



2014



**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# Síntese e Optimização de Nanopartículas Funcionalizadas para a Recuperação Selectiva de Glicoproteínas em Flúidos Humanos

Síntese e Optimização de Nanopartículas Funcionalizadas para a  
Recuperação Selectiva de Glicoproteínas em Flúidos Humanos

Igor André Morgado Vieira

Igor André Morgado Vieira

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Síntese e Optimização de Nanopartículas Funcionalizadas para a Recuperação Selectiva de Glicoproteínas em Fluídos Humanos

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Francisco Amado (Universidade de Aveiro, Departamento de Química) e do Doutor José Alexandre Ferreira (Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, EPE.) com supervisão institucional da Doutora Paula Veríssimo (Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciência e Tecnologia).

Igor André Morgado Vieira

2014

**Este trabalho foi realizado no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, no grupo Organic Chemistry, Natural and Agro-Food Products Research Unit (QOPNA).**

## Agradecimentos

Ao Professor Doutor Francisco Amado, pela sua ajuda, empenho e orientação e por me ter dado a oportunidade de trabalhar num laboratório tão prestigiado e onde tão boa investigação se realiza. A sua orientação foi fundamental para o meu crescimento científico e pessoal.

Ao Doutor José Alexandre Ferreira, pela sua luta incansável e incessante de todos os dias querer tornar a ciência um pouco melhor. É um prazer ver que há gente que acredita e que não desiste nunca de lutar pelo que acredita. Obrigado pelo empenho e por toda a ajuda prestada, pelas “conversas de café” e pelos ensinamentos, tanto pessoais como científicos.

À Doutora Paula Veríssimo, por ter aceitado ser minha tutora institucional e pelas contribuições ao meu percurso científico.

À Doutora Emília Duarte pelas sua ajuda em todas as questões burocráticas e pela resposta pronta a todas as dúvidas.

A todos os companheiros do QOPNA, os quais me ajudaram na adaptação ao grupo e à Universidade desde o primeiro dia. Em especial quero agradecer ao Doutor Rui Vitorino e à Doutora Rita Ferreira pela sua orientação laboratorial e científica e aos companheiros de mesa: o Hugo, a Beta, o David e a Patrícia, os quais me ajudaram mais de perto nas difíceis tarefas de “onde é a cantina?” e “como se chega ao local x?”. Obrigado!

À minha mãe, por seres o meu pilar, por teres compreendido e apoiado mesmo quando os tempos não eram de compreensão, por me dares todo o apoio que sempre precisei, por me fazeres como sou, por me ensinares o que sei e por seres a melhor do mundo!

Ao meu irmão, por ser ele, por existir, apenas e só! Porque vieste ajudar a preencher a minha vida, foste o meu primeiro “bebé” e desde sempre, mesmo ao longe, nos acompanhamos e “crescemos juntos”.

Ao meu pai e às minhas irmãs, porque são o outro suporte que eu tenho, a minha “segunda casa”. Todo o apoio que recebo é fundamental para chegar até aqui e conseguir fechar este capítulo da minha vida.

Aos avós Cácio e Lina, os que me dão de comer, o meu “restaurante privado” em qualquer altura e a qualquer hora. Obrigado pelas horas de conversas, pelas boas refeições, pelas ajudas “sem dizer nada à mãe”. Estão no meu coração!

Aos avós Manuel e Zinda, que mesmo longe estiveram sempre tão perto! Foram o “fundamento” desta caminhada, quem esteve sempre para dar a mão, quem a permitiu desde o primeiro momento possível que eu fosse capaz de chegar até aqui. A minha vida não era nem metade do que é sem vocês.

Aos meus tios, primos e à minha madrinha, por serem o valor acrescentado à minha vida, por animarem os tempos menos bons e por fazerem com que tudo seja sempre mais fácil.

Aos meus amigos Arnaud, Dácio, Rui's, Diogo, Bruno, Serginho, Ana, Nanda... A todos vocês um muito obrigado por serem o “escape”, os que me ouvem, os que entendem, os que estão sempre do meu lado e os que fazem questão de perguntar “quando vens?”, “quando estás?” e “quanto te vemos?”. Mesmo que a vida nos leve um para cada lado, tenho a certeza que nos voltaremos sempre a encontrar! Quanto mais não seja para comer um arroz de feijão com panados.

A toda a gente que me ajudou de alguma forma durante este período da minha vida e que não está aqui especificada. Obrigado a todos os *unknown soldiers*!

*The last but not the least...* À Iria. Não consigo ter palavras para te agradecer o tempo a teu lado... Tenho a certeza que sem ti, sem a tua força, sem o teu apoio, sem o carinho e o amor que me entregas todos os dias esta tese não teria saído do “projecto”. Obrigado pelo ânimo e pela paciência que tiveste e por me encorajares a que terminasse com este capítulo da minha vida.

# Índice

Abreviações .....	VII
Resumo.....	IX
Abstract .....	XI
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Glicosilação.....	2
1.1.1. N-glicosilação .....	4
1.1.2. O-glicosilação .....	6
1.2. Lectinas.....	8
1.2.1. Famílias de Lectinas.....	9
1.2.2. Aplicações Biotecnológicas .....	12
1.3. Estratégias de Imobilização em Nanoplatasformas.....	13
1.4. Pesquisa de Biomarcadores .....	17
1.5. Objectivos.....	19
<b>2. Material e Métodos .....</b>	<b>21</b>
2.1. Descrição dos Reagentes.....	21
2.2. Síntese das MNPs .....	21
2.3. Conjugação das MNPs com as Lectinas.....	24
2.4. Optimização das condições operacionais .....	27
2.5. Enriquecimento Glicoproteico com as MNP@Lectinas .....	29
2.5.1. Enriquecimento de glicoproteínas .....	29
2.5.2. Comparação da recuperação entre MNP@Lectinas e Sepharose. ....	30
2.5.3. Avaliação da afinidade das MNP@Lectinas .....	30
2.6. Desglicosilação da fetuína .....	31
2.7. Quantificação proteica .....	32
2.8. Isolamento das proteínas do Soro, Urina e Saliva.....	32

2.9. Redução proteica, alquilação e digestão trípica .....	33
2.10. Identificação proteica e <i>data mining</i> .....	33
2.11. Análise estatística de dados .....	34
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	<b>35</b>
3.1. Análise das MNP@Lectinas .....	36
3.2. Optimização da síntese de MNP@Lectinas.....	39
3.3. MNP@Lectinas <i>versus</i> Suportes de Sepharose.....	40
3.4. Afinidade das MNP@Lectinas com as Glicoproteínas .....	42
3.5. Recuperação selectiva de glicoproteínas em soro, urina e saliva .....	44
<b>4. Conclusões</b> .....	<b>50</b>
<b>5. Bibliografia</b> .....	<b>53</b>
<b>6. Anexos</b> .....	<b>69</b>

## Abreviações

<b><math>\alpha</math>-CHCA</b>	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>APS</b>	3-aminopropiltrimetoxisilano
<b>Ara</b>	Arabinose
<b>Asn</b>	Asparagina
<b>ATR</b>	Reflectância total atenuada
<b>ConA</b>	Concanavalina-A
<b>CRD</b>	Domínio de reconhecimento dos carboidratos
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DSS</b>	Éster bis- <i>N</i> -hidroxisuccinimida
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>FT-IR</b>	Infravermelho por transformada de Fourier
<b>Fuc</b>	Fucose
<b>Gal</b>	Galactose
<b>GalNAc</b>	N-acetilgalactosamina
<b>GLA</b>	Aglutinina da <i>Galanthus nivalis</i>
<b>Glc</b>	Glicose
<b>GlcNAc</b>	N-acetilglicosamina
<b>Glu-Fib</b>	[Glu1]- Fibrinopéptido B
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>Hyl</b>	Hidroxilisina
<b>Hyp</b>	Hidroxi prolina
<b>LAC</b>	Cromatografia de afinidade com lectinas
<b>LC</b>	Cromatografia de fase líquida
<b>MA</b>	<i>Maackia amurensis</i>
<b>MALDI</b>	Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz
<b>Man</b>	Manose
<b>MLAC</b>	Multi-LAC
<b>MNP@ConA</b>	Nanopartículas magnéticas associadas a concanavalina-A
<b>MNP@Lectinas</b>	Nanopartículas magnéticas associadas a lectinas
<b>MNP@MA</b>	Nanopartículas magnéticas associadas a aglutinina de <i>Maackia amurensis</i>

<b>MNP@WGA</b>	Nanopartículas magnéticas associadas a aglutinina de gérmen de trigo
<b>MNPs</b>	Nanopartículas magnéticas
<b>MS</b>	Espectrometria de Massa
<b>MWCO</b>	Separação por Peso Molecular
<b>Neu5Ac</b>	Ácido N-acetilneuramínico
<b>PAS</b>	Ácido Periódico-Schiff
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato-Salino
<b>Pro</b>	Prolina
<b>RE</b>	Retículo Endoplasmático
<b>RIP</b>	Proteínas Inativadoras do Ribossoma
<b>S/N</b>	Sinal Derivado do Ruído de Fundo
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforese em gel de poliacrilamida c/ dodecil sulfato de sódio
<b>Sepharose@ConA</b>	Suporte de Sepharose associado a concanavalina-A
<b>Sepharose@Lectina</b>	Suporte de Sepharose associado a lectinas
<b>Ser</b>	Serina
<b>Sia</b>	Ácido siálico
<b>TEM</b>	Microscopia electrónica de transmissão
<b>TEOS</b>	Tetraetilortosilicato
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TMFS</b>	Ácido trifluorometanosulfónico
<b>TOF</b>	Tempo de voo
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WGA</b>	Agglutinina de gérmen de trigo
<b>Xaa</b>	Aminoácido não especificado ou desconhecido
<b>XRD</b>	Difracção de Raios-X
<b>Xyl</b>	Xilose

## Resumo

A glicosilação é uma das modificações pós-traducionais mais complexas e abundantes na natureza. Este tipo de modificação tem um papel fundamental na actividade e na síntese proteica, assim como na sinalização, crescimento e diferenciação celular. Padrões alterados e glicosilação aberrante são dois fenómenos profundamente correlacionados com diversas doenças, incluindo o cancro. Assim, a monitorização e a descoberta de padrões de glicosilação em fluídos humanos é de enorme importância para a detecção, acompanhamento e desenvolvimento de novos tratamentos.

Os fluídos humanos são extremamente complexos e muitos possíveis biomarcadores estão presentes em concentrações muito baixas (na ordem dos nano aos femtomolar), o que os torna muito difíceis de encontrar e monitorizar, fazendo com que o enriquecimento seja um passo fundamental para o seu estudo. Uma das estratégias de enriquecimento mais eficientes tira partido da capacidade das lectinas se ligarem selectivamente a mono ou oligossacarídeos das glicoproteínas, que, associadas a um suporte de imobilização, permitem a captura e enriquecimento destes biomarcadores. Assim, é necessário um suporte de imobilização que permita que a captura seja simples, eficiente e específica. As nanopartículas magnéticas (MNP) vieram, em associação com as lectinas, permitir responder a esta demanda, pois promovem uma interacção tridimensional e multivalente das lectinas com as glicoproteínas, aumentando a especificidade e a eficiência da captura.

Neste trabalho, as nanopartículas magnéticas foram revestidas com três lectinas com um largo espectro de captura: Concanavalina A (ConA), *wheat germ agglutinin* (WGA) e lectina de *Maackia amurensis* (MA). Uma nova estratégia, baseada na protecção das lectinas pelos seus açúcares de ligação específica antes da ligação às MNPs foi proposta para superar a natureza não-específica desta conjugação. Esta nova metodologia permitiu a preservação da conformação da lectina, aumentando em 40% e 90% a afinidade da ConA e da MA com as glicoproteínas, quando comparadas com a síntese das MNPs com lectina não-protégida. As condições óptimas de trabalho (temperatura e tempo) e as capacidades máximas de ligação foram determinadas para cada lectina, utilizando a fetuína como referência.

A comparação com outras estratégias de imobilização foi realizada recorrendo a Sepharose@ConA. As MNP@ConA demonstraram uma afinidade 5 vezes superior para as glicoproteínas que a Sepharose@ConA, quando incubadas com ovalbumina e fetuína. As MNP@Lectinas foram, depois, aplicadas a soro, saliva e urina humana e as proteínas

capturadas digeridas com tripsina e analisadas por nano-HPLC MALDI-TOF/TOF. Esta metodologia permitiu a identificação de 180 proteínas, 90% das quais se encontravam glicosiladas de acordo com as ferramentas bioinformáticas utilizadas, revelando um nível muito baixo de ligações inespecíficas. Assim, as MNP@Lectinas demonstraram ser uma ferramenta de elevado valor para estudos glicoproteômicos, especialmente quando lidamos com baixas quantidades de glicoproteínas.

## Abstract

Glycosylation is one of the most abundant and complex posttranslational modification in nature. This type of modification has a key role in the activity and protein synthesis, as well as in signalling, cell growth and differentiation. Altered glycosylation patterns and aberrant glycosylation are deeply correlated with various diseases, including cancer. Thus, monitoring and discovery of glycosylation patterns in human fluids is of great importance for the detection, monitoring and development of new treatments.

Human body fluids are extremely complex and many of these biomarkers are present in a very low concentration range (nano to femtomolar), which makes them very difficult to find and monitor, making the enrichment a key step for their study. One of the most effective strategies to enrich takes advantage of the ability of lectins to bind selectively to oligosaccharide complexes of the glycoproteins which, linked to a support of immobilization, allow the capture and enrichment of these biomarkers. The immobilization support must be simple, efficient and specific. The magnetic nanoparticles (MNP) in association with the lectins, appeared to address this demand, because they promote a three-dimensional and multivalent interaction with glycoproteins, increasing the specificity and efficiency of capture.

In this study, the magnetic nanoparticles were coated with three broad-spectrum lectins: Concanavalin A (Con A), wheat germ agglutinin (WGA) and *Maackia amurensis* lectin (MA). A new strategy, based on the protection of lectins with their specific binding sugars before the coupling with the MNPs was proposed to overcome the non-specific nature of this combination. This new methodology has enabled the preservation of the conformation of the lectin, increasing by 40% and 90% the affinity of ConA and MA with the glycoproteins as compared to the synthesis of MNPs with non-protected lectins. The optimum conditions (temperature and time) and the maximum binding capacities were determined for each lectin, using fetuin as a reference.

Comparison with other strategies of immobilization was performed using Sepharose @ ConA. The MNP@ConA showed 5 times higher affinity for glycoproteins than ConA@Sepharose, when incubated with fetuin and ovalbumin. The MNP@Lectins were, then, applied to human serum, saliva and urine, and the captured proteins digested with trypsin and analyzed by nano-HPLC MALDI-TOF/TOF. This methodology allowed the identification of 180 proteins, 90% of which were glycosylated according to the bioinformatic tools used, revealing

a very low level of non-specific binding. Thus, MNP @ Lectins have shown to be a valuable tool for glycoproteomic studies, especially when dealing with low quantities of glycoproteins.

O trabalho realizado neste trabalho de Mestrado deu origem ao artigo “Synthesis and Optimization of Lectin Functionalized Nanoprobes for the Selective Recovery of Glycoproteins from Human Body Fluids”, publicado na revista *Analytical Chemistry* em 02 Agosto de 2011

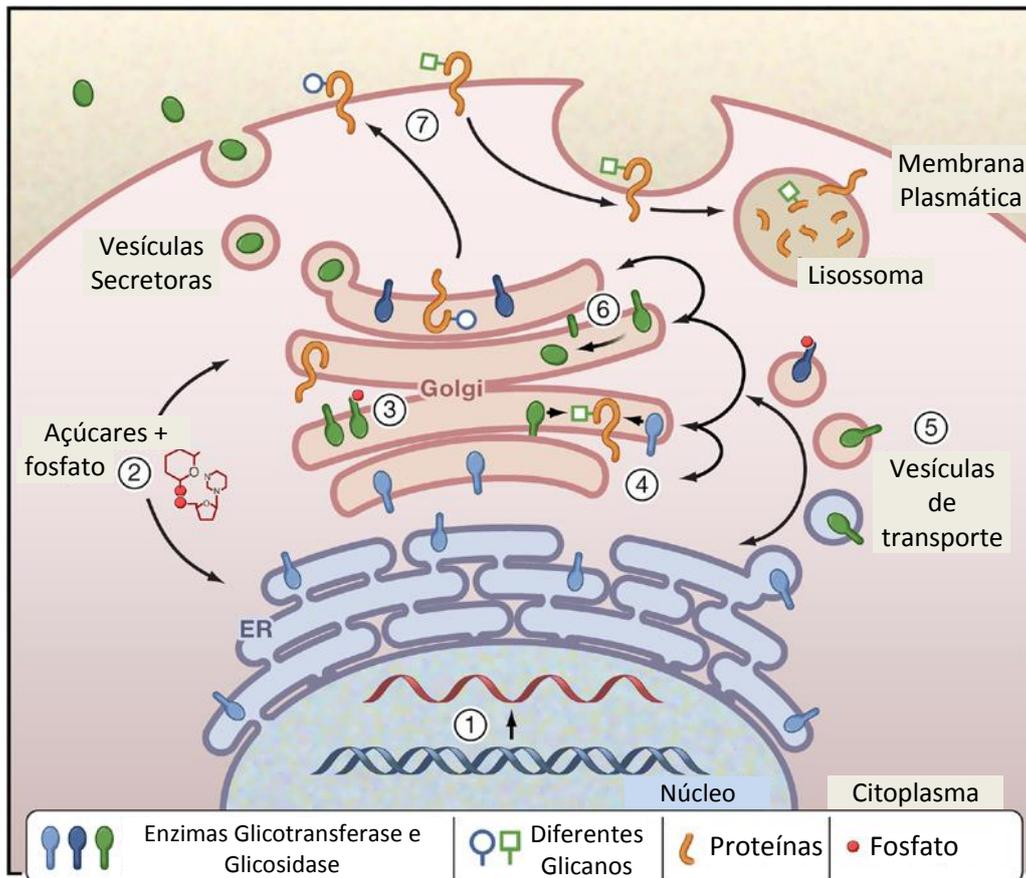
# **1. Introdução**

# 1. Introdução

## 1.1. Glicosilação

A glicosilação é uma das modificações pós-traducional mais comum das proteínas, envolvendo a adição e remoção de carboidratos a proteínas e lípidos que acabaram de ser sintetizados, realizada com o auxílio de um conjunto de enzimas presentes no complexo de Golgi e no RE (Kornfeld et al., 1985; Gill et al., 2010). Este processo é regulado de diversas formas (transcricionalmente, enzimaticamente), e é através do qual os glicanos específicos se associam podendo, assim, alterar a estabilidade e a função das proteínas ou lípidos aos quais se liguem (Campbell et al., 2005). Os carboidratos são, com grande diferença, as moléculas orgânicas mais abundantes encontradas na natureza, sendo que quase todos os organismos os sintetizam e metabolizam (Wade, 1999).

A complexa heterogeneidade dos carboidratos nos sistemas biológicos é um resultado das suas características intrínsecas: a capacidade de diferente número e tipos de resíduos de açúcares formarem ligações glicosídicas entre si, as características estruturais destas moléculas, o tipo de ligação ao carbono anomérico, a posição e a presença ou ausência de ramificações (Mody et al., 1995; Gorelik et al., 2001). De forma a demonstrar o aumento exponencial de complexidade de um dissacarídeo composto de dois monossacarídeos iguais (glucose, por exemplo), podemos compará-lo com um dipéptido composto por dois aminoácidos iguais (por exemplo, glicina). Enquanto o segundo apenas pode produzir um único dipéptido, o primeiro pode formar até onze dissacarídeos diferentes (Sharon et al., 1989). Os glicanos têm a capacidade de codificar uma enorme quantidade de informação biológica, sendo que a mesma não está codificada no genoma (Feizi et al., 2003). O que o genoma codifica são as enzimas que actuam sobre os glicanos, como as glicosiltransferases e as glicosidases. Os níveis de actividade combinada entre estas enzimas no RE, no complexo de Golgi e, também, na superfície celular, determinam os padrões de glicosilação (ou seja, os carboidratos) dos glicolípidos e das glicoproteínas (Sharon et al., 1980; Opdenakker et al., 1993; Zheng et al., 1993). O resumo da forma como é regulada a expressão dos glicanos pode ser encontrada na figura 1.



**Figura 1.** Representação dos múltiplos mecanismos que podem alterar a expressão, a estrutura e a actividade da glicosiltransferase e da glicosidase dentro da célula, e assim, regular a formação de glicanos. Estes mecanismos incluem: o controlo da transcrição do gene da glicosidase e da glicosiltransferase (1); síntese e transporte dos dadores de nucleótidos de açúcar para o RE e o complexo de Golgi (transportadores não ilustrados) (2); modelação da estrutura enzimática por fosforilação (3); quantidades relativas das enzimas que competem pelo mesmo substracto (4); tráfego intracelular das enzimas e acesso condicionado aos substractos (5); proteólise no lúmen do complexo de Golgi, resultando na secreção dos seus domínios catalíticos (6) *turnover* dos glicanos na superfície celular por endocitose, coincidente com o aumento da expressão de outros glicanos (7). Adaptado de Ohtsubo et al., 2006.

A variabilidade estrutural e a complexidade dos glicanos à superfície celular permitem que estes funcionem como moléculas de sinalização, reconhecimento e adesão (Sharon et al., 1993; Ofek et al., 2003). Assim os glicanos à superfície da célula estão envolvidos em diversas funções fisiológicas vitais que incluem o normal desenvolvimento embrionário, diferenciação, crescimento, inibição por contacto, reconhecimento célula a célula, sinalização celular, interacção agente patogénico-hospedeiro, resposta imunitária, metastização, localização e tráfego intracelular, taxa de degradação e rigidez da membrana celular (Blomme et al, 2009; Mukhopadhyay et al., 2009; Ohtsubo et al., 2006, Haltiwanger, 2004; Kulkarni, 2010).

As alterações nos padrões de glicosilação estão correlacionadas com diferentes doenças no ser humano como é o caso do cancro (Reis et al., 2010), Doenças de Alzheimer e

Parkinson (Hwang et al., 2010) e doenças auto-imunes, como o lúpus eritematoso (Chui et al., 2001).

Em contraste com a glicosilação, existe um outro fenómeno de adição de carboidratos chamado glicação. Este refere-se à ligação covalente de sacarídeos (como, por exemplo, a glucose) a proteínas por um processo não mediado por enzimas e irreversível. A ocorrência aumentada deste fenómeno está ligada à diabetes, cataratas, doença de Alzheimer, arterioesclerose e doença de Parkinson (Ghazarian et al., 2011). Também está descrita a sua ligação aos mecanismos de envelhecimento (Suji et al., 2004).

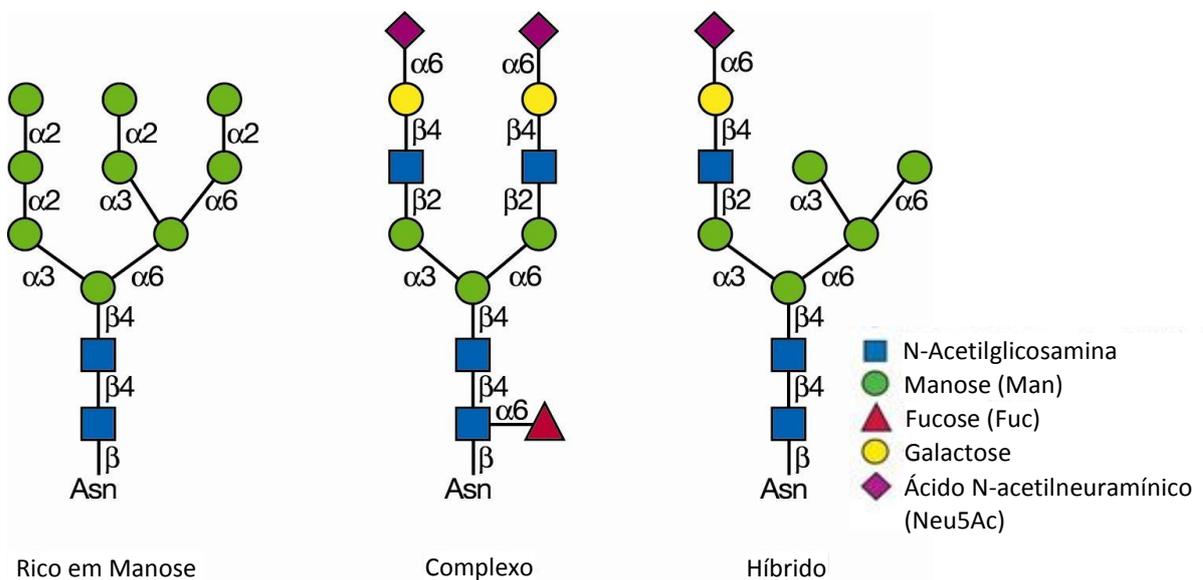
A glicosilação produz diferentes tipos de glicanos, que podem estar ligados a proteínas ou a lípidos. No caso deste trabalho interessam, especialmente, os glicanos ligados a proteínas. As glicoproteínas podem ser, essencialmente, de três tipos: O-glicoproteínas, N-glicoproteínas e os glicosaminoglicanos (também denominados proteoglicanos). Estes últimos são compostos por grandes resíduos de carboidratos ligados a serinas e treoninas, são lineares, produzidos por vias de síntese diferentes e, muitas vezes, altamente sulfatados (Esko et al., 2002). A sua função difere ligeiramente da das glicoproteínas, como a lubrificação de superfícies (na retina, por exemplo), deformabilidade dos tecidos (cartilagens) e suporte à proliferação celular, entre outros (Gandhi et al., 2008). Para o trabalho desenvolvido, e devido ao seu papel fundamental no reconhecimento intercelular e da importância da sua expressão alterada em distintas doenças, como o cancro (Tuccillo et al., 2014), este trabalho centrou-se na pesquisa de O- e N-glicoproteínas.

### **1.1.1. N-glicosilação**

A N-glicosilação é uma das mais comuns e proeminentes modificações pós-transcricionais em proteínas (Woods et al., 1994; Liu et al., 2002). Este tipo de modificação está envolvido em diversos processos biológicos e tem um papel de vital importância no desenvolvimento de seres multicelulares complexos (Varki et al., 2009).

A N-glicosilação consiste na ligação de um resíduo de GlcNAc ao lado amina da cadeia lateral do aminoácido asparagina (ligação N) em configuração  $\beta$ . Os resíduos de asparagina com carboidratos N-ligados apresentam a sequência Asn-Xaa-Ser/Thr-, onde o Xaa pode ser qualquer aminoácido excepto a prolina (Gorelik et al., 2001). Outra das formas pela qual se pode dar a N-glicosilação em células eucarióticas é pela adição de Glc ao resíduo de asparagina e também, pela adição de Glc a uma arginina em configuração  $\beta$  (Spiro, 2002).

Este tipo de glicosilação inicia-se, em células eucarióticas, pela adição covalente de um precursor oligossacarídeo comum com uma cadeia de catorze carboidratos (2 N-acetilglucosamina, 9 manoses e 3 glucoses) ao aminoácido asparagina na proteína-alvo. Este processo é mediado pelo dolicol-fosfato, que transporte e sustenta a cadeia de oligossacarídeos, que irão, depois, ser transferidos com a ajuda da enzima oligosacaril transferase (Zielinska et al., 2012) para o resíduo de asparagina da cadeia polipeptídica em síntese no RE (Chojnacki et al., 1988). A glicosilação N-ligada é essencial, em algumas proteínas, para o seu correcto *fold*ing no RE. Depois do *fold*ing ser bem-sucedido, os três resíduos de glucose do precursor oligossacarídeo são retirados e a glicoproteína segue, depois, para o complexo de Golgi. Neste, o processamento da N-glicoproteína continua, podendo os resíduos de manose ser removidos e outros monossacarídeos (como a GlcNAc, a GalNAc, a galactose, a fucose e os ácidos siálicos, caso do Neu5Ac) adicionados. Todos estes processos de maturação são coordenados por diferentes enzimas. Esta maturação no complexo de Golgi dará origem às três principais classes de oligossacarídeos N-ligados: oligossacarídeos ricos em manoses, oligossacarídeos complexos e oligossacarídeos híbridos (figura 3) (Zielinska et al., 2012).

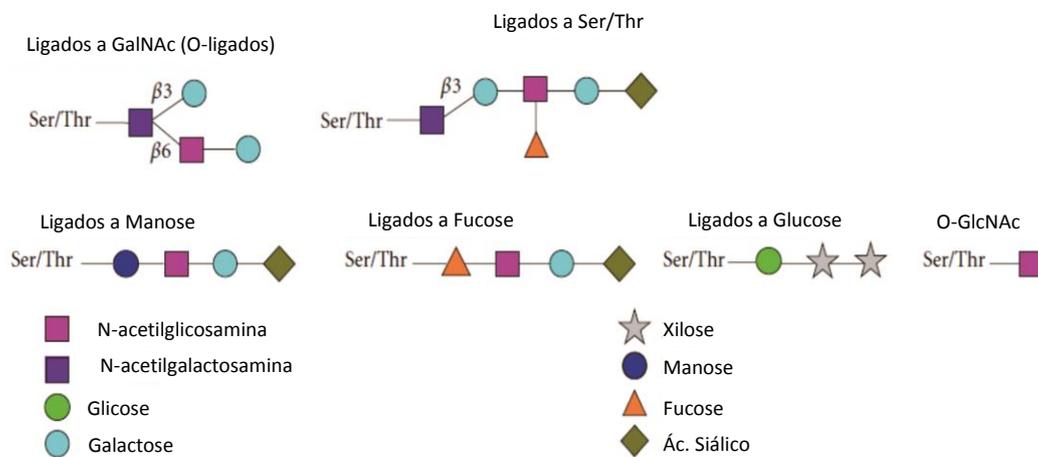


**Figura 2.** Principais tipos de N-glicanos. As representações são do aspecto maturado das N-glicoproteínas. De realçar que todos os N-glicanos partilham o tronco comum de  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ . Adaptado de Varki et al., 2009.

De acrescentar que diferentes porções de uma mesma N-glicoproteína podem ser glicosilados por diferentes classes de N-glicanos (Ghazarian et al., 2011).

### 1.1.2. O-glicosilação

A O-glicosilação é, tal como a N-glicosilação, um dos tipos de glicosilação mais proeminentes e frequentes em mamíferos (Julenius et al., 2005). Este tipo de glicosilação acontece, quando a GalNAc é ligada em  $\alpha$ -1 ao grupo hidroxilo de um resíduo de serina ou treonina (Carraway et al., 1991). Estão, também, descritos outros tipos de O-glicosilação em células eucarióticas, que envolvem diversos carboidratos diferentes (Glc, GlcNAc, GalNAc, Fuc, Man, Xyl, Ara), ligados de formas distintas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), a diversos resíduos de aminoácidos (Ser, Thr, Hyl, Hyp, Tyr), que ocorrem com menos frequência (Spiro, 2002) (Figura 3).



**Figura 3.** Principais tipos de O-glicanos. As representações são do aspecto maturado das O-glicoproteínas. Adaptado de Kim et al., 2011.

A glicosilação tipo mucina (como também é conhecida a adição da GalNAc ao grupo hidroxilo da Ser/Thr), é a O-glicosilação mais frequente nas células eucarióticas. As mucinas têm um alto conteúdo de carboidratos (cerca de 50% do seu peso) e são o principal componente do muco que protege e reveste as superfícies epiteliais da desidratação, danos mecânicos, das proteases e dos organismos patogénicos (Strous et al., 1992). A parte proteica da mucina contém um grande número de locais de O-ligação para os oligossacarídeos, com diversos domínios ricos em Ser, Thr e Pro, sendo, assim, este tipo de glicosilação muito frequente nestas proteínas (Coltart et al., 2002). Foi comprovado que, para além das mucinas, este tipo de glicosilação também acontece em outras proteínas, como na fetuína, nas gonadotropinas humanas e na glicoforina (Spiro, 1973; Sadler, 1984).

A biossíntese de proteínas glicosiladas tipo mucina ocorre no RE rugoso e no complexo de Golgi, depois da N-glicosilação, *fold*ing e oligomerização (Asker et al., 1995; Peters et al.,

1989). Em oposição ao que acontece na N-glicosilação, em que os oligossacarídeos ricos em manose são transferidos em bloco (Chojnacki et al., 1988), a O-glicosilação é um processo que decorre passo-a-passo, com a adição de um monossacarídeo de cada vez (Julenius et al., 2004). Depois da adição da GalNAc, a elongação da cadeia de oligossacarídeos O-ligados continua pela adição de outros carboidratos, como a galactose, fucose, GlcNAc e os ácidos siálicos (como o Neu5Ac) (Schachter et al., 1992). A adição da GalNAc aos resíduos de serina/treonina é o que controla a especificidade do local de glicosilação, sendo que este processo é mediado por, pelo menos, 14 UDP-GalNAc:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferases diferentes (Wang et al., 2003).

Outra das ligações O-glicosídicas de elevada importância em células eucarióticas é a GlcNAc- $\beta$ -Ser/Thr. Este tipo de ligação distingue-se de todas as restantes pelas proteínas em que ocorre (fundamentalmente em proteínas nucleares e do citoesqueleto), sendo a primeira glicosilação a ser descoberta fora do sistema secretor (Hart, 1997). Foi demonstrado que esta O-glicosilação tem uma enorme importância na modulação das actividades das proteínas por diferentes vias: modificação da actividade proteica por fosforilação, regulação das interacções proteína-proteína, regulação da degradação proteica, localização proteica e regulação da transcrição (Hanover, 2001; Zachara et al., 2006; Hart et al., 2007). Em diversos estudos de mapeamento de locais de glicosilação, os locais de ligação da O-GlcNAc mostraram ser os mesmos que os da O-fosforilação (Zachara et al., 2006; Hart et al., 2007). Estes dados sugerem que a O-fosforilação e a O-GlcNAc modificam as proteínas competindo pelos mesmos resíduos de Ser/Thr. Assim, ocupando os resíduos de Ser/Thr utilizados na fosforilação, a O-GlcNAc regula a função da proteína por alteração nos padrões de fosforilação (Zachara et al., 2006).

Assim, em resumo, podemos afirmar que as glicoproteínas estão envolvidas em diversos processos celulares de importância vital e que esses processos são de enorme complexidade e de difícil análise no ambiente celular. Também se pode afirmar que a expressão glicoproteica alterada está correlacionada com diferentes doenças em seres humanos (Narimatsu et al., 2010; Amon et al. 2014). Assim, e de forma a estudar as alterações na expressão de glicoproteínas e as glicosilações aberrantes que ocorrem, existem diversos estudos que procuram definir os perfis glicómicos em seres humanos. Para isso, diversos fluidos foram alvos de estudo na busca de glicoproteínas. São o caso do soro (Zeng et al., 2010; Yang et al., 2005), plasma (Yang et al., 2005), fluido cerebro-espinal (Hwang et al., 2009), urina (Moon et al., 2008) e saliva (Plzak et al., 2005). Estes estudos, no futuro, irão permitir uma detecção mais precoce das doenças, uma monitorização mais eficaz das mesmas e, possivelmente, novos alvos para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas.

Devido à enorme complexidade do proteoma dos fluídos, que é dominado por algumas proteínas muito abundantes que somam 99% do total, e que muitos dos potenciais biomarcadores para as doenças se encontram em quantidades muito baixas nestes fluídos tão complexos, é necessário o uso de ferramentas para o enriquecimento de glicoproteínas (Anderson et al., 2002). Uma das estratégias mais eficientes para a captura e enriquecimento de glicoproteínas aproveita a capacidade das lectinas para se ligarem aos glicanos das glicoproteínas e fazer recuperação selectiva das mesmas.

## 1.2. Lectinas

As lectinas são definidas como proteínas que reconhecem e se ligam, preferencialmente, a estruturas glicosiladas (mono ou oligossacarídeos) (Bies et al., 2004; Minko, 2004). O termo lectina deriva da palavra latina *legere*, que significa “escolher” ou “seleccionar”, e generalizou-se para definir todas as aglutininas não-imunes específicas para carboidratos, independentemente da sua origem (Sharon et al., 2004). A interacção das lectinas com os seus ligandos pode ser tão específica quanto a interacção entre antígeno-anticorpo ou enzima-substrato (Minko, 2004).

Este tipo de proteínas não se liga apenas a oligossacarídeos nas células, mas também a glicanos livres, incluindo monossacarídeos. Contudo as interacções lectina-monossacarídeo são relativamente fracas, com constantes de dissociação a variarem na ordem dos micromolar aos milimolar (Bouckaert et al., 2005; Rabinovich et al., 2007).

As lectinas foram inicialmente descobertas e descritas em plantas e, nos anos subsequentes, descritas em microorganismos e animais (Sharon et al., 2004). De realçar que as lectinas em animais e plantas não têm qualquer homologia na sua estrutura primária, contudo demonstram preferências similares na ligação a carboidratos. Isto sugere que possamos estar na presença de um caso de evolução paralela, que demonstra a grande importância das lectinas nos sistemas vivos (Gorelik et al., 2001).

Nos últimos anos a estrutura das lectinas foi sendo elucidada, principalmente as suas estruturas primárias e terciárias. Foi observado que lectinas de fontes distintas, apesar de apresentarem estruturas primárias diferentes, partilhavam diversas semelhanças nas suas estruturas terciárias (Sharon et al., 2004). Estudos estruturais conduzidos em lectinas animais sugerem que o local de ligação dos carboidratos era um limitado grupo de aminoácidos na lectina denominado domínio de reconhecimento dos carboidratos (CRD) (Sharon et al., 2004).

Os CRD reconhecem os terminais não-reduzidos dos resíduos de carboidratos das glicoproteínas e glicolípidos da membrana celular (Mody et al., 1995). Os CRDs das lectinas podem, também, distinguir entre isômeros anoméricos, tão grande é a sua especificidade. Por exemplo, a ConA é capaz de se ligar especificamente aos  $\alpha$ -anômeros da glicose e da manose, mas não aos seus  $\beta$ -anômeros (Mody et al., 1995). Devido às suas diferenças em relação aos CRD entre lectinas, estas foram agrupadas em famílias, onde dentro das mesmas os motivos de aminoácidos pertencentes ao CRD se encontram mais conservados (Sharon et al., 2004).

### **1.2.1. Famílias de Lectinas**

Existem, tanto dentro das lectinas animais como nas lectinas de plantas, uma grande quantidade de famílias, que diferem entre si nos CRD, nos carboidratos que reconhecem especificamente e na forma como está organizada a sua estrutura.

Dentro das lectinas animais estão descritas, até ao momento, 13 famílias de lectinas. A função e domínios reconhecidos por cada uma delas podem ser encontrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resumo do domínio de açúcares reconhecido e funções das diversas famílias de lectinas animais.

Família	Domínio	Função Celular	Referência
Calnexinas	Glc <sub>1</sub> Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	Sorting proteico no RE.	Williams, 2006
Tipo M	Man <sub>8</sub>	Degradação de glicoproteínas no RE.	Braakman, 2001
Tipo L	Vários	Sorting proteico no RE.	Fiedler et al., 1994
Tipo P	Man 6-fosfato, outros	Sorting proteico pós-Golgi, tráfico glicoproteico, degradação de glicoproteínas no RE., sinalização enzimática.	Cruciat et al., 2006
Tipo C	Vários	Adesão celular (selectinas), limpeza glicoproteica, imunidade inata (colectinas e selectinas).	Kerrigan et al., 2009
Galectinas	B-galactosidases	Ligação cruzada de glicanos na matrix extracelular.	Cooper et al., 1999
Siglecs (ou tipo I)	Ácidos siálicos	Adesão celular.	Crocker et al., 2001
Tipo R	Vários	Sinalização enzimática, controlo das hormonas glicoproteicas.	Hassan et al., 2000
Tipo Caixa-F	GlcNAc <sub>2</sub>	Degradação de proteínas mal enroladas.	Yoshida et al., 2005
Ficolinas	GlcNAc, GalNAc	Imunidade inata.	Ren et al., 2014
Lectinas tipo quitinase	Oligossacarídeos tipo quitina	Metabolismo do colagénio.	Bigg et al., 2006
Tipo F (Fucolectinas)	Oligossacarídeos terminados em Fuc	Imunidade inata.	Honda et al., 2000
Intelectinas	Gal, Galactofuranose, Pentoses	Imunidade inata. Fecundação e embriogénese.	Wrackmeyer et al., 2006

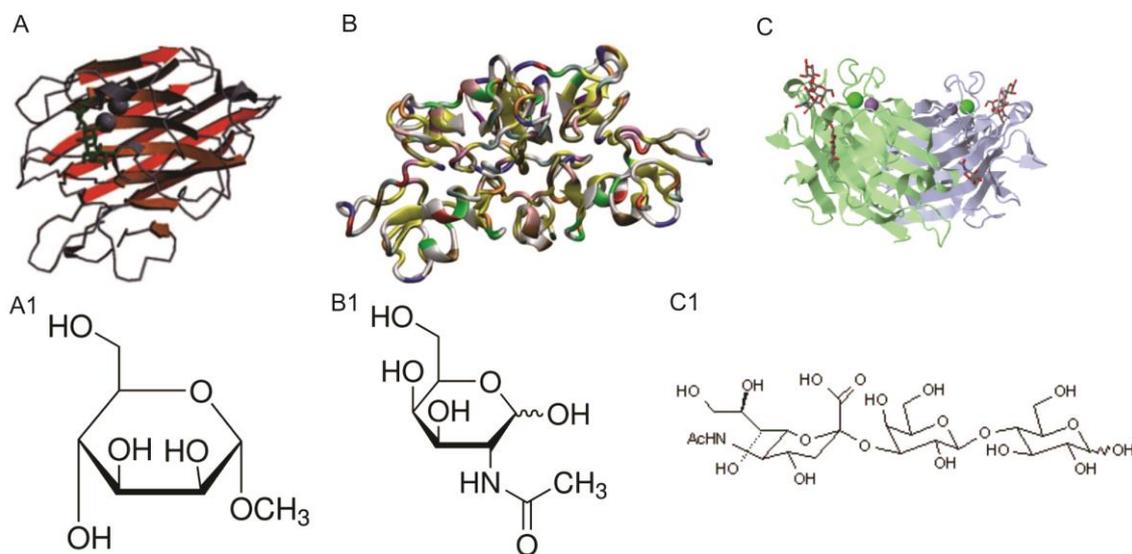
No caso do trabalho desenvolvido nesta tese, foram utilizadas outro tipo de lectinas: lectinas isoladas em plantas. Este facto deveu-se, fundamentalmente, à facilidade com que são isoladas e, por isso, têm um custo mais baixo que as lectinas animais (Peumans et al., 1998). No caso das lectinas de plantas estão identificadas 7 famílias (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resumo do domínio de açúcares reconhecido e funções das diversas famílias de lectinas de plantas.

Família	Domínio	Principais Funções	Referência
Lectinas de Legumes	Vários	Fixação do azoto por simbiose com as bactérias <i>Rhizobium</i> .	Diaz et al., 1989
Lectinas ligantes da quitina	GlcNAc	Fungicida e insecticida (antinutriente).	Raikhel et al., 1993
RIP tipo 2	Gal, GalNAc ou Neu5Ac $\alpha$ (2,6)Gal/GalNAc	Fungicida e insecticida por inibição da síntese proteica.	Mak et al., 2007
Lectinas do floema da <i>Cucurbitaceae</i>	(GlcNAc) <sub>n</sub>	Recuperação de ferimentos e irradiação, defesa contra pestes.	Dinant et al., 2003
Relacionadas com a Jacalina	Gal Manose/Maltose	Defesa em resposta a stresses bióticos e abióticos, armazenamento intracelular e desenvolvimento da planta.	Babosha A.V., 2008
Amarantinas	GalNAc	Insecticida, aglutinador de antígenos-T.	Wu et al., 2006
Relacionadas com a GNA	Manose	Actividade anti-viral e fungicida.	Wu et al., 2013

Como foi anteriormente referido, a escolha das lectinas recaiu nas últimas sobretudo pela facilidade de obtenção e isolamento das mesmas. Especificamente foram usadas duas lectinas de legumes (ConA e MA) e uma lectina ligante da quitina (WGA). Estas três lectinas foram seleccionadas de forma a abranger diferentes motivos de açúcares. A ConA abrange um espectro bastante largo de glicoproteínas, dado que se liga a resíduos de manose e glicose com grupos hidroxilo livres em C3, C4 e C6 (Alvarez-Manilla et al., 2010), a MA a resíduos de ácidos siálicos em ligação  $\alpha$ (2,3) (Azuma et al., 2000) e a WGA a resíduos de GlcNAc (Natsuka et al., 2005). O esquema tridimensional das lectinas utilizadas e um dos seus açúcares-alvo está representado na figura 4. Estas lectinas são isoladas de diferentes plantas: a ConA é isolada de *Canavalia ensiformes* (Jack Bean, Feijão-de-Porco), a WGA de *Triticum vulgare* (Wheat, Trigo) e a MA de *Maackia amurensis* (Amur Maackia).

A grande variedade de açúcares que podem capturar, a obtenção e isolamento a baixo custo, a facilidade com que se podem manusear e os locais onde podem ser aplicadas (modificação transgénica de plantações com lectinas, por exemplo) fazem com que estas proteínas sejam, neste momento, largamente utilizadas como ferramentas biotecnológicas em larga escala (Peumans et al., 1998).



**Figura 4.** Representação tridimensional das lectinas ConA (A) (Sharon et al., 2004), WGA (B) (Kubik et al., 2012) e MA (C) (Imberty et al., 2000). Debaixo de cada uma delas podemos observar um exemplo de cada um dos seus açúcares-alvo: metil- $\alpha$ -D-manopiranosida (A1), GlcNAc (B1) e 3-sialilactose (C1).

### 1.2.2. Aplicações Biotecnológicas

As lectinas são um dos grupos de proteínas mais versáteis e com maior capacidade de aplicação na investigação. O seu potencial de aplicações vai desde a sua aplicação como ferramenta para quantificar e detectar glicoproteínas, passando pelo uso de tecnologia de recombinação de ADN para aumentar a sua disponibilidade e melhorar as suas propriedades, até ao uso em plantas transgênicas, para melhorar a sua qualidade e resistência a pragas (Peumans et al., 1998).

No caso da investigação, as lectinas podem ser utilizadas de duas formas: como ferramentas ou como proteínas bioactivadoras. Aplicadas como proteínas bioactivadoras, as lectinas podem ser úteis na activação de linfócitos recorrendo a lectinas mitogénicas e na indução da síntese de proteínas específicas como enzimas, citocinas e interleucinas (Kilpatrick, 1991). Como ferramentas, as lectinas são utilizadas para detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados (tal como foram utilizadas neste trabalho), devido à sua alta especificidade para determinados motivos de açúcar (Cummings, 2008). Podem, também, ser utilizadas para a aglutinação de glicoproteínas presentes em grandes quantidades em determinados fluidos (albumina, IgG, mucinas) para permitir a identificação de proteínas menos abundantes (Kullolli et al., 2008).

Como ferramenta médica, as lectinas podem ser utilizadas para diagnóstico e tratamento. No caso do diagnóstico estas são utilizadas em testes de determinação do grupo

sanguíneo, na procura de glicosilação aberrante em glicoproteínas, marcação histoquímica de carboidratos e na estimulação da produção de linfócitos para análise cromossômica, entre outros (Naeem et al., 2007). No caso da aplicação terapêutica, acontece fundamentalmente no tratamento de cancro como imunotoxinas e na imunomodulação (como indutores imunológicos) (Pusztai et al., 2008).

Na agricultura, as propriedades das lectinas têm sido utilizadas como uma arma de defesa contra pragas de insectos, fungos e vírus em plantas modificadas geneticamente para a produção de lectinas. As propriedades de aglutinação do ARN das lectinas da família RIP tipo 2 são de grande utilidade no combate de vírus (Broekaert et al., 1986), as ligantes à quitina demonstraram grande efectividade no combate a pragas fúngicas (Kasprzewska A., 2003) e algumas lectinas de leguminosas, como é o caso da fitohemaglutinina (PHA), demonstraram eficácia na protecção das plantações contra animais maiores, dado que, quando comida em cru, provoca vômitos e diarreias (Nasi et al., 2009) e contra insectos (Spawka et al., 2011). As lectinas relacionadas com a GNA também demonstraram enorme actividade contra pragas de insectos (Zhou et al., 1998).

No caso específico deste trabalho, as lectinas foram utilizadas de forma a capturar e isolar glicoconjugados e, mais concretamente, as glicoproteínas de diferentes fluidos humanos. Para que a captura seja bem-sucedida, as lectinas são, normalmente, associadas com diferentes suportes sólidos (como a agarose, sílica, ou Sepharose) (Monzo et al., 2007), colunas monolíticas (Feng et al., 2009) e, mais recentemente, nanopartículas magnéticas, as quais facilitam a recuperação das proteínas e aumentam a sensibilidade do método (Madera et al., 2008).

### **1.3. Estratégias de Imobilização em Nanoplatasformas**

Nos últimos anos houve esforços continuados no sentido do desenvolvimento de estratégias de enriquecimento e separação de glicopéptidos e glicoproteínas de forma a facilitar e melhorar a análise da glicosilação em matrizes complexas (Thaysen-Andersen et al., 2013). Em diferentes áreas de investigação existem diferentes formas de abordar a captura e enriquecimento de glicoproteínas, sendo que este enriquecimento poderá utilizar diferentes métodos baseados ou não nas lectinas (Huang et al., 2014).

Existem diversos métodos que não utilizam as lectinas como meio de captura e se apoiam em outras propriedades inerentes aos glicanos para os imobilizar. Destacam-se: os

baseados em interações hidrofílicas, que fazem uso de um zwitterião (composto químico electricamente neutro mas que possui cargas opostas em diferentes átomos, formando um “sal interno”) para aumentar as diferenças hidrofílicas entre os glicopéptidos e os péptidos não glicosilados (Mysling et al., 2010); os que utilizam a afinidade entre os glicopéptidos e os ácidos borónicos (estes são capazes de formar ligações covalentes com os grupos 1-2 e 1-3 *cis*-diol para formar ésteres cíclicos estáveis em pHs elevados, revertendo a reacção em meios ácidos), sendo que esta técnica apenas pode ser utilizada em glicopéptidos com sacarídeos (glicose, manose, galactose) (Hsiao et al., 2011); e os que se baseiam na capacidade de criação de ligações hidrazona pela hidrazida (depois de os glicopéptidos terem sido oxidados com periodato de sódio para gerar aldeídos) e libertação dos mesmos com PNGase F (no caso dos O-glicopéptidos usa-se uma hidrólise ácida) (Chen et al., 2011). Outras técnicas utilizadas baseiam-se na cromatografia por TiO<sub>2</sub>, troca aniónica, carbono mesoporoso, polímeros de “micela reversa”, sacarídeos “click” (reacção de cicloadição de azidas a alcinos catalizadas pelo Cu(I)) e funcionalização de óxido de grafeno com ácido 1-pirenobutírico (Huang et al., 2014).

Estas técnicas podem ser utilizadas isoladas ou combinadas entre si e apresentam algumas vantagens (como aumento do leque de glicanos que podem capturar), mas também aumentam em grande escala a complexidade do protocolo quando comparadas com as estratégias de imobilização que se baseiam nas lectinas para a captura de glicanos. Assim, devido à fiabilidade, sensibilidade e simplicidade de procedimentos, a captura com recurso a lectinas foi a escolhida para a realização deste trabalho.

Actualmente existem diversos substratos que podem ser utilizados para a imobilização de lectinas (Reichelt et al., 2012). A imobilização das lectinas nos suportes físicos pode ocorrer por adsorção física, ligação química ou através de interações por afinidade (Ongay et al., 2012). Durante a imobilização das lectinas num material de suporte, uma nova superfície é gerada, que combina as características físicas e químicas das lectinas e do suporte imobilizador. Idealmente, as superfícies de imobilização devem apresentar um carácter hidrofílico (livres de locais de ligação hidrofóbicos) de forma a minimizar as interações não-específicas com as proteínas e, também, para aumentar a sua estabilidade (Tozzi et al., 2003). Outra consideração que se deve ter aquando da imobilização, é o tipo de *cross-linker* que se deve utilizar para imobilizar as lectinas à superfície da fase estacionária. Os *cross-linkers* ideais deverão permitir a imobilização das lectinas para que estas se comportem de uma forma similar ao que se comportariam na natureza (i.e., reconhecer e ligar-se aos glicanos de interesse sem que ocorram impedimentos estéricos) (Narayanan et al., 1990).

As técnicas utilizadas para a imobilização de lectinas podem ser de dois tipos principais: não-covalentes e covalentes (Monzo et al., 2007).

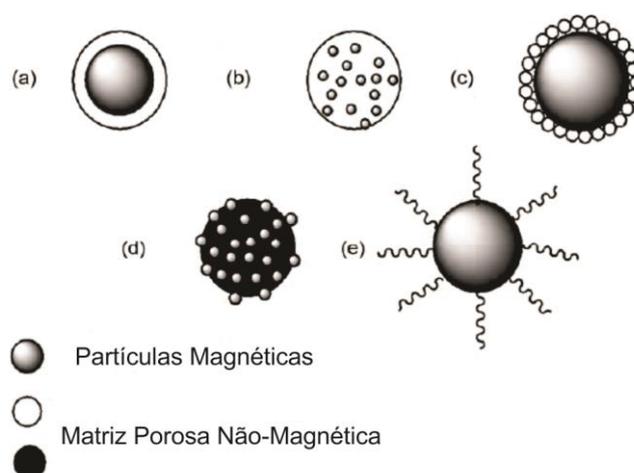
A técnica não-covalente mais largamente utilizada tira partido das interações hidrofóbicas das lectinas com a polimixina B (um decapeptídeo). Este tipo de técnica tem a desvantagem que as interações hidrofóbicas poderão, também, ocorrer com os glicanos de interesse e impedir a sua captura pela glicoproteína (Masárová et al., 2004). A grande vantagem deste tipo de técnica é que, no final, as lectinas podem ser recuperadas pela quebra da ligação não-covalente (Masárová et al., 2004).

No caso das técnicas covalentes, estas são mais amplamente usadas que as anteriores, pois conferem uma maior estabilidade à ligação entre a lectina e o suporte de imobilização (Helholz et al., 2003). O interesse da comunidade científica nas estratégias de imobilização covalente cresce a cada dia, e diferentes imobilizadores são testados de forma a obter interações cada vez mais estáveis (Monzo et al., 2007). Os suportes de imobilização com as características ideais para serem utilizados em ligação covalente às lectinas são vários, dentro dos quais se destacam a agarose, a sílica, a celulose e outros polímeros (como a Sepharose e as colunas monolíticas) (Monzo et al., 2007). A maioria destes suportes físicos são utilizados para LAC ou para outro tipo de cromatografias (LAC em série, MLAC e colunas monolíticas de afinidade com lectinas) e para electroforese, que são procedimentos mais demorados, exigem uma maior preparação do material biológico para a sua análise e estão sujeitos a uma maior quantidade de interações não-específicas em matrizes complexas, como é o caso dos fluídos humanos (Huang et al., 2014). Estas interações não-específicas são particularmente influentes na presença de proteínas muito abundantes e diminuem a especificidade e a sensibilidade da técnica de imobilização (Tang et al., 2004).

Neste contexto, os grandes avanços na nanotecnologia levaram ao desenvolvimento das nanopartículas magnéticas (MNPs) que, com a associação a caudas funcionais, têm diversas aplicações biológicas e biomédicas (Aguilar-Arteaga et al., 2001). Algumas das suas aplicações são: o uso das MNPs para a melhoria do contraste em MRI (Kim et al., 2003), para provocar hipertermia e eliminar células cancerígenas (Jordan et al., 2001), para entrega de medicação especificamente em células malignas (Lubbe et al., 2001), para separação magnética (Madera et al., 2008) e para o estudo celular com marcadores magnéticos (Moller et al., 2003). Em particular, a associação com moléculas biológicas tem demonstrado uma superior capacidade de separação quando comparada com outras plataformas microdimensionais (Gijs M.A.M., 2004). As principais vantagens da utilização de nanopartículas

suspensas em lugar dos ensaios em superfícies são a possibilidade de utilizar quantidades diminutas de amostra, a diminuição dos tempos de incubação necessários, a melhor difusão dos suportes de imobilização na amostra e uma maior área de superfície de captura em relação ao volume de amostra. Se adicionarmos a estas vantagens o facto de se utilizar nanopartículas magnéticas, podemos acrescentar a facilidade da separação destas da amostra, e assim isolar os glicanos de interesse recorrendo ao uso de um campo magnético e removendo o sobrenadante (Gijs M.A.M., 2004).

No caso deste trabalho, e pelas vantagens apresentadas anteriormente, o tipo de suporte de imobilização utilizado foram as nanopartículas associadas a lectinas. A estrutura das nanopartículas pode diferir em vários aspectos. Todas utilizam partículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) podendo estas ser utilizadas como núcleo ou como revestimento de um núcleo não-magnético (Figura 5).



**Figura 5.** Diferentes tipos de estruturas de nanopartículas magnéticas: a) núcleo-revestimento, b) multi-núcleo, c) e d) esfera a esfera e e) em escova. Adaptado de Aguilar-Arteaga et al., 2010.

Estes núcleos magnéticos podem ser isolados de bactérias magnéticas nos sedimentos marinhos (Matsunaga et al., 2007), ou coprecipitados partindo de sais metálicos (Wei et al., 2008). O resultado da coprecipitação terá, depois, de ser revestido por sílica, polímeros orgânicos ou outros óxidos metálicos (Wikstrom et al., 1987). Este revestimento vai permitir, numa segunda fase, a funcionalização do revestimento com o material de captura de interesse (ex: enzimas, lectinas, anticorpos) (Knopp et al., 2007). Contudo, estes protocolos de imobilização devem, sempre, tentar reduzir a adsorção não-específica, isto é, a interação entre o grupo funcional e a superfície da partícula deve ser minimizada, objectivos que podem ser conseguidos recorrendo a uma ligação covalente (Aguilar-Arteaga et al., 2010). Para isto, é

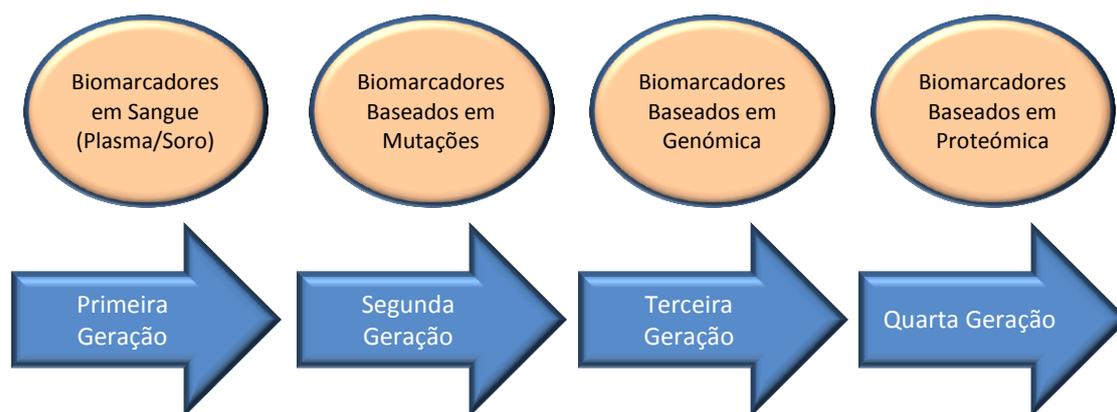
de grande importância a utilização de um *cross-linker* para a imobilização da proteína. Este, além de permitir reduzir as interações não-específicas, aumenta a distância lateral entre os captadores (no caso deste trabalho, as lectinas) diminuindo possíveis interações entre si. Os *cross-linkers* utilizados com mais frequência são o glutaraldeído, os compostos epóxi, brometo de cianogénio e a éster bis-*N*-hidroxisuccinimida (DSS) (Fuentes et al., 2005). Com a esfera magnética revestida e provida de um *cross-linker* funcional, a proteína de captura já pode ser ligada às nanopartículas.

Dado o potencial das nanopartículas magnéticas, este trabalho procurou desenvolver e otimizar esta plataforma para o enriquecimento selectivo de glicoproteínas recorrendo a nanopartículas magnéticas funcionalizadas com lectinas. Estas nanopartículas foram, depois, utilizadas para a recuperação selectiva em soro humano, urina e saliva. No futuro poderão ser aplicadas na pesquisa de biomarcadores em diferentes doenças.

#### **1.4. Pesquisa de Biomarcadores**

Os biomarcadores são os indicadores do estado fisiológico da célula e sofrem grandes alterações durante o desenvolvimento do processo de doença. Genes activados, os seus produtos e outros compostos orgânicos produzidos pela célula são identificadores singulares que, no seu conjunto, compõem a “assinatura molecular” da célula. Durante as doenças, existem diversas modificações na maquinaria celular que se sobrepõem à regulação biológica normal, modificando o comportamento celular (Srinivas et al., 2001).

Existem diversos tipos de biomarcadores para a detecção das modificações na maquinaria celular. Desde a alteração nos valores de marcadores serológicos e imunológicos, passando pelas alterações genómicas até à proteómica, todas estas variações podem ser utilizadas como marcadores do estado biológico das células (Figura 6). De todas as metodologias empregues na pesquisa de biomarcadores, a que oferece a capacidade de uma visualização mais global de todas as alterações que ocorrem na célula é a proteómica. Isto deve-se ao seu carácter dinâmico e fluxo constante, pois engloba as alterações provocadas pelo *splicing* alternativo dos mRNAs, as modificações pós-traducionais (ex: glicosilação, fosforilação) e a regulação funcional e temporal da expressão genética (Van Eyk J.E., 2001).



**Figura 6.** Evolução na pesquisa de biomarcadores. Adaptado de Srinivas et al., 2001.

No caso específico das glicoproteínas, estas alterações estão relacionadas com diversas doenças, sendo que fundamentalmente são utilizadas como biomarcadores para a monitorização, triagem e definição de estadios em diversos tipos de cancro (Clark et al., 2012). Isto deve-se às alterações dos padrões de glicosilação que ocorrem nos tumores. A glicosilação aberrante (Drake et al., 2010), a alteração nos N-glicanos que participam na adesão celular (Reis et al., 2010) e a forte possibilidade que os glicanos e os locais de glicosilação possam estar alterados durante a iniciação e progressão cancerígena (Kim et al., 2011) são fortes evidências do papel central das glicoproteínas no mecanismo de evolução cancerígeno. A comparação dos padrões de glicosilação em células normais e cancerígenas pode, também, ser utilizada como biomarcador clínico num futuro próximo (Meany et al., 2011). Actualmente, diversas glicoproteínas estão aprovadas para uso médico na detecção e seguimento de tumores (Clark et al., 2012). Assim, detectar as alterações nos padrões de glicosilação ou na estrutura dos glicanos pode ajudar a aumentar a especificidade e a sensibilidade dos actuais métodos de detecção, e permitir a detecção precoce da doença (Hart et al., 2010). A detecção precoce é de enorme importância neste tipo de doença pois melhora o prognóstico e a sobrevida.

Em conclusão, é possível afirmar que tendo em conta o valor das glicoproteínas e a especificidade e simplicidade de procedimentos oferecidos pelas lectinas, quando associadas com um suporte de imobilização que facilita em grande escala o processo de recuperação como são as nanopartículas magnéticas, que a optimização deste tipo de técnica poderá ter um impacto significativo na futura pesquisa de biomarcadores em diferentes fluidos humanos, facilitando e simplificando os procedimentos e permitindo a captura de glicoproteínas em grande escala.

## 1.5. Objectivos

A aplicação de diferentes estratégias para a captura de glicoproteínas em fluídos humanos tem demonstrado várias limitações (complexidade de procedimentos, inespecificidade, falta de sensibilidade) principalmente quando se tratam de fluídos complexos como o soro, a urina e a saliva. Recentemente, a nanotecnologia desenvolveu nanopartículas magnéticas que, funcionalizadas com lectinas, abriram uma nova perspectiva na captura de glicoproteínas. Assim, os objectivos deste trabalho foram:

Objectivo geral:

- Desenvolvimento e optimização de uma nova plataforma para a pesquisa de biomarcadores glicoproteicos.

Objectivos específicos:

- Síntese de MNP's associadas a lectinas (ConA, WGA e MA);
- Optimização da síntese das MNP@lectinas para obter uma maior sensibilidade e especificidade na técnica;
- Optimização das MNP@lectinas sintetizadas, nomeadamente dos tempos e temperatura de incubação;
- Realização de testes comparativos com outra estratégia de imobilização que utiliza esferas funcionais (Sepharose);
- Realização de testes de captura de glicoproteínas em fluídos humanos (soro, urina e saliva) com as MNP@lectinas sintetizadas.

## **2. Material e Métodos**

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Descrição dos Reagentes

Todos os reagentes foram comprados na Sigma (Karlsruhe, Alemanha), excepto quando referido o contrário.

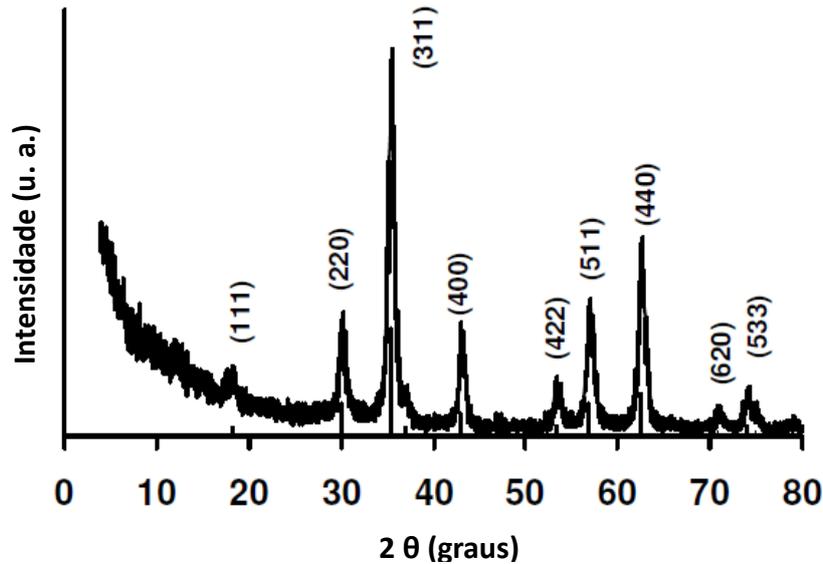
A fetuína de soro fetal de vitela e a ovalbumina de clara de ovo ( $\geq 98\%$ ) foram usados como glicoproteínas modelo para este estudo. A fetuína foi descrita pelo fabricante como contendo entre 5-8% de ácidos siálicos (p/p). Tinha, também, 3.5% de Man (39% do total de açúcares) e 4.8% de GlcNAc, numa análise de açúcares prévia realizada por Ferreira et al., 2010. A albumina comprada exibiu um conteúdo em Man correspondente a 69% do total de açúcares.

### 2.2. Síntese das MNPs

As MNPs foram sintetizadas com a colaboração da Doutora Ana Daniel-da-Silva no CICECO (Centre for Research in Ceramics and Composite Materials Associated Laboratory do Departamento de Química da Universidade de Aveiro).

O núcleo magnético das MNPs consiste em nanopartículas de óxido de ferro magnético que foram obtidos por co-precipitação de  $\text{FeCl}_2$  e  $\text{FeCl}_3$  em condições alcalinas (Bumb et al., 2008).

O difractograma obtido por difracção de raios-X do precipitado negro resultante foi observado recorrendo ao uso do difractómetro de raio-X Rigaku Geigerflex Dmax-C equipado com uma fonte de radiação monocromática  $\text{Cu K}\alpha$  e comparado com os padrões típicos de difracção observados na magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (Figura 7).

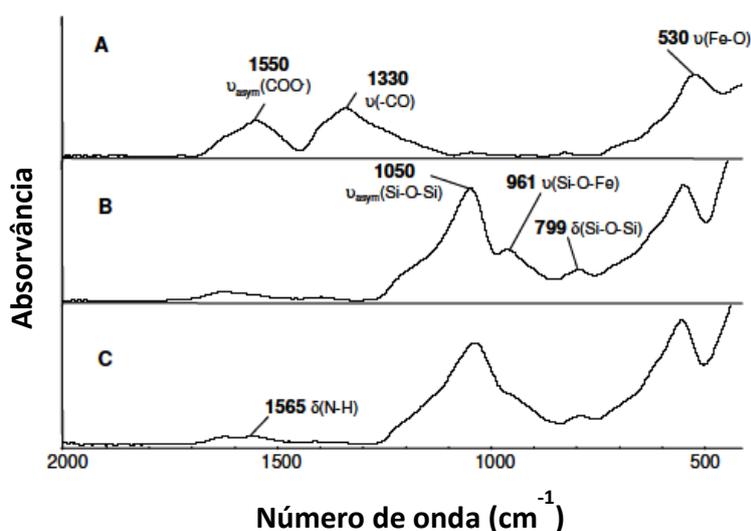


**Figura 7.** Padrão de XRD obtido para as nanopartículas de óxido de ferro. Os índices Miller indicados entre parêntesis correspondem aos picos mais intensos de reflexão da magnetite.

As nanopartículas foram, depois, revestidas com sílica amorfa para prevenir o aglutinamento das esferas e assegurar estabilidade química. Antes da encapsulação com sílica, as nanopartículas foram estabilizadas com íões citrato (Bumb et al., 2008). Uma alteração da cor das nanopartículas (de negro para castanho escuro) observou-se nesta fase e poderá indicar a formação de uma fase quimicamente mais estável, a maguemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). O revestimento de sílica das nanopartículas foi realizado recorrendo à hidrólise com TEOS em condições alcalinas, usando a trietilamina como catalisador. Este procedimento foi adaptado, com modificações, do descrito por Bumb et al., 2008. As nanopartículas (100 mg) foram suspensas em 20 mL de água destilada, seguidas de sonicação para prevenir a agregação das esferas. Foram adicionados 1 mL de TEOS (30% v/v em etanol) e 0.1 mL de trietilamina. Esta reacção foi feita num sonicador, durante 15 min à temperatura ambiente e as nanopartículas recuperadas sob a forma de pó negro e lavadas repetidas vezes com água destilada e 1-propanol. Seguidamente, a superfície das nanopartículas revestidas com sílica foi funcionalizada com grupos amina de forma a reduzir as interações inespecíficas com as proteínas de interesse (Lin et al., 2006, 2007). As esferas revestidas (30 mg) foram, depois, dispersadas em 3 mL de água destilada, seguido da adição de 100  $\mu\text{L}$  de APS. A mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 12h e o precipitado negro resultante recuperado e lavado repetidamente com água destilada.

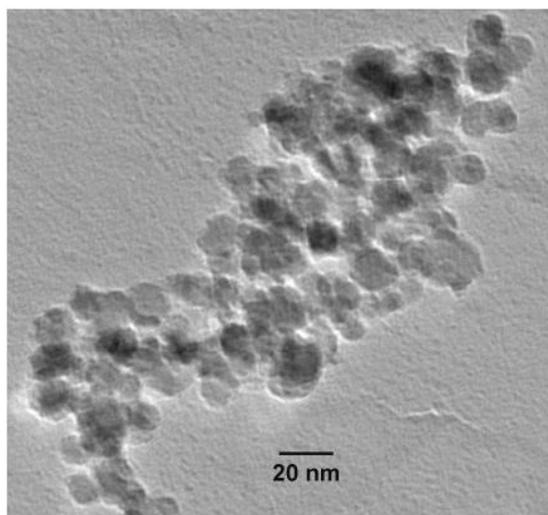
O sucesso da síntese e da modificação da superfície da matriz de MNPs foi verificado através de uma monitorização passo-a-passo com espectroscopia FT-IR (Figura 8) detectada

por um espectrómetro Mattson 7000 acoplado com uma célula horizontal de ATR com 256 scans e  $4\text{ cm}^{-1}$ . No espectro das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizado com citrato verificam-se as típicas bandas vibracionais de Fe-O nos  $530\text{ cm}^{-1}$  e de  $-\text{COO}^-$  e  $-\text{CO}$  centradas nos  $1550\text{ cm}^{-1}$  e  $1330\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente (Figura 8A). O revestimento de sílica foi comprovado através da observação de bandas de absorção com máximo nos  $961\text{ cm}^{-1}$ ,  $1050\text{ cm}^{-1}$  e  $799\text{ cm}^{-1}$ , que correspondem ao Si-O-Fe, Si-O-Si e Si-OH, respectivamente (Figura 8B). A funcionalização da superfície de aminas no revestimento das nanopartículas foi verificada através da observação de uma banda nos  $1565\text{ cm}^{-1}$  originada pela vibração de tesoura da ligação N-H na amina primária (Figura 8C).



**Figura 8.** Espectro ATR-FTIR das nanopartículas de óxido de ferro estabilizadas com citrato (A), nanopartículas magnéticas revestidas com  $\text{SiO}_2$  (B) e nanopartículas funcionalizadas com a superfície de amina (C). As bandas de infravermelho assinaladas são as mais relevantes ( $\nu$  – vibração de estiramento,  $\delta$  – vibração de tesoura).

O tamanho e forma das MNPs foram avaliados com recurso à TEM usando um microscópio electrónico de transmissão JEOL 200CX com um potencial acelerador de 300 kV. Na preparação para a TEM, a suspensão de MNPs diluídas foi levada à evaporação numa grelha de cobre revestida com filme de carbono amorfo. As observações por TEM confirmaram que as nanopartículas magnéticas estavam revestidas com as cápsulas de sílica amorfa (Figura 9). As MNPs foram observadas juntas numa forma estreita e alongada com um diâmetro médio de  $14\pm 3\text{ nm}$ , confirmando as expectativas em relação à sua dimensão.



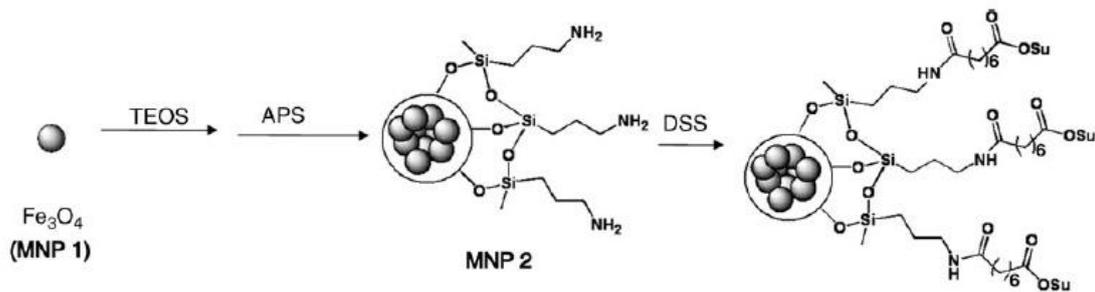
**Figura 9.** Imagem representativa das MNPs analisadas por TEM, que demonstra um tamanho médio das esferas de  $14 \pm 3$  nm. A zona nuclear mais escura corresponde às nanopartículas de óxido de ferro.

### 2.3. Conjugação das MNPs com as Lectinas

As lectinas não conjugadas ConA de *Canavalia ensiformes*, WGA de *Triticum vulgare* e de MA de *Maackia amurensis* foram comprados na Vector Laboratories (Burlingame, CA). Estas lectinas foram usadas para revestir as MNPs e originar as conjugações MNP@ConA, MNP@WGA e MNP@MA, respectivamente.

A superfície das MNPs foi primeiro activada com um ligante bifuncional de ácido subérico, o DSS como descrito por Lin et al., 2007. O DSS reage com as amins primárias (Lin et al., 2007), sendo um ponte de ligação covalente entre as MNPs aminosilanzadas e as lectinas. Adicionalmente, a cadeia de oito carbonos do DSS ajuda, também, a reduzir os efeitos estéricos das interações entre lectinas, resultado da sua proximidade com a matriz das MNPs.

A derivatização de 1 mg de MNPs foi conseguida através da dispersão das esferas de nanopartículas magnéticas em 250  $\mu$ L de DMSO seguida da adição de 10 mg de DSS. A mistura foi, depois, incubada durante uma hora para que a *N*-hidroxisuccinimida activasse as MNPs (Figura 10). As MNPs activadas foram, se seguida, lavadas três vezes com DMSO (200  $\mu$ L) e depois incubadas com 300  $\mu$ L de ConA, WGA ou MA (1mg/mL) em 20mM de Tris, 500 mM NaCl, com pH 7.45, a 4°C durante 12h.



**Figura 10.** Breve resumo ilustrativo do aspecto das MNPs depois da activação com DSS (adaptado de Lin et al, 2006).

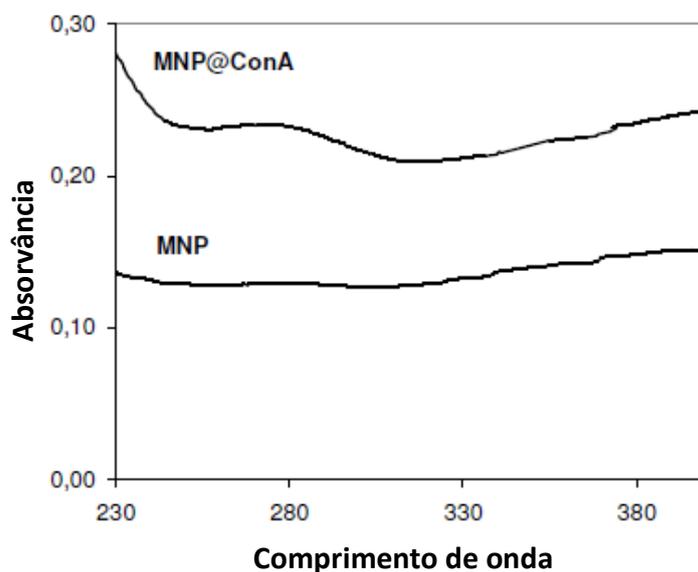
Numa tentativa de melhorar o rendimento da recuperação de glicoproteínas, foi testada a preservação dos sítios de ligação dos açúcares nas lectinas, aquando da sua ligação covalente com as MNPs.

Esta preservação foi conseguida recorrendo à incubação de ConA, WGA e MA (1mg/mL) nos seus tampões de ligação correspondentes (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM MnCl<sub>2</sub>, 5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.45 para a ConA; 20mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.45 para a WGA e a MA) contendo 200 mM de metil- $\alpha$ -D-mannopiranosida, GlcNAc e 3'-sialilactose comprados na Dextra Laboratories (Reading, UK), respectivamente. Estes açúcares são os açúcares-alvo de cada uma das respectivas lectinas, e funcionam como bloqueadores, preservando os locais de ligação dos açúcares inalterados.

Recorrendo às suas propriedades superparamagnéticas, as MNP@Lectinas foram recuperadas na forma de um pó negro por separação magnética e posteriormente lavadas com água destilada e PBS (100 mM, pH 7.4).

As MNP@Lectinas sintetizadas a partir das lectinas protegidas com açúcares foram submetidas, previamente à incubação com as amostras, a um passo adicional de regeneração, de forma a remover os carboidratos a si ligados. As MNP@ConA foram regeneradas através da lavagem com 200  $\mu$ L de Tris 100 mM, 500mM NaCl, pH 8.5 seguido de 100 mM de acetato de sódio, 1.0 M NaCl e pH 4.5. O procedimento de regeneração foi repetido três vezes e as nanopartículas foram, depois, equilibradas em tampão de ligação antes de nova análise. As MNP@WGA e MNP@MA foram regeneradas através de três lavagens com o tampão de regeneração (200  $\mu$ L de Tris 20 mM, 1 M NaCl, pH 3.0). Foram, no final, equilibradas em tampão de ligação.

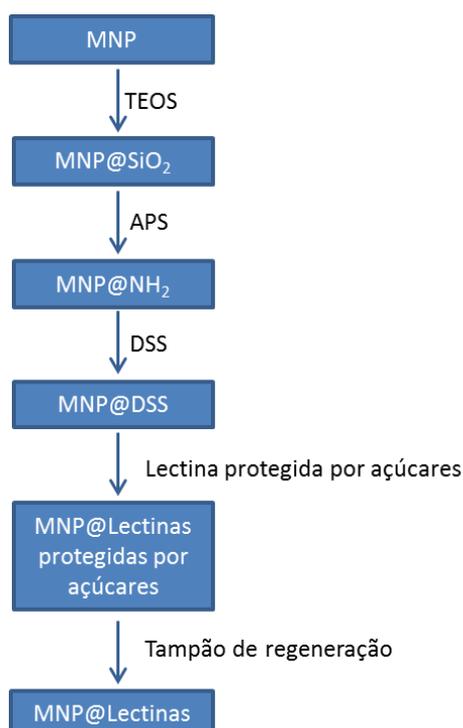
O sucesso da ancoragem da ConA, WGA e MA à superfície das MNPs foi confirmado através da análise do espectro UV recorrendo ao espectrofotómetro Jasco U-560 UV-Vis. A visualização de uma banda com um máximo aos 280 nm confirmou a ancoragem das lectinas (Figura 11).



**Figura 11.** Espectro UV das MNPs antes e depois da ancoragem com a ConA.

A quantidade de lectina ligada foi estimada indirectamente baseada no conteúdo em proteína recuperado depois da conjugação com as MNPs. O esquema 1 descreve resumidamente os passos seguidos para a síntese de MNP@Lectinas.

**Esquema 1.** Resumo da síntese de MNP@Lectinas



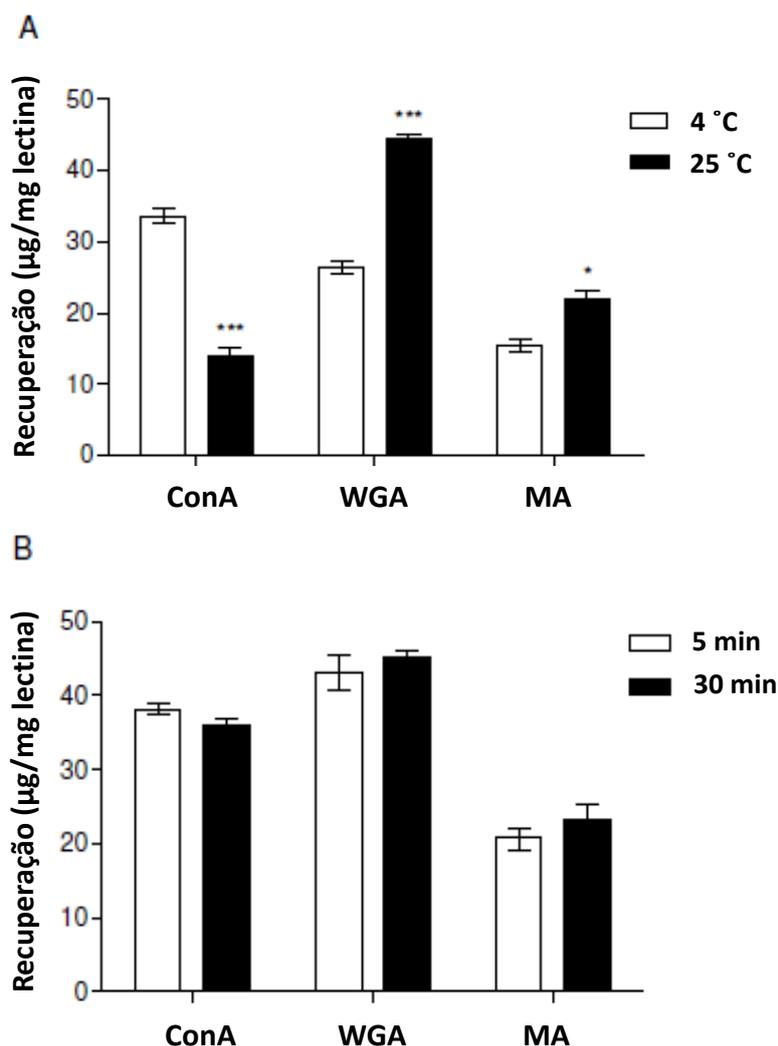
## 2.4. Optimização das condições operacionais

Por forma a otimizar a quantidade de proteína recuperada, foram conduzidos alguns testes para definir as condições óptimas de trabalho de cada lectina, nomeadamente o tempo de incubação e a temperatura.

A temperatura óptima de incubação para as MNP@lectinas foi determinada pela incubação com fetuína a 4 e a 25°C durante 30 min e a proteína recuperada foi expressa em termos de proteína recuperada por mg de lectina (Figura 12A). Estes testes comprovaram que a quantidade de glicoproteína capturada pela ConA a 4°C é duas vezes superior que a observada a 25°C. Estes dados são suportados por observações anteriores, indicativas de uma menor taxa de dissociação dos complexos ConA-glicano a baixas temperaturas (Dulaney et al., 1979). Pelo contrário, as MNP@WGA e as MNP@MA demonstraram melhores performances a 25°C. Assim, todos os testes posteriores foram conduzidos a 4°C durante a incubação com MNP@ConA e a 25°C no caso das MNP@WGA e MNP@MA.

Numa tentativa de otimizar os tempos de incubação, os mesmos foram reduzidos de 25 para 5 min (Figura 12B). A comparação entre os dois tempos de incubação para as três

lectinas não mostrou diferenças significativas, levando ao ajuste do tempo de incubação para 5 min.



**Figura 12.** Recuperação de proteína depois da incubação com MNP@ConA, MNP@WGA e MNP@MA com 200 µL de fetuína (100 µg/mL) a A) 4 °C e 25 °C e B) 5 e 30 min usando as temperaturas ótimas de incubação obtidas previamente. Os dados apresentados são médias ± desvio padrão de µg de proteína por mg de lectina (triplicados de n=3), \*p<0.05; \*\*\* p<0.001 em comparação com a concentração obtida pela condição oposta.

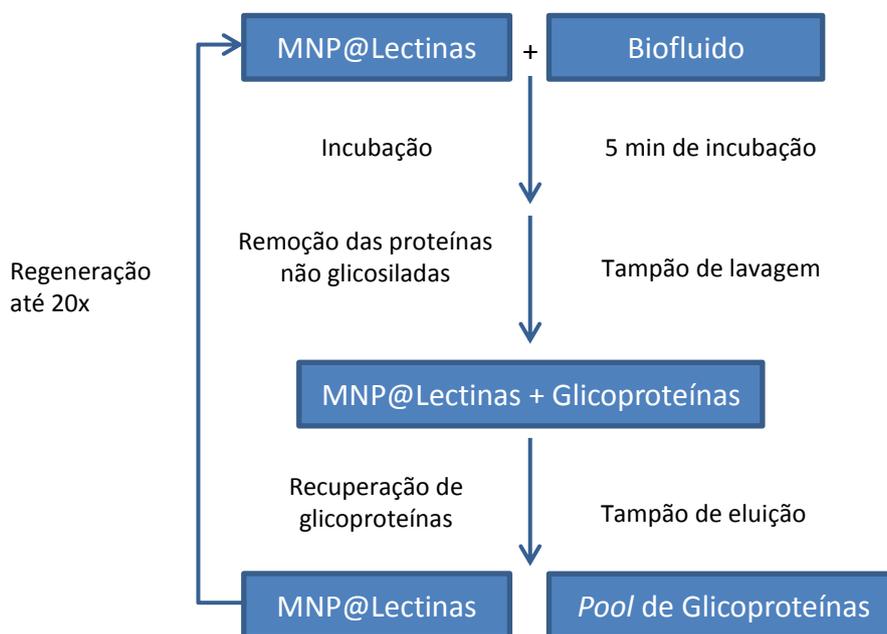
Adicionalmente, as MNP@Lectinas foram testadas em relação à sua estabilidade durante vários ciclos de incubação-regeneração, não tendo sido observada uma perda significativa da sua capacidade de ligação depois de 20 ciclos de repetição.

## 2.5. Enriquecimento Glicoproteico com as MNP@Lectinas

### 2.5.1. Enriquecimento de glicoproteínas

O protocolo de trabalho seguido para o enriquecimento glicoproteico com recurso às MNP@Lectinas está representado no esquema 2.

**Esquema 2.** Protocolo em esquema da linha de trabalho seguida para o enriquecimento de glicoproteínas com as MNP@Lectinas.



Resumidamente, os extractos proteicos foram diluídos em 200  $\mu$ L do tampão de ligação das lectinas (tabela 3) e incubados juntamente com 1 mg de MNP@Lectinas num agitador rotativo a 4 (MNP@ConA) ou a 25°C (MNP@WGA e MNP@MA) durante 5 e 30 min. As MNP@Lectinas foram, depois, separadas do sobrenadante recorrendo a um forte campo magnético, permitindo assim a fácil remoção do sobrenadante. As proteínas não capturadas pelas lectinas foram, depois, removidas com três lavagens de tampão de lavagem (tabela 3). As glicoproteínas foram, depois, recuperadas submetendo as MNP@Lectinas a três lavagens com tampão de eluição (tabela 3).

Entre cada ciclo de enriquecimento, as MNP@lectinas foram regeneradas através do uso do tampão de regeneração (tabela 3), que as permitiu reciclar para novos enriquecimentos.

**Tabela 3.** Composição dos tampões das MNP@Lectinas.

	MNP@ConA	MNP@WGA	MNP@MA
<b>Tampão de ligação</b>	20 mM de Tris, 500 mM de NaCl, 5 mM de MgCl <sub>2</sub> , 5 mM de MnCl <sub>2</sub> e 5 mM de CaCl <sub>2</sub> , pH 7.45	20 mM de Tris, 150 mM NaCl e 0,05% de Tween-20, pH 7.45	20 mM de Tris, 150 mM NaCl e 0,05% de Tween-20, pH 7.45
<b>Tampão de lavagem</b>	0,05% de Tween-20 em tampão de ligação	0,05% de Tween-20 em tampão de ligação	0,05% de Tween-20 em tampão de ligação
<b>Tampão de eluição</b>	500 mM de metil- $\alpha$ -D-mannopiranosida em tampão de lavagem	500 mM de GlcNAc em tampão de lavagem	200 mM de 3'-sialillactose em tampão de lavagem
<b>Tampão de regeneração</b>	100 mM de Tris e 500 mM de NaCl, pH 8.5 (tampão básico) seguido de 100 mM de acetato de sódio e 1.0 M de NaCl, pH 4.5 (tampão ácido)	20 mM de Tris e 1 M NaCl, pH 3.0	20 mM de Tris e 1 M NaCl, pH 3.0

### 2.5.2. Comparação da recuperação entre MNP@Lectinas e Sepharose.

Foi feita uma comparação do enriquecimento em glicoproteínas recorrendo a duas formas de captura: nanopartículas associadas a lectinas e suporte de Sepharose associado a lectinas. Para este teste foram usadas MNP@ConA (tamanho médio da esfera de 10 nm) e Sepharose@ConA (tamanho médio da esfera de 90  $\mu$ m; 10 mg/mL de meio drenado) comprados na GE Healthcare (Freiburg, Alemanha).

As MNP@ConA e a Sepharose@ConA foram, depois, incubadas com 200  $\mu$ L de fetuína (50  $\mu$ g/mL) ou 200  $\mu$ L de ovalbumina (50  $\mu$ g/mL) em tampão de ligação de ConA durante 30 min a 4°C. Os testes foram conduzidos com 1 mg de MNP@ConA (80  $\mu$ g de ConA) e 60  $\mu$ g (6  $\mu$ L; 80  $\mu$ g de ConA) e 1 mg (100  $\mu$ L; 500  $\mu$ g de ConA) de Sepharose@ConA a 4°C durante 30 min. As esferas de Sepharose@ConA foram recuperadas por centrifugação (12000g, 4°C). Todos os testes foram efectuados em triplicado.

### 2.5.3. Avaliação da afinidade das MNP@Lectinas

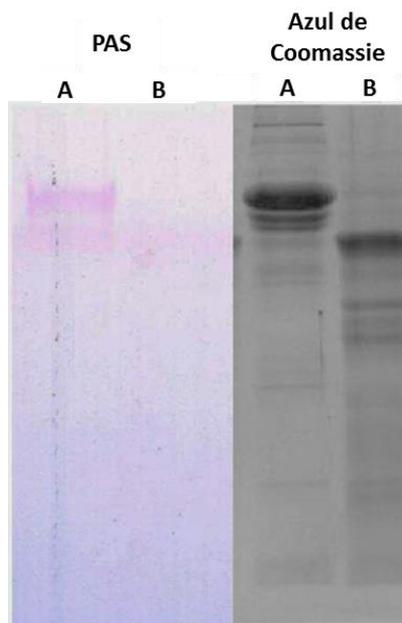
As interações não-específicas foram determinadas através da incubação das MNP@Lectinas com 200  $\mu$ L de soluções desglicosiladas de fetuína (concentrações de 3.5, 17.5,

87.5, 175.0 e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A afinidade das MNP@Lectinas para com as glicoproteínas foi comprovada com o mesmo protocolo, utilizando fetuína glicosilada. Todos os testes foram efectuados em triplicado.

## **2.6. Desglicosilação da fetuína**

A fetuína foi desglicosilada e usada para avaliar a afinidade das MNP@lectinas com os fragmentos glicosilados. A desglicosilação foi efectuada por hidrólise com TFMS tal como foi previamente descrito por Edge et al., 1981. Resumidamente, a fetuína em pó foi desglicosilada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de TFMS (10% em tolueno) previamente arrefecido num banho de etanol e gelo seco durante 20 s e incubado durante 4 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O excesso de TFMS foi, depois, removido com a adição de 150  $\mu\text{L}$  de uma mistura de piridina/metanol/água (3:1:1), seguida de uma incubação durante 15 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A solução foi depois neutralizada com 400  $\mu\text{L}$  de 0.5% de bicarbonato de amónio e as proteínas desglicosiladas recuperadas por centrifugação a 20000g durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .

A integridade da estrutura das proteínas e a eficiência da desglicosilação foram confirmadas através de um SDS-PAGE (12.5%), tal como descrito por Laemmli et al., 1970. As proteínas no gel foram coradas com Azul de Coomassie (Figura 13) enquanto os carboidratos foram corados com PAS (Figura 13).



**Figura 13.** Géis de SDS-PAGE corados com PAS e Azul de Coomassie com fetuína A) glicosilada e B) desglicosilada (depois do tratamento com TFMS).

## 2.7. Quantificação proteica

O conteúdo em proteínas foi determinado recorrendo ao uso da plataforma de quantificação Qubit (Invitrogen, Barcelona, Espanha) de acordo com as instruções do fabricante.

## 2.8. Isolamento das proteínas do Soro, Urina e Saliva

As amostras de sangue, urina e saliva foram obtidas de seres humanos saudáveis do sexo masculino, que deram o seu consentimento informado para este estudo. Para eliminar as contribuições interindividuais, a análise foi feita recorrendo à junção das proteínas dos três indivíduos (*pool* proteica).

Imediatamente após a colheita, as amostras de sangue foram deixadas a coagular a temperatura ambiente durante 1 h, sendo o soro recolhido por centrifugação a 5000g durante 40 min a 4 °C. A segunda micção completa de urina da manhã foi recolhida para frascos estéreis e centrifugada a 5000g durante 40 min a 4 °C. A saliva humana foi recolhida sem recurso a qualquer estimulação (cerca de 1 mL), em jejum, de acordo com o protocolo

estandardizado descrito previamente por Vitorino et al., 2004, sendo depois centrifugada a 12000g, durante 20 min a 4 °C, de forma a remover material particulado em suspensão.

As proteínas de soro, saliva e urina foram isoladas por filtração com um filtro MWCO de 10 kDa (Millipore, MA). As proteínas retidas foram, depois, ressuspensas em 200 µL de tampão de ligação da lectina, numa concentração de 250 µg/mL (50 µg de proteína total) e as glicoproteínas isoladas através da incubação com as MNP@Lectinas.

## **2.9. Redução proteica, alquilação e digestão triptica**

As glicoproteínas de soro, saliva e urina recuperadas depois da incubação com as MNP@Lectinas foram diluídas em 0.1 M de tampão de bicarbonato de amónio com 6 M de cloridrato de guanidina (pH 8.0). As amostras desnaturadas foram, depois, reduzidas com a incubação em 5 mM de DTT a 75 °C durante 1 h e depois alquiladas com 20 mM de iodoacetamida à temperatura ambiente, no escuro, durante 2 h. Seguidamente foi efectuada uma filtração com um filtro MWCO de 10 kDa (Millipore, MA). As amostras foram, então, ressuspensas com 0.1 M de tampão de bicarbonato de amónio (pH 8.0). A tripsina (Promega, Madison, WI) foi adicionada num rácio 1:100 (p/p) e as amostras incubadas a 37 °C para digestão *overnight*.

## **2.10. Identificação proteica e *data mining***

A identificação proteica foi realizada tal como o descrito previamente por Vitorino et al., 2010. As proteínas digeridas pela tripsina foram separadas por nano-HPLC. Para este processo foi usada uma coluna C18 Pepmap100 (Dionex) (150 mm x 75 µm, tamanho da esfera de 3 µm) com um fluxo de 300 nL/min num cromatógrafo Ultimate 3000 (Dionex/ LC Packings, Sunnyvale, CA). O fluxo foi mantido durante 35 min, com um gradiente linear de 5% a 50% de tampão B (85% ACN, 5% 2-propanol e 0.04% TFA). Os péptidos eluídos na coluna foram misturados com um fluxo contínuo de solução matriz  $\alpha$ -CHCA (270 nL/ min, 2 mg/mL em 70% de ACN/ 0.1% TFA e um padrão interno Glu-Fib a 15 fmol) com um Probot (Dionex/ LC Packings, Sunnyvale, CA) directamente para uma placa de MALDI (Opti-TOF, Applied Biosystems, Foster City, CA) em intervalos de 20 s para cada *spot* (100 nL/fracção). Em cada corrida foram recolhidas 156 fracções. A análise MS MALDI-TOF/TOF foi realizada num analisador 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foi usado um limiar S/N

de 50 na análise dos picos MS/MS e uma voltagem de fragmentação de 2 kV ao longo da obtenção do espectro. Os espectros MS e MS/MS obtidos foram, depois, processados e analisados pela Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems) que usa um software interno MASCOT (v. 2.1.0.4, Matrix Science, UK), usando impressões digitais baseadas na massa peptídica e dados MS/MS para a identificação proteica. A identificação proteica obtida foi cruzada com base de dados proteica Swiss-Prot (Março de 2009, 428 650 entradas) para *Homo sapiens*.

A tolerância do MS foi ajustada para 30 ppm para iões percursores e 0.3 Da para iões fragmentados, assim como tolerância para duas clivagens falhadas. A identificação proteica foi considerada fiável com um *score* >70 no MASCOT (o *score* do MASCOT é calculado por  $-10 \times \log P$ , em que  $P$  é a probabilidade de que a correspondência observada seja devido a um evento aleatório). Este é o *score* mais baixo indicado pelo programa como significativo ( $p < 0.05$ ).

A N-glicosilação em proteínas humanas foi prevista recorrendo ao uso do servidor NetNglyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>), uma rede neuronal artificial que examina as sequências Asn-Xaa-Ser/Thr (em que Xaa não é Pro). A O-glicosilação foi prevista com a ferramenta NetOglyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>) que prevê, recorrendo a uma rede neuronal, locais de O-glicosilação pela GalNAc, frequentemente encontrados em mucinas, em proteínas de mamíferos (Julenius et al., 2005).

## 2.11. Análise estatística de dados

Todos os dados obtidos foram exportados para o GraphPad Prism (v5.0) e a distribuição normal foi comprovada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Dado que todas as distribuições se demonstraram normais, as diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas pelo teste t de Student para amostras independentes. Os níveis de significância estatística foram colocados para  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) e  $p < 0.001$  (\*\*\*) .

## **3. Resultados e Discussão**

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Análise das MNP@Lectinas

A glicosilação produz um repertório abundante, diverso e altamente regulado de glicoproteínas que serão peça-chave em diversos processos biológicos. Para além disto, muitos dos biomarcadores clínicos são glicoproteínas presentes em diversos fluidos, tais como o soro, a urina e a saliva, em quantidades muito reduzidas. É, assim, essencial desenvolver estratégias eficientes para a captura e isolamento de glicoproteínas em meios tão diversos e tão complexos.

Presentemente, as estratégias mais utilizadas para a captura e isolamento de glicoproteínas baseiam-se em lectinas imobilizadas em diferentes suportes: agarose (Zhao et al., 2007; Patwa et al., 2006), Sepharose (Rho et al., 2009), sílica (Madera et al., 2005), colunas monolíticas (Feng et al., 2009), *Microarray* (Hsu et al., 2009; Gupta et al., 2010) e nanopartículas magnéticas funcionalizadas (Sparbier et al., 2007; Loo et al., 2010). Estes diferentes tipos de suportes foram usados em diversos estudos clínicos para recuperar glicoproteínas de soro (Zhao et al., 2007; Patwa et al., 2006; Madera et al., 2008; Kullolli et al., 2010), urina (Feng et al., 2009; Wang et al., 2006) e, até, em linhas celulares (Tang et al., 2010; He et al., 2011). No entanto, e apesar dos melhoramentos na sensibilidade das ferramentas proteómicas e da diversidade e funcionalidade de algumas das estratégias de imobilização propostas, apenas algumas dezenas de glicoproteínas foram identificadas. Assim, o desenvolvimento e melhoramento destas estratégias de imobilização permanece um assunto desafiante e com enorme interesse para a glicobiologia.

Foram descritos, nos últimos anos, diversos relatórios a comprovar as superiores capacidades de isolamento e captura das nanopartículas magnéticas em relação a outros suportes de imobilização (Aguilar-Arteaga et al., 2010; Frimpong et al., 2010; Kullolli et al., 2010). Contudo, e apesar das evidências anteriores, os suportes baseados em nanopartículas para a captura de glicanos são ainda escassos e o seu desenvolvimento é, ainda, prematuro.

Tendo em conta os factos acima referenciados, este trabalho foi pensado para desenvolver a síntese, caracterização e optimização das MNP@Lectinas direccionadas ao isolamento de glicoproteínas em fluidos humanos, de forma a poderem ser usadas em estudos glicómicos e glicoproteómicos, em particular na pesquisa de biomarcadores.

Tendo por base a tecnologia previamente descrita por Lin et al. (2006, 2007), a qual descreve as bases para uma eficiente imobilização de proteínas biologicamente activas em nanosportes, as MNPs foram revestidas com as lectinas ConA, WGA e MA, as quais têm um reconhecido potencial na investigação de biomarcadores. A ConA é reconhecida pela sua capacidade de ligação em diversas glicoproteínas. É uma glicoproteína de largo espectro, tendo afinidade com resíduos de mannosil e glucosil em glicanos contendo grupos hidroxilo livres nas posições C3, C4 e C6 e foi fortemente usada para recuperação de N-glicoproteínas em fluidos humanos (Alvarez-Manilla et al., 2010). Por outro lado, a WGA e a MA são lectinas mais específicas. A WGA liga-se aos resíduos GlcNAc (Natsuka et al., 2005), enquanto a MA tem afinidade para glicanos exibindo ácidos siálicos ligados em  $\alpha$ -2,3 (Azuma et al., 2000), sendo que ambas as lectinas foram usadas para isolar O- e N-glicoproteínas. Para além disto, em estudos prévios, a interacção alterada das glicoproteínas com as lectinas WGA e MA foi correlacionada com diversas patologias, como doença de Alzheimer (Butterfield et al., 2011), diabetes (Vazquez-Moreno et al., 2001) e cancro (Haab et al., 2010).

Utilizando os conhecimentos e modificações tecnológicos previamente descritas, foi possível sintetizar nanopartículas revestidas com  $80 \pm 15$ ,  $120 \pm 7$  e  $92 \pm 12$   $\mu\text{g}$  de lectina por mg de MNP (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resumo das características das MNP@ConA, MNP@WGA e MNP@MA.

	MNP@ConA	MNP@WGA	MNP@MA
<b>Diâmetro médio (nm)</b>	14 $\pm$ 3	14 $\pm$ 3	14 $\pm$ 3
<b>Lectina ligada (<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math> of MNP)</b>	80 $\pm$ 15	120 $\pm$ 7	92 $\pm$ 12
<b>Capacidade de ligação (<math>\mu\text{g}</math> de fetuína/mg de lectina)</b>	40 $\pm$ 3	46 $\pm$ 4	30 $\pm$ 2
<b>Capacidade de ligação (ng de açúcar/mg de lectina)</b>	1,4	2,2	1,5 $\pm$ 2,4
<b>Temperatura de funcionamento (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	4	25	25
<b>Tempo de incubação (min)</b>	5	5	5

Estes valores foram calculados indirectamente a partir da quantidade de proteína recuperada pelas MNPs. Com base nas observações feitas por TEM (Figura 9, Material e Métodos), foi verificado que as MNP@Lectinas sintetizadas eram uniformes, esféricas,

monodispersas (ou seja, com tamanhos semelhantes), não porosas e superparamagnéticas. O diâmetro médio das esferas obtidas foi de  $14 \pm 3$  nm. Este tamanho tão reduzido permite uma alta mobilidade em solução, que permite que a superfície de captura das mesmas interaja contínua e livremente com todo o volume de amostra. Assim, este é um sistema ideal para bioseparações. Tirando partido das suas capacidades superparamagnéticas, estas nanopartículas podem ser puxadas contra as paredes do tubo onde se está a realizar a captura com um forte campo magnético permitindo, facilmente, a total remoção do sobrenadante. As glicoproteínas poderão, depois, ser recuperadas das MNP@Lectinas através de diversos passos de lavagem com uma solução dos açúcares-alvo de cada uma das lectinas.

Dito isto, é possível afirmar que este método de enriquecimento glicoproteico baseado em MNP@Lectinas é de alto interesse para a pesquisa de biomarcadores, em particular na busca de quantidades mínimas de proteínas glicosiladas em fluidos humanos (onde a *pool* proteica é enorme e muito variada). Para atingir estes objectivos, os esforços concentraram-se na optimização da síntese das MNP@Lectinas, na optimização das condições de enriquecimento e na caracterização da sua capacidade de captura. A eficiência da captura das MNP@Lectinas foi, posteriormente, testada nos três fluidos humanos mais recorrentemente estudados: soro, saliva e urina.

De forma a optimizar a captura de glicoproteínas, os testes foram conduzidos para definir as temperaturas (4 ou 25 °C) e o período de incubação (5 e 30 min). Os ensaios foram efectuados usando a fetuína, uma sialoproteína (5-8% de ácidos siálicos, de acordo com o fabricante), descritos como O- e N-glicosilados e contendo 3.5% e Man e 4.8% de GlcNAc sendo, assim, expectável que se ligue a todas as lectinas. Os ensaios de temperatura demonstraram que a temperatura ideal de incubação para a ConA foi de 4 °C, enquanto a WGA e a MA demonstraram melhores resultados a 25 °C (Tabela 4; Figura 12, Material e Métodos). Quando o tempo de incubação foi baixado de 30 para 5 min, não foram encontradas diferenças significativas no rendimento do enriquecimento glicoproteico em nenhuma das três lectinas. Em resultado destas observações o tempo de incubação para os restantes ensaios foi fixado em 5 min (Figura 12, Material e Métodos).

Outro dos testes efectuado para as MNP@Lectinas foi o teste à sua capacidade de regeneração. A capacidade de regeneração é a capacidade das glicoproteínas sofrerem consecutivos processos de incubação-regeneração sem que a sua estabilidade e capacidade de enriquecimento seja alterada. Observou-se que, depois de 20 ciclos de regeneração, a capacidade de captura e estabilidade das lectinas se manteve inalterada.

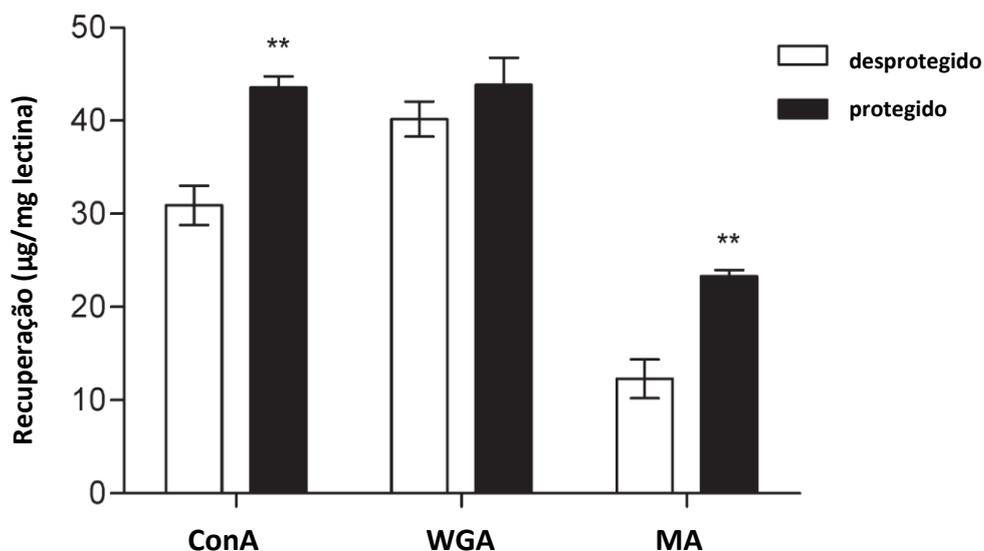
### 3.2. Optimizaç o da s ntese de MNP@Lectinas

Um dos passos mais cr ticos da s ntese de MNP@Lectinas   a conjugac o da lectina com as MNPs modificadas com as aminos (depois da aplicac o do APS). Os processos que correntemente s o mais utilizados recorrem ao uso do DSS como ligante, de forma a fazer a ponte entre os grupos amina prim rios e as lectinas (Lin et al., 2006). Contudo, e devido   inespecificidade desta ligac o, poder-se-  perder uma parte significativa da actividade da lectina e da sua funcionalidade.

De forma a preservar a integridade conformacional dos locais de ligac o das lectinas, e assim reduzir as perdas de actividade das mesmas, as lectinas foram protegidas com os seus a uc ares-alvo antes da conjugac o com as MNPs. Assim, foram utilizados os a uc ares Man no caso da ConA, GlcNAc para a WGA e 3'-sialilactose para a MA. Para testar esta hip tese, as MNP@Lectinas (com e sem o local de ligac o dos a uc ares protegido aquando da incubac o com as MNPs) foram regeneradas e, depois, incubadas com a fetu na.

Os resultados deste teste est o apresentados na Figura 14 e demonstram que a protec o dos locais de ligac o foi respons vel por um aumento na funcionalidade da lectina e da sua capacidade de captura. A sua capacidade de captura foi aumentada de 30 para 42  $\mu\text{g}$  de prote na por mg de lectina no caso das MNP@ConA (40% de aumento) e de 11 para 21  $\mu\text{g}/\text{mg}$  nas MNP@WGA (90% de aumento). No caso das MNP@MA, e apesar do aumento n o ser significativo, foi demonstrada um ligeiro aumento da sua capacidade de captura (de 40 para 42  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), sugerindo que a protec o dos locais de ligac o poder , tamb m, ter um efeito positivo para esta lectina.

Assim   poss vel afirmar que estes resultados demonstram que a protec o com a uc ares dos locais activos das lectinas contribui para uma correcta orienta o das mesmas aquando da conjugac o com as MNPs, provavelmente porque possibilitam a manuten o da integridade conformacional dos seus locais de ligac o aos a uc ares. Tendo em conta estes resultados,   poss vel assumir que esta estrat gia de acoplamento das lectinas  s MNPs   uma mais-valia e todos os ensaios daqui foram conduzidos com MNP@Lectinas conjugadas recorrendo a esta t cnica.



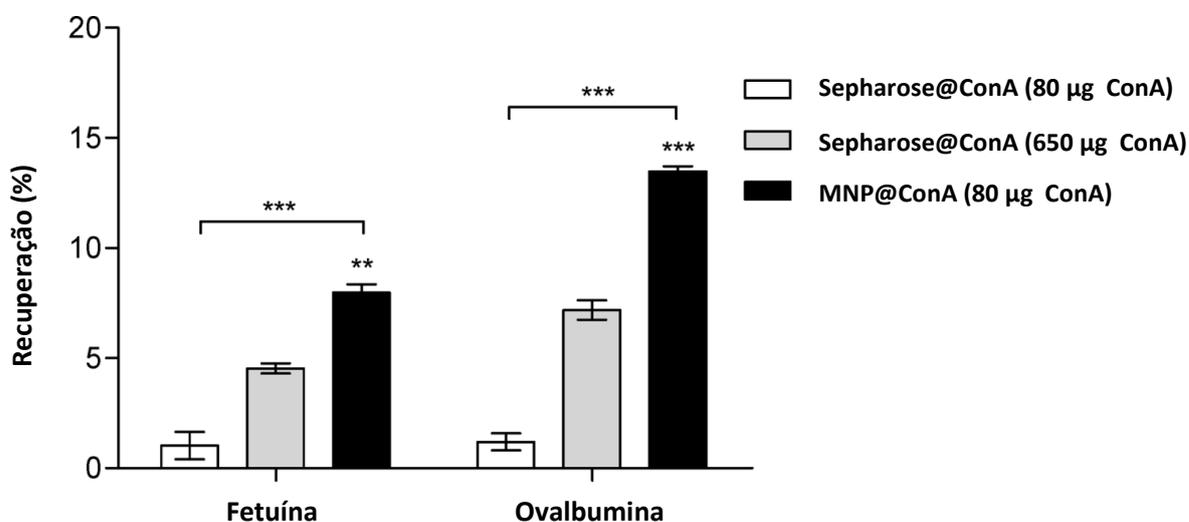
**Figura 14.** Fetuína recuperada pelas MNP@Lectinas sintetizadas: comparação entre a recuperação por lectinas com os açúcares a proteger o local de ligação aquando da síntese e sem protecção. Os dados apresentados são médias (com o desvio padrão associado) de µg de fetuína recuperada por mg de MNP@Lectina (triplicados de n=3), \*\* p<0.01.

### 3.3. MNP@Lectinas versus Suportes de Sepharose

A eficiência da imobilização de glicoproteínas em MNP@Lectinas foi comparada com um outro suporte normalmente utilizado para captura de glicoproteínas, a Sepharose@Lectinas. Esta avaliação foi efectuada recorrendo à lectina ConA, comparando, assim, o rendimento entre a captura de MNP@ConA e Sepharose@ConA com a mesma quantidade de lectina associada. Além da fetuína, também a ovalbumina foi utilizada para este teste. A ovalbumina é uma N-glicoproteína, com afinidade para com a ConA (Johnson et al., 1986; Ohyama et al., 1985).

Depois da incubação com 10 µg de fetuína e ovalbumina, é possível verificar (Figura 15) que a MNP@ConA consegue recuperar cerca de 9% da fetuína colocada e cerca de 14% de ovalbumina. Em contraste com estes resultados, a Sepharose@ConA apenas recuperou cerca de 2% de fetuína e 3% de ovalbumina. A diferença de afinidades que a ConA tem para estas duas proteínas é explicada pela diferença do conteúdo de Man em cada uma delas (66% do total de açúcares na ovalbumina e 39% do total de açúcares na fetuína). A baixa taxa de recuperação observada para ambas as proteínas nos dois métodos de enriquecimento pode ser explicada pelo excesso na quantidade de proteína usada em relação à capacidade de ligação da lectina. Mesmo tendo em conta este factor, pode-se observar que a lectina

imobilizada em nanopartículas consegue recuperar cerca de 5 vezes mais proteína que a mesma quantidade de lectina imobilizada na Sepharose.



**Figura 15.** Percentagem de glicoproteína recuperada pelas MNP@ConA em comparação com a Sepharose@ConA. Os dados estão representados em média  $\pm$  desvio padrão (triplicados de  $n=3$ ) depois da incubação com 10  $\mu$ g de fetúina ou ovalbumina. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  em comparação com a concentração anterior.

Este tipo de teste foi também realizado recorrendo à Sepharose com um conteúdo 5 vezes superior em ConA. Neste caso, as taxas de recuperação da Sepharose@ConA foram de 5% para a fetúina e 6% para a ovalbumina, ainda inferiores às conseguidas com as MNP@ConA com uma concentração em ConA muito mais baixa.

Com estes ensaios foi possível verificar que as nanopartículas magnéticas têm uma capacidade de recuperação de proteínas superior à dos suportes convencionais (neste caso da Sepharose) quando se trata de recuperar quantidades muito baixas de glicoproteínas em solução. Estas observações vão de encontro a descrições prévias que indicam a maior eficiência das MNPs em bioseparações (Aguilar-Arteaga et al., 2010; Frimpong et al., 2010; Kullolli et al., 2010). Em particular, a forma globular e a grande área de ligação promovem interações tridimensionais e inúmeros locais onde podem ocorrer as ligações com as glicoproteínas, resultando numa taxa de recuperação proteica superior quando comparada com outros suportes de enriquecimento (Lin et al., 2006).

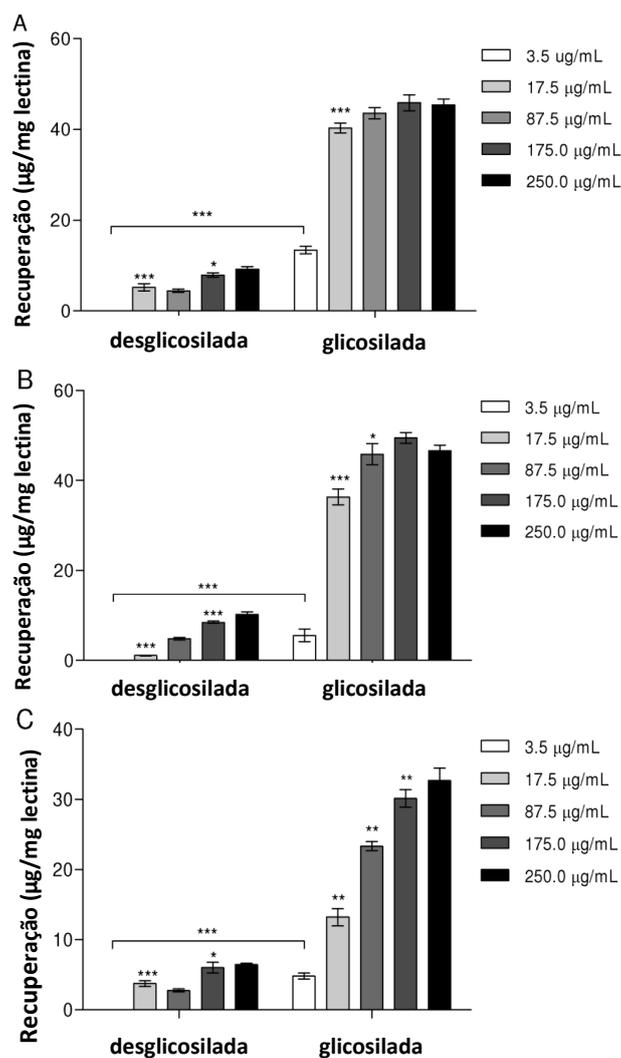
No futuro deverão também ser realizados ensaios comparativos de controlo com outras estratégias de imobilização, para uma melhor comparação da sensibilidade e especificidade das nanopartículas sintetizadas. Uma das estratégias de imobilização que pode

ser utilizada como comparativo são as micro-beads, que estão disponíveis comercialmente, pois são as mais semelhantes às sintetizadas neste trabalho.

### **3.4. Afinidade das MNP@Lectinas com as Glicoproteínas**

A afinidade das MNP@Lectinas para com as glicoproteínas foi avaliada recorrendo à incubação de fetuína (3.5, 17.5, 87.5, 175 e 250 µg/mL). A fetuína, nas mesmas concentrações foi, também, des-O- e des-N-glicosilada pelo uso do TFMS (como descrito no material e métodos) de forma a avaliar as interações inespecíficas das MNP@Lectinas com as proteínas não glicosiladas. A eficiência da desglicosilação foi confirmada por SDS-PAGE depois da coloração com PAS para os glicanos e Azul de Coomassie para as proteínas (Figura 11, Material e Métodos).

Os resultados apresentados na Figura 16 revelam quantidades residuais de proteínas (<10 µg/mg de lectina; <1 µg de proteína) foram recuperados na incubação com fetuína não glicosilada. Este dado foi observada nas três lectinas estudadas para concentrações superiores a 3.5 µg/mL, e tornaram-se mais pronunciadas com o aumento da quantidade de fetuína. Assim é possível concluir que poder-se-á esperar maiores interações inespecíficas quanto maior for a quantidade de proteína utilizada.



**Figura 16.** Proteína recuperada depois da incubação com diferentes concentrações de fetuína glicosilada e desglicosilada com A) MNP@ConA, B) MNP@WGA e C) MNP@MA. Os dados apresentados são médias  $\pm$  desvio padrão (triplicados de n=3). \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 em comparação com a concentração anterior.

Na presença da fetuína glicosilada, todas as lectinas demonstraram maior afinidade em relação aos resultados obtidos com fetuína desglicosilada. Em particular, para uma concentração de 3.5 µg/mL de fetuína, as lectinas estudadas apresentavam recuperações entre 60 a 100% superiores quando contrastadas com a mesma concentração de fetuína desglicosilada. Assim podemos afirmar que a afinidade das MNP@Lectinas para com os domínios glicosilados ficou demonstrada.

O gráfico da Figura 16 e a Tabela 4 demonstram, também, que as MNP@ConA atingem a sua capacidade máxima de ligação para uma concentração de fetuína de 17.5 µg/mL (que

corresponde a 3.2 µg de fetuína capturada). Isto corresponde a uma capacidade de ligação de 40 µg de fetuína/mg de lectina e a 1.4 µg de Man/mg de lectina (0.1 µg de Man no total).

A capacidade máxima de imobilização das MNP@WGA foi de 45 µg de fetuína/mg de lectina (5.4 µg de fetuína), imobilização atingida para uma concentração de 87.5 µg/mL. Estes valores correspondem a uma concentração de 2.2 µg/mg de lectina de GlcNAc (0.3 µg de GlcNAc capturada).

No caso das MNP@MA, a recuperação máxima atingida foi na ordem dos 30 µg de fetuína /mg de lectina (2.7 µg de fetuína), observada para uma concentração de fetuína de 175.0 µg/mL, que corresponde a uma recuperação de ácidos siálicos de 1.5-2.4 µg/mg de lectina (0.1-0.2 µg de ácidos siálicos).

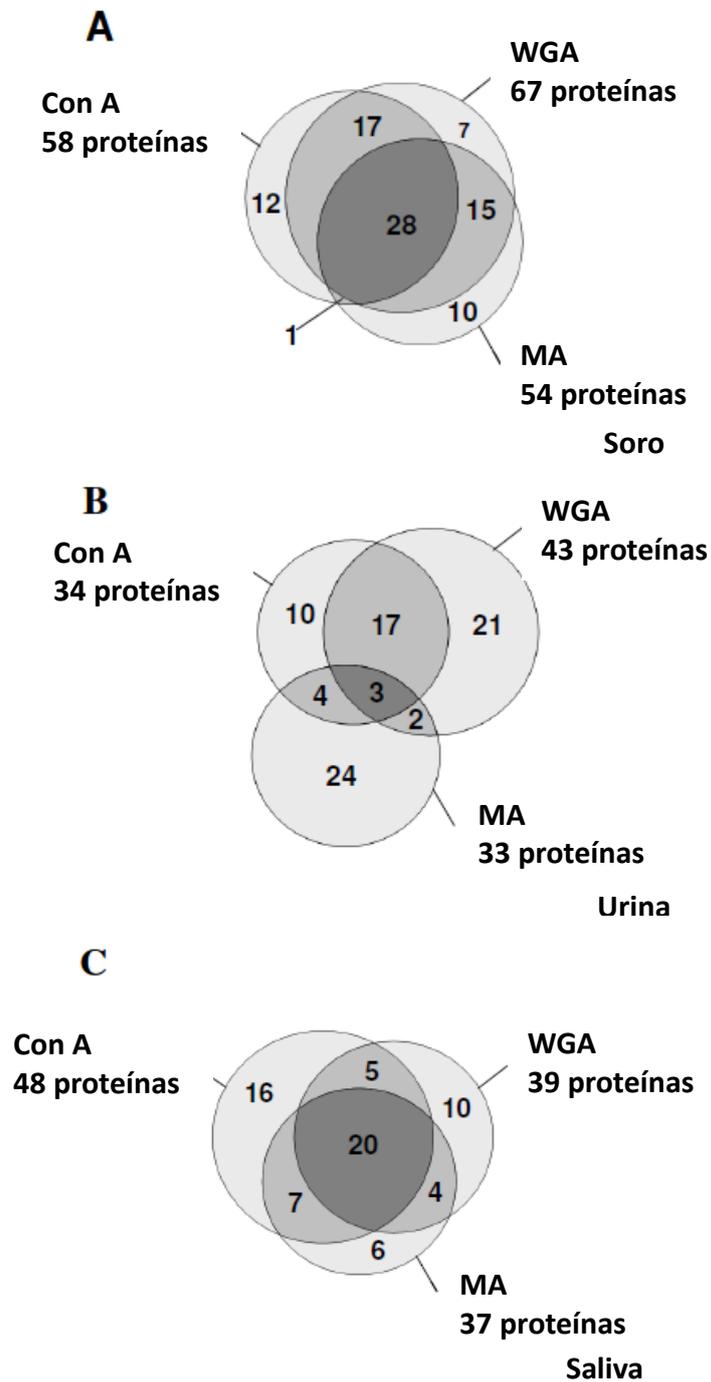
Em resumo, estes ensaios demonstraram que o método de síntese para a obtenção das MNP@lectinas é altamente versátil, dado que permitiu a imobilização de diferentes lectinas de um modo funcional. É possível, com estes dados, afirmar que a síntese teve resultados muito satisfatórios. Utilizando a fetuína como glicoproteína de referência permitiu, também, estabelecer limites máximos de recuperação para estas três lectinas.

### **3.5. Recuperação selectiva de glicoproteínas em soro, urina e saliva**

O potencial deste método analítico foi demonstrado através da recuperação selectiva de glicoproteínas em três fluidos humanos distintos: soro, saliva e urina. Estes três fluidos foram escolhidos devido às suas diferentes composições, perfil proteico e a grande utilização clínica destes para o estudo de novos biomarcadores de interesse. As glicoproteínas foram isoladas de extractos com concentrações de proteína de 250 µg/mL (50 µg de proteína) sendo, assim, uma concentração acima da capacidade de ligação máxima determinada para as três lectinas (Tabela 4). As proteínas foram depois de isoladas com as lectinas, foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina (tal como descrito no Material e Métodos) antes da sua análise *tandem-shotgun* por nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF.

Esta metodologia de análise permitiu a identificação de um total de 180 proteínas, nos três biofluidos (Anexo 1 e Figura 17): 90 proteínas no soro (Anexo 1 e Figura 17A), das quais 58 foram capturadas com a ConA, 67 com a WGA e 54 com a MA; 81 proteínas na urina (Figura 17B), das quais 34 foram capturadas com a ConA, 43 com a WGA e 33 com a MA; e 68

proteínas na saliva (Figura 17C), das quais 48 foram capturadas com a ConA, 39 com a WGA e 37 com a MA.



**Figura 17.** Representação em diagrama de Venn do número de proteínas comuns e únicas recuperadas por cada MNP@Lectinas em A) soro, B) urina e C) saliva.

A distribuição das proteínas capturadas e identificadas pelas três lectinas em cada um dos biofluidos utilizados foi representada num diagrama de Venn (Figura 17). Tendo em conta

a informação obtida através da Uniprot e com a predição dos locais de glicosilação recorrendo ao uso das ferramentas bioinformáticas NetNGlyc 1.0 e do NetNGlyc 3.1 (Anexo 1) foi verificado que cerca de 90% das proteínas identificadas estavam, previsivelmente, glicosiladas. Das 180 proteínas identificadas, 71% (124 proteínas) foram previstas como O-glicosiladas pelo NetOGlyc 3.1. Contudo 30% destas não apresentavam o péptido sinal esperado necessário para a glicosilação. No entanto, de acordo com a Uniprot, apenas 23% das proteínas previsivelmente O-glicosiladas apresentavam a glicosilação. Outro factor que merece destaque foi que, das proteínas encontradas glicosiladas, duas não apresentavam o péptido sinal esperado necessário para a glicosilação. Aproximadamente 70% das proteínas identificadas foram, também, previstas como estando N-glicosiladas pelo NetNGlyc 1.0. Contudo, neste caso o número de proteínas que não apresentavam o péptido sinal esperado necessário para a glicosilação era consideravelmente maior (47%). Ainda assim, mais de 95% das proteínas identificadas foram descritas como apresentando N-glicanos na Uniprot. Estes resultados sugerem que o péptido sinal necessário à glicosilação pode estar ausente das proteínas maturadas e, assim, não pode ser um critério de exclusão para a presença da glicosilação. Para além disto, cinco proteínas foram indicadas pela Uniprot como estando glicadas, que pode ter sido um factor para que estas se conjugassem com as lectinas e fossem isoladas. De destacar, também, a detecção de albumina glicada. A albumina é uma das proteínas mais abundantes nos fluidos humanos, daí advém a dificuldade do seu isolamento. A glicação da albumina, podendo ser algo que ocorre naturalmente (Day et al., 1979), poderá, caso os níveis de albumina glicadas sejam muito elevados, servir como biomarcador para *Diabetes mellitus* (Roohk et al., 2008).

Entre os 10% de proteínas marcadas como não-glicosiladas, cerca de 50% correspondem a proteínas de baixo peso molecular, sugerindo que as MNP@Lectinas podem ser mais susceptíveis a interacções não-específicas com péptidos e pequenas proteínas. A existência de interacções não-específicas entre proteínas também poderá ter contribuído para este fenómeno. A albumina, por exemplo, pode estar associada com muitas das proteínas identificadas, pois uma das suas funções é o transporte de proteínas. As ligações não específicas foram observadas, na sua maioria, na saliva (16%, enquanto na urina foram de 6% e no soro de 3%). Esta observação deveu-se, fundamentalmente, às muitas proteínas de baixo peso molecular, assim como péptidos, com um tamanho entre os 7 e os 20 kDa (cistatinas, estaterinas e SMR3B). O comportamento diferencial da saliva reflecte as subtilidades particulares deste fluido, como é o caso da abundância em mucinas (MUC5B e MUC7, que se ligam às lectinas). Estes arranjos macromoleculares podem, pela sua dimensão, capturar pequenas

proteínas e péptidos no seu interior (como as estaterinas) num efeito de *sandwich* (Iontcheva et al., 1997; Soares et al., 2004). Para além disso, a saliva apresenta uma grande variedade de pequenos péptidos como resultado da enorme actividade proteolítica existente na cavidade oral (Vitorino et al., 2009), que são propensos à glicosilação, tal como foi recentemente demonstrado para proteínas ricas em prolina (Vitorino et al., 2010).

No geral, a pequena percentagem de ligações inespecíficas apresentada pelas MNP@Lectinas deve ser destacada. Os resultados superiores das MNP@Lectinas são ainda mais pronunciados quando comparados com outros estudos glicoproteómicos feitos em fluidos humanos utilizando estratégias de imobilização convencionais. Em particular, a conjugação de agarose@ConA obteve mais de 30% de capturas não-específicas em urina (Wang et al., 2006), o que contrasta com os 6% obtidos pelas MNP@ConA. Ligações não-específicas elevadas foram, também, obtidas por Sparbier et al. (2007) com micropartículas magnéticas da Bruker Daltonik GmbH em soro. As glicoesferas@ConA obtiveram 23% (contra 3% das MNP@ConA) de ligações não-específicas, as glicoesferas@WGA 23% também (contra 6% das MNP@WGA). A possibilidade de redução das ligações não-específicas pelas MNP@Lectinas é de importância vital para o estudo de glicoproteínas, pois permite o aumento de locais de ligação para os ligandos de interesse e evita a perda das proteínas de interesse.

A maioria dos estudos em glicoproteínas usando enriquecimento com lectinas em fluidos humanos apoiam-se na ConA e, fundamentalmente, em fluidos como o soro e, em menos quantidade, a urina mas não na saliva. De facto, transportar esta estratégia para a saliva foi bastante complexo, devido às dificuldades em otimizar as condições operacionais. Estas dificuldades deveram-se, sobretudo, à grande concentração de mucinas presentes na saliva. Ainda assim, nos resultados obtidos em estudos que as metodologias são comparáveis (em soro e urina), esta metodologia apresentou uma recuperação superior no número de proteínas. Por exemplo, as MNP@ConA recuperaram mais 30 proteínas que a agarose@ConA quando aplicadas ao soro humano (Madera et al., 2008). Entre estas estão incluídas a  $\beta$ -2-glicoproteína 1 e o angiotensinogénio, duas glicoproteínas presentes no soro em concentrações na ordem dos  $0.00001 \text{ gL}^{-1}$  (Sparbier et al., 2007). Esta observação demonstra a capacidade das MNP@Lectinas de recuperar glicoproteínas quando a concentração das mesmas é muito baixa. Também no soro, Sparbier et al. (2007) reportaram um número semelhante de proteínas recuperadas pelas glicoesferas@ConA e glicoesferas@WGA e as mesmas lectinas imobilizadas em MNPs. Contudo, tal como o descrito previamente, o grau de inespecificidade foi bastante mais elevado (23% frente a 3%).

As propriedades superiores das MNP@Lectinas foram, também, evidenciadas em estudos com urina humana. Nomeadamente, Feng et al. (2009) recuperaram 12 glicoproteínas utilizando agarose@ConA, em contraste com as 34 glicoproteínas recuperadas neste estudo com as MNP@ConA. Além disto, as colunas capilares monolíticas de escala nano associadas a ConA e as MNP@ConA demonstraram um número similar de proteínas identificadas (35 glicoproteínas), evidenciando a eficiência das nanoplataformas. Dentro dos estudos realizados em urina humana, apenas um (Wang et al., 2006) descreveu um número superior de N-glicoproteínas na urina recorrendo a agarose@ConA (43 com a agarose@ConA frente às 34 com MNP@ConA aqui obtidas). Ainda assim tem de ser evidenciado que estes resultados derivaram de diversos passos de enriquecimento, utilizando tranches de 100 µg de proteínas urinárias que foram, depois, separadas por SDS-PAGE, LC de fase reversa/MS/MS e LC/MS/MS bi-dimensional. Esta estratégia contrasta com a utilizada neste trabalho, uma análise *shotgun* baseada num único passo de enriquecimento com *pools* de 50 µg de proteína.

Assim, as MNP@Lectinas apresentaram, nos três fluidos, níveis baixos de ligação não-específica e uma grande quantidade de proteínas capturadas, quando comparadas com suportes convencionais de imobilização. Para além disto, ficou demonstrado o seu potencial para a recuperação de glicoproteínas que estão presentes em quantidades muito baixas nos diversos fluídos e oferecem a oportunidade de ultrapassar as limitações técnicas quando se trabalha com saliva humana. Também se deve referir que grande parte das técnicas utilizadas comumente requerem colunas de depleção para remoção das proteínas mais abundantes (Madera et al., 2005; Hao et al., 2009) antes da utilização das lectinas, ao contrário do que se passa com as MNP@Lectinas, que podem ser usadas sem necessidade de grandes manipulações prévias. A afinidade diferencial das glicoproteínas em cada um dos fluidos humanos para as diferentes lectinas pode ajudar a separar as proteínas em relação à presença ou ausência de glicosilação, assim como ajudar no estabelecimento de padrões de interesse para diversos estudos clínicos.

## **4. Conclusões**

## 4. Conclusões

O presente trabalho descreve a síntese e a optimização de uma plataforma de enriquecimento selectivo de glicoproteínas em fluidos humanos recorrendo ao uso de nanopartículas magnéticas associadas a lectinas. As partículas ferro-magnéticas foram revestidas com sílica, funcionalizadas com grupos amina e acopladas com lectinas utilizando o DSS como ponte de ligação. Este tipo de síntese provou ser altamente versátil pois permitiu a imobilização de diferentes lectinas de modo funcional. Para além disto, uma estratégia melhorada para a preservação da integridade das glicoproteínas aquando da sua imobilização junto das MNPs foi, também, testada. Foi observado que a protecção das lectinas recorrendo aos seus açúcares-alvo antes da imobilização melhorou a captura das mesmas consideravelmente, quando comparado com as lectinas imobilizadas sem protecção. Este efeito foi mais pronunciado para a ConA (aumento de 40%) e para a MA (aumento de 90%). Pensa-se que este efeito se deveu à preservação dos locais de ligação das lectinas pelos açúcares-alvo.

As MNP@Lectinas obtidas desta forma demonstraram melhores resultados quando comparados com outros suportes de imobilização. Nomeadamente, a MNP@ConA exibiu 5 vezes mais afinidade para com a fetuína e a ovalbumina quando comparada com a Sepharose@ConA, utilizando a mesma quantidade de lectina imobilizada. Para além destas observações, as MNP@Lectinas possibilitaram a identificação de um maior número de glicoproteínas em fluídos humanos, estendidas numa maior gama de concentrações. Estas observações estão de acordo com estudos anteriores que enaltecem a superiores propriedades funcionais das MNPs (Gijs et al., 2004; Xu et al., 2004). Nomeadamente, a grande superfície e forma globular demonstradas pelas MNPs foi descrita como sendo promotora de interacções tridimensionais suportando diversos locais de ligação entre os ligandos e os receptores, resultando numa elevada recuperação de proteínas (Lin et al., 2003).

Para além destes resultados, as MNP@Lectinas também demonstraram uma alta especificidade para os domínios glicosídicos e baixos níveis de ligações não-específicas, particularmente tendo em conta os complexos fluidos humanos onde foi aplicada como é o caso do soro, da urina e, fundamentalmente, da saliva.

Globalmente, as MNP@Lectinas comprovaram ser uma alternativa eficiente aos suportes de imobilização disponíveis actualmente. Assim, constituem uma ferramenta de grande valor para o isolamento de glicoproteínas presentes em quantidades diminutas em

fluidos humanos de grande complexidade e poderão ser utilizadas na investigação futura de biomarcadores de interesse em diferentes áreas.

## **5. Bibliografia**

## 5. Bibliografía

Aguilar-Arteaga, K., J.A. Rodriguez, and E. Barrado, *Magnetic solids in analytical chemistry: a review*. Anal Chim Acta, 2010. **674**(2): p. 157-65.

Alvarez-Manilla, G., et al., *Glycoproteomic analysis of embryonic stem cells: identification of potential glycobiomarkers using lectin affinity chromatography of glycopeptides*. J Proteome Res, 2010. **9**(5): p. 2062-75.

Amon, R., et al., *Glycans in immune recognition and response*. Carbohydr Res, 2014. **389**: p. 115-22.

Asker, N., et al., *The human MUC2 mucin apoprotein appears to dimerize before O-glycosylation and shares epitopes with the 'insoluble' mucin of rat small intestine*. Biochem J, 1995. **308 ( Pt 3)**: p. 873-80.

Azuma, Y., A. Taniguchi, and K. Matsumoto, *Decrease in cell surface sialic acid in etoposide-treated Jurkat cells and the role of cell surface sialidase*. Glycoconj J, 2000. **17**(5): p. 301-6.

Babosha, A.V., *Inducible lectins and plant resistance to pathogens and abiotic stress*. Biochemistry (Mosc), 2008. **73**(7): p. 812-25.

Bies, C., C.M. Lehr, and J.F. Woodley, *Lectin-mediated drug targeting: history and applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(4): p. 425-35.

Bigg, H.F., et al., *The mammalian chitinase-like lectin, YKL-40, binds specifically to type I collagen and modulates the rate of type I collagen fibril formation*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 21082-95.

Blomme, B., et al., *Alteration of protein glycosylation in liver diseases*. J Hepatol, 2009. **50**(3): p. 592-603.

Bouckaert, J., et al., *Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the Escherichia coli FimH adhesin*. Mol Microbiol, 2005. **55**(2): p. 441-55.

- Braakman, I., *A novel lectin in the secretory pathway. An elegant mechanism for glycoprotein elimination*. EMBO Rep, 2001. **2**(8): p. 666-8.
- Bumb, A., et al., *Synthesis and characterization of ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticles thinly coated with silica*. Nanotechnology, 2008. **19**(33): p. 335601.
- Butterfield, D.A. and J.B. Owen, *Lectin-affinity chromatography brain glycoproteomics and Alzheimer disease: insights into protein alterations consistent with the pathology and progression of this dementing disorder*. Proteomics Clin Appl, 2011. **5**(1-2): p. 50-6.
- Campbell, C.T. and K.J. Yarema, *Large-scale approaches for glycobiology*. Genome Biol, 2005. **6**(11): p. 236.
- Carraway, K.L. and S.R. Hull, *Cell surface mucin-type glycoproteins and mucin-like domains*. Glycobiology, 1991. **1**(2): p. 131-8.
- Chen, Y., et al., *Two-step protease digestion and glycopeptide capture approach for accurate glycosite identification and glycoprotein sequence coverage improvement*. Talanta, 2011. **85**(1): p. 70-75.
- Chojnacki, T. and G. Dallner, *The biological role of dolichol*. Biochem J, 1988. **251**(1): p. 1-9.
- Chui, D., et al., *Genetic remodeling of protein glycosylation in vivo induces autoimmune disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(3): p. 1142-7.
- Clark, D. and L. Mao, *Cancer biomarker discovery: lectin-based strategies targeting glycoproteins*. Dis Markers, 2012. **33**(1): p. 1-10.
- Cooper, D.N. and S.H. Barondes, *God must love galectins; he made so many of them*. Glycobiology, 1999. **9**(10): p. 979-84.
- Crocker, P.R. and A. Varki, *Siglecs, sialic acids and innate immunity*. Trends Immunol, 2001. **22**(6): p. 337-42.

- Cruciat, C.M., C. Hassler, and C. Niehrs, *The MRH protein Erlectin is a member of the endoplasmic reticulum synexpression group and functions in N-glycan recognition*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12986-93.
- Cummings, R.D., *Lectins as Tools for Glycoconjugate Purification and Characterization*, in *Glycosciences*. 2008, Wiley-VCH Verlag GmbH. p. 191-199.
- Day, J.F., S.R. Thorpe, and J.W. Baynes, *Nonenzymatically glucosylated albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum*. J Biol Chem, 1979. **254**(3): p. 595-7.
- Diaz, C.L., et al., *Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis*. Nature, 1989. **338**(6216): p. 579-581.
- Dinant, S., et al., *Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms*. Plant Physiol, 2003. **131**(1): p. 114-28.
- Drake, P.M., et al., *Sweetening the pot: adding glycosylation to the biomarker discovery equation*. Clin Chem, 2010. **56**(2): p. 223-36.
- Dulaney, J.T., *Factors affecting the binding of glycoproteins to concanavalin A and Ricinus communis agglutinin and the dissociation of their complexes*. Anal Biochem, 1979. **99**(2): p. 254-67.
- Edge, A.S., et al., *Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid*. Anal Biochem, 1981. **118**(1): p. 131-7.
- Esko, J.D. and S.B. Selleck, *Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 435-71.
- Feizi, T. and B. Mulloy, *Carbohydrates and glycoconjugates. Glycomics: the new era of carbohydrate biology*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(5): p. 602-4.
- Feng, S., et al., *Enrichment of glycoproteins using nanoscale chelating concanavalin A monolithic capillary chromatography*. Anal Chem, 2009. **81**(10): p. 3776-83.

- Ferreira, J.A., et al., *Identification of cell-surface mannans in a virulent Helicobacter pylori strain*. Carbohydr Res, 2010. **345**(6): p. 830-8.
- Fiedler, K. and K. Simons, *A putative novel class of animal lectins in the secretory pathway homologous to leguminous lectins*. Cell, 1994. **77**(5): p. 625-6.
- Frimpong, R.A. and J.Z. Hilt, *Magnetic nanoparticles in biomedicine: synthesis, functionalization and applications*. Nanomedicine (Lond), 2010. **5**(9): p. 1401-14.
- Fuentes, M., et al., *Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies*. Biosens Bioelectron, 2005. **20**(7): p. 1380-7.
- Gandhi, N.S. and R.L. Mancera, *The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins*. Chem Biol Drug Des, 2008. **72**(6): p. 455-82.
- Gatehouse, A.M.R., et al., *Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection*. Pp 35-58. In: *Lectins: Biomedical Perspectives*, ed. Pusztai, A. & Bardocz, S. Taylor e Francis., London, 1995.
- Ghazarian, H., B. Idoni, and S.B. Oppenheimer, *A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics*. Acta Histochem, 2011. **113**(3): p. 236-47.
- Gijs, M.M., *Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications*. Microfluidics and Nanofluidics, 2004. **1**(1): p. 22-40.
- Gill, D.J., et al., *Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes*. J Cell Biol, 2010. **189**(5): p. 843-58.
- Gorelik, E., U. Galili, and A. Raz, *On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2001. **20**(3-4): p. 245-77.
- Gupta, G., A. Surolia, and S.G. Sampathkumar, *Lectin microarrays for glycomic analysis*. Omics, 2010. **14**(4): p. 419-36.
- Haab, B.B., et al., *Glycosylation variants of mucins and CEACAMs as candidate biomarkers for the diagnosis of pancreatic cystic neoplasms*. Ann Surg, 2010. **251**(5): p. 937-45.

- Haltiwanger, R.S. and J.B. Lowe, *Role of glycosylation in development*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 491-537.
- Hanover, J.A., *Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine*. Faseb j, 2001. **15**(11): p. 1865-76.
- Hao, P., Y. Ren, and Y. Xie, *Label-free relative quantification method for low-abundance glycoproteins in human serum by micrOTOF-Q*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(16-17): p. 1657-66.
- Hart, G.W. and R.J. Copeland, *Glycomics hits the big time*. Cell, 2010. **143**(5): p. 672-6.
- Hart, G.W., *Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 315-35.
- Hart, G.W., M.P. Housley, and C. Slawson, *Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins*. Nature, 2007. **446**(7139): p. 1017-22.
- Hassan, H., et al., *The lectin domain of UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T4 directs its glycopeptide specificities*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38197-205.
- He, J., et al., *Glycoproteomic analysis of glioblastoma stem cell differentiation*. J Proteome Res, 2011. **10**(1): p. 330-8.
- Honda, S., et al., *Multiplicity, structures, and endocrine and exocrine natures of eel fucose-binding lectins*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 33151-7.
- Hsiao, H.Y., et al., *Fabrication of carbohydrate microarrays through boronate formation*. Chem Commun (Camb), 2011. **47**(4): p. 1187-9.
- Hsu, K.L. and L.K. Mahal, *Sweet tasting chips: microarray-based analysis of glycans*. Curr Opin Chem Biol, 2009. **13**(4): p. 427-32.
- Huang, B.Y., et al., *Stationary phases for the enrichment of glycoproteins and glycopeptides*. Electrophoresis, 2014.

- Hwang, H., et al., *Glycoproteomics in neurodegenerative diseases*. Mass Spectrom Rev, 2010. **29**(1): p. 79-125.
- Hwang, H.J., T. Quinn, and J. Zhang, *Identification of glycoproteins in human cerebrospinal fluid*. Methods Mol Biol, 2009. **566**: p. 263-76.
- Imberty, A., et al., *An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two Maackia amurensis lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17541-8.
- Iontcheva, I., F.G. Oppenheim, and R.F. Troxler, *Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins*. J Dent Res, 1997. **76**(3): p. 734-43.
- Johnson, W.V. and E.C. Heath, *Evidence for posttranslational O-glycosylation of fetuin*. Biochemistry, 1986. **25**(19): p. 5518-25.
- Jordan, A., et al., *Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2001. **225**(1-2): p. 118-126.
- Julenius, K., et al., *Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites*. Glycobiology, 2005. **15**(2): p. 153-64.
- Kasprzewska, A., *Plant chitinases--regulation and function*. Cell Mol Biol Lett, 2003. **8**(3): p. 809-24.
- Kerrigan, A.M. and G.D. Brown, *C-type lectins and phagocytosis*. Immunobiology, 2009. **214**(7): p. 562-75.
- Kilpatrick D.C., *Lectin interactions with human leukocytes: mitogenicity, cell separation, clinical applications*. In: *Lectin Reviews*, ed: D.C. Kilpatrick, E. Van Driessche and T.C. Bog-Hansen, Vol. 1, St Louis (USA): Sigma Chemical Company, pp. 69-80.
- Kim, D.K., et al., *Starch-Coated Superparamagnetic Nanoparticles as MR Contrast Agents*. Chemistry of Materials, 2003. **15**(23): p. 4343-4351.

- Kim, E.H. and D.E. Misek, *Glycoproteomics-based identification of cancer biomarkers*. Int J Proteomics, 2011. **2011**: p. 601937.
- Knopp, D., D. Tang, and R. Niessner, *Review: bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles*. Anal Chim Acta, 2009. **647**(1): p. 14-30.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld, *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*. Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 631-64.
- Kubik, S., *Carbohydrate recognition: A minimalistic approach to binding*. Nat Chem, 2012. **4**(9): p. 697-698.
- Kulkarni, A.A., A.A. Weiss, and S.S. Iyer, *Detection of carbohydrate binding proteins using magnetic relaxation switches*. Anal Chem, 2010. **82**(17): p. 7430-5.
- Kullolli, M., W.S. Hancock, and M. Hincapie, *Automated platform for fractionation of human plasma glycoproteome in clinical proteomics*. Anal Chem, 2010. **82**(1): p. 115-20.
- Kullolli, M., W.S. Hancock, and M. Hincapie, *Preparation of a high-performance multi-lectin affinity chromatography (HP-M-LAC) adsorbent for the analysis of human plasma glycoproteins*. J Sep Sci, 2008. **31**(14): p. 2733-9.
- Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
- Lin, C.C., et al., *Quantitative analysis of multivalent interactions of carbohydrate-encapsulated gold nanoparticles with concanavalin A*. Chem Commun (Camb), 2003(23): p. 2920-1.
- Lin, P.C., et al., *Ethylene glycol-protected magnetic nanoparticles for a multiplexed immunoassay in human plasma*. Small, 2006. **2**(4): p. 485-9.
- Lin, P.C., et al., *Functionalized magnetic nanoparticles for small-molecule isolation, identification, and quantification*. Anal Chem, 2007. **79**(9): p. 3401-8.

- Liu, F., et al., *Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease*. FEBS Lett, 2002. **512**(1-3): p. 101-6.
- Loo, D., A. Jones, and M.M. Hill, *Lectin magnetic bead array for biomarker discovery*. J Proteome Res, 2010. **9**(10): p. 5496-500.
- Lubbe, A.S., C. Alexiou, and C. Bergemann, *Clinical applications of magnetic drug targeting*. J Surg Res, 2001. **95**(2): p. 200-6.
- Madera, M., et al., *Efficacy of glycoprotein enrichment by microscale lectin affinity chromatography*. J Sep Sci, 2008. **31**(14): p. 2722-32.
- Madera, M., Y. Mechref, and M.V. Novotny, *Combining lectin microcolumns with high-resolution separation techniques for enrichment of glycoproteins and glycopeptides*. Anal Chem, 2005. **77**(13): p. 4081-90.
- Mak, A.N.-S., et al., *Structure-function study of maize ribosome-inactivating protein: implications for the internal inactivation region and the sole glutamate in the active site*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**(18): p. 6259-6267.
- Masarova, J., et al., *Novel peptide surface for reversible immobilization of concanavalin A*. J Biochem Biophys Methods, 2004. **60**(2): p. 163-70.
- Matsunaga, T., et al., *Fully automated immunoassay for detection of prostate-specific antigen using nano-magnetic beads and micro-polystyrene bead composites, 'Beads on Beads'*. Anal Chim Acta, 2007. **597**(2): p. 331-9.
- Meany, D.L. and D.W. Chan, *Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers*. Clin Proteomics, 2011. **8**(1): p. 7.
- Minko, T., *Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(4): p. 491-509.
- Mody, R., S. Joshi, and W. Chaney, *Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer*. J Pharmacol Toxicol Methods, 1995. **33**(1): p. 1-10.

- Moller, W., I. Nemoto, and J. Heyder, *Effect of magnetic bead agglomeration on Cytomagnometric measurements*. IEEE Trans Nanobioscience, 2003. **2**(4): p. 247-54.
- Monzo, A., G.K. Bonn, and A. Guttman, *Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2007. **26**(5): p. 423-432.
- Moon, P.G., et al., *Identification of rat urinary glycoproteome captured by three lectins using gel and LC-based proteomics*. Electrophoresis, 2008. **29**(21): p. 4324-31.
- Mukhopadhyay, B., et al., *Bacterial detection using carbohydrate-functionalised CdS quantum dots: a model study exploiting E. coli recognition of mannosides*. Tetrahedron Letters, 2009. **50**(8): p. 886-889.
- Mysling, S., et al., *Utilizing ion-pairing hydrophilic interaction chromatography solid phase extraction for efficient glycopeptide enrichment in glycoproteomics*. Anal Chem, 2010. **82**(13): p. 5598-609.
- Naeem, A., M. Saleemuddin, and R.H. Khan, *Glycoprotein targeting and other applications of lectins in biotechnology*. Curr Protein Pept Sci, 2007. **8**(3): p. 261-71.
- Narayanan, S.R. and L.J. Crane, *Affinity chromatography supports: a look at performance requirements*. Trends Biotechnol, 1990. **8**(1): p. 12-6.
- Narimatsu, H., et al., *A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics*. Febs j, 2010. **277**(1): p. 95-105.
- Nasi, A., G. Picariello, and P. Ferranti, *Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety*. J Proteomics, 2009. **72**(3): p. 527-38.
- Natsuka, S., et al., *Characterization of wheat germ agglutinin ligand on soluble glycoproteins in Caenorhabditis elegans*. J Biochem, 2005. **138**(2): p. 209-13.
- Ofek, I., D.L. Hasty, and N. Sharon, *Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **38**(3): p. 181-91.

- Ohtsubo, K. and J.D. Marth, *Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease*. Cell, 2006. **126**(5): p. 855-67.
- Ohyama, Y., et al., *Frontal affinity chromatography of ovalbumin glycoasparagines on a concanavalin A-sepharose column. A quantitative study of the binding specificity of the lectin*. J Biol Chem, 1985. **260**(11): p. 6882-7.
- Ongay, S., et al., *Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis*. J Sep Sci, 2012. **35**(18): p. 2341-72.
- Opdenakker, G., et al., *Concepts and principles of glycobiology*. Faseb j, 1993. **7**(14): p. 1330-7.
- Patwa, T.H., et al., *Screening of glycosylation patterns in serum using natural glycoprotein microarrays and multi-lectin fluorescence detection*. Anal Chem, 2006. **78**(18): p. 6411-21.
- Peters, B.P., et al., *O-glycosylation of the alpha-subunit does not limit the assembly of chorionic gonadotropin alpha beta dimer in human malignant and nonmalignant trophoblast cells*. Endocrinology, 1989. **124**(4): p. 1602-12.
- Peumans, W.J. and Van Damme E.J.M., *Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology*. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1998. **15**(7): p. 199-228.
- Plzak, J., et al., *Glycobiology of head and neck squamous epithelia and carcinomas*. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2005. **67**(2): p. 61-9.
- Pusztai, A., S. Bardocz, and S.W. Ewen, *Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 1130-40.
- Rabinovich, G.A., et al., *Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices*. Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(5): p. 513-20.
- Raikhel, N.V., H.I. Lee, and W.F. Broekaert, *Structure and Function of Chitin-Binding Proteins*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1993. **44**(1): p. 591-615.

- Reichelt, S., et al., *Amino-functionalized monolithic spin-type columns for high-throughput lectin affinity chromatography of glycoproteins*. *Analyst*, 2012. **137**(11): p. 2600-7.
- Reis, C.A., et al., *Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection*. *J Clin Pathol*, 2010. **63**(4): p. 322-9.
- Ren, Y., Q. Ding, and X. Zhang, *Ficolins and infectious diseases*. *Virology*, 2014. **29**(1): p. 25-32.
- Rho, J.H., M.H. Roehrl, and J.Y. Wang, *Glycoproteomic analysis of human lung adenocarcinomas using glycoarrays and tandem mass spectrometry: differential expression and glycosylation patterns of vimentin and fetuin A isoforms*. *Protein J*, 2009. **28**(3-4): p. 148-60.
- Roohk, H.V. and A.R. Zaidi, *A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes*. *J Diabetes Sci Technol*, 2008. **2**(6): p. 1114-21.
- Sadler, J.E., *Biosynthesis of glycoproteins: formation of O-linked oligosaccharides*. In Ginsburg, V. and Robbins, P.W., editors. *Biology of carbohydrates*, vol. 2. Wiley; New York: 1984. p. 199-288.
- Schachter, H. and Brockhausen, I., *The biosynthesis of serine (threonine)-N-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties*. In: Allen, H.J.; Kisailus, E.C.; editors. *Glycoconjugates Composition, Structure and Function*. Marcel Dekker Inc.; New York: 1992. p. 262-332.
- Sharon, N. and H. Lis, *Carbohydrates in cell recognition*. *Sci Am*, 1993. **268**(1): p. 82-9.
- Sharon, N. and H. Lis, *History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules*. *Glycobiology*, 2004. **14**(11): p. 53r-62r.
- Sharon, N. and H. Lis, *Lectins as cell recognition molecules*. *Science*, 1989. **246**(4927): p. 227-34.
- Sharon, N., *Carbohydrates*. *Sci Am*, 1980. **243**(5): p. 90-116.

- Soares, R.V., et al., *Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme*. Arch Oral Biol, 2004. **49**(5): p. 337-43.
- Sparbier, K., et al., *Analysis of glycoproteins in human serum by means of glycospecific magnetic bead separation and LC-MALDI-TOF/TOF analysis with automated glycopeptide detection*. J Biomol Tech, 2007. **18**(4): p. 252-8.
- Spiro, R.G., *Glycoproteins*. Adv Protein Chem, 1973. **27**: p. 349-467.
- Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**(4): p. 43r-56r.
- Sprawka, I., et al., *Insecticidal action of phytohemagglutinin (PHA) against the grain aphid, Sitobion avenae*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2011. **100**(1): p. 64-69.
- Srinivas, P.R., B.S. Kramer, and S. Srivastava, *Trends in biomarker research for cancer detection*. Lancet Oncol, 2001. **2**(11): p. 698-704.
- Strous, G.J. and J. Dekker, *Mucin-type glycoproteins*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1992. **27**(1-2): p. 57-92.
- Suji, G. and S. Sivakami, *Glucose, glycation and aging*. Biogerontology, 2004. **5**(6): p. 365-73.
- Tang, J., et al., *Concanavalin A-immobilized magnetic nanoparticles for selective enrichment of glycoproteins and application to glycoproteomics in hepatocellular carcinoma cell line*. Proteomics, 2010. **10**(10): p. 2000-14.
- Tang, N., P. Tornatore, and S.R. Weinberger, *Current developments in SELDI affinity technology*. Mass Spectrom Rev, 2004. **23**(1): p. 34-44.
- Thaysen-Andersen, M., et al., *Structural analysis of glycoprotein sialylation - Part I: pre-LC-MS analytical strategies*. RSC Advances, 2013. **3**(45): p. 22683-22705.

- Tozzi, C., L. Anfossi, and G. Giraudi, *Affinity chromatography techniques based on the immobilisation of peptides exhibiting specific binding activity*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. **797**(1-2): p. 289-304.
- Tuccillo, F.M., A. de Laurentiis, and C. Palmieri, *Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43*. 2014. **2014**: p. 742831.
- Varki a., et al., *Essentials of Glycobiology*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- Vazquez-Moreno, L., M.C. Candia-Plata, and M.R. Robles-Burgueno, *Hypersialylated macromolecular serum immunoglobulin A1 in type 2 diabetes mellitus*. Clin Biochem, 2001. **34**(1): p. 35-41.
- Vitorino, R., et al., *Finding new posttranslational modifications in salivary proline-rich proteins*. Proteomics, 2010. **10**(20): p. 3732-42.
- Vitorino, R., et al., *Identification of human whole saliva protein components using proteomics*. Proteomics, 2004. **4**(4): p. 1109-15.
- Vitorino, R., et al., *Towards defining the whole salivary peptidome*. PROTEOMICS – Clinical Applications, 2009. **3**(5): p. 528-540.
- Wade, L.G., Jr., *Organic Chemistry*. Prentice-Hall, Inc; 1999.
- Wang, H., et al., *Cloning and characterization of a novel UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, pp-GalNAc-T14*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(3): p. 738-44.
- Wang, L., et al., *Concanavalin A-captured glycoproteins in healthy human urine*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(3): p. 560-2.
- Wei, J., et al., *Highly efficient enrichment of phosphopeptides by magnetic nanoparticles coated with zirconium phosphonate for phosphoproteome analysis*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(7): p. 1069-1080.

- Wikström, P., et al., *Magnetic aqueous two-phase separation: A new technique to increase rate of phase-separation, using dextran-ferrofluid or larger iron oxide particles*. *Analytical Biochemistry*, 1987. **167**(2): p. 331-339.
- Williams, D.B., *Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 4): p. 615-23.
- Woods, R.J., C.J. Edge, and R.A. Dwek, *Protein surface oligosaccharides and protein function*. *Nat Struct Biol*, 1994. **1**(8): p. 499-501.
- Wrackmeyer, U., et al., *Intelectin: a novel lipid raft-associated protein in the enterocyte brush border*. *Biochemistry*, 2006. **45**(30): p. 9188-97.
- Wu, J., et al., *Transgenic cotton, expressing *Amaranthus caudatus* agglutinin, confers enhanced resistance to aphids*. *Plant Breeding*, 2006. **125**(4): p. 390-394.
- Wu, L. and J.-k. Bao, *Anti-tumor and anti-viral activities of *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA)-related lectins*. *Glycoconjugate Journal*, 2013. **30**(3): p. 269-279.
- Xu, C., et al., *Nitrilotriacetic acid-modified magnetic nanoparticles as a general agent to bind histidine-tagged proteins*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**(11): p. 3392-3.
- Yang, Z., et al., *A study of glycoproteins in human serum and plasma reference standards (HUPO) using multilectin affinity chromatography coupled with RPLC-MS/MS*. *Proteomics*, 2005. **5**(13): p. 3353-66.
- Yoshida, Y., et al., *Glycoprotein-specific ubiquitin ligases recognize N-glycans in unfolded substrates*. *EMBO Rep*, 2005. **6**(3): p. 239-44.
- Zachara, N.E. and G.W. Hart, *Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc!* *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1761**(5-6): p. 599-617.
- Zeng, X., et al., *Lung cancer serum biomarker discovery using glycoprotein capture and liquid chromatography mass spectrometry*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(12): p. 6440-9.

- Zhao, J., et al., *Glycoprotein microarrays with multi-lectin detection: unique lectin binding patterns as a tool for classifying normal, chronic pancreatitis and pancreatic cancer sera*. J Proteome Res, 2007. **6**(5): p. 1864-74.
- Zheng, M., et al., *Regulatory role of GM3 ganglioside in alpha 5 beta 1 integrin receptor for fibronectin-mediated adhesion of FUA169 cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 2217-22.
- Zhou, Y., et al., *Inhibition effect of transgenic tobacco plants expressing snowdrop lectin on the population development of Myzus persicae*. Chin J Biotechnol, 1998. **14**(1): p. 9-16.
- Zielinska, D.F., et al., *Mapping N-glycosylation sites across seven evolutionarily distant species reveals a divergent substrate proteome despite a common core machinery*. Mol Cell, 2012. **46**(4): p. 542-8.

## **6. Anexos**

## 6. Anexos

**Anexo 1.** Lista de proteínas capturadas com as MNP@Lectinas ordenadas pelo peso molecular.

Número de Acesso	Nome de Entrada	Nome da Proteína	Mw (Da)	Soro			Saliva			Urina			Descrito			Previsto	
				ConA	WGA	MA	ConA	WGA	MA	ConA	WGA	MA	O-ligadas	N-ligadas	Glicação	Previsão O	Previsão N
Q8WXI7	MUC16_HUMAN	Mucin-16	2353428								X	X	X	-	2	2	
Q8NF91	SYNE1_HUMAN	Nesprin-1	1011028								X	-	-	-	*O	-	
Q8WXH0	SYNE2_HUMAN	Nesprin-2	796442								X	-	-	-	*O	-	
Q8WXG9	GPR98_HUMAN	G-protein coupled receptor 98	692674			X						-	-	-	O	-	
Q9HC84	MUC5B_HUMAN	Mucin-5B	596340				X	X	X			X	X	-	O	-	
Q9Y6R7	FCGBP_HUMAN	IgGfC-binding protein	572017								X	-	X	-	O	-	
A2VEC9	SSPO_HUMAN	SCO-spondin	547504								X	-	X	-	O	-	
Q9NZJ4	SACS_HUMAN	Saccin	521126								X	-	-	-	*O	-	
P04114	APOB_HUMAN	Apolipoprotein B-100	515605	X	X	X						-	X	-	-	-	
Q14517	FAT1_HUMAN	Protocadherin Fat 1	506278								X	-	X	-	O	-	
P98160	PGBM_HUMAN	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	468830							X		X	X	-	O	-	
Q685J3	MUC17_HUMAN	Mucin-17	451741								X	X	X	-	O	-	
Q0VDD8	DYH14_HUMAN	Dynein heavy chain 14, axonemal	399895								X	-	X	-	O	N	
Q9H251	CAD23_HUMAN	Cadherin-23	369525		X							-	X	-	O	N	
P24043	LAMA2_HUMAN	Laminin subunit alpha-2	343905								X	-	X	-	O	*N	

Q9Y493	ZAN_HUMAN	Zonadhesin	305573							X		-	X	-	O	N	
Q86YZ3	HORN_HUMAN	Hornerin	282390	X	X		X	X	X	X	X	X	-	-	-	-	*N
Q9UGM3	DMBT1_HUMAN	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	260735										X	-	O	*N	
Q9NTG1	PKDRE_HUMAN	Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly-related protein	255449			X							X	-	O	*N	
Q14008	CKAP5_HUMAN	Cytoskeleton-associated protein 5	225495							X					*O	*N	
O43451	MGA_HUMAN	Maltase-glucoamylase, intestinal	209852							X		-	X	-	O	N	
Q8IZD2	MLL5_HUMAN	Histone-lysine N-methyltransferase MLL5	204965				X					X	-	-	*O	*N	
Q99666	RGPD5_HUMAN	RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 6	198924						X				-	-	*O	*N	
Q8NI35	INADL_HUMAN	InaD-like protein	196368			X							-	-	*O	*N	
Q9Y238	DLEC1_HUMAN	Deleted in lung and esophageal cancer protein 1	195684			X							-	-	*O	*N	
P0C0L5	CO4B_HUMAN	Complement C4-B	192793	X	X					X	X		-	X	-	O	N
P0C0L4	CO4A_HUMAN	Complement C4-A	192771		X								-	X	-	O	N
P01031	CO5_HUMAN	Complement C5	188305							X			-	X	-	O	N
P01024	CO3_HUMAN	Complement C3	187148	X	X	X	X	X		X	X		-	X	-	O	N
A6NE52	K1875_HUMAN	WD repeat-containing protein KIAA1875	180307				X						-	-	*O	*N	
P20742	PZP_HUMAN	Pregnancy zone protein	163863	X	X			X					-	X	-	O	N
P01023	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	163291	X	X	X	X	X	X	X	X		-	X	-	O	N
Q01955	CO4A3_HUMAN	Collagen alpha-3(IV) chain	161813							X			-	X	-	O	*N
P49790	NU153_HUMAN	Nuclear pore complex protein Nup153	153938			X							-	-	*O	*N	
Q9UMD9	COHA1_HUMAN	Collagen alpha-1(XVII) chain	150419					X					-	X	-	*O	*N
P08603	CFAH_HUMAN	Complement factor H	139096	X	X	X				X			-	X	-	-	N

P02452	CO1A1_HUMAN	Collagen alpha-1(I) chain	138941						X			X	X	-	O	*N		
P02461	CO3A1_HUMAN	Collagen alpha-1(III) chain	138564									X	X	-	O	*N		
Q5TIE3	VW5B1_HUMAN	Von Willebrand factor A domain-containing protein 5B1	133802									X	-	X	-	O	*N	
A4D2P6	GRD2I_HUMAN	Delphinin	132276									X	-	-	-	*O	*N	
P07996	TSP1_HUMAN	Thrombospondin-1	129383		X	X							X	X	-	O	N	
Q9ULH1	ASAP1_HUMAN	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	125498										X	-	-	-	*O	*N
P00450	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	122205	X	X	X	X	X	X		X	X	-	X	-	O	N	
Q08174	PCDH1_HUMAN	Protocadherin-1	114743			X							-	X	-	*O	*N	
P19823	ITIH2_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	106463	X	X	X							X	X	-	O	*N	
O43707	ACTN4_HUMAN	Alpha-actinin-4	104854				X						-	-	-	-	*N	
Q14624	ITIH4_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	103357	X	X	X				X	X		X	X	-	O	*N	
P12814	ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1	103058				X						-	-	-	*O	*N	
P19827	ITIH1_HUMAN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	101389	X	X	X							X	X	-	O	*N	
Q8IWU5	SULF2_HUMAN	Extracellular sulfatase Sulf-2	100455							X			-	X	-	-	*N	
P02671	FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	94973	X	X	X					X		-	X	-	O	N	
O15394	NCAM2_HUMAN	Neural cell adhesion molecule 2	93046									X	-	X	-	O	*N	
P00747	PLMN_HUMAN	Plasminogen	90569	X	X	X					X		X	X	-	O	-	
P06396	GELS_HUMAN	Gelsolin	85698		X	X							-	-	-	O	-	
P05164	PERM_HUMAN	Myeloperoxidase	83869				X						-	X	-	O	N	
P01833	PIGR_HUMAN	Polymeric immunoglobulin receptor	83284				X	X	X				-	X	-	O	N	
P16070	CD44_HUMAN	CD44 antigen	81538							X			-	X	-	O	N	



P04196	HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein	59578		X	X							-	X	-	O	N	
Q8TCT8	PSL2_HUMAN	Signal peptide peptidase-like 2A	58143											-	-	-	-	N
P04745	AMY1_HUMAN	Alpha-amylase 1	57768				X							-	X	-	-	N
P19961	AMY2B_HUMAN	Alpha-amylase 2B	57710											-	-	-	-	*N
P04746	AMYP_HUMAN	Salivary alpha-amylase	57707											X				N
P07237	PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase	57116															O
P06576	ATPB_HUMAN	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56560															*O
P02675	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	55928	X	X									X	X			-
P08697	A2AP_HUMAN	Alpha-2-antiplasmin	54566		X	X												-
P04004	VTNC_HUMAN	Vitronectin	54306	X	X	X												X
P04217	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	54254	X														X
P18428	LBP_HUMAN	Lipopolysaccharide-binding protein	53384		X													-
P01019	ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	53154	X														X
P02774	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	52964	X	X	X												X
P01008	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	52602	X														X
P10909	CLUS_HUMAN	Clusterin	52495		X	X												X
P02790	HEMO_HUMAN	Hemopexin	51676	X	X	X								X	X			X
P02679	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	51512															X
P80303	NUCB2_HUMAN	Nucleobindin-2	50196															X
P01871	IGHM_HUMAN	Ig mu chain C region	49307	X	X		X	X	X	X	X							X
Q8N4F0	BPIL1_HUMAN	Bactericidal/permeability-increasing protein-like 1	49172															X
Q96IY4	CBPB2_HUMAN	Carboxypeptidase B2	48424		X	X												X

P01011	AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	47651	X				X		X	-	X	-	-	N
P01009	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	46737	X	X	X	X	X	X	X	-	X	-	O	N
P36955	PEDF_HUMAN	Pigment epithelium-derived factor	46312		X						-	X	-	O	N
P06727	APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV	45399	X	X	X					-	-	-	-	-
P00738	HPT_HUMAN	Haptoglobin	45205	X	X				X		-	X	-	O	N
P13473	LAMP2_HUMAN	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	44961						X		-	X	-	O	*N
P35462	DRD3_HUMAN	D(3) dopamine receptor	44225					X			-	X	-	*O	*N
O14791	APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1	43974			X					-	X	-	O	*N
P04220	MUCB_HUMAN	Ig mu heavy chain disease protein	43057			X					-	X	-	*O	*N
P00790	PEPA_HUMAN	Pepsin A	41977							X	-	-	-	-	-
P60709	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	41737				X				-	-	-	*O	*N
P01860	IGHG3_HUMAN	Ig gamma-3 chain C region	41287	X	X	X	X		X	X	-	X	-	*O	*N
P02812	PRB2_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 2	40799				X				-	X	-	O	N
P08571	CD14_HUMAN	Monocyte differentiation antigen CD14	40076						X		X	X	-	-	N
P27169	PON1_HUMAN	Serum paraoxonase/arylesterase 1	39731	X		X					-	X	-	-	N
P02765	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein	39325	X	X	X				X	X	X	-	O	*N
P00739	HPTR_HUMAN	Haptoglobin-related protein	39030	X						X	-	-	-	O	N
P02760	AMBP_HUMAN	Protein AMBP	38999						X	X	X	X	-	O	N
P04280	PRP1_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 1	38546				X				-	-	-	O	-
P51884	LUM_HUMAN	Lumican	38429		X	X					-	X	-	-	N
P02749	APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	38298	X	X						X	X	-	O	N
Q6P552	CF058_HUMAN	UPF0762 protein C6orf58	37926				X	X			-	X	-	O	*N

P01876	GHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	37655	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	*O	*N	
Q02985	FHR3_HUMAN	Complement factor H-related protein 3	37323		X								-	X	-	O	*N
P01877	IGHA2_HUMAN	Ig alpha-2 chain C region	36526	X	X		X		X			X	-	X	-	*O	*N
P02649	APOE_HUMAN	Apolipoprotein E	36154	X	X	X							X	X	X	O	-
P01857	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	36106	X	X					X	X		-	X	-	*O	*N
P01861	IGHG4_HUMAN	Ig gamma-4 chain C region	35941	X	X			X		X	X		-	X	-	*O	*N
P01859	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region	35901	X	X	X	X			X		X	-	X	-	*O	*N
P10451	OSTP_HUMAN	Osteopontin	35423							X			X	X	-	O	N
P08574	CY1_HUMAN	Cytochrome c	35422									X	-	-	-	-	-
P23280	CAH6_HUMAN	Carbonic anhydrase 6	35367				X	X					-	X	-	-	N
P25311	ZA2G_HUMAN	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34259				X				X	X	-	X	-	O	N
P35030	TRY3_HUMAN	Trypsin-3	32529									X	-	-	-	*O	-
P10163	PRB4_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 4	31352					X	X				-	X	X	O	N
Q04118	PRB3_HUMAN	Basic salivary proline-rich protein 3	30980				X	X					-	X	-	O	N
P02647	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	30778	X	X	X	X	X	X		X		-	X	X	-	-
Q8WVN6	SCTM1_HUMAN	Secreted and transmembrane protein 1	27039							X			-	X	-	O	*N
Q8NHM4	TRY6_HUMAN	Putative trypsin-6	26539									X	-	-	-	O	-
P02747	C1QC_HUMAN	Complement C1q subcomponent subunit C	25774	X	X								X	-	-	-	-
P02743	SAMP_HUMAN	Serum amyloid P-component	25387	X									-	X	-	-	N
Q8IU8	CBLN2_HUMAN	Cerebellin-2	24084									X	-	-	-	O	*N
P02763	A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1	23512	X	X								-	X	-	-	*N
A8MT79	ZAGL1_HUMAN	Putative zinc-alpha-2-glycoprotein-like 1	22980									X	-	X	-	O	*N
Q96DA0	ZG16B_HUMAN	Zymogen granule protein 16 homolog B	22739				X	X	X				-	X	-	*O	*N

P05090	APOD_HUMAN	Apolipoprotein D	21276					X	X	-	X	-	O	*N
P41222	PTGDS_HUMAN	Prostaglandin-H2 D-isomerase	21029					X	X	-	X	-	O	*N
P02810	PRPC_HUMAN	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	17016				X	X	X		X	-	O	-
P12273	PIP_HUMAN	Prolactin-inducible protein	16572				X	X	X		-	X	-	N
P03950	ANGI_HUMAN	Angiogenin	16550		X						-	-	-	-
P61626	LYSC_HUMAN	Lysozyme C	16537		X	X		X			-	-	-	-
P09228	CYTT_HUMAN	Cystatin-SA	16445				X	X	X		-	-	-	-
P01037	CYTN_HUMAN	Cystatin-SN	16388				X	X	X		-	-	-	-
P01036	CYTS_HUMAN	Cystatin-S	16214				X	X	X		-	-	-	-
P28325	CYTD_HUMAN	Cystatin-D	16080				X				-	-	-	-
P68871	HBB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta	15998				X				-	X	X	*O -
P02766	TTHY_HUMAN	Transthyretin	15887	X	X	X					-	X	-	O -
P69905	HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha	15258		X	X	X	X			-	X	X	- -
P35542	SAA4_HUMAN	Serum amyloid A-4 protein	14747	X							-	X	-	- N
P13987	CD59_HUMAN	CD59 glycoprotein	14177						X		X	X	X	- N
P18136	KV313_HUMAN	Ig kappa chain V-III region HIC	14089	X			X				-	-	-	O -
P02775	CXCL7_HUMAN	Platelet basic protein	13894		X	X					-	-	-	O -
P02735	SAA_HUMAN	Serum amyloid A protein	13532						X		-	-	-	- -
P06312	KV401_HUMAN	Ig kappa chain V-IV region (Fragment)	13380	X							-	-	-	O -
P06702	S10A9_HUMAN	Protein S100-A9	13242				X	X	X		-	-	-	*O -
O95183	VAMP5_HUMAN	Vesicle-associated membrane protein 5	12805							X	-	-	-	*O *N
P01777	HV316_HUMAN	Ig heavy chain V-III region TEI	12803					X		X	-	-	-	*O *N
P04433	KV309_HUMAN	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	12575	X			X				-	-	-	O -

