a adição de HRP 0,5 mmol L⁻¹ em jArtinM, utilizando a Equação 26.

As constantes de relaxação, τ^{-1} , definida pelo inverso do tempo de relaxação, referentes a cada concentração de HRP adicionada a lectina nativa e recombinante são apresentadas na Tabela 5.

Em um segundo passo, a constante de relaxação, τ^{-1} , foi esboçada em função da concentração de HRP adicionada a cada uma das formas da lectina Artin M, e estas curvas são apresentadas na Figura 25.

Esta curva é a base para a determinação da constante de associação cinética da interação, pois o tempo de relaxação está relacionado com a concentração inicial do ligante pela Equação 28 (MAO, 2002; LEBED, 2006).

$$\tau^{-1} = k_1[C] + k_{-1} \quad (28)$$

A constante de associação cinética da interação lectina-glicoproteína é dada pela Equação 29 (MAO, 2002; LEBED, 2006).

$$K_a = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (29)$$

Tabela 5. Resultados obtidos para as interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP por meio do ajuste das curvas Δf vs. t realizados com a utilização da Equação 27.

[HRP] / mmol L ⁻¹	jArtinM	rArtinM
	$\tau^{-1}_{\text{média}} (*10^{-3}) / \text{s}^{-1}$	$\tau^{-1}_{\text{média}} (*10^{-3}) / \text{s}^{-1}$
0,15	6 ± 1	8 ± 1
0,22	12 ± 1	9 ± 1
0,30	13 ± 1	13 ± 1
0,40	17 ± 1	15 ± 1
0,50	15 ± 1	17 ± 1
0,65	24 ± 1	22 ± 2
0,75	24 ± 1	23 ± 2

Os valores das constantes de associação, k_1 , dissociação, k_{-1} , e associação cinética, K_A , obtidos a partir das curvas da Fig. 25, para as interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP, estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores das constantes de associação, dissociação e de associação cinética das interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP.

Interação	$k_1 / \text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$	k_{-1} / s^{-1}	$K_A / \text{L mol}^{-1}$
jArtinM-HRP	28 ± 4	(4 ± 2) x 10 ⁻³	(7 ± 3) x 10 ³
rArtinM-HRP	27 ± 2	(4 ± 1) x 10 ⁻³	(7 ± 2) x 10 ³

Figura 25. Constante de relaxação em função da concentração da HRP adicionada aos cristais de quartzo modificados com (a) jArtinM e (b) rArtinM.

Por meio dos valores das constantes de associação cinética, K_A , pode-se afirmar que as interações, jArtinM-HRP e rArtinM-HRP, possuem uma cinética equivalente, apesar das diferenças estruturais existentes entre a forma nativa e recombinante da lectina. Os valores das constantes de associação, k_1 , e dissociação, k_{-1} , corroboram para tal afirmação.

Comparando-se os valores das constantes de afinidade aparente (seção 4.3) e das constantes de associação cinética (Tab. 6) das interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP, nota-se a existência de uma pequena diferença entre eles. Esta diferença pode ser atribuída ao modo como são obtidos os valores das constantes.

Quando a HRP é adicionada ao cristal funcionalizado, esta pode interagir inespecificamente com a monocamada e também com as moléculas de gelatina utilizadas no bloqueio dos grupamentos carboxílicos remanescentes. Porém, quando o fluxo é religado essas ligações, por não serem específicas, ou seja, por serem ligações fracas, se rompem e essas moléculas de HRP são lavadas da superfície do cristal, restando, somente as moléculas que estão interagindo especificamente com a lectina imobilizada.

Na determinação da constante de afinidade aparente são utilizados os valores de variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo depois de religado o fluxo, ou seja, valores referentes, somente, às interações ArtinM-HRP, seja ela nativa ou recombinante. Enquanto que, na realização do ajuste para a obtenção da constante de relaxação, são utilizadas as variações da frequência de oscilação do cristal de quartzo antes de religado o fluxo, sendo que, neste caso as interações inespecíficas não são eliminadas.

Embora as interações inespecíficas entre a glicoproteína HRP e a monocamada possam prejudicar a comparação entre as duas constantes calculadas para as interações ArtinM-HRP, ainda assim é possível se observar a equivalência entre a lectina nativa e recombinante. Por meio da constante de afinidade aparente verifica-se que a afinidade dos sítios presentes na estrutura da lectina nativa pela HRP é equivalente à afinidade do único sítio presente na estrutura da lectina recombinante pela HRP. E na análise da constante de associação cinética verifica-se que ambas as lectinas possuem a mesma cinética de interação com a glicoproteína HRP, corroborando para a confirmação da equivalência entre a jArtinM e a rArtinM.

Avaliação da Interação entre a Artin M e Linhagens Leucêmicas

A técnica de QCM vem sendo utilizada para o monitoramento de ciclo celular, para a avaliação de adesão celular, apoptose e senescência, além do desenvolvimento de imunossensores (ALESSANDRINI, 2006; SHEN, 2007; ELSOM, 2008; SAFINA, 2008; TAN, 2008; CHEN, 2009; CHOU, 2009; POITRAS, 2009; WHITE, 2009). Acoplada a esta técnica, as lectinas também vem sendo utilizadas para o desenvolvimento de imunossensores para a detecção de *E. coli* (SHEN, 2007) e para a discriminação entre células normais e cancerosas (TAN, 2008).

A possibilidade de estudos na distinção entre células normais utilizando lectinas é devido ao fato de que as células tumorais têm uma habilidade maior de se ligar às lectinas vegetais do que as células normais. Tal processo é decorrente do processo de glicosilação alterado apresentado pelas células tumorais, resultando em uma glicosilação aberrante. A alteração da glicosilação acarreta alterações nas interações célula-célula e célula-matriz, além das alterações das vias de sinalização que regulam a proliferação, diferenciação, migração e angiogênese.

Além da identificação de células tumorais algumas lectinas vegetais vêm sendo estudadas para a sua utilização como potencial droga para o tratamento de alguns tumores, devido a sua capacidade de induzir a morte celular de células cancerígenas. Neste contexto, a lectina Artin M possui a capacidade de induzir a morte celular de algumas linhagens de células leucêmicas humanas (CARVALHO, 2008).

Sendo assim, este trabalho, também avaliou a capacidade da lectina Artin M de interagir com células de linhagem leucêmica. As linhagens NB4 (leucemia promielocítica aguda), K562 (leucemia eritro-megacarioblástica) e U937 (leucemia monocítica), foram escolhidas devido à prévia verificação que de que Artin M, na sua forma nativa tetramérica, é capaz de induzir apoptose, a morte celular, das mesmas em diferentes níveis. Sendo a ordem de citotoxicidade da Artin M sobre as células leucêmicas, NB4 > K562 > U937. A forma monomérica da lectina, apesar de não induzir morte celular, interage com essas células da mesma maneira que a forma tetramérica, devido à presença de glicoproteínas na membrana das mesmas. Dessa maneira, a morte é dependente não só do reconhecimento, mas também do “cross-linking” de receptores glicosilados (CARVALHO, 2008).

Devido à dificuldade de obtenção da lectina nativa, optou-se pela avaliação das constantes de interação utilizando-se a lectina recombinante, monomérica. Esta opção mostrava-se segura, pois nas seções 4.3 e 4.4, observou-se que ambas as formas da Artin M

possuem cinéticas de interação equivalentes com a glicoproteína HRP, assim como afinidade de interação equivalente.

Desta forma, a variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo foi registrada em função do tempo, e nas curvas obtidas foi realizado um ajuste por meio da Equação 20. Os valores da constante de relaxação da velocidade da reação para cada concentração de células adicionadas estão apresentados na Tabela 7.

Por meio das curvas da constante de relaxação em função da concentração de células adicionadas, apresentadas na Figura 26, foram determinadas as constantes de equilíbrio cinética para a interação entre a rArtinM e as três linhagens de células leucêmicas.

Por meio da linearização, no intervalo de concentração apresentado na Tabela 7, das curvas apresentadas na Figura 26, obteve-se os valores das constantes de associação (k_1), de dissociação (k_{-1}) e de associação cinética (k_a) das interações rArtinM-U937, rArtinM-K562 e rArtinM-NB4, os quais são apresentados na Tabela 8.

Tabela 7. Resultados obtidos para a interação da rArtinM com as linhagens de células leucêmicas, por meio do ajuste das curvas Δf vs. t realizados com a utilização da Equação 27.

NB4		K562		U937	
[NB4] / cel mL ⁻¹	$\tau_{\text{média}}^{-1} (*10^{-3})$ / s ⁻¹	[K562] / cel mL ⁻¹	$\tau_{\text{média}}^{-1} (*10^{-3})$ / s ⁻¹	[U937] / cel mL ⁻¹	$\tau_{\text{média}}^{-1} (*10^{-3})$ / s ⁻¹
5,0 x10 ⁶	(2,8 ± 0,2)	1,25 x10 ⁶	(2,3 ± 0,2)	1,25 x10 ⁶	(3,1 ± 0,2)
7,5 x10 ⁶	(2,6 ± 0,1)	2,5 x10 ⁶	(2,4 ± 0,1)	2,5 x10 ⁶	(4,2 ± 0,2)
10,0 x10 ⁶	(2,9 ± 0,1)	5,0 x10 ⁶	(3,1 ± 0,2)	5,0 x10 ⁶	(7,1 ± 0,4)
12,5 x10 ⁶	(3,1 ± 0,2)	7,5 x10 ⁶	(3,6 ± 0,1)	7,5 x10 ⁶	(7,9 ± 0,2)
15,0 x10 ⁶	(3,2 ± 0,1)	10,0 x10 ⁶	(3,9 ± 0,1)	10,0 x10 ⁶	(9,3 ± 0,3)

Figura 26. Curvas da constante de relaxação em função da concentração de células da linhagem (▽) NB4, (●) K562 e (□) U937 adicionadas aos cristais contendo rArtinM imobilizada.

Tabela 8. Valores das constantes de associação, dissociação e de equilíbrio cinética das interações entre a forma recombinante da lectina Artin M e as linhagens de células leucêmicas.

Linhagem	k_1 / mL cel ⁻¹ s ⁻¹	k_{-1} / s ⁻¹	K_A / mL cel ⁻¹
NB4	$(0,06 \pm 0,01) \times 10^{-9}$	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(0,3 \pm 0,1) \times 10^{-7}$
K562	$(0,18 \pm 0,01) \times 10^{-9}$	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(0,9 \pm 0,1) \times 10^{-7}$
U937	$(0,71 \pm 0,03) \times 10^{-9}$	$(2,6 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^{-7}$

A análise dos resultados obtidos mostra que a afinidade da lectina pelas linhagens decresce na seguinte ordem U937 > K562 > NB4. Esta variação de interação está relacionada com diferenças no padrão de glicosilação nos receptores celulares de Artin M nestas células.

As diferenças nos padrões de glicosilação são provindas da mutação que ocorreu em cada uma das linhagens, pois se tratam de células cancerosas.

A determinação das constantes de associação cinética entre a rArtinM e as linhagens leucêmicas foi realizada com o intuito de se estabelecer uma relação entre a afinidade da lectina pelas glicoproteínas da membrana celular e seu efeito citotóxico, desta forma, observou-se uma relação inversa entre os dois eventos.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 8, pode-se observar que a constante de associação, k_1 , é a responsável pela diferença de citotoxicidade, pois a constante de dissociação, k_{-1} , é praticamente a mesma para a interação entre a lectina e cada uma das linhagens. Desta forma, a constante de associação foi relacionada através do efeito citotóxico, da Artin M sobre as linhagens leucêmicas, com o tempo de vida da lectina no meio contendo cada uma das linhagens.

Os resultados obtidos demonstraram que quanto mais rápida a associação entre a lectina Artin M e os glicoconjugados presentes na membrana das células leucêmicas menor a sua citotoxicidade sobre esta linhagem. Essa diminuição de citotoxicidade pode estar relacionada ao consumo da lectina durante a interação, ou seja, o tempo de vida dela no meio.

Quando a velocidade de associação entre a lectina e os glicoconjugados da membrana é muito alta, apesar desta ser uma interação reversível, a lectina é consumida, ou seja, perde sua conformação ótima, sendo, desta forma, impedida de interagir com outras células, o que diminui seu efeito citotóxico sobre esta linhagem. Porém, quando a velocidade de associação é baixa a lectina é liberada antes que ocorra a perda da sua conformação ótima, permitindo, desta forma, que uma mesma lectina interaja com mais células aumentando, assim, a sua citotoxicidade sobre esta linhagem.

Apesar disso, apenas um estudo proteômico poderá dizer com segurança quais são os alvos de reconhecimento da lectina nas distintas linhagens e, assim, justificar melhor os resultados observados.

CONCLUSÕES

A técnica de microbalança a cristal de quartzo mostrou-se adequada para a avaliação de interações do tipo lectina-glicoconjugado, estando o glicoconjugado livre em solução ou fixado à membrana celular na forma de receptor. A técnica também se mostrou adequada para a realização de estudos em meio líquido.

A metodologia de funcionalização do cristal de quartzo piezelétrico, as monocamadas auto-organizadas, mostrou-se adequada para a imobilização da lectina, tanto nativa como recombinante, promovendo o espaçamento adequado entre as moléculas de proteína imobilizada e possibilitando o estudo das interações sem problemas com impedimento estérico.

As formas nativa e recombinante da lectina Artin M, apesar das diferenças estruturais, mostraram-se equivalentes quanto às suas afinidades pela glicoproteína HRP, além de possuírem equivalência em sua cinética de interação.

Perante os resultados das constantes de associação cinética e de afinidade aparente das interações jArtinM-HRP e rArtinM-HRP, foi possível estabelecer uma relação inversa entre o efeito citotóxico da lectina Artin M sobre as linhagens hematopoéticas humanas, NB4, K562 e U937 e a cinética de interação entre a lectina e os glicoconjugados expressos na membrana destas células.

SUGESTÕES

DE TRABALHOS FUTUROS

Futuramente ainda podem ser avaliados os comportamentos de ambas as formas da lectina Artin M frente a outros carboidratos e glicoproteínas pelos quais esta possui afinidade. Isto, porque, apesar da Artin M recombinante não possuir todas as funções biológicas que a nativa possui, devido à presença de somente um sítio de interação com carboidrato em sua estrutura, àquelas funções que dependem somente da interação lectina-carboidrato para ocorrer, são também apresentadas pela lectina recombinante.

No Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Maria Helena de Souza Goldman a lectina Artin M já está sendo expressa em organismos diferentes, na tentativa de se conseguir a expressão da proteína tetramérica. Desta forma, futuramente, também poderá ser realizado um estudo de equivalência analisando o comportamento desta nova proteína recombinante frente às glicanas pelas quais a lectina nativa possui afinidade.

REFERÊNCIAS

- ALESSANDRINI, A.; CROCE, M. A.; TIOZZO, R.; FACCI, P. Monitoring cell-cycle-related viscoelasticity by a quartz crystal microbalance. **Applied Physics Letters**, v. 88, p. 083905, Feb. 2006.
- ATKINS, P.; PAULA, J. **Physical chemistry**. 8th ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2006. p. 329-332.
- BARRE, A.; PEUMANS, W. J.; ROSSIGNOL, M.; CULERRIER, R.; VAN DAMME, E. J.; ROUGÉ, P. Artocarpin is a polyspecific jacalin-related lectin with a monosaccharide preference for mannose. **Biochimie**, v. 86, p. 685-691, Sept. 2004.
- BOUJDAY, S.; MÉTHVIER, C.; BECCARD, B.; PRADIER, C. M. Innovative surface characterization techniques applied to immunosensor elaboration and test: comparing the efficiency of Fourier transform-surface plasmon resonance, quartz crystal microbalance with dissipation measurements, and polarization modulation-reflection absorption infrared spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 387, n. 2, p. 194-201, Jan. 2009.
- BOURNE, Y.; ASTOUL, C. H.; ZAMBONI, V.; PEUMANS, W. J.; MENU-BOUAOUICHE, L.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Structural basis for the unusual carbohydrate-binding specificity of jacalin towards galactose and mannose. **Biochemical Society**, v. 364, p. 173-180, Mar. 2002.
- BRIAND, E.; GU, C.; BOUJDAY, S.; SALMAIN, M.; HERRY, J. M.; PRADIER, C. M. Functionalisation of gold surfaces with thiolate SAMs: topography/bioactivity relationship - A combined FT - RAIRS, AFM and QCM investigation. **Surface Science**, v. 601, p. 3850-3855, Apr. 2007.
- BUNDE, R. L.; JARVI, E. J.; ROSENTERETER, J. J. Piezoelectric quartz crystal biosensors. **Talanta**, v. 46, p. 1223-1236, Nov. 1998.
- BUNN-MORENO, M. M.; CAMPOS NETO, A. Lectin(s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. **Journal of Immunology**, v. 127, p. 427-429, Aug. 1981.
- BUTTRY, D. A.; WARD, M. D. Measurement of interfacial processes at electrode surfaces with the electrochemical quartz crystal microbalance. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 6, p. 1355-1379, June 1992.
- CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. Rio de Janeiro: RevinteR, 2001. p. 11-23 ; 99-106.
- CARUSO, F.; RODDA, E.; FURLONG, D. N. Orientational aspects of antibody immobilization and immunological activity on quartz crystal microbalance electrodes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 178, p. 104-115, Jan. 1996.

CARVALHO, F. C. **Morte de linhagem celular de leucemia mielóide humana induzida pela lectina Artin M de *Artocarpus integrifolia***. 2008. 68 f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CASTELLAN, G. **Physical chemistry**. 4th ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2001. p. 460-463.

CHAHUD, F.; RAMALHO, L. N. Z.; RAMALHO, F. S.; HADDAD, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, p. 166-173, Jan. 2009.

CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, p. 1-12, Sept. 2002.

CHEN, H-M.; HUANG, T-H.; TSAI, R-M. A biotin-hydrogel-coated quartz crystal microbalance biosensor and applications in immunoassay and peptide-displaying cell detection. **Analytical Biochemistry**, v. 392, p. 1-7, May 2009.

CHO, Y-K.; KIM, S.; KIM, Y. A.; LIM, H. K.; LEE, K.; YOON, D.; LIM, G.; PAK, Y. E.; HA, T. H.; KIM, K. Characterization of DNA immobilization and subsequent hybridization using *in situ* quartz crystal microbalance, fluorescence spectroscopy, and surface plasmon resonance. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 278, n.1, p. 44-51, July 2004.

CHOU, H-C.; YAN, T-R.; CHEN, K-S. Detecting cells in the surface of a silver electrode quartz crystal microbalance using plasma treatment and graft polymerization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, p. 244-249, June 2009.

COFFEY, T.; ABDELMAKSoud, M.; KRIM, J. A scanning probe and quartz crystal microbalance study of the impact of C-60 on friction at solid-liquid interfaces. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 13, n. 21, p. 4991-4999, May 2001.

COLTRI, K. C.; OLIVEIRA, L. L.; PINZAN, C. F.; VENDRUSCOLO, P. E.; MARTINEZ, R.; GOLDMAN, M. H.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 2, p. 423-432, Aug. 2008.

COOPER, M. A.; SINGLETON, V. T. A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions. **Journal of Molecular Recognition**, v. 20, p. 154-184, May 2007.

COSNIER, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 14, p. 443-456, May 1999.

DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, jul. 2004.

EDVARDSSON, M.; RODAHL, M.; KASEMO, B.; HÖÖK, F. A dual-frequency QCM-D setup operating at elevated oscillation amplitudes. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 15, p. 4918-4926, Aug. 2005.

ELSOM, J.; LETHEN, M. I.; REES, G. D.; HUNTER, A. C. Novel quartz crystal microbalance based biosensor for detection of oral epithelial cell-microparticle interaction in real time. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, p. 1259-1265, Jan. 2008.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (Brasil). L. L. P. da Silva; A. Panunto Castelo; M. H. de S. Goldman; M. C. R. A. Barreira; R. S. de Oliveira; M. D. Baruffi; J. B. de M. Machado. **Composição farmacêutica para prevenir e cicatrizar lesões epiteliais, composição farmacêutica imunomoduladora, composição farmacêutica para tratar toxoplasmose, composição farmacêutica, composição inseticida, inseticida, uso de lectina km+ para tratar cicatrizações, uso de lectina km+ para tratar toxoplasmose, uso de lectina km+ para preparar medicamento para tratar toxoplasmose, uso de lectina km+ para preparar medicamento imunomodulador, uso da lectina km+ para preparar medicamento anti-bacteriano, uso de lectina km+ para preparar medicamento anti-viral, método de expressão, vetor de dna, organismo recombinante, seqüência de nucleotídeos, proteínas, anticorpo e plasmídeo.** BR2003011547-A, 19 maio 2003, 22 mar. 2005.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, jan. 2003.

GANIKO, L. **Interação da lectina KM+ com componentes da matriz extracelular na haptotaxia de neutrófilos.** 2001. 159 f. Tese (Doutorado em Imunologia Básico e Aplicada) – Departamento de Biologia Molecular e Celular e Bioagentes Patogênicos, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

GOODING, J. J.; HIBBERT, D. B. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 525-533, 1999.

HIKI, Y.; IWASE, H.; SAITOH, M.; SAITOH, Y.; HORII, A.; HOTTA, K.; KOBAYASHI, Y. Reactivity of glomerular and serum IgA1 to Jacalin in IgA nephropathy. **Nephron**, v. 72, n. 3, p. 429-435, Mar. 1996.

JEYAPRAKASHI, A. A.; SRIVASTAV, A.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Structural basis for the carbohydrate specificities of artocarpin: variation in the length of a loop as a strategy for generating ligand specificity. **Journal of the Molecular Biology**, v. 338, p. 757-770, Mar. 2004.

JEYAPRAKASHI, A. A.; JAYASHREE, G.; MAHANTA, S. K.; SWAMINATHAN, C. P.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Structural basis for the energetics of jacalin-sugar interactions: promiscuity *versus* specificity. **Journal of the Molecular Biology**, v. 137, p. 181-188, Jan. 2005.

KANAZAWA, K. K.; GORDON, J. G. The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid. **Analytica Chimica Acta**, v. 175, p. 99-105, Jan. 1985.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 187-197, June 2002.

KIM, G-H.; RAND, A. G.; LETCHER, S. V. Impedance characterization of a piezoelectric immunosensor Part I: Antibody coating and buffer solution. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 18, p. 83-89, Jan. 2003.

KOSSLINGER, C.; UTTENTHALER, E.; DROST, S.; ABERL, F.; WOLF, H.; BRINK, G.; STANGLMAIER, A.; SACKMANN, E. Comparison of the QCM and the SPR method for surface studies and immunological applications. **Sensors and Actuators B – Chemical**, v. 24, n. 1-3, p. 107-112, 1995.

KRISTENSEN, E. M. E.; RENSMO, H.; LARSSON, R.; SIEGBAHN, H. Characterization of heparin surfaces using photoelectron spectroscopy and quartz crystal microbalance. **Biomaterials**, v. 24, p. 4153-4159, Apr. 2003.

LARICCHIA-ROBBIO, L.; REVOLTELLA, R. P. Comparison between the surface plasmon resonance (SPR) and the quartz crystal microbalance (QCM) method in a structural analysis of human endothelin-1. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 19, p. 1753-1758, Jan. 2004.

LEBED, K.; KULIK, A. J.; FORRÓ, L.; LEKKA, M. Lectin-carbohydrate affinity measured using a quartz crystal microbalance. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 299, p. 41-48, Mar. 2006.

LIN, Z.; WARD, M. D. The role of longitudinal waves in quartz crystal microbalance applications in liquids. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 685-693, Feb. 1995.

MAO, Y.; WEI, W.; HE, D.; NIE, L.; YAO, S. Monitoring and kinetic parameter estimation for the binding process of berberine hydrochloride to bovine serum albumin with piezoelectric quartz crystal impedance analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 306, p. 23-30, June 2002.

MARX, K. A. Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 5, p. 1099-1120, Sept./Oct. 2003.

MENDES, R. K.; CARVALHAL, R. F.; KUBOTA, L. T. Effects of different self-assembled monolayers on enzyme immobilization procedures in peroxidase-based biosensor development. **Electroanalytical Chemistry**, v. 612, p. 164-172, Jan. 2008.

MISQUITH, S.; RANI, P. G.; SUROLIA, A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 48, p. 30393-30401, Dec. 1994.

MOORE, W. J. **Physical chemistry**. 4th ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. p. 452-453.

NILSSON, C. L. **Lectins: analytical technologies**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 1-14; 111-117.

OKAHATA, Y.; NIIMURA, K.; FURUSAWA, H.; MATSUNO, H. A highly sensitive 27 MHz quartz-crystal microbalance as a device for kinetic measurements of molecular recognition on DNA strands. **Analytical Sciences**, v. 16, p. 1113-1119, Nov. 2000.

PEDROSO, M. M. **Estudo da interação lectina-carboidrato por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo**. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química Analítica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

PEDROSO, M. M.; WATANABE, A. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; BUENO, P. R.; FARIA, R. C. Quartz crystal microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass. **Microchemical Journal**, v. 89, p. 153-158, Feb. 2008.

PEI, Z.; ANDERSON, H.; AASTRUP, T.; RAMSTRÖM, O. Study of real-time lectin-carbohydrate interactions on the surface of a quartz crystal microbalance. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, p. 60-66, Jan. 2005.

POITRAS, C.; TUFENKJI, N. A QCM-D-based biosensor for E. coli O157:H7 highlighting the relevance of the dissipation slope as a transduction signal. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 24, p. 2137-2142, Jan. 2009.

PRATAP, J. V.; JEYAPRAKASH, A. A.; RANI, P. G.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Crystal structures of artocarpin, a moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl- α -D-mannose: implications to the generation of carbohydrate specificity. **Journal of the Molecular Biology**, v. 317, p. 237-247, Jan. 2002.

RICCI, F.; VOLPE, G.; MICHELI, L.; PALLESCHI, G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 605, p. 111-129, Nov. 2007.

ROITT, I.; BRASTOFF, F.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. Barueri: Manole, 2003. p. 1-11; 58-62.

ROSA, J. C.; OLIVEIRA, P. S. de; GARRAT, R.; BELTRAMINI, L.; RESING, K.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GREENE, L. J. KM⁺, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. **Protein Science**, v. 8, p. 13-24, Jan. 1999.

SAFINA, G.; LIER, M.; DANIELSSON, B. Flow-injection assay of the pathogenic bacteria using lectin-based quartz crystal microbalance biosensor. **Talanta**, v. 77, p. 468-472, Mar. 2008.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, Jan. 1998.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, n. 11, p. 53R-62R, June 2004.

SHEN, Z.; HUANG, M.; XIAO, C.; ZHANG, Y.; ZENG, X.; WANG, P. G. Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 2312-2319, Mar. 2007.

SILVA, G. P. da; MORENO, A. N.; MARQUES, F.; OLIVER, C.; JAMUR, M. C.; PANUNTO CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil activation induced by the lectin km+ involves binding to CXCR2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 86-94, Oct. 2006.

SILVA, G. P. da; ROQUE-BARREIRA, M. C.; VAN DAME, E. J. M. Artin M: a rational substitution for the names artocarpin and KM+. **Immunology Letters**, v. 119, p. 114-115, June 2008.

SILVA, L. L. P.; MOLFETTA-MACHADO, J. B.; PANUNTO-CASTELO, A.; DENECKE, J.; GOLDMAN, M. H. S. cDNA cloning and functional expression of KM+, the mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 251-260, Sept. 2005.

SKOTTRUP, P. D.; NICOLAISEN, M.; JUSTESEN, A. F. Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 24, p.339-348, July 2008.

TAN, L.; JIA, X.; JIANG, X.; ZHANG, Y.; TANG, H.; YAO, S.; XIE, Q. Real-time monitoring of the cell agglutination process with a quartz crystal microbalance. **Analytical Biochemistry**, v. 383, p. 130-136, Aug. 2008.

TEIXEIRA, C. S.; CAVASSANI, K. A.; GOMES, R. B.; TEIXEIRA, M. J.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; CAVADA, B. S.; SILVA, J. S.da; BARRAL, A.; BARRAL NETO, M. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, v. 24, n.15, p. 3001-3008, Jan. 2006.

TLILI, A.; ABDELGHANI, A.; HLELI, S.; MAAREF, M. A. Electrical characterization of a thiol SAM o gold as a first step for the fabrication of immunosensors based on a quartz crystal microbalance. **Sensors**, v. 4, p. 105-114, Aug. 2004.

VEICH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classical enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, p. 249-259, Feb. 2004.

WATSON, J. D. **Recombinant DNA**. 2nd ed. New York: Scientific American Books, 1996. 626 p.

WHITE, D. A.; BUELL, A. K.; DOBSON, C. M.; WELLAND, M. E.; KNOWLESS, T. P. J. Biosensor-based labbel-free assays of amyloid growth. **FEBS Letters**, v. 538, p. 2587-2592, June 2009.

WILCZEWSKI, M.; HEYDEN, A. V.; RENAUDET, O.; DUMY, P.; COCHE-GUÉRENTE, L.; LABBÉ, P. Promotion of sugar-lectin recognition through the multiple sugar presentation offered by regioselectively addressable functionalized templates (RAFT): a QCM-D and SPR study. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 1114-1122, Feb. 2008.

WINK, T.; VAN ZUILEN, S. J.; BULT, A.; VAN BENNEKOM, W. P. Self-assembled monolayers for biosensors. **Analyst**, v. 122, p. 43R-50R, Apr. 1997.

WU, A. M.; WU, J. M.; LIN, L. H.; LIN, S. H.; LIU, J. H. Binding profile of *Artocarpus integrifolia* agglutinin (Jacalin). **Life Sciences Research Report**, v. 72, p. 2285, Jan. 2003.

WUHRER, M.; BALOG, C. I. A.; KOELEMAN, C. A. M.; DEELDER, A. M.; HOKKE, C. H. New features of site-specific horseradish peroxidase (HRP) glycosylation uncovered by nano-LC-MS with repeated ion-isolation/fragmentation cycles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1723, p. 229-239, Mar. 2005.

ZHANG, Y.; LUO, S.; TANG, Y.; YU, L.; HOU, K. Y.; CHENG, J. P.; ZENG, X.; WANG, P. G. Carbohydrate-protein interactions by "clicked" carbohydrate self-assembled monolayers. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 6, p. 2001-2008, Mar. 2006.

APÊNDICE

Dedução detalhada da equação do modelo cinético

A variável de relaxação do sistema em equilíbrio como δ , e descrita pela Equação A1.

$$\delta = \theta_1 - \theta_{1,e} = [HRP] - [HRP]_e = \theta_{2,e} - \theta_2 \quad (A1)$$

Um desvio do equilíbrio corresponde à derivada da velocidade da reação, sendo descrito pela Equação A2.

$$-\frac{d\delta}{dt} = k_1(\theta_{1,e} + \delta) \cdot ([HRP]_e + \delta) - k_{-1}(\theta_{2,e} - \delta) \quad (A2)$$

Desenvolvendo a Equação A2 temos então,

$$-\frac{d\delta}{dt} = k_1\theta_{1,e}[HRP]_e + k_1\theta_{1,e}\delta + k_1[HRP]_e\delta + k_1\delta^2 - k_{-1}\theta_{2,e} + k_{-1}\delta \quad (A3)$$

Sabe-se, pela Equação A4 que,

$$k_1\theta_{1,e}[HRP]_e = r_e \quad (A4)$$

$$k_{-1}\theta_{2,e} = r_e \quad (A4)$$

E como δ é um termo muito pequeno, pode-se desprezar δ^2 de modo que,

$$k_1\delta^2 = 0 \quad (A5)$$

Substituindo, então as Equações A4 e A5 na Equação A3 temos que,

$$-\frac{d\delta}{dt} = k_1\theta_{1,e}\delta + k_1[HRP]_e\delta + k_{-1}\delta \quad (A6)$$

Rearranjando a Equação A4 obtêm-se as Equações A7 e A8.

$$r_e = k_1\theta_{1,e} \rightarrow k_1 = \frac{r_e}{\theta_{1,e}[HRP]_e} \quad (A7)$$

$$r_e = k_{-1} \theta_{2,e} \quad \rightarrow \quad k_{-1} = \frac{r_e}{\theta_{2,e}} \quad (\text{A8})$$

Substituindo, então as Equações A7 e A8 na Equação A6 obtêm-se que,

$$-\frac{d\delta}{dt} = \delta r_e \left(\frac{1}{[HRF]_e} + \frac{1}{\theta_{1,e}} + \frac{1}{\theta_{2,e}} \right) \quad (\text{A9})$$

O termo que multiplica δ é uma constante, denominada como constante de relaxação, sendo assim,

$$r_e \left(\frac{1}{[HRF]_e} + \frac{1}{\theta_{1,e}} + \frac{1}{\theta_{2,e}} \right) = \frac{1}{\tau} \quad (\text{A10})$$

Integrando-se, então a Equação A9 obtêm-se,

$$-\frac{d\delta}{dt} = \delta \frac{1}{\tau} \quad \rightarrow \quad \int \frac{1}{\delta} d\delta = \int -\frac{1}{\tau} dt \quad (\text{A11})$$

$$\ln|\delta| = -\frac{1}{\tau} t + C \quad (\text{A12})$$

Onde C é a constante de integração. Sendo assim,

$$\delta = e^{-\frac{1}{\tau} t} e^C \quad \rightarrow \quad e^C = \alpha \quad (\text{A13})$$

Como δ é um pequeno deslocamento do equilíbrio, este é dado pela Equação A14.

$$\delta = \theta_{2,e} - \theta_2 \quad (\text{A14})$$

Substituindo a Equação A14 na Equação A13 obtêm-se,

$$\theta_2 = \theta_{2,e} - \alpha e^{-\frac{1}{\tau} t} \quad (\text{A15})$$

Como condições de contorno têm-se que, quando o tempo é zero a percentagem de complexos receptor-ligante formados também é zero, portanto,

$$t = 0, \quad \theta_2 = 0 \quad \text{portanto,} \quad \alpha = \theta_{2,e}$$

Substituindo-se, então o valor de α , encontrado pelas condições de contorno, obtêm-se a Equação A16, utilizado como modelo para a realização dos ajustes e determinação da constante de associação cinética.

$$\theta_2 = \theta_{2,e} (1 - e^{-\frac{1}{\tau} t}) \quad (\text{A16})$$