



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

FRANCISCO NASCIMENTO PEREIRA JÚNIOR

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E
CRISTALIZAÇÃO DE UMA LECTINA LIGANTE DE
MANOSE/N-ACETIL-D-GLICOSAMINA DAS
SEMENTES DE *Platymiscium floribundum* VOGEL**

**FORTALEZA
2011**

FRANCISCO NASCIMENTO PEREIRA JÚNIOR

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E
CRISTALIZAÇÃO DE UMA LECTINA LIGANTE DE
MANOSE/N-ACETIL-D-GLICOSAMINA DAS
SEMENTES DE *Platymiscium floribundum* VOGEL**

Dissertação de Mestrado submetida à
Coordenação do Curso de Pós Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa
Cavada

FORTALEZA
2011

FRANCISCO NASCIMENTO PEREIRA JÚNIOR
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Purificação, caracterização parcial e cristalização de uma lectina ligante de manose/N-acetil-D-glicosamina das sementes de *Platymiscium floribundum* Vogel

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Co-orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Prof. Plínio Delatorre (Examinador)
Universidade Federal da Paraíba

*À minha mãe e ao meu pai, que nunca mediram
esforços para que eu pudesse realizar meus
sonhos e objetivos, me ajudando e apoiando em
todos os momentos da minha vida,*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter concedido paciência, paz, saúde e felicidades a mim e aos meus familiares, dando-me forças para seguir sempre em frente.

A meu orientador, Prof^o. Dr. Benildo Sousa Cavada por ter me recebido em seu laboratório e acreditado em meu potencial e ter confiança no meu trabalho.

A Professora Dra. Kyria Santiago do Nascimento, pela co-orientação na realização deste trabalho e pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante o convívio no laboratório.

Ao Professor Dr. Plínio Delatorre, por participar da banca de defesa dessa dissertação e pelos conhecimentos transmitidos ao longo de minha graduação.

A Professora Ana Maria Sampaio Assereuy e a Alana de Freitas Pires, pela colaboração para a realização dos testes de atividade biológica.

Ao Professor Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante a graduação, e agora na pós-graduação, pela amizade e ensinamentos dentro e fora do laboratório.

Ao Prof^o. Dr. Celso Shiniti Nagano pelo suporte nos dados de espectrometria de massa e pelos ensinamentos.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC, pelos valiosos ensinamentos que me proporcionaram ao longo do curso

A minha orientadora durante a iniciação científica na URCA, a Professora Dra. Beatriz Tupinambá Freitas, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse entrar no mundo da ciência.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

Aos meus grandes amigos, companheiros e colegas de trabalho, Helton, Rafael, Eduardo, Ito, Joana, Maria Júlia, pelo convívio, amizade e aprendizado, dentro e fora do laboratório, no decorrer desses anos.

Aos amigos do BioMol-Lab, Camila, Alfa, Mayron, Rômulo, Suzete, Alysson, Tales, Arthur, Guilherme, Fernando, Batista, Sâmia e a todos os demais que compõe o BioMol-Lab que contribuíram durante esta caminhada e a quem aprendi a ter um grande carinho.

Aos meus amigos do curso de mestrado, Vladimir e Geórgia, pelos momentos de descontração e companhia durante esses dois anos.

RESUMO

As sementes de *Platymiscium floribundum* Vogel, uma espécie pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Dalbergieae, possuem uma lectina manose/N-acetil-D-glicosamina específica, que aglutina eritrócitos nativos ou tratados com enzimas proteolíticas de coelho. A lectina de sementes de *P. floribundum* foi purificada por precipitação com sulfato de amônio seguida por cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose-manose. Esse procedimento resultou na lectina purificada, nomeada de PFL. O processo de purificação da PFL foi monitorado por SDS-PAGE e atividade hemaglutinante específica, observou-se que a lectina purificada é caracterizada por um perfil eletroforético composto por uma única banda, com massa molecular aparente de aproximadamente 29 kDa, tanto na presença quanto na ausência de um agente redutor. A análise por espectrometria de massa indicou que PFL possui massa molecular de 27.054 ± 2 Da, e teve sua estrutura primária parcialmente sequenciada através de espectrometria de massa sequencial. PFL é uma glicoproteína e demonstra elevada estabilidade, sendo capaz de manter sua atividade hemaglutinante após exposição a temperaturas de até 60 ° C por 1 hora e na faixa de pH de 7,0 a 9,0. A PFL não apresentou atividade anti-inflamatória em modelo de edema de pata. PFL foi cristalizada em diferentes condições de cristalização.

ABSTRACT

Platymiscium floribundum Vogel seeds, a species of the Leguminosae family, Papilionoideae subfamily, Dalbergieae tribe, have a lectin mannose/N-acetyl-D-glucosamine specific rabbit erythrocytes that agglutinate native or treated with proteolytic enzymes. The lectin from *P. floribundum* was purified by precipitation with ammonium sulfate followed by affinity chromatography on Sepharose-mannose. This procedure resulted in a purified lectin, named PFL. PFL purification process was monitored by SDS-PAGE and showed that the purified lectin is characterized by an electrophoretic profile consists of a single band with apparent molecular mass of approximately 29 kDa, in both presence and absence of an reducer agent. The analysis by mass spectrometry indicated that PFL has a molecular mass of 27,054 Da, and its primary structure was partially sequenced. PFL is a glycoprotein and shows high stability, being able to maintain its haemagglutinating activity after exposure to temperatures up to 60 °C for one hour and at pH 7.0 to 9.0. The PFL showed no anti-inflammatory activity in paw edema model. PFL was crystallized under different crystallization.

LISTA DE SIGLAS

ABU: ácido aminobutírico	PAL: Lectina de <i>Pterocarpus angolensis</i>
ACA: Lectina de <i>Amaranthus caudatus</i>	PDB: Protein Data Bank
BSA: Albumina Sérica Bovina	PEG: Polietilenoglicol
CID: Dissociação induzida por colisão	PEL: Lectina de <i>Platypodium elegans</i>
ConA: Lectina de sementes de <i>Canavalia ensiformes</i>	PFL: Lectina de <i>Platymiscium floribundum</i>
ConBr: Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>	pH: Logaritmo negativo da concentração de íons de hidrogênio
Da: Dalton	PHA: Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
DDA: Análise Direta de Dados	PPL2: Lectina de <i>Parkia platycephala</i> 2
EDTA: Ácido Etilenodiaminotetraácido	RIP: Proteína inativadora de ribossomo
ESI: Ionização por Electrospray	s.c.: Injeção Subcutânea
GlcNAc: N-Acetilglicosamina	SBA: Lectina de sementes de soja (<i>Glycine max</i>)
GNA: Lectina de <i>Galanthus nivalis</i>	SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico	TEMED: N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina
kDa: Kilodalton	ToF: Tempo de Vôo
kV: Kilovolt	TxLCI: Lectina do bulbo de tulipa
m/z: Relação massa/carga	U.H.: Unidade Hemaglutinante
MALDI: Ionização por Dessorção a laser assistida por matriz	VML: Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
MIC: Concentração Mínima Inibitória	
MS: Espectrometria de Massa	
MS/MS: Espectrometria de massa em sequencial	

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Especificidade por açúcares das lectinas da tribo Dalbergieae.....	27
TABELA 2: Atividade hemaglutinante do extrato total das sementes de <i>P. floribundum</i>.....	53
TABELA 3: Inibição da atividade hemaglutinante no extrato total.....	54
TABELA 4: Tabela de Purificação da Lectina de Sementes de <i>P. floribundum</i>.....	55

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Classificação estrutural das lectinas vegetais.** Representação esquemática de merolectinas (Heveína; PDB: 1Q9B), hololectinas (ConBr; PDB: 3JU9), quimerolectinas (PPL-2; PDB: 2GSJ) e superlectinas, estas últimas não possuem representantes com estrutura tridimensional elucidada. Adaptado de Peumans & Van Damme, 1999..... 19
- FIGURA 2. Classificação das Lectinas Vegetais.** (A) Lectinas de leguminosas, *Canavalia brasiliensis* (ConBr); (B) Lectina ligante à quitina compostas por domínios heveínicos, Heveína; (C) Lectina de monocotiledôneas ligantes à manose, *Galanthus nivalis* agglutinina (GNA); (D) RIP's do tipo II, Ricina; (E) Lectinas relacionadas às Jacalinas, *Parkia platycephala* (PPL-1); (F) Lectina da família da amarantina, *Amaranthus caudatus* (ACA). Fonte: PDB..... 21
- FIGURA 3: monômero de lectina de leguminosa.** Estrutura do monômero da lectina ConBr (PDB: 3JU9)..... 25
- FIGURA 4: Estrutura geral da lectina de P. Angolensis.** Representação esquemática do dímero de PAL em duas orientações ortogonais. Um monômero colorido de laranja e o outro de amarelo. Os íons de manganês são mostradas como esferas azuis e íons de cálcio como esferas verdes. As moléculas de ligantes Me- α -D-glicopiranosídeo também estão representados. Adaptado de LORIS *et al.*, 2003..... 28
- FIGURA 5. Fotos de *Platymiscium floribundum* Vogel.** (A) Árvore de *P. floribundum*, (B) vagens secas e (C) sementes maduras. Árvore localizada no sítio Carás do Umari, Juazeiro do Norte-CE..... 30
- FIGURA 6. Esquema dos componentes principais de um espectrômetro de massa.**..... 31
- FIGURA 7: Cristalização por difusão de vapor.** Métodos de montagem de gota suspensa (A), gota sentada (B) e gota sanduíche (C)..... 36
- FIGURA 8. Perfil de eluição da cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose-manose.** A fração 0-60% solubilizada em Tris-HCl 0,05 mol/L pH 7,6 com NaCl 0,15 mol/L e foi aplicada em uma matriz de Sepharose-manose (1,0 x 10,0 cm) previamente equilibrada com a mesma solução. A fração não retida (P1) foi eluída com o tampão de equilíbrio, e a partir da flecha, a fração retida (P2) foi eluída com o tampão de equilíbrio contendo 0,1 mol/L de manose..... 55
- FIGURA 9: SDS-PAGE. Poços: 1-** Marcadores moleculares (Fosforilase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrate Carbônica 29 kDa e α - lactoalbumina 14,4 kDa), **2-** Extrato total, **3-** F 0-60 %, **4-** PFL em condições não redutoras, **6-** PFL em condições redutoras..... 56
- FIGURA 10: Propriedades físico-químicas da lectina da PFL.** (A) Estabilidade térmica. (B) Estabilidade a variações de pH..... 57
- FIGURA 11: Análise por Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray.** Espectro de massa deconvoluído mostrando a massa média de PFL..... 58

FIGURA 12: Análise de peptídeos por MS/MS. (A) sequenciamento *De novo* do espectro de massa do peptídeo Q1 obtido da digestão com quimiotripsina. (B) sequenciamento *De novo* do espectro de massa do peptídeo T6 obtido da digestão com tripsina..... 59

FIGURA 13: Mapa de peptídeos obtido pela digestão com tripsina (T) e quimiotripsina (Q). A primeira linha corresponde a sequência da lectina de *Pterocarpus angolensis* (Uniprot: Q8GSD2), as outras linhas são os peptídeos obtidos pela digestão com tripsina (T) e com quimiotripsina (Q) referentes a sequência da PFL. Os aminoácidos idênticos nas sequências estão em preto e os que diferiram estão em vermelho..... 60

FIGURA 14: Alinhamento da sequência parcial de PFL com outras lectinas da tribo Dalbergieae. O alinhamento foi realizado utilizando o programa na internet ESPript 2.2. *P. Angolensis* (Uniprot: Q8GSD2), *P. rotundifolius* (Uniprot: Q6GUG5), *A. hypogaea* (Uniprot: Q43374), *V. macrocarpa* (Uniprot: P81371)..... 61

FIGURA 15: Cristais da lectina de *Platymiscium floribundum*. Condição 37 do Crystal Screen 1 contendo Acetato de Sódio Triidratado 0,1 M pH 4,6 / PEG 4000 8 % (m/v) (A) Cristal da proteína nativa, (B) cristal da proteína complexada com manose..... 62

FIGURA 16: Efeito antiedematogênico da PFL. A lectina foi administrada por via endovenosa (e.v.) nas doses de 0,01; 0,1 ou 1,0 mg/Kg (0,1mL/100g de massa corporal), 30 min. antes da aplicação s.c. do estímulo inflamatório causado pela carragenina..... 63

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Generalidades de Lectinas Vegetais	14
1.2. Aspectos Históricos	16
1.3. Classificação das Lectinas de Acordo com a Estrutura.....	18
1.4. Lectinas de Plantas	20
1.6. Lectinas de Papilionoideae	26
1.7. <i>Platymiscium floribundum</i> Vogel	29
1.8. Aspectos Gerais da Espectrometria de Massa	31
1.9. Cristalização de Proteínas.....	34
1.10. Aspectos Gerais do Processo Inflamatório.....	36
2- OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo Geral	41
2.2. Objetivos Específicos	41
3- MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. Purificação da Lectina de Sementes de <i>P. floribundum</i>	43
3.1.1. Preparação da farinha.....	43
3.1.2. Extração de proteínas de sementes	43
3.1.3. Fracionamento Protéico do Extrato Total.....	43
3.1.4. Dosagem de proteínas	44
3.1.5. Atividade hemaglutinante	44
3.1.6. Cálculo da atividade hemaglutinante específica.....	44
3.1.7. Especificidade por carboidratos.....	45
3.1.8. Cromatografia de afinidade em matriz de sepharose-manose	45
3.2. Caracterização da Lectina de Sementes de <i>P. floribundum</i>	46
3.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	46
3.2.2. Determinação da massa molecular por espectrometria de massa	47
3.2.3. Digestão <i>in gel</i> e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa	47
3.2.4. Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante	48
3.2.5. Efeito de agente quelante sobre a atividade hemaglutinante	48
3.2.6. Efeito do pH Sobre a atividade hemaglutinante	49
3.2.7. Dosagem de carboidratos totais	49
3.3. Cristalização da Lectina de Sementes de <i>P. floribundum</i>	49
3.4. Avaliação da Atividade Antiedematogênica da Lectina de Sementes de <i>P. floribundum</i>	50
3.4.1 Animais.....	50

3.4.2. Drogas e reagentes	50
3.4.3. Atividade antiedematogênica da lectina	50
3.4.4. Análise estatística	50
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Purificação da Lectina de Sementes de <i>Platymiscium floribundum</i>	53
4.2. Caracterização Físico-química da Lectina de Sementes de <i>P. floribundum</i>	55
4.3. Determinação da Massa Molecular Sequenciamento por Espectrometria de Massa	58
4.3. Cristalização da Lectina de Sementes de <i>P. floribundum</i>	61
4.4. Avaliação da Atividade Antiedematogênica da Lectina.....	62
5. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS	66

1-INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades de Lectinas Vegetais

Por muito tempo os carboidratos foram vistos apenas como moléculas envolvidas em processos de geração de energia, na forma de monossacarídeos ou oligossacarídeos, ou, ainda, como material estrutural, como a celulose nas plantas e a quitina dos exoesqueletos de insetos.

O interesse pelo estudo dos carboidratos como moléculas de reconhecimento celular só surgiu por volta de 1968. Antes disso, pouco era pesquisado e divulgado, em grande parte devido à complexidade estrutural dos mesmos e das inúmeras possibilidades de interligações dos carboidratos, o que dificultava o controle estereosseletivo nas reações de síntese e a caracterização estrutural dos produtos obtidos (SHARON & LIS, 1993).

Os carboidratos localizados sobre a superfície das células contribuem com a maioria das interações entre as células e o ambiente. Por formarem uma camada que recobre as células, os carboidratos que constituem o glicocálice são as primeiras moléculas a serem encontrados e reconhecidos por outras células, anticorpos e microrganismos invasores, como vírus e bactérias. Moléculas secretadas, tais como hormônios e toxinas também, se ligam a motivos de carboidratos que atuam como receptores para essas moléculas. Em função do já conhecido papel da glicosilação na comunicação celular, não é surpreendente que padrões de glicosilação anormais são conhecidos como marcadores, ou em alguns casos até mesmo a causa, de certas doenças como, por exemplo, câncer (DENNIS *et al.*, 1999).

Carboidratos agem como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos e podem influenciar fenômenos de diferenciação, proliferação e interações entre células em condições fisiológicas e patológicas. As informações presentes na estrutura dos oligossacarídeos conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células são reconhecidas por um grupo especializado de proteínas, as lectinas (GABIUS, 2000).

As lectinas, por serem moléculas capazes de “decifrar os glicocódigos” codificados na estrutura dos glicoconjugados que compõem as membranas celulares, desempenham um papel fundamental em muitos processos biológicos, tais como comunicação celular, resposta imunológica, fertilização, desenvolvimento de infecções parasitárias e metástase de tumores (GABIUS E GABIUS, 1997).

A habilidade para o reconhecimento e ligação a carboidratos específicos distinguem as lectinas de todas as outras proteínas de plantas. Elas são classicamente consideradas um grupo heterogêneo de proteínas, pois apresentam propriedades bioquímicas e

atividades biológicas acentuadamente diferentes, distintas estruturas moleculares e especificidades (PEUMANS E VAN DAMME, 1995)

Muitas funções têm sido propostas para as lectinas, tais como proteção contra patógenos e insetos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), proteínas de reserva ou reguladores de crescimento (PUSZTAI, 1991).

Atualmente estas proteínas têm mostrado aplicabilidades em diversas áreas científicas, abrangendo aplicações que vão da medicina à agricultura, sendo muitas destas proteínas consideradas como ferramentas básicas para áreas de ponta como a biotecnologia, tendo em vista suas várias propriedades, tais como: atividade anti-inflamatória e pró-inflamatória (FREIRE *et al.* 2003, BENJAMIN *et al.*, 1997, ASSREUY *et al.*, 1997, ALENCAR *et al.*, 2005), atividade inseticida (MACEDO *et al.*, 2007; OHIZUMI *et al.*, 2009, BENETEAU *et al.*, 2010), efeito tóxico para moluscos hospedeiros de *Schistosoma mansoni* (SANTOS *et al.*, 2010), agentes em drug delivery (MAKHLOF *et al.*, 2010), efeito vasodilatador (ASSEREUY *et al.*, 2009), e indução do fenômeno de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001).

Nos vegetais as lectinas têm sido encontradas em organismos mais simples como algas (LIMA *et al.*, 2005) e musgos (MOLINA & VINCENTE, 1995) até os mais complexos como gimnospermas (HAN *et al.*, 2005) e angiospermas (WONG & NG, 2005; KAUR *et al.*, 2005). De todos esses grupos, as angiospermas têm sido as mais investigadas, sendo que algumas centenas de lectinas já foram isoladas e caracterizadas de plantas pertencentes a diferentes famílias dessa divisão.

A localização das lectinas em vegetais é muito ampla. Elas podem existir em vários tecidos da mesma planta e têm diferentes localizações celulares e propriedades moleculares. As lectinas são mais abundantes nas sementes, porém podem facilmente ser encontradas em partes vegetativas. Em sementes de leguminosas estão prevalentemente nos tecidos cotiledonares (PUSZTAI, 1991).

Apesar das lectinas terem sido descobertas há mais de 100 anos, estas proteínas permaneceram por muitas décadas como meras curiosidades científicas. Foi somente a partir dos anos 60 que a comunidade científica despertou um real interesse por estas moléculas. Atualmente, entretanto, estas proteínas têm mostrado aplicabilidades em diversas áreas científicas, que vão da medicina à agricultura, sendo muitas destas proteínas consideradas como ferramentas básicas para áreas como a biotecnologia, tendo em vista suas várias propriedades.

Embora lectinas apresentem a propriedade comum de se ligar, reversivelmente, a carboidratos específicos, elas apresentam características próprias, principalmente no que diz respeito a aplicações biológicas. Isto faz com que, via de regra, cada lectina tenha as suas potencialidades de aplicação, o que justifica que cada uma delas, por mais semelhante que possa parecer com outra lectina estruturalmente, mereça ser estudada separadamente.

Fica evidente, então, que a descoberta, o isolamento e a caracterização química, físico-química e biológica de novas lectinas se revestem de grande importância, na medida em que novas lectinas com diferentes aplicabilidades podem ser encontradas. A descoberta de novas lectinas com especificidades diferentes torna-se atrativa, uma vez que podem servir como novos modelos para o entendimento destes processos dinâmicos de comunicação célula-molécula, célula-célula e célula-microrganismo.

1.2. Aspectos Históricos

No final do século XIX, várias evidências indicavam a existência na natureza de proteínas com a capacidade de aglutinar eritrócitos. Essas proteínas foram denominadas inicialmente de hemaglutininas, ou fitoaglutininas por terem sido originalmente encontradas em plantas (SHARON E LIS, 2004).

A primeira descrição do que agora conhecemos como lectinas vegetais data de antes de 1888, quando Stillmark publicou sua dissertação intitulada “Ricina, um fermento tóxico de sementes de *Ricinus communis* L. e algumas outras espécies de euforbiáceas”. Embora, agora esteja evidente que a ricina de Stillmark era uma complexa mistura de moléculas tóxicas de ricina e aglutininas não tóxicas, seu trabalho pioneiro foi um marco na biologia, pois foi o primeiro a unir a toxicidade da mamona à ocorrência de um fator protéico hemaglutinante. Além disso, sua descoberta foi também um marco na bioquímica de plantas porque a ricina foi à primeira proteína vegetal cuja atividade biológica pôde ser determinada (VAN DAMME *et al.*, 1998, SHARON & LIS, 2004).

Posteriormente, substâncias tóxicas similares a ricina foram identificadas em sementes de *Croton tiglium* (crotina), *Abrus precatorius* (abrina) e em casca de *Robinia pseudoacacia* (robina). Em 1898, Elfstrand introduziu pela primeira vez o termo “hemaglutinina” como um nome comum a todas as proteínas vegetais capazes de aglutinar células. Este termo foi inspirado na similaridade entre a visível atividade macroscópica das proteínas vegetais e a das aglutininas do soro humano e animal, primeiramente descrito por Landois em 1875 (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Ricina e Abrina foram amplamente utilizadas como modelos de antígenos em estudos imunológicos. Isto permitiu a Paul Ehrlich, do Instituto Real de Terapia Experimental (Frankfurt), estabelecer no final da década de 1890, vários dos princípios fundamentais da imunologia, dentre estes, a especificidade da relação antígeno/anticorpo, o fenômeno da memória imunológica e a transferência da imunidade humoral de mãe para filho (SHARON E LIS, 2004).

A idéia de que a toxicidade é uma propriedade intrínseca das lectinas foi abandonada no início do século XX, depois que Ladsteiner e Raubitscheck em 1907 relataram pela primeira vez a presença de uma lectina não tóxica nas leguminosas *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha) e *Vicia sativa*. Após esse trabalho muitas outras hemaglutininas vegetais não tóxicas foram descobertas. Tornou-se, a partir de então, evidente que lectinas estão difundidas no reino vegetal e que a toxicidade atribuída às mesmas, é exceção, e não regra (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Em 1919, James Sumner isolou a partir das sementes de *Canavalia ensiformes*, utilizando a técnica de cristalização, uma proteína que ele próprio nomeou de concanavalina A (ConA) e obteve dessa forma a primeira lectina pura. Contudo, somente em 1936, Sumner e Howell demonstraram que a concanavalina A aglutinava células tais como eritrócitos e também precipitava glicogênio de soluções. Eles demonstraram também que a hemaglutinação era inibida pela sacarose da cana-de-açúcar, demonstrando pela primeira vez a especificidade das lectinas por açúcares (SHARON E LIS, 2004). Mas só em 1952 é que foi demonstrado que as propriedades hemaglutinantes de lectinas eram baseadas em uma atividade específica de ligação a carboidratos (WATKINS E MORGAN, 1952).

O marco seguinte na história das lectinas vegetais foi a descoberta realizada por Renkonen em 1948 e Boyd e Reguera em 1949 de que algumas hemaglutininas exibem uma clara preferência a eritrócitos de um grupo particular de tipo sanguíneo dentro do sistema ABO. Observou-se que algumas proteínas vegetais obtidas de sementes de plantas podiam reconhecer um grupo específico e aglutiná-lo, onde hemácias do sistema ABO respondiam ao contato com essas hemaglutininas de maneira distinta, umas aglutinando e outras não (VAN DAMME *et al.*, 1998). A habilidade das aglutininas de plantas em distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou Boyd e Shapleigh a propor em 1954 o termo “lectina” (do latim *legere*, que significa selecionar ou escolher) para nomear essas proteínas (SHARON E LIS, 2004).

Outro grande marco na história das lectinas ocorreu em 1960, quando Petter C. Nowell, demonstrou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) possui atividade mitogênica

sobre linfócitos. Essa descoberta teve um impacto revolucionário sobre a imunologia, pois até aquele momento acreditava-se que os linfócitos eram células incapazes de se dividirem ou de se diferenciarem em outros tipos celulares (SHARON & LIS, 2004).

Ao serem reconhecidas como proteínas ligantes de carboidratos, as lectinas puderam ser distinguidas de outras proteínas com base em um critério funcional bem definido. Goldstein *et al.* (1980) conceituou lectinas como sendo proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune ligantes a carboidratos que são capazes de aglutinar células e/ou precipitar polissacarídeos ou glicoconjugados.

Uma das mais recentes e aceitas definições de lectinas de plantas, foi apresentada por Peumans & Van Damme (1995), que define lectinas como sendo proteínas de origem não imune, que aglutinam células e glicoconjugados e são capazes de se ligar reversível e especificamente a carboidratos e substâncias que contenham açúcar, sem alterar a estrutura covalente de nenhum ligante glicosil.

1.3. Classificação das Lectinas de Acordo com a Estrutura

As lectinas formam um grupo de proteínas muito heterogêneas. Van Damme *et al.* (1998) subdividiu as lectinas vegetais de acordo com os tipos estruturais em quatro classes principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 1).

As merolectinas são proteínas que consistem exclusivamente de único domínio de ligação a carboidrato. Devido seu caráter monovalente, as merolectinas são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. A heveína, uma proteína do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*), que se liga à quitina, é uma típica merolectina (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

As hololectinas também são compostas exclusivamente de domínios de carboidratos ligantes, mas com dois ou mais sítios ligantes que são idênticos ou parecidos. Devido a hololectinas serem divalentes ou multivalentes, elas podem aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. As hololectinas comportam-se como verdadeiras aglutininas e compreendem a maioria das lectinas de plantas e representam a classe de lectinas mais bem estudada. São exemplos típicos de hololectinas aquelas encontradas em sementes de plantas pertencentes à subtribo Diocleinae (CAVADA *et al.*, 2001).

As quimerolectinas são a fusão de proteínas compostas de um ou mais domínios de carboidratos ligantes e de um domínio não relacionado, com uma atividade catalítica bem definida, e que age independentemente dos domínios de carboidratos ligantes. Dependendo do

número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou hololectinas. Um representante deste grupo são as proteínas inativadoras de ribossomos (RIP tipo 2), como por exemplo a ricina (toxina da mamona), que possui dois domínios de ligação para carboidratos comportando-se como uma hololectina e um domínio para a inativação do ribossomo (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). Outro exemplo é a PPL-2, uma lectina quitina-ligante isolada de sementes de *Parkia platycephala* que possui, além do sítio ligante a carboidrato, um sítio catalítico com atividade endoquitinásica (CAVADA *et al.*, 2006).

As superlectinas consistem de no mínimo dois domínios de ligação para carboidratos. Diferente das hololectinas os domínios de ligação para carboidratos das superlectinas reconhecem açúcares estruturalmente e funcionalmente diferentes. Como exemplo, a lectina do bulbo de tulipa (TxLCI) que são formados por dois domínios de ligação a carboidrato, que reconhecem manose e N-acetil galactosamina, respectivamente (VAN DAMME *et al.*, 1996).

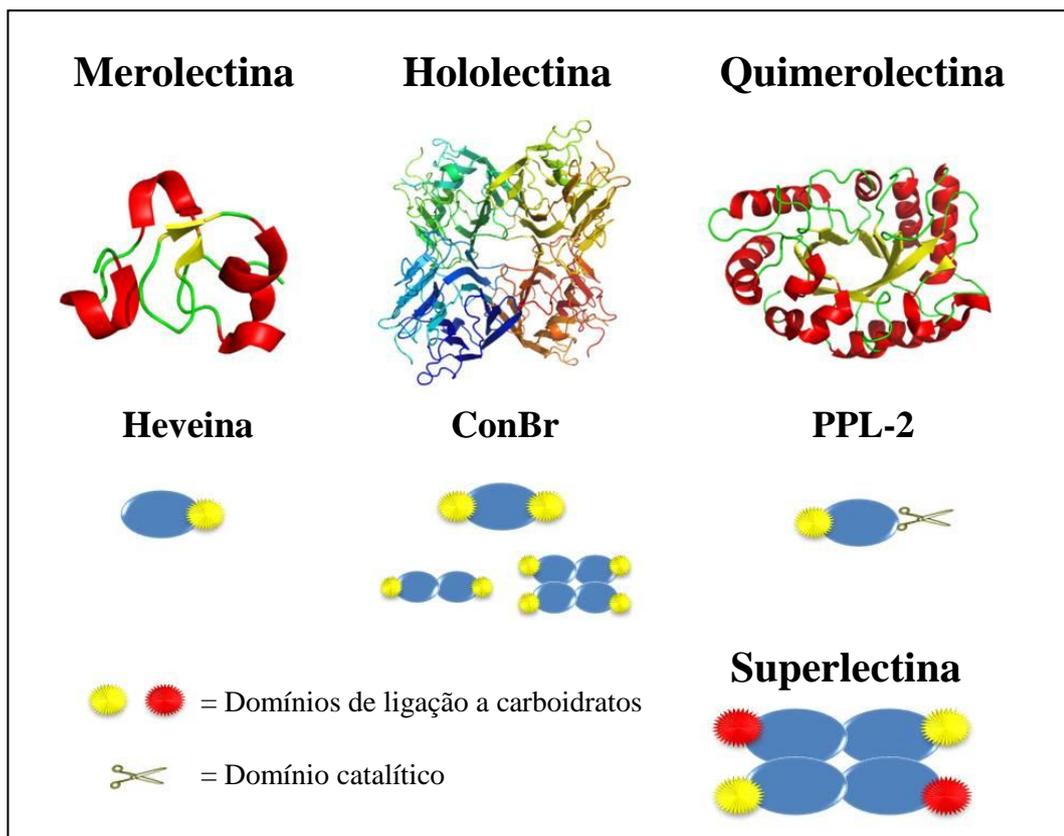


Figura 1. Classificação estrutural das lectinas vegetais. Representação esquemática de merolectinas (Heveína; PDB: 1Q9B), hololectinas (ConBr; PDB: 3JU9), quimerolectinas (PPL-2; PDB: 2GSJ) e superlectinas, estas últimas não possuem representantes com estrutura tridimensional elucidada. Adaptado de Peumans & Van Damme, 1999.

1.4. Lectinas de Plantas

Nos vegetais, as lectinas são detectadas em centenas de espécies de plantas. A maioria das lectinas vegetais estudadas foi obtida de semente, principalmente em leguminosas, onde são acumuladas no período de maturação e desaparecem após a germinação. As lectinas constituem cerca de 10 % das proteínas totais de semente, porém a quantidade isolada é pequena: varia entre 0,1-1 % deste total (LORIS, 2002; SHARON & LIS, 2004).

Apesar das lectinas serem amplamente distribuídas no reino vegetal, abrangendo principalmente as famílias Leguminosae, Gramineae, Algae, Euphorbiaceae, entre outras, a família Leguminosae é a que apresenta o maior número de lectinas isoladas e destas destacam-se principalmente as de sementes (SHARON, 1993; PRAKASHKUMAR *et al.*, 1998; LORIS *et al.*, 1998), embora possam ser encontradas também em outras partes das plantas, como folhas (RATANAPO *et al.*, 2001), frutos (SAMPIETRO *et al.*, 2001), raízes de algumas Convolvulaceae (PEUMANS *et al.*, 1997; VAN DAMME *et al.*, 1997) e tubérculos (SUSEELAN *et al.*, 2002).

Van Damme e colaboradores (1998) classificaram as lectinas de plantas em sete grupos, ou famílias, de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas. Esses grupos são nomeados de: lectinas de leguminosas, lectinas ligantes a quitina contendo domínios heveínicos, lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose, proteínas inativadoras de ribossomo tipo II (RIPs tipo II), lectinas de floema de Cucurbitaceae, lectinas relacionadas à jacalina e lectinas de Amaranthaceae (Figura 2).

As lectinas de leguminosas correspondem à família de lectinas mais estudada até o presente, com dezenas de representantes já purificados e caracterizados. As proteínas desse grupo caracterizam-se por possuírem uma alta similaridade estrutural, porém, com especificidade por carboidratos e propriedades biológicas distintas. Se enquadram nesse grupo a Concanavalina-A (ConA), extraída de sementes de *Canavalia ensiformes*, e as lectinas extraídas de outras plantas da subtribo Diocleinae (CAVADA *et al.*, 2001).

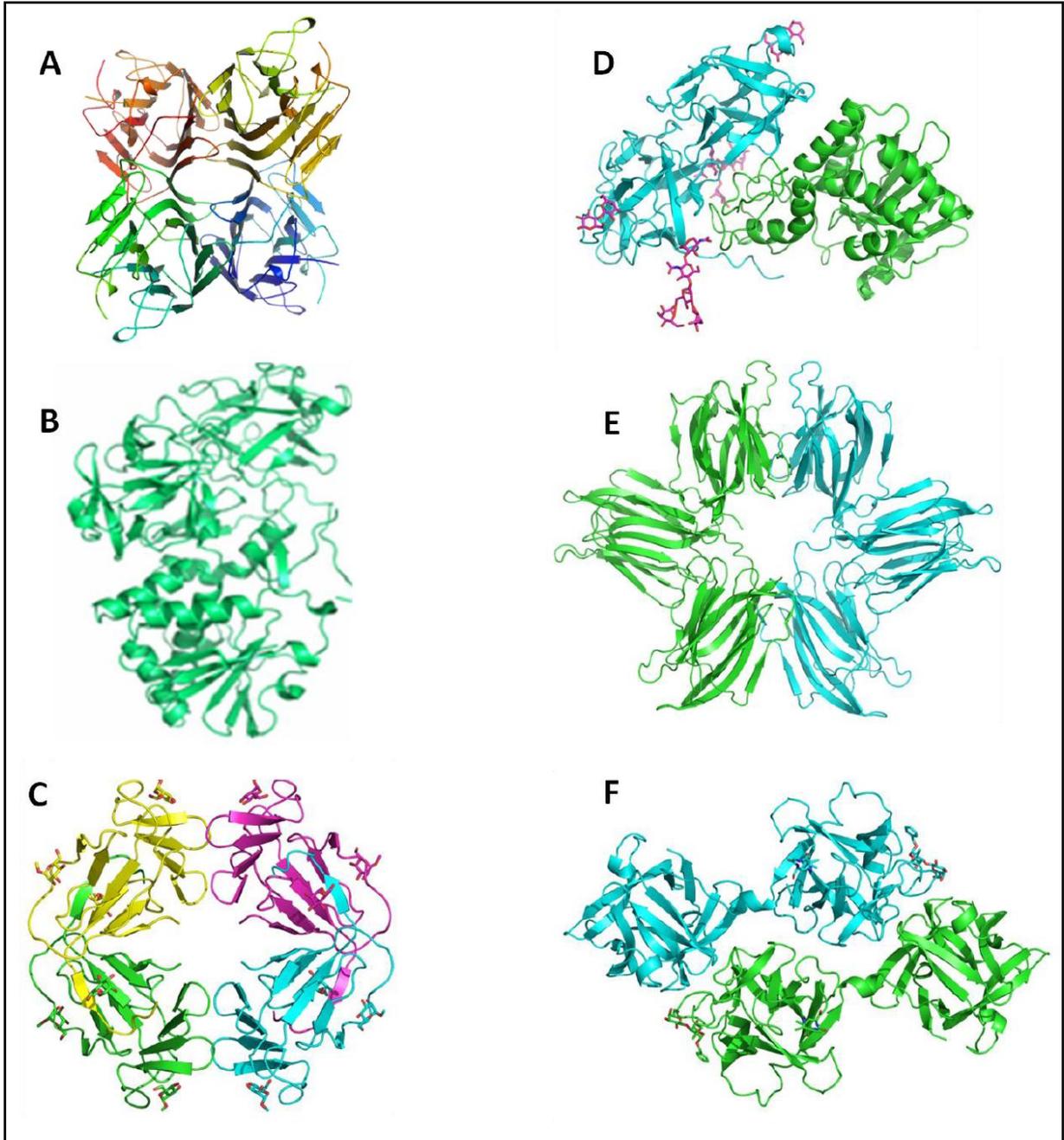


Figura 2. Classificação das Lectinas Vegetais. (A) Lectinas de leguminosas, *Canavalia brasiliensis* (ConBr); (B) Lectina ligante à quitina compostas por domínios heveínicos, Heveína; (C) Lectina de monocotiledôneas ligantes à manose, *Galanthus nivalis* agglutinina (GNA); (D) RIP's do tipo II, Ricina; (E) Lectinas relacionadas às Jacalinas, *Parkia platycephala* (PPL-1); (F) Lectina da família da amarantina, *Amaranthus caudatus* (ACA). Fonte: PDB.

As lectinas que se ligam a quitina são capazes de se ligar a resíduos de N-acetilglicosamina (principal unidade monomérica constituinte da quitina) e têm como característica principal o fato de possuir um domínio heveínico em suas moléculas (VAN DAMME *et al.*, 1998). O termo “domínio heveínico” refere-se a uma pequena proteína (uma merolectina) de 43 resíduos de aminoácidos, extraída do látex da *Hevea brasiliensis*, a

popular seringueira (WALJUNO *et al.*, 1975). Lectinas pertencentes a esse grupo têm sido encontradas em várias famílias de plantas não relacionadas taxonomicamente tais como Gramineae, Leguminosae, Solanaceae, Urticaceae, Papaveraceae e Amaranthaceae. São também exemplos de lectinas que se ligam a quitina as quitinases classe I (COLLINGE *et al.*, 1993).

O termo “lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose” refere-se a uma família de lectinas estreitamente relacionadas que possuem especificidade para manose, encontradas exclusivamente em plantas monocotiledôneas, como nas famílias Amaryllidaceae, Alliaceae, Araceae, Liliaceae, Orchidaceae e Bromeliaceae. Estudos comparativos indicam que essas proteínas compartilham um alto grau de similaridade de sequência primária, porém com uma completa heterogeneidade de estrutura molecular (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As proteínas inativadoras de ribossomos tipo II (RIPs tipo II) são lectinas do tipo quimerolectina formadas por duas cadeias polipeptídicas sintetizadas a partir de uma única molécula precursora a qual é pós-transducionalmente processada através da excisão de uma ligação entre as cadeias. A primeira dessas cadeias (cadeia A) é formada por um polipeptídeo constituído de um domínio adenosina glicosidase e a outra cadeia (cadeia B) constituída por um domínio de ligação a carboidratos, sendo que as cadeias permanecem unidas por pontes dissulfeto. Ao penetrar nas células, esta ligação dissulfeto é quebrada e a cadeia A adquire uma forte atividade N-glicosidase tornado-se capaz de inativar cataliticamente ribossomos eucarióticos e procarióticos (VAN DAMME *et al.*, 1998). A Ricina (*Ricinus communis*) e Abrina (*Abrus precatorius*) são exemplos clássicos de RIPs tipo 2 com potentes atividades biológicas (PEUMANS *et al.*, 2001).

As lectinas do floema de Curcubitaceae são proteínas diméricas composta de duas subunidades idênticas de 24 kDa que se ligam a resíduos de N-acetilglicosamina. Todas as lectinas conhecidas dos floemas de Curcubitaceae mostram um grau de similaridade sequencial, mas não apresentam qualquer similaridade sequencial com outras lectinas de plantas ou proteínas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A expressão “lectinas relacionadas à Jacalina” é usada para nomear um grupo de lectinas que são evolucionaria e estruturalmente relacionadas a Jacalina, uma lectina com especificidade para D-galactose extraída de sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*). Esse tipo de lectina é encontrada principalmente em espécies de Moreaceae e Convolvulaceae (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A amarantina, uma lectina extraída de *Amaranthus caudatus*, não se assemelha a nenhuma outra lectina de plantas, tanto com relação a seqüência de aminoácidos quanto com relação a estrutura tridimensional. Baseado nessas informações, a amarantina é considerada um protótipo da família de lectinas das Amaranthaceae. Várias outras lectinas extraídas de plantas do gênero *Amaranthus*, como por exemplo *Amarantus leucocarpus*, contêm lectinas que são muito similares à amarantina, sendo todas elas lectinas ligantes específicas por N-acetilgalactosamina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Apesar de parecer clara, esta classificação das lectinas vegetais tende a deixar de ser baseada em aspectos evolutivos e passa a levar em conta somente os aspectos estruturais. Isso se dá pelo fato de que, à medida que novas lectinas vão sendo descobertas e caracterizadas, deixa de existir um limite taxonômico bem definido entre as famílias de lectinas vegetais. Um exemplo claro deste fato é a lectina específica para glicose e manose extraída de sementes da leguminosa *Parkia platycephala*, cuja estrutura é composta por três domínios repetidos relacionados a jacalina (MANN *et al.*, 2001; GALEGO DEL SOL *et al.*, 2005).

1.5. Lectinas de Leguminosas

A maioria das lectinas de dicotiledôneas estudadas foi isolada de plantas de tribos da família das Leguminosas. As lectinas de leguminosas constituem uma ampla família de proteínas estreitamente relacionadas, encontradas exclusivamente em espécies representativas da família Leguminosae. Elas estão presentes em sementes, folhas, caules e raízes (SHARON & LIS, 1990; LORIS *et al.*, 1998).

Até o momento, dezenas de lectinas desta família já foram isoladas e caracterizadas, principalmente lectinas de sementes, onde o percentual de pode variar de 1 a 10 % do total de proteínas solúveis, embora algumas espécies possam apresentar concentrações acima de 50 %, ou abaixo de 0,1 % do total de proteínas solúveis presentes nas sementes. (SHARON & LIS, 1990; VAN DAMME, *et al.*, 1998).

Este grupo de lectinas requer cátions divalentes para manutenção de atividade biológica. Os íons Ca^{+2} e Mn^{+2} estabilizam o sítio de ligação a carboidrato bem como fixam as posições dos aminoácidos que interagem com os carboidratos ligantes. Os aminoácidos envolvidos na ligação desses íons são bastante conservados (WEIS & DRICKAMER, 1996).

Sabe-se que as lectinas de Leguminosas são sintetizadas no retículo endoplasmático na forma de pré-pro-lectinas. Essa proteína imatura possui na sua extremidade N-terminal um peptídeo sinal, com 20 a 30 resíduos de aminoácidos, que é removido posteriormente durante o transporte da pré-pro-lectina para o lúmen do retículo endoplasmático, originando uma pró-lectina. A pró-lectina passa então por uma série de modificações pós-traducionais, como glicosilação e clivagens proteolíticas, dando origem a lectina madura (SHARON & LIS, 1990).

Do ponto de vista estrutural as lectinas de leguminosas são geralmente compostas de 2 ou 4 subunidades, iguais ou diferentes com massa molecular em torno de 25 a 30 kDa. Cada uma destas subunidades apresenta um único sítio de ligação a carboidratos com a mesma especificidade. Frequentemente, suas subunidades são compostas de uma única cadeia polipeptídica e sua união é estabelecida por forças não covalentes como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, que formando dímeros canônicos e estabilizam o tetrâmero pela união destes dímeros. Entretanto, algumas lectinas possuem subunidades formadas por 2 cadeias polipeptídicas, entre elas as lectinas da tribo Viciae, gêneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, e *Lens*. Estas lectinas são dímeros formados por duas subunidades iguais e cada subunidade é constituída de uma cadeia α (5 a 7 kDa) e uma β (15 a 19 kDa) mantidas por ligações não-covalentes (SHARON & LIS, 1989).

Algumas lectinas de leguminosas podem ser encontradas em diferentes isoformas, como, por exemplo, a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) que é formada por duas subunidades gênicas diferente, denominadas E (31,7 kDa) e L (29,9 kDa), que combinadas dão origem a uma família de cinco isolectinas tetraméricas: E4, E3L, E2L2, EL3, L4 (FELDSTED *et al.*, 1977). Além da heterogeneidade genética, ou seja, mais de um gene codificando uma lectina, a ocorrência de isoformas pode ser atribuída a processamentos pós-traducionais incompletos (YOUNG *et al.*, 1995).

Outras lectinas de diferentes partes vegetais existem como uma complexa mistura de isoformas, como por exemplo, as lectinas de *Robinia pseudoacacia* (VAN DAMME *et al.*, 1995), do gênero *Erythrina* (BONNEIL *et al.*, 2004), de *Acacia constricta* (GUZMAN-PARTIDA *et al.*, 2004) e de *Amaranthus leucocarpus* (HERNANDEZ *et al.*, 2001). A presença de isoformas têm alto impacto sobre a função biológica de lectinas, e a existência de várias isoformas poderiam oferecer uma estratégia alternativa ou uma adaptação evolutiva para compensar a baixa especificidade.

As estruturas dos monômeros de diferentes lectinas de leguminosas são extremamente similares e podem ser descritas como um β -sanduíche rígido consistindo de

seis folhas-beta (atrás) e outro curvado de sete folhas-beta (frente), além de uma terceira pequena folha beta, consistindo de cinco folhas ligadas por duas maiores (BANERJEE *et al.*, 1996; HAMELRYCK *et al.*, 1998).

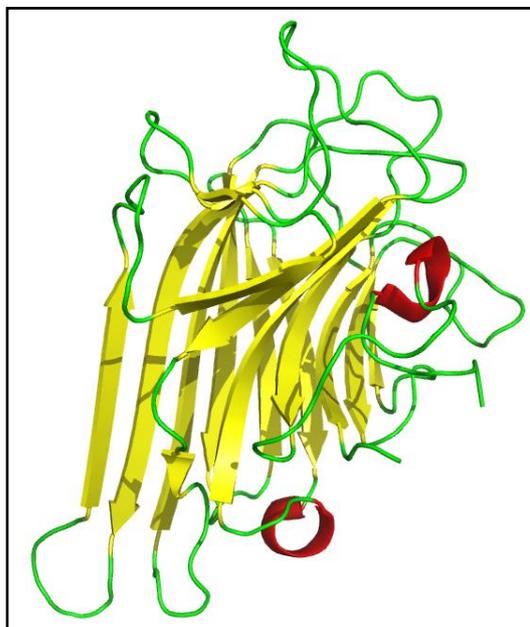


Figura 3: Monômero de uma lectina de leguminosa. Estrutura do monômero da lectina ConBr (PDB: 3JU9).

O sítio de ligação a carboidratos está localizado no lado côncavo do β -sanduíche, próximo ao sítio de ligação a metais. O sítio de reconhecimento a carboidratos consiste de diversos “*loops*” com diferentes graus de variabilidade (SHARMA & SUROLIA, 1997). As conformações destes *loops* são determinadas pela presença de íons de metais de transição, como o cálcio e o manganês, na estrutura (LORIS *et al.*, 1998; BOUCKAERT *et al.*, 2000). A ausência desses metais resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004).

Além de um sítio de ligação a carboidratos, altamente conservado, juntamente com um sítio de ligação a metais, que é responsável pela estabilização do “*loop*” que compõe o sítio de ligação a carboidratos, estudos recentes mostraram a capacidade dessas proteínas interagirem com compostos hidrofóbicos. Algumas lectinas de leguminosas podem interagir com outras espécies de moléculas, que não carboidratos, tais como adenina (HAMELRYCK *et al.*, 1999) e ácido aminobutírico (ABU) (DELATORRE *et al.*, 2007). A ligação das lectinas a essas moléculas se dá através de uma região estrutural hidrofóbica, altamente conservada em muitas lectinas de leguminosas e que, devido a esse alto grau de conservação, pode estar envolvida em algum papel biológico importante (DELATORRE *et al.*, 2007).

Algumas lectinas de leguminosas, como as lectinas extraídas de espécies da subtribo Diocleinae, exibem uma oligomerização dependente de pH, onde a proporção entre proteínas no estado dimérico e no estado tetramérico pode ser alterada de acordo com pH do meio (CALVETE *et al.*, 1999; NAGANO *et al.*, 2008). A alteração desse equilíbrio dímero/tetrâmero dependente de pH pode influenciar diretamente nas atividades biológicas dessas lectinas, pelo fato dessas proteínas serem capazes de se ligar aos receptores glicoconjugados da superfície das membranas com uma maior afinidade quando na forma tetramérica (DELATORRE *et al.*, 2006).

1.6. Lectinas de Papilionoideae

As lectinas de Leguminosas representam o grupo mais bem estudado dentre as lectinas de plantas, sendo a maioria dos estudos de lectinas extraídas de membros da subfamília Papilionoideae, principalmente da tribo Phaseoleae (MANN *et al.*, 2001).

A subfamília Papilionoideae está representada por 483 gêneros e 13.800 espécies divididas em 28 tribos. No Brasil são 88 gêneros e 180 espécies nativas (BARROSO *et al.* 1991; LEWIS *et al.*, 2005). Muitas lectinas de espécies desta subfamília foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente. São exemplos as lectinas de *Sesbania aculeata* (BISWAS *et al.*, 2009), *Cajanus cajan* (NAEEM *et al.*, 2001), *Camptosema ellipticum* (BATISTA *et al.*, 2010), *Canavalia grandiflora* (CECCATTO *et al.*, 2002), *Dioclea guianensis* (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2010) e *Dioclea rostrata* (DELATORRE *et al.*, 2006).

Várias atividades biológicas têm sido descritas para as lectinas extraídas de espécies da subfamília Papilionoideae como atividade antifúngica (ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2010), efeito tóxico para moluscos hospedeiros de *Schistosoma mansoni* (SANTOS *et al.*, 2010), efeito anti-inflamatório e analgésico (NUNES *et al.*, 2009), atividade antinociceptiva (FIGUEIREDO *et al.*, 2009), efeito vasodilatador (ASSEREUY *et al.*, 2009), relaxamento da aorta e formação de óxido nítrico (GADELHA *et al.*, 2005).

A tribo Dalbergieae compreende cerca de 48 gêneros e 1.200 espécies. Até o presente momento foram relatadas a presença de lectinas nas espécies *Vatairea macrocarpa* (CAVADA *et al.*, 1998), *Lonchocarpus carpassa* (JOUBERT, SHARON E MERRIFIELD, 1986), *Lonchocarpus sericeus* (ALENCAR *et al.*, 1999), *Andira fraxinifolia* (RANGEL *et al.*, 2009), *Machaerium acutifolium* (BEZERRA *et al.*, 2003), *Platypodium elegans* (BENEVIDES, 2008), *Platymiscium floribundum* (PEREIRA-JÚNIOR, 2008), *Pterocarpus rotundifolius* (MARONDEDZE *et al.*, 2004), *Pterocarpus angolensis* (LORIS *et al.*, 2003).

Apesar de pertencer a mesma tribo, as lectinas de espécies da tribo Dalbergia apresentam especificidade por açúcares diferentes (Tabela 1).

Tabela 1: Especificidade por açúcares das lectinas da tribo Dalbergieae

Lectina	Especificidade por açúcar
<i>Vatairea macrocarpa</i>	Galactose/N-acetilgalactosamina
<i>Lonchocarpus carpassa</i>	Galactose/N-acetilgalactosamina/Glicose
<i>Lonchocarpus sericeus</i>	N-acetilglicosamina
<i>Andira fraxinifolia</i>	Manose
<i>Machaerium acutifolium</i>	N-Acetilglicosamina/ α -metil-Glicopiranosídeo
<i>Platypodium elegans</i>	Manose/Glicose
<i>Pterocarpus angolensis</i>	Manose/Glicose
<i>Platymiscium floribundum</i>	Manose/N-Acetilglicosamina

A lectina extraída de *Vatairea macrocarpa* é uma proteína ligante a galactose/N-acetilgalactosamina, formada por quatro subunidades de 26 kDa que formam um tetrâmero em solução independente do pH (RAMOS *et al.*, 2000). Seus efeitos biológicos incluem indução da infiltração de leucócitos em edema de pata (ALENCAR *et al.*, 2004), liberação de mediadores quimiotáticos por macrófagos (ALENCAR *et al.*, 2007), aumento da resistência vascular renal, taxa de filtração glomerular e fluxo urinário (MARTINS *et al.*, 2005), migração de neutrófilos *in vivo* por mecanismo indireto (ALENCAR *et al.*, 2003) e apresenta especificidade para resíduos de antígeno Tn (DAM *et al.*, 2007).

Algumas atividades biológicas também foram evidenciadas em uma lectina extraída de sementes de *Lonchocarpus sericeus*, como alta atividade anti-inflamatória em modelo de edema de pata (ALENCAR *et al.*, 1999), efeito anti-inflamatório e antibacteriano em um modelo de peritonite infecciosa (ALENCAR *et al.*, 2005) e diminuiu a migração leucocitária e hipernocicepção mecânica pela inibição da produção de citocinas e quimiocinas (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

A lectina GlcNAc específica extraída de sementes de *Platypodium elegans* (PEL) apresentou atividade termiticida promissora contra operários e soldados de *Nasutitermes corniger*, além de um grande potencial fungicida contra os fungos *Fusarium solani*, *Fusarium*

oxysporum e *Fusarium lateritium* (BENEVIDES *et al.*, 2008). Essas duas atividades reforçam a evidência da participação das lectinas na defesa vegetal, atuando contra fitopatógenos.

De acordo com Pereira-Júnior (2008), as sementes de *Platymiscium floribundum* possuem pelo menos uma lectina específica por manose e N-acetilglicosamina e seus derivados, capaz de aglutinar hemácias de coelho, mas que não aglutina hemácias do Sistema ABO. Esse trabalho descreveu o isolamento e a purificação parcial desta lectina, que apresentou grande estabilidade térmica de 37 a 60 °C para exercer sua atividade biológica.

Dentre as lectinas da tribo Dalbergieae, a lectina ligante de manose/glicose de *Pterocarpus angolensis*, denominada de PAL, foi a única que teve sua estrutura determinada (LORIS *et al.*, 2003)(Figura 4). A sua estrutura contém um loop clássico de especificidade a manose, mas seu loop de ligação a metal assemelha-se a de lectinas com especificidades não relacionadas como *Ulex europeus* e *Maackia amurensis*. Como consequência, as interações com a manose no sítio primário de ligação são conservadas, porém, este sítio de ligação apresenta detalhes na periferia de sua estrutura. Estas observações explicam as diferenças em seus respectivos perfis de especificidade para oligomanoses (LORIS *et al.*, 2004).

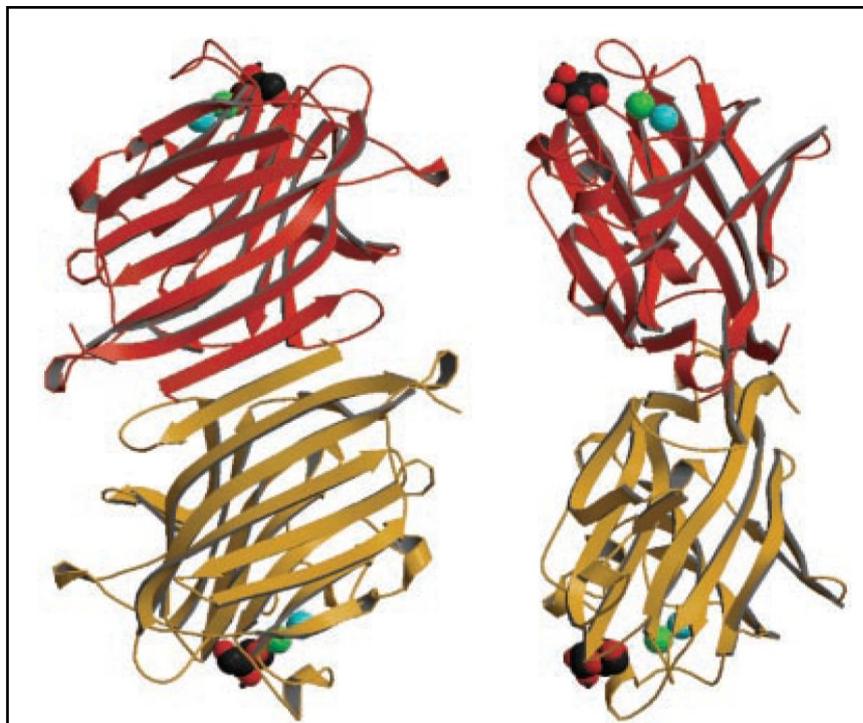


Figura 4: Estrutura geral da lectina de P. Angolensis. Representação esquemática do dímero de PAL em duas orientações ortogonais. Um monômero colorido de laranja e o outro de amarelo. Os íons de manganês são mostradas como esferas azuis e íons de cálcio como esferas verdes. As moléculas de ligantes Me- α -D-glicopiranosídeo também estão representados. Adaptado de LORIS *et al.*, 2003.

Outros estudos realizados investigaram a interação entre o sítio de ligação de metal, atividade de reconhecimento e ligação a carboidratos, estabilidade e estrutura da lectina de *P. angolensis*. Estes resultados juntos com dados termodinâmicos contribuem para o melhor entendimento das interações lectina-carboidrato (GARCIA-PINO *et al.*, 2006; GARCIA-PINO *et al.*, 2007; BUTS *et al.*, 2006).

Parece promissor e importante à identificação e caracterização de novas lectinas, possíveis fontes de novas ferramentas biotecnológicas. Em face da grande versatilidade das lectinas, resolveu-se caracterizar a lectina de sementes de *Platymiscium floribundum* (PFL).

1.7. *Platymiscium floribundum* Vogel

Platymiscium floribundum Vogel (Figura 5) é uma espécie pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Dalbergieae DC. É conhecido popularmente como mocó, pau-mocó, sacambu ou jacarandá-amarelo.

Exsicatas da árvore de *P. floribundum* foram identificadas taxonomicamente pelo Dr. Afrânio G. Fernandes, do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará - UFC.

Platymiscium é um gênero neotropical estabelecido por Vogel em 1837, distribuindo-se do norte do México ao sul do Brasil e Bolívia, com ocorrência em quase toda a América Central e do Sul. Geralmente as espécies habitam tanto ambientes secos como úmidos, ocorrendo em altitudes abaixo de 1.000 m, podendo, no entanto atingir até 2.100 m. as espécies pertencentes ao gênero *Platymiscium* em sua grande maioria se tratam de árvores de altura média a alta atingindo de 7 a 33 m de altura com 5 a 120 cm de diâmetro (KLITGAARD, 1999).

O gênero é definido inequivocamente como Leguminosae baseado na combinação das seguintes características: folhas opostas, estípulas interpeciolares e flores amarelas (KLITGAARD, 1999; GENTRY, 1993). Em todas as recentes classificações, *Platymiscium* tem sido alocada como pertencente à tribo Dalbergieae apresentando fortes afinidades com os gêneros *Pterocarpus*, *Machaerium* e *Dalbergia*.

A madeira da *P. floribundum* é apropriada para construção civil, como caibros, vigas, batentes de portas e janelas, portas maciças, marcenaria fina, cabos de peças de cutelaria, puxadores e gavetas; pode ser utilizada no paisagismo por ser bastante ornamental; é indicada para reflorestamentos mistos e recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 1998).



A



B



C

Figura 5. Fotos de *Platymiscium floribundum* Vogel. (A) Árvore de *P. floribundum*, (B) vagens secas e (C) sementes maduras. Árvore localizada no sítio Carás do Umari, Juazeiro do Norte-CE.

1.8. Aspectos Gerais da Espectrometria de Massa

Em linhas gerais, a espectrometria de massa (MS) é uma técnica capaz de determinar a relação entre massa e carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa (AEBERSOLD & MANN, 2003). Um espectrômetro de massa consiste fundamentalmente de três partes: uma fonte de ionização, que é fundamental para gerar os íons das moléculas de interesse a serem analisadas, um analisador, que separa as moléculas pela sua m/z e um detector que converte os íons em sinais eletrônicos capaz de serem interpretados por um computador (Figura 6). As fontes de ionização empregadas em MS aplicada à análise proteômica são *Electrospray* (ESI) (FENN *et al.*, 1989) e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) (KARAS & HILLENKAMP, 1988) tendo a função de ionizar (de maneira suave, preservando assim a estrutura polipeptídica) e transferir as espécies a serem analisadas para a fase gasosa.

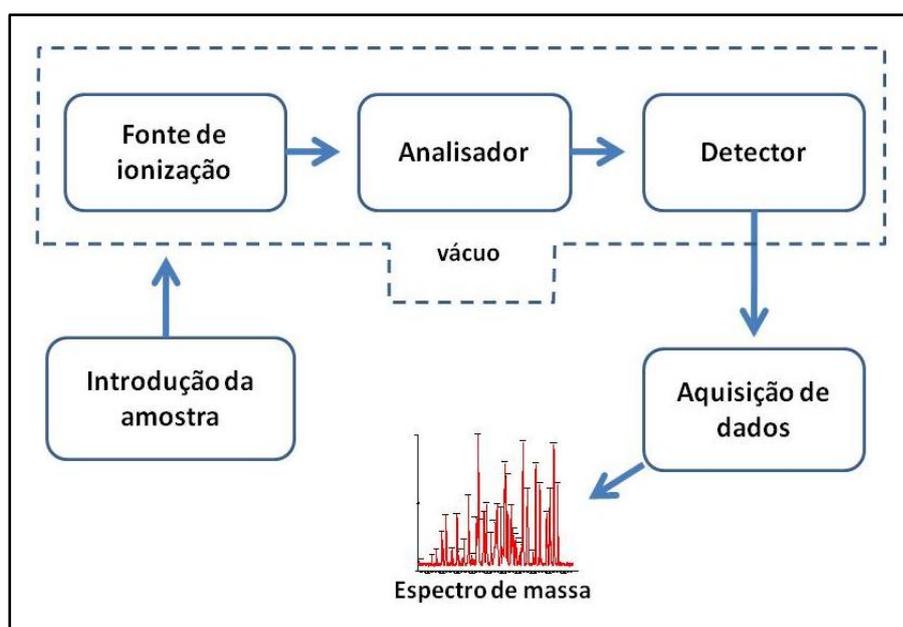


Figura 6. Esquema dos componentes principais de um espectrômetro de massa.

A ionização por MALDI possui características muito importantes que a fazem uma fonte de ionização importante na caracterização de proteínas como a alta sensibilidade (amostras em baixíssima concentração e quantidade podem ser analisadas por esta técnica) e tolerância a contaminação das amostras com sais, tampões, detergentes etc (STUMP, 2002 e CHEN, 1998).

Dentro da fonte e sob vácuo, a mistura de matriz e amostra será irradiada por um laser pulsado durante um determinado período de tempo. O mecanismo pelo qual os íons são formados no MALDI não é completamente elucidado, porém postula-se que a irradiação pelo laser induz um rápido aquecimento do cristal formado pela matriz pela acumulação de uma grande quantidade de energia na fase condensada pela excitação da matriz. Este rápido aquecimento causa a sublimação dos cristais da matriz, ablação de uma porção da superfície cristalina e expansão da matriz para a fase gasosa, levando o analito intacto na pluma em expansão (DREISEWERD, 2003).

A ionização por electrospray (ESI) é um método de ionização brando, muito utilizado para análise de proteínas e diversas moléculas polares e possui capacidade de análise de moléculas com menos de 100 Da até maiores de 1.000.000 Da e é desenvolvida a pressão atmosférica.

Neste método, a amostra é dissolvida em um solvente polar e volátil e bombeada através de um capilar de aço inoxidável em um fluxo de 1 μ L/min a 1mL/min. Uma alta voltagem é aplicada a ponta do capilar (3 a 4 kV) formando um alto campo elétrico, a amostra sai da ponta do capilar dispersa em forma de aerossol com gotas altamente carregadas. Esse processo é auxiliado por um fluxo de gás nebulizador (geralmente nitrogênio) por fora do capilar. Este gás auxilia o direcionamento do spray para o espectrômetro de massa e a evaporação do solvente (HOFFMAN, 2007).

À medida que o solvente é evaporado e as gotas vão diminuindo de tamanho, a repulsão eletrostática entre as moléculas carregadas vai se tornando altíssima. Nesse mecanismo vão ocorrendo sucessivas explosões coulômbicas de modo que gotas contendo apenas um íon são formadas. Paralelo a isso a diminuição da gota também faz com que a tensão superficial não suporte tantas cargas (limite de Rayleigh) e induz a transferência dos íons para a fase gasosa (CANTU *et.al.*, 2008).

Diversos analisadores de massas, tais como, quadrupolos, *ion-traps* (tridimensionais e lineares), *Time-of-Flight* (ToF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR), *orbitrap*, entre outros, são comercialmente disponíveis e cada um possui aspectos positivos e negativos, de acordo com o experimento planejado e o resultado experimental requerido. Estes analisadores podem ser usados “sozinhos” e de maneira independente ou acoplados entre si, dando origem a equipamentos classificados como híbridos, os quais fazem uso das vantagens inerentes a cada analisador. Tais equipamentos permitem que experimentos em sequência (*tandem*) sejam realizados, isto é, sendo possível detectar um determinado íon e posteriormente submetê-lo a uma etapa de fragmentação. Uma vez separados, esses íons são

detectados por eletromultiplicadoras que constituem os detectores mais largamente usados (CANTU *et al.*, 2008).

Como técnica analítica das mais versáteis e das mais sensíveis, a espectrometria de massas é atualmente uma das ferramentas analíticas valiosas em diversos estudos nas áreas de Biologia, de Ciências Médicas e de Ciências Tecnológicas. Por MS é possível determinar a massa molecular e quantificar biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e oligonucleotídeos, e também fragmentá-las de forma a elucidar sua estrutura e confirmar sua identificação.

Os programas mais comumente empregados para a identificação de proteínas em bancos de dados a partir de dados de MS são o Sequest e o Mascot. Ambos os programas correlacionam espectros de massas de fragmentação (não interpretados) de peptídeos com seqüências de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados (CHAMRAD *et al.*, 2004; ELIAS *et al.*, 2005). Além disso, esses softwares também têm a capacidade de usar seqüências de nucleotídeos para fazer tal correlação. Para tal, eles primeiramente simulam as seqüências primária potenciais das proteínas correspondentes àquelas seqüências de nucleotídeos encontradas nos bancos de genes, utilizando-se do código genético universal. Posteriormente, simulam a fragmentação destas seqüências primárias. De forma geral, estes programas têm como objetivo encontrar a seqüência de aminoácidos, em um determinado banco de dados, que melhor descreve os íons fragmentos encontrados em um espectro. As seqüências “candidatas” são procuradas nos bancos de dados de acordo com a massa do peptídeo intacto e com o espectro de fragmentação obtido para cada peptídeo (CANTU *et al.*, 2008).

Além disso, a interpretação manual de espectros de fragmentação (sequenciamento *De novo*) é recomendada em todos os casos e indispensável em algumas situações. Por fim, existem situações nas quais o genoma de uma determinada espécie ainda não está completamente seqüenciado ou disponível e, neste cenário, é necessário derivar a seqüência primária de aminoácidos de um determinado peptídeo baseada única e exclusivamente nos dados obtidos por espectrometria de massas, isto é, sem recorrer a banco de dados (sequenciamento *De novo*) (STEEN & MANN, 2004).

O potencial de aplicação de MS em estudos biológicos tem sido bastante estendido, em razão dos impressionantes avanços observados nos últimos anos nas áreas de genômica, de transcriptômica, de metabolômica, de proteômica, de lipidômica e de outras plataformas “*omics*”, e do desenvolvimento extraordinário dos equipamentos (HOFFMANN e STROOTBART, 2007; FENG *et al.*, 2008). A MS é atualmente uma técnica bastante

utilizada para identificação de proteínas e para estudo de modificações pós-traducionais em diferentes condições fisiológicas. Além disso, a MS vem sendo utilizada no monitoramento e na caracterização de diversos processos industriais, tais como processos fermentativos e até mesmo análise de microrganismos intactos (CLAYDON *et al.*, 1996; FENSELAU & DEMIREV, 2001).

1.9. Cristalização de Proteínas

O principal objetivo da cristalização de proteínas é o estudo estrutural, por métodos de difração de raios X. Através desta técnica pode-se determinar espacialmente a posição atômica de todos os átomos que constituem uma macromolécula biológica como uma proteína. Esse estudo estrutural é fundamental para o entendimento molecular de vários mecanismos biológicos (DELATORRE, 2006).

Cristais são caracterizados por apresentarem alto grau de ordenação interna, ou seja, são formados por repetições translacionais de moléculas ou átomos em todas as direções. A periodicidade interna é descrita por uma pequena unidade de volume uniforme da qual o cristal pode ser considerado um derivado, chamada de cela unitária. Cada cela unitária é caracterizada por três vetores a , b e c que definem suas arestas e pelos ângulos α , β e γ existentes entre elas (DELATORRE *et al.*, 2000).

Cristais de proteínas são bem diferentes de cristais de pequenas moléculas, como os sais, e isso se deve principalmente ao alto conteúdo de solvente, que acaba por preservar o caráter bioquímico da molécula, permitindo o acesso de ligantes e dando alguma liberdade dinâmica à molécula. Estes cristais são estabilizados por contatos intermoleculares, e tanto a aderência intermolecular quanto a integridade da rede são asseguradas pelas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e a rede cristalina.

Uma das partes mais críticas na resolução da estrutura de uma macromolécula biológica é a sua cristalização. A cristalização de macromoléculas é um processo de múltiplos parâmetros, que envolve três passos: nucleação, crescimento e cessação do crescimento. Para obtenção de um bom cristal, que sirva para a coleta de dados de difração de raios X, é necessário certificar-se da pureza do material.

O que torna o processo de cristalização de proteínas e de outras macromoléculas biológicas diferente do processo para pequenas moléculas é a quantidade de parâmetros envolvidos. As proteínas possuem valores de pH e força iônica definidas para a sua estabilidade e função, portanto os cristais de macromoléculas biológicas têm de ser crescidos

a partir de soluções aquosas complexas. Mas a principal diferença é a flexibilidade conformacional e a versatilidade apresentada por moléculas como as proteínas e, conseqüentemente, sua maior sensibilidade às condições externas.

A formação de núcleos cristalinos de moléculas protéicas quase sempre ocorre a níveis extremamente altos de supersaturação, porém nesses níveis a formação de precipitados amorfos é cineticamente mais favorável. A cristalização de uma solução é semelhante à formação de gelo, ou seja, representa uma mudança de fase. Isso ocorre porque a barreira energética é superada e a transição de fase é dirigida a um estado do sistema mais favorável energeticamente. Em processos de cristalização de macromoléculas biológicas a transição de fase está próximo do nível energético mais favorável para a disposição destas moléculas em solução, causando uma situação de desequilíbrio energético que só é melhorada no estado sólido (DELATORRE, 2001).

Para que o processo de cristalização seja efetivo é necessário, primeiramente, perturbar as interações entre as macromoléculas e os componentes da solução e para que isso seja possível à solução deve ser preferencialmente composta de água e íons. Em segundo plano, a estrutura do solvente deve ser também perturbada para que a macromolécula fique em situação desconfortável, promovendo a separação de fases e a uma provável formação cristalina (DELATORRE, 2006).

A técnica de difusão de vapor é, atualmente, a técnica de cristalização mais utilizada. Uma gota contendo a proteína a ser cristalizada em tampão com o agente de cristalização e aditivos é equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota. O equilíbrio prossegue por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota seja igual à pressão de vapor do reservatório. Uma vez que o equilíbrio ocorre através da troca de vapor d'água (da gota para o reservatório), o volume da gota diminui e há um aumento das concentrações de todos os constituintes da gota de cristalização.

Esta técnica é utilizada para três principais métodos de montagem da gota: gotas suspensas, gotas sentadas e gotas sanduíches (Figura 7). O método da gota suspensa é um dos mais usuais e consiste no preparo de gotas, com volume variando de 1 a 10 μL de solução de proteínas acrescidas de igual quantidade da solução de precipitante do reservatório em lâminulas de vidro.

A proposição de métodos de cristalização onde um número limitado de condições de cristalização é tentado, usando-se pequenas quantidades de proteínas, foi possível à medida

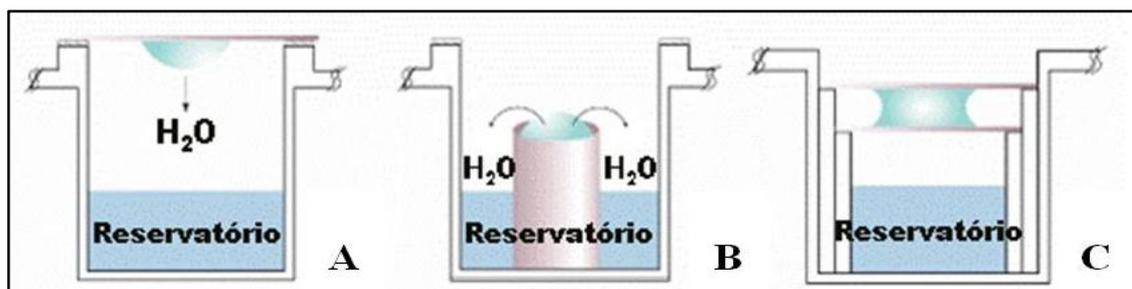


Figura 7: Cristalização por difusão de vapor. Métodos de montagem de gota suspensa (A), gota sentada (B) e gota sanduíche (C).

que aumentaram o número de proteínas cristalizadas com sucesso, uma vez que as condições de cristalização se assemelhavam e o número de precipitantes, tampões e aditivos é limitado.

Nesta perspectiva, foi proposto o método da matriz esparsa (JANCARICK e KIM, 1991), onde diversas condições diferentes são testadas com o objetivo de encontrar a condição de cristalização de proteínas. Apenas três categorias de parâmetros que afetam a cristalização (tampões com suas possíveis variações de pH, aditivos e agentes precipitantes) foram escolhidas como variáveis principais no processo de cristalização, já que considerar todas as possibilidades para cristalização seria inviável dado o número elevado de variáveis e a sua natureza combinatória.

A principal técnica usada para a determinação de estrutura tridimensional de moléculas biológicas é a cristalografia de raios X, porém o uso desta técnica requer a existência de um bom cristal da molécula de interesse, ou seja, um cristal que difracte a alta resolução. Desta forma, obter bons cristais é o requisito mínimo para a análise cristalográfica de proteínas.

O estabelecimento da estrutura tridimensional de uma proteína é de fundamental importância, não só por esclarecer aspectos funcionais da proteína em questão, mas também por fornecer informações relevantes ao problema do enovelamento, que permanece como um dos problemas mais intrigantes na bioquímica.

1.10. Aspectos Gerais do Processo Inflamatório

Segundo Vilcek e Feldman (2004) a inflamação é um conjunto de alterações (nos vasos sanguíneos, nos tecidos e nos fluidos internos) provocadas por lesões, infecções, substâncias nocivas ou distúrbios orgânicos e está estreitamente interligada ao processo de reparação.

O processo inflamatório é uma sequência complexa de eventos que ocorre em tecidos vascularizados, em resposta a agressão por agentes lesivos. Esta reação tem como principal objetivo livrar o organismo do agente causador da injúria e também desencadear processos que tendem a reparação do tecido lesado (McGEER & McGEER, 2000). Uma característica importante deste processo é que, independente da natureza do estímulo, a resposta inflamatória segue um padrão característico, podendo ser observadas modificações discretas no padrão de resposta, inerente ao agente etiológico, ao tecido ou órgão lesado e ao estado patológico do hospedeiro (RANG *et al.*, 2001).

A inflamação possui como sinais clínicos característicos: calor, tumor, rubor, dor e perda de função (CONTRAN *et al.*, 2000). Didaticamente, o processo inflamatório é dividido em dois momentos. O primeiro que é desencadeado logo após a instalação do agente agressor (inflamação aguda), sendo caracterizado por infiltrado predominantemente neutrofílico, associado ao aumento de permeabilidade vascular com exsudação de plasma e proteínas plasmáticas, edema, dor e necrose. O outro momento que depende ou não da resolução do processo na fase aguda (inflamação crônica), é caracterizado pela presença de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo (BAUHMANN & GAUDIE, 1994).

Vários tipos de células estão envolvidos no processo inflamatório e estas podem ser classificadas em três tipos: células endoteliais, células próprias do tecido (mastócitos, fibroblastos e macrófagos fixos) e células migratórias (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos sanguíneos, plasmócitos e macrófagos livres).

A resposta inflamatória aguda envolve fenômenos vasculares (vasodilatação e aumento da permeabilidade celular) e celulares (infiltração celular) decorrentes da liberação local de mediadores químicos formados e liberados concomitantemente ou sequencialmente no local da lesão. Os mediadores inflamatórios atuam nos vasos sanguíneos e células inflamatórias modulando os principais eventos relacionados a inflamação: vasodilatação, opsonização, quimiotaxia para células inflamatórias, destruição tecidual e dor, como também febre e mal estar. Os mediadores da inflamação são classificados como de origem plasmática (advindo das cascatas das citocinas/quimiocinas, coagulação, fibrinólise e complemento) ou tecidual (aminas vasoativas, eicosanóides, enzimas lisossomais, radicais livres derivados do oxigênio, fator ativador de plaquetas, citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e fatores de crescimento) (LANSEN & HENSON, 1993; SIQUEIRA & DANTAS, 2000).

Um grande número de mediadores tem sido implicado no processo de migração dos leucócitos do sangue ao foco de inflamação. Acredita-se que na fase precoce do processo

inflamatório induzido por diferentes estímulos, células residentes no tecido, como macrófagos, mastócitos e linfócitos, participam no controle da migração de neutrófilos.

Os mediadores oriundos de células normalmente estão sequestrados nos grânulos intracelulares, que precisam ser secretados (histamina nos grânulos de mastócitos) ou são sintetizados originalmente (prostaglandinas, citocinas) em resposta a um estímulo (CONTRAN *et al.*, 2000). Substâncias endógenas e exógenas (carragenina e zimosan) podem agir como agentes quimiotáticos.

A vasodilatação é um fenômeno que corresponde a alterações no calibre vascular, que conduz a um aumento do fluxo sanguíneo, decorrente da ação de mediadores principalmente em arteríolas. O aumento da permeabilidade vascular se deve a ação de mediadores inflamatórios sobre as células endoteliais venulares, induzindo a contração das mesmas. Isto permite a passagem de proteínas plasmáticas para o interstício, as quais não seriam filtradas em condições fisiológicas. O aumento da permeabilidade vascular somado ao aumento da pressão de filtração, por consequência da vasodilatação, leva à formação do edema inflamatório.

A migração de leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no foco da agressão é uma das etapas fundamentais para a defesa do organismo. Os leucócitos ingerem os agentes agressores, destroem as bactérias e outros micróbios e degradam o tecido necrótico e os antígenos estranhos. Porém, os leucócitos podem prolongar a inflamação e induzir lesão tecidual mediante a liberação de enzimas, de mediadores químicos e de radicais livres do oxigênio.

A mobilização adequada dos leucócitos, da microcirculação para o foco inflamatório (tecido intersticial), é também uma etapa fundamental para a defesa do organismo e é denominada de extravasamento. Pode ser dividida nas seguintes etapas: (1) intraluminais: marginação, rolagem e adesão; (2) transmigração através do endotélio (também denominada de diapedese); e (3) migração nos tecidos intersticiais na direção do estímulo quimiotático.

No sangue, que flui normalmente, os eritrócitos e os leucócitos ficam confinados a uma coluna axial e deixa em contato com o endotélio uma camada de plasma pobre em células. À medida que o fluxo torna-se lento no início da inflamação (como decorrência do aumento da permeabilidade vascular), os leucócitos saem da coluna central e assumem uma posição periférica, passando a margear a superfície endotelial. Este processo inicial, denominado marginação, é causado em grande parte por alterações nas condições hemodinâmicas geradas pela lenta circulação sanguínea (CONTRAN *et al.*, 2000). Fileiras de

leucócitos deslocam-se lentamente ao longo do endotélio e aderem transitoriamente (um processo denominado de rolagem), e finalmente, interrompem seu trajeto em algum ponto onde possam aderir firmemente nas paredes endoteliais (KIEDA, 1998). Com o tempo, o endotélio passa a ser praticamente recoberto por leucócitos e adquire um aspecto “pavimentado”. Após a fase de adesão firme, o leucócito insere pseudópodes nas junções entre as células endoteliais, se espreme através das junções endoteliais e passa a se posicionar entre as células endoteliais e a membrana basal. Por fim, atravessa a membrana basal e escapa para o espaço extravascular para exercer seu papel. Tanto neutrófilos quanto monócitos, linfócitos e eosinófilos e basófilos empregam este trajeto.

2- OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo purificar, cristalizar e caracterizar uma lectina de sementes de *Platymiscium floribundum* Vogel, abrindo possibilidades para sua utilização como ferramenta biotecnológica nas mais diversas áreas da ciência.

2.2. Objetivos Específicos

- Purificar uma lectina de sementes de *P. floribundum* através da utilização de métodos cromatográficos tradicionais;
- Caracterizar a lectina purificada quanto à sua afinidade por carboidratos e quanto a suas características físico-químicas;
- Testar a atividade anti-inflamatória utilizando o modelo de edema de pata em ratos;
- Determinar a massa molecular da lectina de *P. floribundum* por espectrometria de massa;
- Determinar a estrutura primária da lectina de *P. floribundum* por espectrometria de massa sequencial (MS/MS);
- Cristalizar a lectina de *P. floribundum* na sua forma nativa e complexada com carboidratos específicos pelo método de difusão de vapor;

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Purificação da Lectina de Sementes de *P. floribundum*

3.1.1. Preparação da farinha

Para a obtenção da farinha fina, sementes quiescentes e maduras de *P. floribundum* coletadas no Sítio Carás do Umari, localizado na zona rural da cidade de Juazeiro do Norte-CE, foram descascadas e trituradas em moinho elétrico. Em virtude das sementes serem ricas em lipídeos, a farinha foi submetida a uma delipidação por hexano. A farinha de fina granulação e delipidada foi então armazenada em frascos fechados para posterior utilização.

3.1.2. Extração de proteínas de sementes

As proteínas solúveis presentes na farinha sementes de *P. floribundum* foram extraídas em solução de Tris-HCl 0,1 mol/L pH 7,6 contendo NaCl 0,15 mol/L, na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante por 4 h a temperatura ambiente. A suspensão obtida foi centrifugada a 4.000 g, temperatura 4 °C, durante 20 min, obtendo-se assim um precipitado que foi descartado, e um sobrenadante denominado de extrato total, o qual foi utilizado para realização de ensaios de atividade hemaglutinante e de dosagem de proteínas solúveis, para o posterior cálculo da atividade específica, útil para futuras comparações e análises.

3.1.3. Fracionamento Protéico do Extrato Total

O extrato total foi submetido a fracionamento protéico através da adição lenta sob agitação constante de sulfato de amônio sólido em diferentes concentrações, correspondendo às frações 0-60 % e 60-100 % de saturação. Após 4 horas de contato em repouso, as suspensões foram centrifugadas a 4.000 g por 20 minutos obtendo-se, nos precipitados, as frações respectivas. As frações foram extensivamente dialisadas contra água destilada, e então solubilizada em Tris-HCl 0,05 mol/L pH 7,6 contendo NaCl 0,15 mol/L.

3.1.4. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas totais solúveis no extrato e nas diferentes frações foi verificada pelo método descrito por Bradford (1976). A cada 100 μ L de amostra, diluída ou não, 2,5mL do reagente de Bradford foram adicionados. A mistura foi então deixada em repouso por cerca de 10 minutos e em seguida teve sua absorbância determinada a 595 nm em um espectrofotômetro de luz visível (VIS LBK Novaspec II, Pharmacia). A concentração de proteínas solúveis nas amostras analisadas foi determinada à partir de uma curva padrão obtida com o uso de soluções de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Para os experimentos cromatográficos, o conteúdo protéico foi avaliado utilizando-se a absorbância a 280 nm dos eluatos cromatográficos.

3.1.5. Atividade hemaglutinante

Os testes para detecção de atividade hemaglutinante nos extratos e nas diferentes frações protéicas foram realizados em tubos, a partir de uma adaptação ao protocolo descrito por Moreira e Perrone (1967) como descrito a seguir:

As amostras, em duplas seriadas, foram diluídas em tubos (1:2, 1:4, 1:8...) em Tris-HCl 0,1 mol/L pH 7,6 contendo NaCl 0,15 mol/L. A 100 μ L de cada diluição adicionou-se 100 μ L de uma suspensão de hemácias de coelho ou dos tipos sanguíneos A, B e O, normais ou tratadas com enzimas proteolíticas (papaína ou tripsina) a 2 % em NaCl 0,15 mol/L. O ensaio foi incubado a 37 °C por 30 minutos e, após esse período, deixado em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A presença ou não de hemaglutinação foi então detectada macroscopicamente.

Os títulos de hemaglutinação foram medidos em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H./mL) como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível.

3.1.6. Cálculo da atividade hemaglutinante específica

Após a obtenção do título de hemaglutinação e da concentração de proteínas solúveis, a atividade específica para cada uma das frações foi calculada, com o objetivo de se monitorar avanços na concentração/purificação da lectina em estudo.

O cálculo foi feito pela divisão do título de hemaglutinação (U.H./mL) pela dosagem de proteínas solúveis (mgP/mL), cujo quociente foi expresso em U.H./mgP (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína). Esses resultados poderão ser comparados, levando à escolha da melhor condição / fração purificadora ou concentradora da atividade hemaglutinante.

3.1.7. Especificidade por carboidratos

A especificidade por carboidratos da lectina de sementes de *P. floribundum* foi determinada através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples e por glicoproteínas, os quais foram realizados segundo protocolo adaptado a partir daquele descrito por Ramos e colaboradores (1996).

Para tal propósito, 50 µL de soluções estoques, a uma concentração de 0,1 mol/L de cada carboidrato, foram diluídos serialmente em Tris-HCl 0,1 mol/L pH 7,6 contendo NaCl 0,15 mol/L. Em seguida, foi adicionada a cada tubo 50 µL de uma solução de lectina em uma concentração capaz de provocar uma aglutinação de 4 U.H./mL.

O ensaio foi então incubado a 37 °C por 30 minutos, e, após isso, mantido em repouso à temperatura ambiente por mais trinta minutos. Após este período, foram acrescentados 100 µL de uma suspensão a 2 % de eritrócitos tripsinizados de coelho a todos os tubos do ensaio. A mistura foi novamente incubada a 37 °C, durante 30 minutos, e depois, deixada em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A inibição da atividade hemaglutinante pelos açúcares foi então determinada.

Para aqueles carboidratos que se mostraram capazes de inibir a atividade hemaglutinante foi determinada a concentração mínima inibitória (MIC), a qual corresponde a maior diluição, ou a menor concentração, do açúcar em que permaneceu a ausência de atividade hemaglutinante.

3.1.8. Cromatografia de afinidade em matriz de sepharose-manose

A Fração 0-60 %, obtida pelo fracionamento protéico com sulfato de amônio, por apresentar maior atividade específica foi submetida à cromatografia de afinidade em uma matriz de Sepharose-manose, para tal, a fração foi extensivamente dialisada contra água destilada, solubilizada em Tris-HCl 0,05 mol/L pH 7,6 contendo NaCl 0,15 mol/L, centrifugada a 4.000 g por 10 minutos e, em seguida, 5 mL do sobrenadante, com uma

concentração de proteínas de 3,54 mg/mL, foram aplicados em uma matriz de Sepharose-manose (1,0 x 10,0 cm), previamente equilibrada com a mesma solução. A fração não retida foi eluída com o tampão de equilíbrio, enquanto que, a fração retida foi eluída com o tampão de equilíbrio adicionado de 0,1 mol/L de manose. Frações de aproximadamente 1 mL foram coletadas manualmente.

As frações obtidas foram exaustivamente dialisadas contra água destilada e, então, liofilizadas. A atividade hemaglutinante, o teor de proteínas solúveis e a atividade específica de todas as frações cromatográficas foram avaliados.

3.2. Caracterização da Lectina de Sementes de *P. floribundum*

3.2.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS foi realizada segundo o método descrito por Laemmli (1970) com algumas modificações. A concentração do gel de separação (main gel) foi de 12,5 % (a uma proporção de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8), preparado em tampão Tris-HCl 0,1 mol/L pH 8,8 contendo SDS 20 %, TEMED (concentrado) e persulfato de amônio (100 mg/mL). O gel superior ou de aplicação (stacking gel) foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 4 % em tampão Tris-HCl 0,1 mol/L pH 6,8, SDS 20 %, persulfato de amônio (100 mg/mL) e TEMED concentrado.

As amostras liofilizadas, obtidas das diferentes frações protéicas e da cromatografia de afinidade foram solubilizadas a uma concentração de 1 mg/mL em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,0625 mol/L pH 6,8, 10 % de glicerol, 0,02 % de azul de bromofenol e 1% de SDS. Foram aplicados 10 µL desta preparação em cada poço.

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em um sistema Mini-Protean II mini-gel (Bio-Rad; Milão, Itália) com a voltagem variando até 200 V, potência até 5 W e amperagem constante de 35 mA. O tampão de corrida utilizado conteve Tris 0,025 mol/L, Glicina 0,192 mol/L e SDS 0,1 % pH 8,8. Os marcadores de massa molecular (GE Healthcare) utilizados foram: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

Após a corrida eletroforética, o gel de separação foi fixado em uma solução contendo 25 % isopropanol e 10 % ácido acético, por no mínimo 1 hora. O gel fixado foi então corado em Coomassie R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água a

uma proporção 1:3,5:8 (v/v/v). A retirada do excesso do corante (descoramento) foi feita em água destilada aquecida.

3.2.2. Determinação da massa molecular por espectrometria de massa

A massa molecular da lectina purificada foi determinada através da técnica de espectrometria de massa com Ionização por Eletrospray (ESI) utilizando um instrumento híbrido (Synapt HDMS, Waters Corp., Milford, USA) operando no modo positivo, com uma resolução de 10.000 e uma exatidão de massa de 3 ppm. Para tal, a proteína foi solubilizada em uma solução contendo 50 % de acetonitrila e 0,1 % de ácido fórmico, a uma concentração final de aproximadamente 1 pMol de proteína. A amostra foi aplicada a um fluxo de 10 μ L/minuto e as voltagens do capilar e do cone foram ajustadas para 3,0 kV e 40 V, respectivamente. A coleta de dados foi realizada com o auxílio do software Mass Lynx 4.0 e os espectros multicarregados foram deconvoluídos usando técnicas de maximização da entropia (FERRIGE *et al.*, 1992).

3.2.3. Digestão *in gel* e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa

As proteínas a serem analisadas foram aplicadas a um gel de 12 % de poliacrilamida (SDS-PAGE). A banda referente à proteína foi retirada do gel e recortada com auxílio de uma ponteira plástica. O gel de eletroforese contendo a proteína de interesse foi descorado em uma solução de 50 % de acetonitrila contendo 0,025 mol/L de bicarbonato de amônio, desidratado em 100 % de acetonitrila e seco em Speedvac (LabConco). O gel foi então reidratado em uma solução de 0,05 mol/L de bicarbonato de amônio contendo a enzima tripsina (Promega) ou quimiotripsina (Sigma) na proporção de 1:50 (p/p; enzima:substrato). Para digestão da amostra com a enzima termolisina, o gel foi reidratado numa solução de 0,05 mol/L de Tris-HCl pH 7,5 com NaCl 0,005 mol/L e CaCl₂ 0,005 mol/L nas mesmas proporções que as demais enzimas. A reação de digestão permaneceu overnight a 37 °C, sendo parada com a adição de ácido fórmico a 2 %.

Os peptídeos oriundos da digestão foram extraídos do gel em utilizando uma solução de 5 % de ácido fórmico em 50 % de acetonitrila sob agitação durante 15 minutos. Este procedimento foi repetido por 3 vezes, o sobrenadante contendo os peptídeos extraídos foram unidos e concentrados em Speedvac e avolumados para 25 μ L com ácido fórmico 0,1 %. Estes peptídeos foram injetados em um sistema nanoacquit (Waters Corp) conectado a

uma fonte de nano eletrospray de um espectrômetro de massa (SYNAPT HDMS – Waters Corp). A amostra foi aplicada a uma coluna de fase reversa C18 (75 μ M x 100 μ M) e eluída em um gradiente de acetonitrila de 10 % a 85 % contendo 0,1 % de ácido fórmico.

O espectrômetro de massa operou em modo positivo, com a temperatura da fonte de 90 °C e a voltagem do capilar de 3.0 kV. Os experimentos de LC-MS/MS foram realizados de acordo com a função DDA (Direct Data Analysis – Análise Direta de Dados) os íons precursoros com carga entre +2 e +4 foram selecionados para análise de MS/MS sendo fragmentados através de CID (Collision Induced Decomposition – Decomposição induzida por colisão). Os dados foram coletados, processados e analisados utilizando o programa MassLynx v4.1 (Waters Corp) e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp). Os peptídeos comuns a outras proteínas foram sequenciados por buscas em banco de dados utilizando ferramenta de pesquisa por padrão de fragmentação dos peptídeos nos programas ProteinLynx (Waters Corp) e MASCOT (Matrix Science). Os demais peptídeos foram determinadas as sequências através da interpretação manual dos espectros de fragmentação (sequenciamento *De novo*).

3.2.4. Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante

Alíquotas da lectina de sementes de *P. floribundum* solubilizadas em NaCl 0,15 mol/L (1 mg/ml), foram preparadas em tubos de microcentrífuga de 2 mL. Em seguida, cada amostra foi submetida a diferentes temperaturas variando de 30 °C a 100 °C por 60 minutos. Após este período, a atividade hemaglutinante foi testada em todas as amostras.

3.2.5. Efeito de agente quelante sobre a atividade hemaglutinante

O requerimento de cátions divalentes para a atividade da lectina foi investigado acrescentando-se EDTA ao ensaio de hemaglutinação (quelante de Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}). Primeiramente, alíquota da lectina de *P. floribundum* (1 mg/mL) foi preparada em NaCl 0,15 mol/L. Em seguida, adicionou-se 50 μ L de NaCl 0,15 mol/L e 50 μ L de EDTA 0,025 mol/L em diluições seriadas em placas de microtitulação, em seguida foi adicionado a lectina (1 mg/mL), deixando em incubação por 30 minutos. Após esse período, acrescentou-se 50 μ L de eritrócitos de coelho a 2 % em cada poço e levou-se a incubação por 1 hora.

3.2.6. Efeito do pH Sobre a atividade hemaglutinante

O efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da lectina foi avaliado através de testes de atividade hemaglutinante. Para isto, a lectina de sementes de *P. floribundum* solubilizada em NaCl 0,15 mol/L (1 mg/ml) foi dialisada por 24 horas contra diferentes soluções tampão com pH variando de 4,0 a 10,0 contendo NaCl 0,15 mol/L. Os seguintes tampões foram utilizados: Citrato de sódio 0,1 mol/L pH 4,0 e 6,0, acetato de sódio 0,1 mol/L pH 5,0, fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,0, Tris-HCl 0,1 mol/L pH 8,0, glicina-NaOH pH 9,0 e 10,0.

3.2.7. Dosagem de carboidratos totais

A lectina de sementes de *P. floribundum* solubilizada em NaCl 0,15 mol/L (1,0 mg/mL) foi submetida ao método de Dubois *et al.* (1956) para a determinação do conteúdo de carboidratos, utilizando-se glicose como padrão.

3.3. Cristalização da Lectina de Sementes de *P. floribundum*

A proteína liofilizada, previamente purificada, foi suspensa em água Milli-Q na concentração final de 12 mg/mL. A suspensão da proteína foi então centrifugada à 4.000 g por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para os passos futuros. Para experimentos com o ligante, a proteína em solução foi encubada com manose na concentração final de 3 mM por uma hora antes dos experimentos de cristalização. A proteína foi então submetida ao “screen” de cristalização, utilizando o método da matriz esparsa inicialmente descrito por Jancarik & Kim (1991). Os kits utilizados foram o “crystal screen 1” e “crystal screen 2” (Hampton) onde as variáveis iniciais foram pH, sal e precipitantes.

O método utilizado foi o de difusão de vapor e gota suspensa utilizando placas de cristalização de 24 poços. Foram colocados em cada poço da placa de cristalização 300 µL da solução do kit (condição de cristalização) e a gota foi composta por 2 µL da solução de proteína e 2 µL da condição de cristalização. O poço foi então vedado com silicone e deixado em repouso à temperatura de 18 °C. Após a obtenção de cristais foi feita a otimização dessa condição de cristalização, variando a concentração de precipitante e o pH da solução, repetindo o método da difusão de vapor. Essa otimização visou melhorar a condição de

formação do cristal, produzindo assim, um cristal com características necessárias para que ele possa ser difratado quando submetido à difração de raios X.

3.4. Avaliação da Atividade Antiedematogênica da Lectina de Sementes de *P. floribundum*

3.4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) (150 a 250 g) procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). Estes animais receberam ração e água *ad libitum*, sob condições adequadas de luz e temperatura e foram manipulados de acordo com os padrões estabelecidos pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

3.4.2. Drogas e reagentes

Carragenina- λ foi adquirida da Sigma Chemical Company. Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica.

3.4.3. Atividade antiedematogênica da lectina

Os volumes de líquido deslocados pelas patas foram medidos pletismograficamente antes (tempo zero) e após 30 min., 1, 2, 3, 4 e 5h da injeção subcutânea (s.c.) intraplantar da carragenina (500 μ g/pata). O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado antes e após o estímulo e expresso em mL.

Na avaliação da atividade antiedematogênica, a lectina foi administrada por via endovenosa (e.v.) nas doses de 0,01; 0,1 ou 1,0 mg/Kg (0,1mL/100g de massa corporal), 30 min. antes da aplicação s.c. do estímulo inflamatório. O grupo controle positivo de edema foi administrado com carragenina e o controle negativo com salina s.c.

3.4.4. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média dos valores \pm S.E.M. para n experimentos. A avaliação estatística foi combinada pela análise de variância (ANOVA) para

múltiplas comparações, seguida pelo teste t de “student”. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação da Lectina de Sementes de *Platymiscium floribundum*

Os métodos utilizados para a extração e purificação da lectina de *P. floribundum* foram aqueles comumente usados para proteínas vegetais, que envolvem a extração utilizando soluções salinas e/ou ácidas, precipitação por solventes orgânicos ou por sais e fracionamento por técnicas cromatográficas, tais como exclusão molecular e troca iônica (BELITZ *et al.* 1990).

Ao interagirem com glicoconjugados da superfície celular, as lectinas podem promover a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes, causando sua aglutinação (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Esta propriedade foi utilizada para a identificação de sua presença em sementes de *P. floribundum*.

A presença de lectina em sementes de *Platymiscium floribundum* foi reportada por Pereira-Júnior (2008), seu trabalho apresenta a purificação e caracterização parciais de uma lectina de sementes de *P. floribundum*. O protocolo de purificação utilizado por Pereira-junior (2008) foi modificado, sendo utilizado uma nova matriz cromatográfica para purificação da lectina.

O extrato protéico preparado com a farinha de sementes de *P. floribundum* apresentou níveis relativamente altos de atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho, tratados com enzimas proteolíticas ou nativos, mas não apresentou atividade para eritrócitos humanos do sistema ABO (Tabela 2), sendo que o maior título de hemaglutinação foi observado contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina. Estudos mostram que algumas lectinas tem sua atividade hemaglutinante potencializada após o tratamento dos eritrócitos com enzimas proteolíticas (NAGANO *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2008), isto ocorre pelo fato destas enzimas atuarem clivando certas proteínas da superfície da membrana celular dos eritrócitos, expondo melhor carboidratos que compõem o glicocálice. Isso permite que as lectinas tenham um maior acesso a estes, aumentando assim os títulos de hemaglutinação.

Tabela 2: Atividade hemaglutinante do extrato total das sementes de *P. floribundum*

Eritrócitos	Tratamento enzimático		
	Tripsina	Papaína	Nativo
Coelho	1024*	512	128
Humano tipo A	ND**	ND	ND
Humano tipo B	ND	ND	ND
Humano tipo O	ND	ND	ND

* Valores expressos em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H.)

**ND: Não detectado

A determinação da especificidade por carboidratos foi realizada pelo método da inibição da atividade hemaglutinante utilizando-se carboidratos. Esse método é semiquantitativo, e pode proporcionar informações quanto à habilidade relativa de carboidratos em inibir a atividade de lectinas (PADMA *et al.*, 1999).

Os resultados demonstraram que a atividade hemaglutinante do extrato bruto foi inibida por N-acetil-D-glicosamina e manose, apresentando maior especificidade por manose (Tabela 3).

Tabela 3: Inibição da atividade hemaglutinante no extrato total

Carboidrato	MIC* (mM)
D-Manose	1,56
D-Galactose	ND**
D-Frutose	ND
D-Glicose	ND
D-Arabinose	ND
N-Acetil-D-glicosamina	6,25
α -metil-D-galactopiranosídeo	ND
α -metil-D-glicopiranosídeo	ND
Lactose	ND
Sacarose	ND

* Concentração Mínima Inibitória em mM;

**O carboidrato não inibiu a uma concentração de 100 mM.

A lectina de sementes de *P. floribundum* foi purificada por precipitação pela adição de sulfato de amônio seguida por uma cromatografia de afinidade em uma matriz de Sepharose-manose. Para isto, o extrato total foi inicialmente precipitado pela adição de sulfato de amônio sólido e duas frações protéicas foram obtidas (F 0-60 % e F 60-100 %). A atividade hemaglutinante se concentrou quase que exclusivamente na fração 0-60 % e, por esse motivo, esta fração foi utilizada para a cromatografia de afinidade em uma matriz de Sepharose-manose (Figura 8). Esse procedimento resultou na lectina purificada com um grau de pureza de 8,6 vezes (Tabela 04).

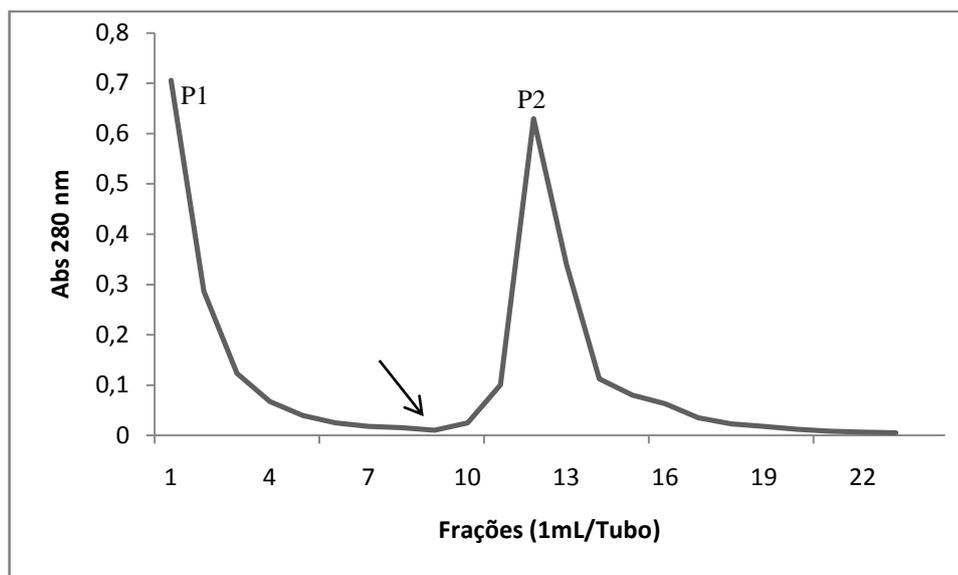


Figura 8. Perfil de eluição da cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose-manose. A fração 0-60% solubilizada em Tris-HCl 0,05 mol/L pH 7,6 com NaCl 0,15 mol/L e foi aplicada em uma matriz de Sepharose-manose (1,0 x 10,0 cm) previamente equilibrada com a mesma solução. A fração não retida (P1) foi eluída com o tampão de equilíbrio, e a partir da flecha, a fração retida (P2) foi eluída com o tampão de equilíbrio contendo 0,1 mol/L de manose.

Tabela 04: Tabela de Purificação da Lectina de Sementes de *P. floribundum*.

Fração	a) Proteínas (mg/mL)	b) U.H.	c) A.H.E. (U.H./mgP)	d) Purificação
Extrato Total	4,75	512	107,8	1
Fração 0-60 %	3,54	2048	579,1	5,4
Pico II	0,82	4096	5.009,50	46,5

a) Concentração de proteínas determinada pelo método de Bradford (1976);

b) Atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina, expressa em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H.);

c) Atividade Hemaglutinante Específica calculada como a relação entre a atividade hemaglutinante e a concentração de proteínas;

d) Purificação, calculada como a relação entre a atividade hemaglutinante específica do extrato total e aquela de cada passo de purificação subsequente.

4.2. Caracterização Físico-química da Lectina de Sementes de *P. floribundum*

O processo de purificação de PFL foi monitorado por SDS-PAGE na presença ou ausência do agente redutor β -mercaptoetanol. A figura 9 mostra o perfil eletroforético de das frações protéicas correspondentes aos diferentes estágios de purificação da lectina. Nesta figura pode-se observar que a lectina purificada é caracterizada por um perfil composto por uma banda única de massa molecular aparente de aproximadamente 29 kDa, tanto na presença quanto na ausência do agente redutor. A lectina de *Platypodium elegans* apresentou uma

banda dupla de massa molecular aparente de aproximadamente 30 kDa (dados não publicados).

Em outra espécie também da mesma tribo Dalbergieae, a *Vatairea macrocarpa*, possui uma lectina com um perfil eletroforético com quatro bandas, duas bandas de peso molecular aparente maior, de 34 e 32 kDa, e duas bandas de peso molecular aparente menor, de 22 e 13 kDa (CAVADA *et al.*, 1998), sendo as bandas de 22 e 13 kDa correspondem aos fragmentos C-(beta)-terminal e N-(gama)-terminal da cadeia alfa, respectivamente (CALVETE *et al.*, 1999).

A dosagem de carboidratos totais mostrou que a PFL é uma glicoproteína com aproximadamente 2 % de carboidratos. A lectina de *V. macrocarpa* também se mostrou ser uma glicoproteína composta de aproximadamente 8 % de carboidratos (CAVADA *et al.*, 1998), semelhante a lectina de *Platypodium elegans* que apresentou aproximadamente 7 % de carboidratos totais (dados não publicados).

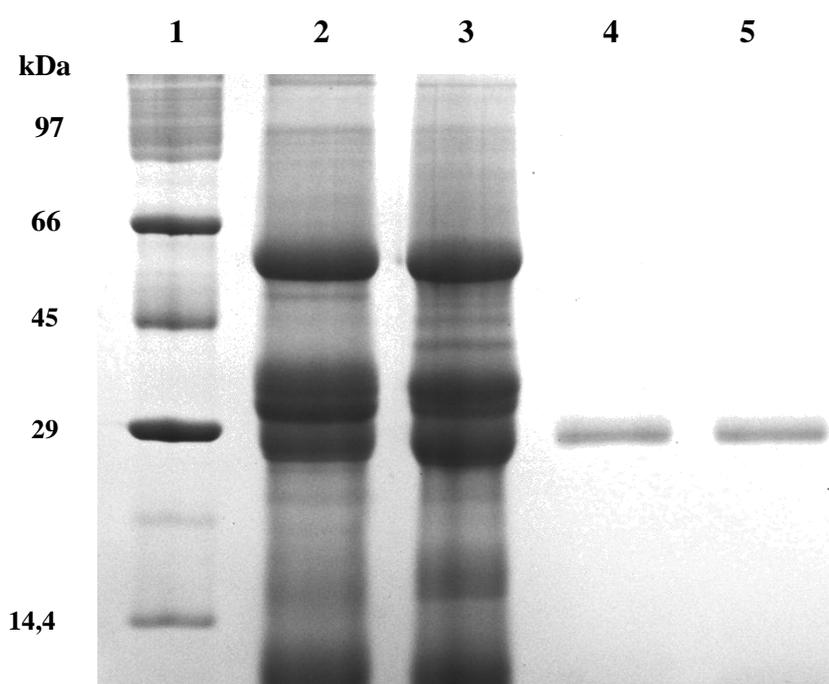


Figura 9: SDS-PAGE. Poços: 1- Marcadores moleculares (Fosforilase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrate Carbônica 29 kDa e α - lactoalbumina 14,4 kDa), **2-** Extrato total, **3-** F 0-60 %, **4-** PFL em condições não redutoras, **6-** PFL em condições redutoras.

PFL demonstrou ser uma proteína termoestável mantendo sua atividade hemaglutinante mesmo após incubação a 60 °C por 1 hora. Contudo, a lectina teve sua atividade hemaglutinante reduzida consideravelmente quando exposta a temperaturas iguais ou superiores a 70 °C (Figura 10A).

A atividade hemaglutinante de PFL também é resistente a uma ampla faixa de pH. Os títulos de hemaglutinação alcançaram seus valores mais altos no intervalo de pH situado entre 7,0 e 9,0, indicando que esta é a faixa de pH ótimo para a atividade dessa proteína. No entanto, a atividade hemaglutinante foi reduzida em valores extremos de pH (Figura 10B).

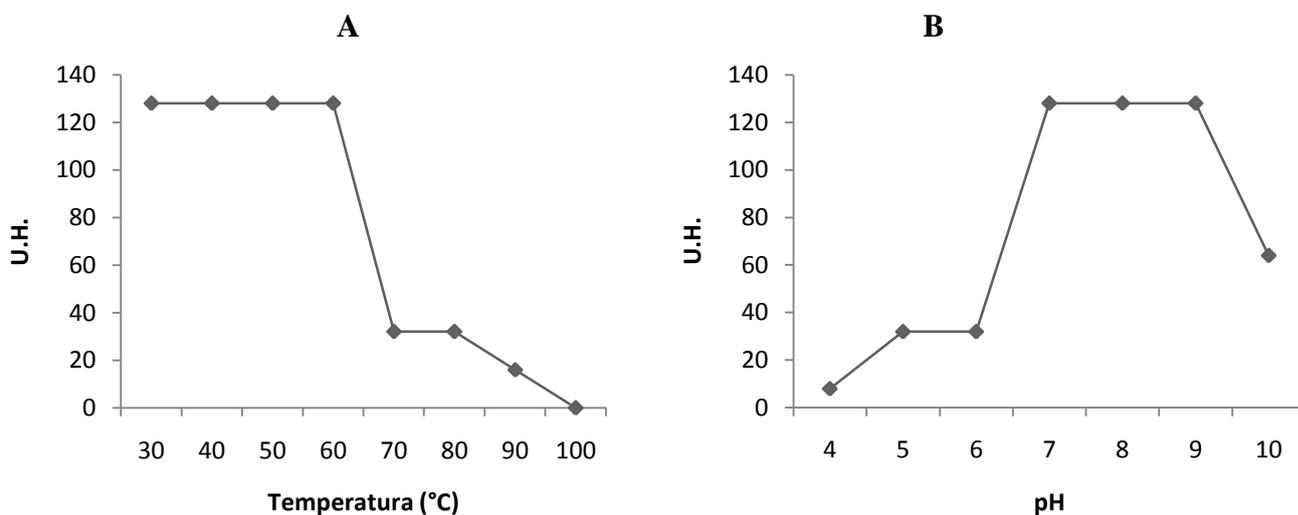


Figura 10: Propriedades físico-químicas da lectina da PFL. (A) Estabilidade térmica. (B) Estabilidade a variações de pH.

Uma das características principais das lectinas de leguminosas é o fato de que estas possuem sítios de ligação a cátions divalentes, principalmente cálcio e manganês, em suas estruturas. Esses íons atuam estabilizando a estrutura do sítio de ligação a carboidratos e sua ausência resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004). Contudo, a atividade hemaglutinante da lectina de sementes de *P. floribundum* não foi afetada após diálise exaustiva da proteína nativa contra solução de EDTA 0,1 M. Estes resultados sugerem que a PFL, diferentemente da maioria das lectinas de leguminosas (LORIS *et al.*, 1998; CAVADA *et al.*, 2001), não necessita de íons metálicos para sua atividade ou estes íons, se presentes na estrutura da proteína, estão fortemente ligados a molécula e não são quelados pelo EDTA.

Por outro lado, a lectina de *Pterocarpus angolensis*, também da tribo Dalbergieae, teve sua atividade hemaglutinante completamente perdida após tratamento com EDTA (ECHEMENDIA-BLANCO *et al.*, 2009). Outra lectina de leguminosa, como por exemplo, a lectina de *Bauhinia pentandra* (SILVA *et al.*, 2001) teve sua atividade hemaglutinante inibida por EDTA, enquanto que outras lectinas deste mesmo gênero, a lectina de sementes de *B.*

variegata (SILVA *et al.*, 2007) e *B. bauhinioides* (SILVA *et al.*, 2010) não tiveram sua atividade hemaglutinante afetada por este agente quelante.

4.3. Determinação da Massa Molecular Sequenciamento por Espectrometria de Massa

A massa molecular da lectina purificada foi determinada através da técnica de espectrometria de massa com Ionização por Eletrospray (ESI). A análise indicou que a PFL possui uma massa molecular de 27.053 Da (Figura 11).

Os peptídeos oriundos da digestão foram aplicados ao espectrômetro de massa e seus dados foram coletados, processados e analisados utilizando o programa MassLynx v4.1 (Waters Corp) e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp). Os peptídeos comuns a outras proteínas

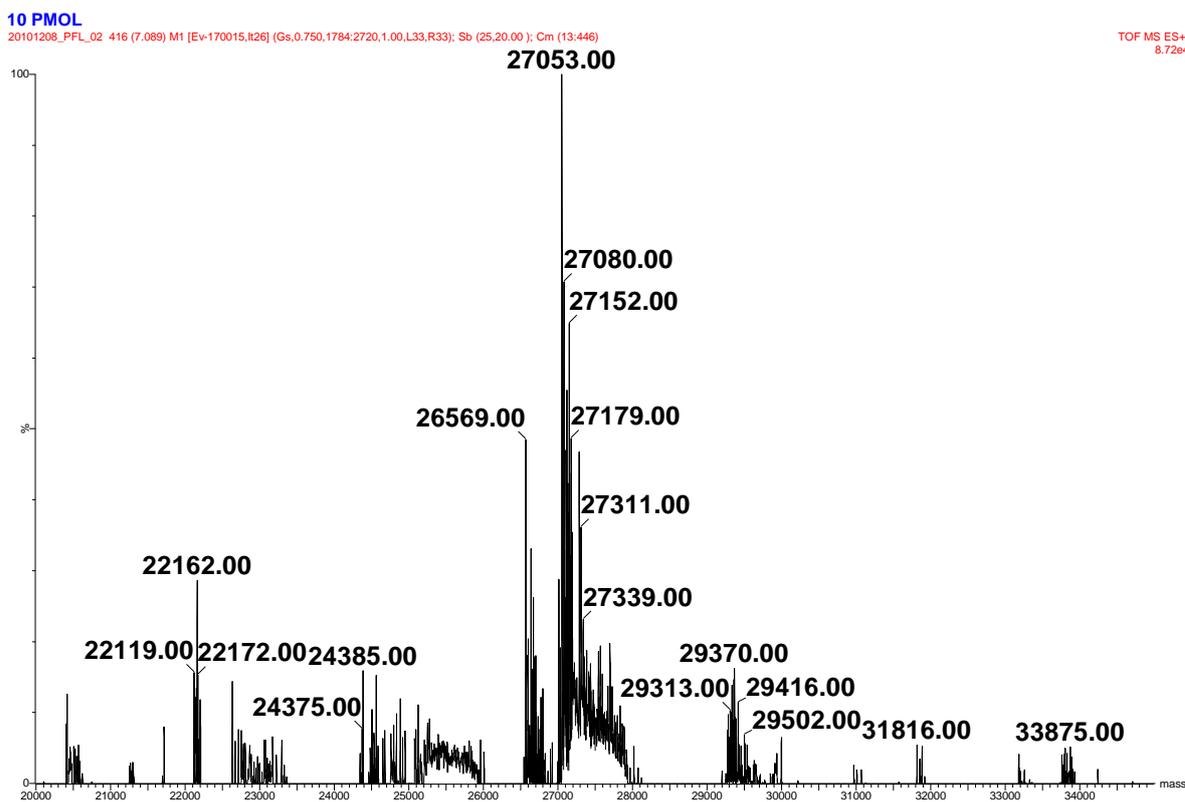
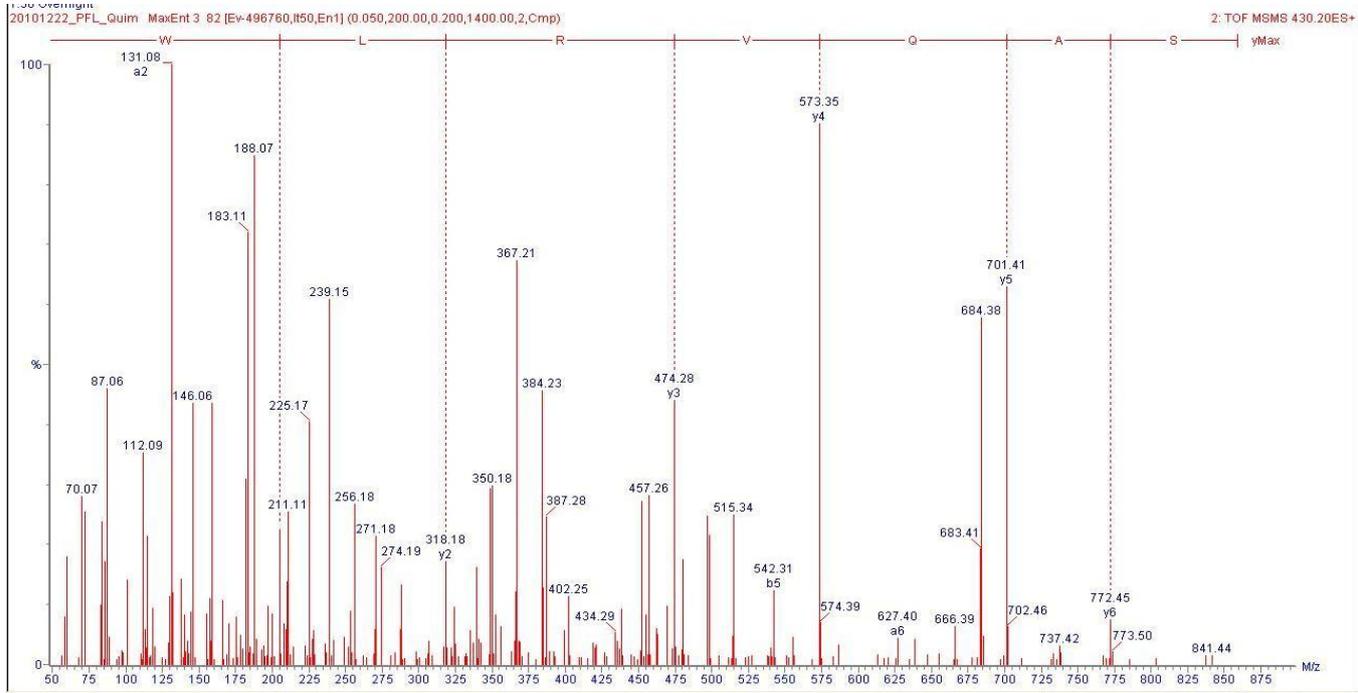


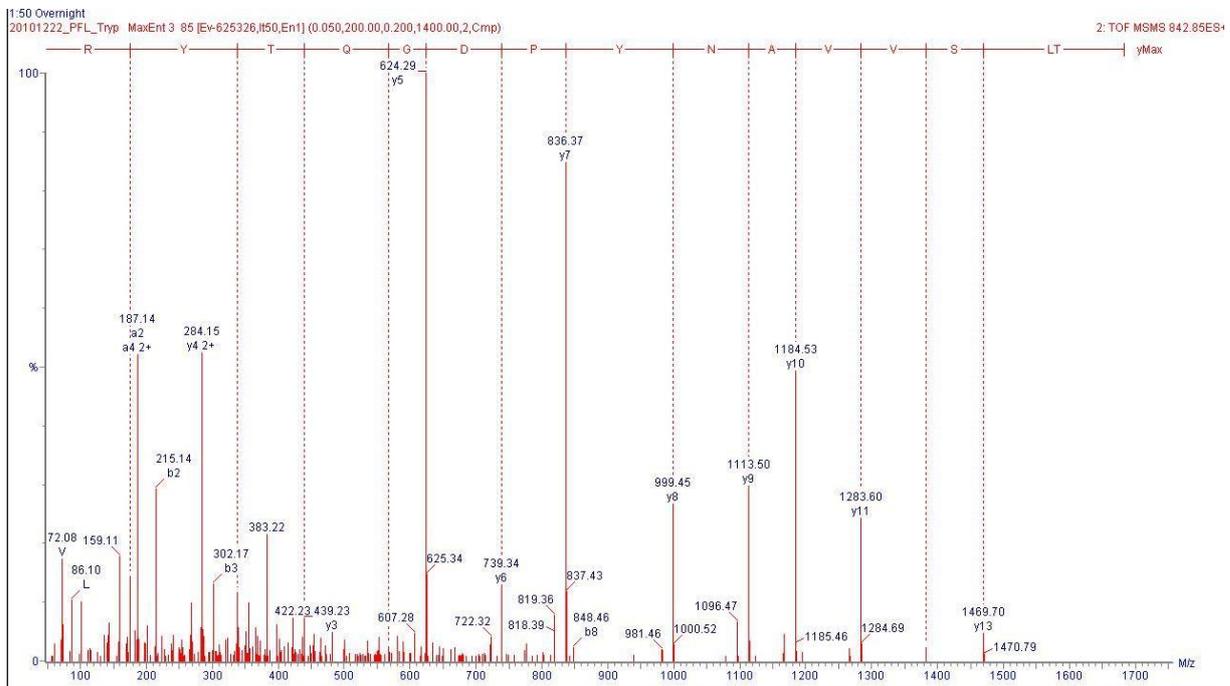
Figura 11: Análise por Espectrometria de Massa com Ionização por Eletrospray. Espectro de massa deconvolvido mostrando a massa média de PFL.

foram sequenciados por buscas em banco de dados utilizando ferramenta de pesquisa por padrão de fragmentação dos peptídeos nos programas ProteinLynx e MASCOT (Matrix Science). Foram encontrados peptídeos da PFL comuns aos da sequência da lectina de *Pterocarpus angolensis*, a qual foi utilizada como modelo para sequenciar a PFL. Os demais

peptídeos foram sequenciados manualmente por sequenciamento *De novo* (Figura 12). Ao final, obteve-se a seqüência parcial da PFL (55 % da seqüência total) através da sobreposição dos peptídeos sequenciados, a qual está representada no mapa de peptídeos (Figura 13).



A



B

Figura 12: Análise de peptídeos por MS/MS. (A) sequenciamento *De novo* do espectro de massa do peptídeo Q1 obtido da digestão com quimiotripsina. (B) sequenciamento *De novo* do espectro de massa do peptídeo T6 obtido da digestão com tripsina.

1 QDSL~~S~~FGFPT F~~P~~S~~D~~QKNLIF QGDAQ~~T~~KN~~N~~A VQLTKTDSNG NPVASTVGRI LFSAQV~~H~~LWE
 SDSL~~S~~SFSYNN F~~D~~R NLIF QGDAQ~~V~~SR SAQV~~R~~LW
 (T1) (T2) (Q1)

61 KSSSR~~V~~ANFQ S~~Q~~F~~S~~F~~S~~LK~~S~~P LSN~~G~~ADGIAF FIAPPD~~T~~TIP SGSGG~~L~~LGL FAPGTAQNTS
 LANFQ T~~Q~~F~~S~~F~~V~~LR
 (T3)

121 ANQVIAVEFD TFYAQDSNTW DPNYP~~H~~IGID VNSIRSVKTV KWDRRD~~G~~QSL NVLVT~~F~~NPST
 HIGID VNSIR S~~Q~~LL NVLVT~~Y~~EGST
 (T4) (T5)

181 RNL~~D~~VVATYS DG~~T~~RYEVS~~Y~~E VD~~V~~R~~S~~VLPEW VRVGFSAASG EQYQ~~T~~H~~T~~LES WSFTSTLLYT
 RTLS~~V~~VANYP DG~~Q~~TYR VGFSASSG L~~Q~~V~~Q~~SHSLAS WSFTSTLLYT
 (T6) RLSHV VDL AALPEW VRVGF (T7)
 (Q2) (Q3)

241 A~~Q~~KKGENLAL EM
 AR

Figura 13: Mapa de peptídeos obtido pela digestão com tripsina (T) e quimiotripsina (Q). A primeira linha corresponde a sequência da lectina de *Pterocarpus angolensis* (Uniprot: Q8GSD2), as outras linhas são os peptídeos obtidos pela digestão com tripsina (T) e com quimiotripsina (Q) referentes a sequência da PFL. Os aminoácidos idênticos nas sequências estão em preto e os que diferiram estão em vermelho.

O alinhamento da sequência parcial da PFL com outras sequências de lectinas de espécies da tribo Dalbergieae mostrou a presença de regiões de similaridades consideráveis (Figura 14). A sequência parcial da PFL apresentou 79 % de similaridade com a rPEL (Lectina recombinante de *Platypodium elegans*), 70 % com a PAL (lectina *Pterocarpus angolensis*), 67 % com a lectina de *Pterocarpus rotundifolius*, 70 % com a lectina de *Arachis hipogaea* e 49 % com a lectina VML (Lectina de *Vatairea macrocarpa*).

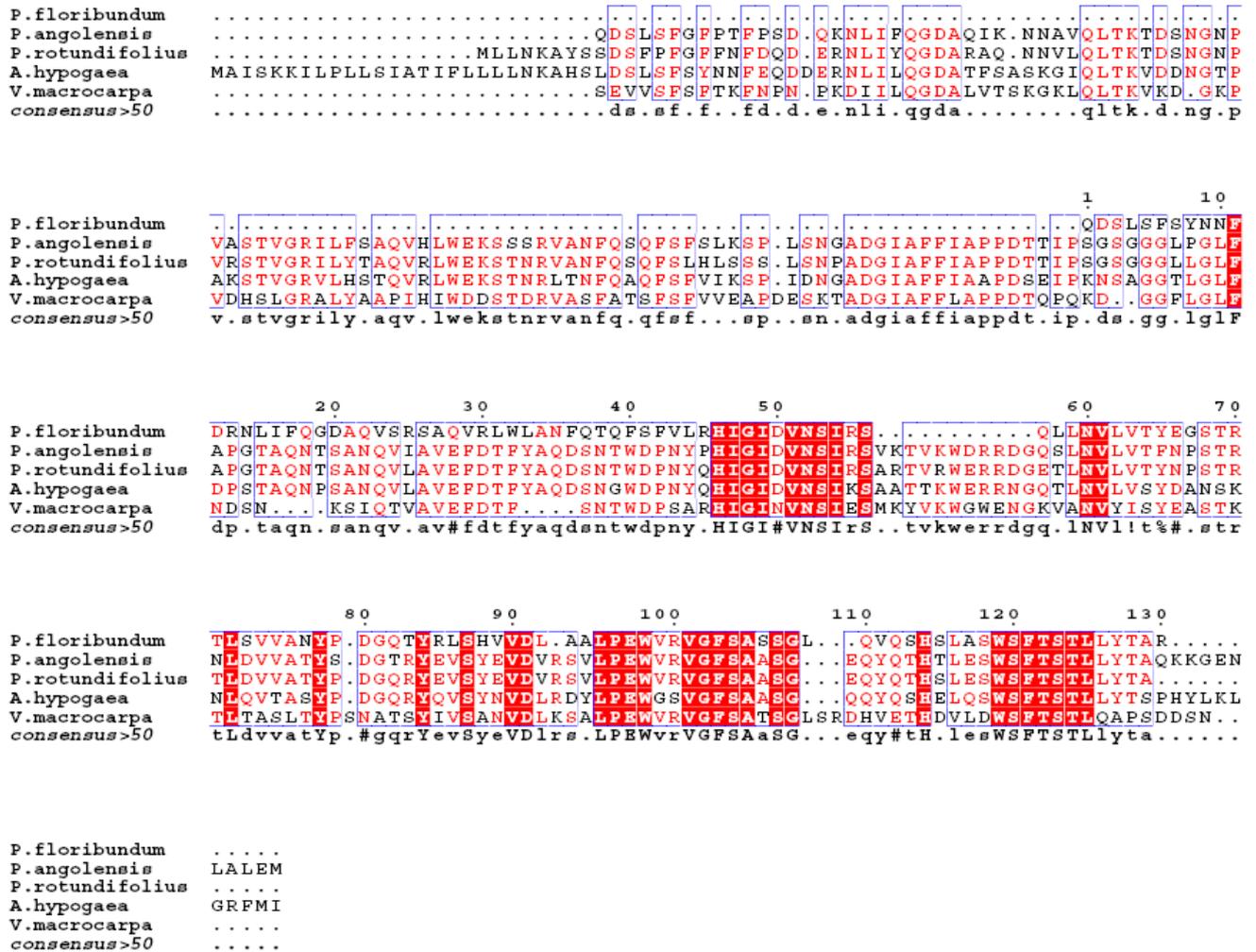


Figura 14: Alinhamento da sequência parcial de PFL com outras lectinas da tribo Dalbergieae. O alinhamento foi realizado utilizando o programa na internet ESPrict 2.2. *P. Angolensis* (Uniprot: Q8GSD2), *P. rotundifolius* (Uniprot: Q6GUG5), *A. hypogaea* (Uniprot: Q43374), *V. macrocarpa* (Uniprot: P81371).

4.3. Cristalização da Lectina de Sementes de *P. floribundum*

Um dos paradoxos na cristalização é que uma solução que oferece as condições ótimas para a nucleação de cristais nem sempre é ideal para favorecer o subsequente crescimento do mesmo. Isto porque a nucleação espontânea ocorre facilmente em níveis elevados de supersaturação, enquanto que o crescimento ordenado de cristais é favorecido por baixos níveis de supersaturação (BERGFORS, 2003).

A proteína liofilizada, previamente purificada foi submetida ao *screen* de cristalização, utilizando o método da matriz esparsa inicialmente descrito por Jancarik e Kim (1991). Os kits utilizados foram o Crystal Screen 1 e Crystal Screen 2 (Hampton Research) onde as variáveis iniciais foram pH, sal e precipitantes. Foram obtidos cristais de PFL nativa e complexada com manose nas condições 36 (Tris-HCl 0,1M pH 8,5 / PEG 8000 8% (m/v)), 37

(Acetato de Sódio Triidratado 0,1 M pH 4,6 / PEG 4000 8 % (m/v)) e 50 (Sulfato de Lítio Monohidratado 0,5 M / PEG 8000 15 % (m/v)) do Crystal Screen 1 e nas condições 36 (HEPES 0,1 M pH 7.5 / cloreto de sódio 4,3 M) e 43 (fosfato monobásico de amônio 0,2 M/ Tris 0,1 M pH 8,5 / 50 % v/v (+/-)-2-Metil-2,4-pentanodiol) do Crystal Screen 2 (Figura 15).

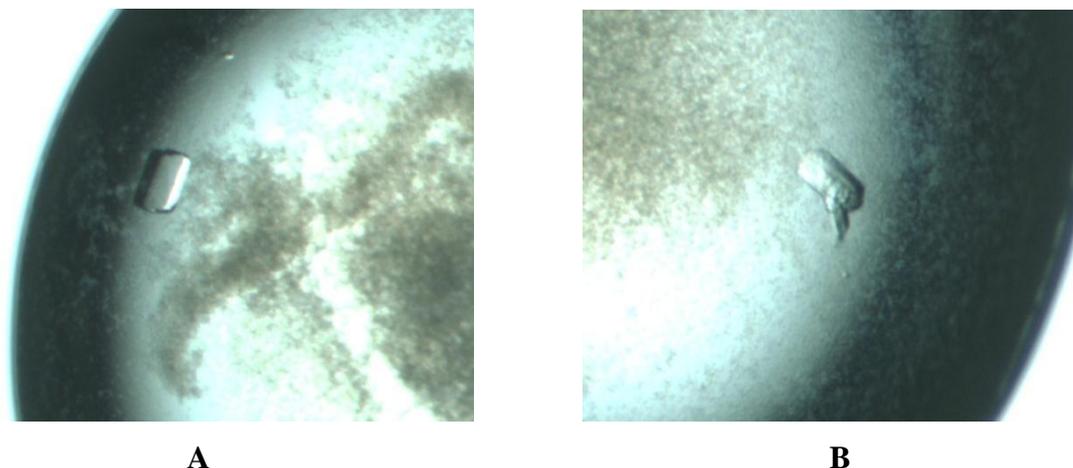


Figura 15: Cristais da lectina de *Platymiscium floribundum*. Condição 37 do Crystal Screen 1 contendo Acetato de Sódio Triidratado 0,1 M pH 4,6 / PEG 4000 8 % (m/v) (A) Cristal da proteína nativa, (B) cristal da proteína complexada com manose

Os cristais da PFL foram levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo, para realização da difração de raios X, porém os cristais não resistiram a viagem e foram desfeitos. A fragilidade é um indicio da composição protéica dos cristais, uma vez que cristais de macromoléculas biológicas são bem mais frágeis em virtude das fracas interações entre as macromoléculas dentro da rede cristalina e do alto conteúdo de solvente nestes cristais (DELATORRE, 2006).

Até o presente momento, na tribo Dalbergieae, apenas a lectina ligante de manose/glicose de *Pterocarpus angolensis* (PAL) possui estrutura tridimensional determinada (LORIS *et al.*, 2003). Porém, muitas outras lectinas de leguminosas já tiveram sua estrutura determinada, como por exemplo, de lectinas de *Canavalia maritima* e *Canavalia gladiata* (BEZERRA *et al.*, 2007), *Cymbosema roseum* (CAVADA *et al.*, 2006) e *Parkia platycephala* (GALEGO DEL SOL *et al.*, 2005).

4.4. Avaliação da Atividade Antiedematogênica da Lectina

Para a avaliação da atividade antiedematogênica, a lectina foi administrada por via endovenosa (e.v.) nas doses de 0,01; 0,1 ou 1,0 mg/Kg (0,1mL/100g de massa corporal), 30

min. antes da aplicação s.c. do estímulo inflamatório. O grupo controle positivo de edema foi administrado com carragenina e o controle negativo com salina s.c. A PFL não apresentou atividade antiedematogênica (figura 16).

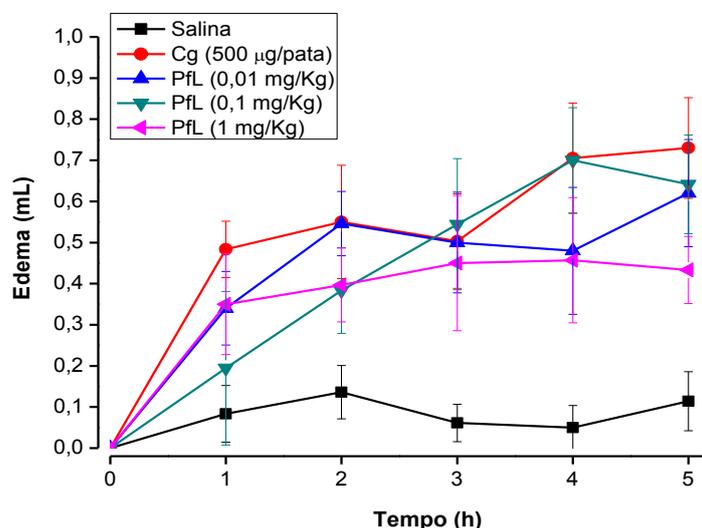


Figura 16: Efeito antiedematogênico da PFL. A lectina foi administrada por via endovenosa (e.v.) nas doses de 0,01; 0,1 ou 1,0 mg/Kg (0,1mL/100g de massa corporal), 30 min. antes da aplicação s.c. do estímulo inflamatório causado pela carragenina.

Por outro lado, lectina extraída de sementes de *Lonchocarpus sericeus*, também tribo Dalbergieae, apresentou alta atividade anti-inflamatória em modelo de edema de pata (ALENCAR *et al.*, 1999), além de efeito anti-inflamatório e antibacteriano em um modelo de peritonite infecciosa (ALENCAR *et al.*, 2005) e diminuição da migração leucocitária e hipernocicepção mecânica pela inibição da produção de citocinas e quimiocinas (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

A lectina extraída de *Vatairea macrocarpa*, outra espécie da mesma tribo, possui efeitos biológicos que incluem a indução da infiltração de leucócitos em edema de pata (ALENCAR *et al.*, 2004), liberação de mediadores quimiotáticos por macrófagos (ALENCAR *et al.*, 2007), aumento da resistência vascular renal, taxa de filtração glomerular e fluxo urinário (MARTINS *et al.*, 2005), migração de neutrófilos *in vivo* por mecanismo indireto (ALENCAR *et al.*, 2003) e apresenta especificidade para resíduos de antígeno Tn (DAM *et al.*, 2007).

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que uma lectina específica para manose de sementes de *Platymiscium floribundum* Vogel foi purificada através de um protocolo simples, reproduzível e eficiente. A lectina possui uma massa de 27.054 Da, apresentando-se estável em uma ampla faixa de temperatura e pH, não perdendo sua atividade pelo tratamento com agente quelante. Estes resultados reforçam a importância das interações proteínas-carboidratos nas células e fornecem subsídios para a utilização de lectinas vegetais com ferramentas biotecnológicas em estudos envolvendo os mecanismos de interação proteína-carboidrato.

REFERÊNCIAS

- AEBERSOLD R, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics. (2003) *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):198-207.
- ALENCAR NM, ASSREUY AM, HAVT A, BENEVIDES RG, DE MOURA TR, DE SOUSA RB, RIBEIRO RA, CUNHA FQ, CAVADA BS. (2007) *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2007 Jan;374(4):275-82.
- ALENCAR NM, CAVALCANTE CF, VASCONCELOS MP, LEITE KB, ARAGÃO KS, ASSREUY AM, NOGUEIRA NA, CAVADA BS, VALE MR. (2005) Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol*. 57(7):919-22.
- ALENCAR NM, TEIXEIRA EH, ASSREUY AMS, CAVADA BS, FLORES CA, RIBEIRO RA. (1999) Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. *Mediators. Inflamm*. 8: 107–13.
- ALENCAR NMN, ASSREUY AMS, ALENCAR VBM, MELO SC, RAMOS MV, CAVADA BS, CUNHA FQ, RIBEIRO RA (2003) The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1674–1681
- ALENCAR NMN, ASSREUY AMS, CRIDDLE DN, SOUZA EP, SOARES PMG, HAVT A, ARAGÃO KS, BEZERRA, DP, RIBEIRO RA, CAVADA BS (2004) *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. *Protein Peptide Letters* 11:195–200.
- ALENCAR, N. M. N. ; ASSREUY, A. M. S. ; BINDÁ, A. H. ; BENEVIDES, R. G. ; R R MOURA ; SOUSA, R. B. ; RIBEIRO, R A ; CUNHA, F. Q. ; CAVADA, B.S. (2005) *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 374, p. 275-282.
- ARAÚJO-FILHO JH, VASCONCELOS IM, MARTINS-MIRANDA AS, GONDIM DM, OLIVEIRA JT. (2010). A ConA-like lectin from *Dioclea guianensis* Benth. has antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, unlike its homologues, ConM and ConA. *J Agric Food Chem*. 58(7):4090-6.
- ASSREUY AM, FONTENELE SR, PIRES ADE F, FERNANDES DC, RODRIGUES NV, BEZERRA EH, MOURA TR, DO NASCIMENTO KS, CAVADA BS. Vasodilator effects of *Diocleinae* lectins from the *Canavalia* genus. (2009) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 380(6):509-21.
- ASSREUY, A. M. S. ; MD, Shibuya ; GJ, Martins ; MLP, de Souza ; BS, Cavada ; RA, Moreira ; JA, Oliveira ; RA, Ribeiro ; CA, Flores . (1997) Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators of Inflammation, Inglaterra*, v. 6, p. 201-210.
- BANERJEE, R., DAS, K., RAVISHANKAR, R., SUGUNA, K., SUROLIA, A. & VIJAYAN, M. (1996). Conformation, Protein-Carbohydrate Interactions and a Novel Subunit Association in the Refined Structure of Peanut Lectin-Lactose Complex *J. Mol. Biol.*, 259: 281-296.

- BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B., GRANGEIRO, T.B., FREITAS, L.A.R. and BARRAL-NETTO, M. (2001) In Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96 (5): 673-678.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASSO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F. & LIMA, H.C. (1991). *Sistemática das Angiospermas do Brasil*. v.2. Viçosa, Imprensa Universitária.
- Batista FA, Goto LS, Garcia W, de Moraes DI, de Oliveira Neto M, Polikarpov I, Cominetti MR, Selistre-de-Araújo HS, Beltramini LM, Araújo AP. (2010). Camptosemin, a tetrameric lectin of *Camptosema ellipticum*: structural and functional analysis. *Eur Biophys J*. 39(8):1193-205.
- BAUHMANN, H., GAUDIE, J. (1994) The acute phase response. *Immunol. Today* , v. 15, p.74-80.
- BELITZ, H.D. AND WEDER, J.K.P. (1990). Protein inhibitor of hidrolases in plant foodstuffs. *Food Rev. Int.*, 6: 151-211.
- BENETEAU J, RENARD D, MARCHÉ L, DOUVILLE E, LAVENANT L, RAHBÉ Y, DUPONT D, VILAINE F, DINANT S. (2010) Binding properties of the N-acetylglucosamine and high-mannose N-glycan PP2-A1 phloem lectin in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 153(3):1345-61.
- BENEVIDES, R.G. (2008). Avaliação do Potencial Fungicida e Termiticida de uma Fração Protéica Lectínica de Sementes de *Platypodium elegans* Vogel e Obtenção da Lectina Purificada. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- BENJAMIN, C.F., FIGUEIREDO, R.C., HENRIQUES, M.G.M.O., BARJA-FIDALGO, C. (1997). Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 30: 873-881.
- BEZERRA, GA, OLIVEIRA TM, MORENO FBMB, SOUZA EP, ROCHA BAM, BENEVIDES RG, DELATORRE P, AZEVEDO JR, WA, CAVADA BS (2007)Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: New insights into the understanding of the structure–biological activity relationship in legume lectins. *Journal of Structural Biology* 160: 168–176.
- BEZERRA, D. P.; LEITE, K. B.; NUNES, E. P.; MARINHO, E. S.; CAVADA, B. S.(2003) Purificação de uma Lectina Presente em Sementes de *Machaerium acutifolium*. In: XXVI Reunião Nordestina de Botânica, Fortaleza. Anais da XXVI Reunião Nordestina de Botânica.
- BISWAS S, AGRAWAL P, SAROHA A, DAS HR.(2009) Purification and mass spectrometric characterization of *Sesbania aculeata* (Dhaincha) stem lectin. *Protein Journal*. 28(9-10):391-9.

- BONNEIL E, YOUNG NM, LIS H, SHARON N, THIBAUT P. (2004) Probing genetic variation and glycoform distribution in lectins of the *Erythrina* genus by mass spectrometry. *Arch Biochem Biophys.* 426:241–9.
- BOUCKAERT, J., DEWALLEF, Y., POORTMANS, F., WYNS, L. & LORIS, R. (2000). The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 19778–87.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254. 1976.
- BUTS L, GARCIA-PINO A, IMBERTY A, AMIOT N, BOONS GJ, BEECKMANS S, VERSÉES W, WYNS L, LORIS R. (2006) Structural basis for the recognition of complex-type biantennary oligosaccharides by *Pterocarpus angolensis* lectin. *FEBS J.* 273(11):2407-20.
- CALVETE, J. J., THOLE, H. H., RAIDA, M., URBANKE, C., ROMERO A., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., ALMEIDA DA ROCHA, I. M, GUIMARÃES, F.N., CAVADA, B.S.. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1430, 367-375, 1999.
- CANTU, M.D., CARRILHO, E., WULFF, N.A., PALMA, M.S. (2008) SEQUENCIAMENTO DE PEPTÍDEOS USANDO ESPECTROMETRIA DE MASSAS: UM GUIA PRÁTICO. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 3, 669-675.
- CAVADA, B. S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T. B., & BARRAL NETTO, M. (2001). Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Current Protein and Peptide Sciences*, 2: 123–135.
- CAVADA, B. S., MORENO, F. B. B., ROCHA, B. A. M. da, AZEVEDO, J.R., W. F. de, CASTELLÓN, R. E. R., GOERSCH, G. V., NAGANO, C. S., SOUZA, E. P. de, NASCIMENTO, K. S., RADIS-BAPTISTA, G., DELATORRE, P., LEROY, Y., TOYAMA, M. H., PINTO, V. P. T., SAMPAIO, A. H., BARETTINO, D., DEBRAY, H., CALVETE, J. J. & SANZ, L. (2006). cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. *FEBS Journal*, 273: 3962–3974.
- CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Ducke. *Phytochemistry*, v. 49, p. 675-680. 1998.
- CECCATTO VM, CAVADA BS, NUNES EP, NOGUEIRA NA, GRANGEIRO MB, MORENO FB, TEIXEIRA EH, SAMPAIO AH, ALVES MA, RAMOS MV, CALVETE JJ, GRANGEIRO TB. (2002). Purification and partial characterization of a lectin from *Canavalia grandiflora* benth. seeds. *Protein Peptide Letters.* 9(1):67-73.
- CHAMRAD DC, KÖRTING G, STÜHLER K, MEYER HE, KLOSE J, BLÜGGEL M. (2004) Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. *Proteomics.* 4(3):619-28.

- CHEN, X.J., CARROLL, J.A. and BEAVIS, R.C. (1998) Near-UV-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 9 (9), 885-91.
- CLAYDON, M.; DAVEY, S.; EDWARD-JONES, V.; GORDON, D. (1996) The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, v. 14, n. 11, p. 1584-1586.
- CONTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. (2000). *Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.
- DAM TK, GERKEN TA, CAVADA BS, NASCIMENTO KS, MOURA TR, BREWER CF. (2007) Binding studies of alpha-GalNAc-specific lectins to the alpha-GalNAc (Tn-antigen) form of porcine submaxillary mucin and its smaller fragments. *The Journal Of Biological Chemistry*. 282: 28256–28263.
- DELATORRE, P. ; DELLAMANO, M. ; FADEL, V ; HONDA, R. ; SMARRA, A. L. S. ; CANDURI, F ; OLIVIERI, J. R. ; RODRIGUEZ, G. O. B. ; F, Azevedo Junior, W. . (2000) Crystallographic studies of fish hemoglobins. *Eclética Química (Araraquara) JCR*, São Paulo - Brasil, v. 25, p. 147-159.
- DELATORRE, P. (2006) *Lectinas de leguminosas: novos enfoques estruturais para velhas moléculas*. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., SOUZA, E. P., OLIVEIRA, T.M., BEZERRA, G.A., MORENO, F.B., FREITAS, B.T., SANTI-GADELHA, T., SAMPAIO, A. H., AZEVEDO JR., W. F., CAVADA, B. S. (2007). Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules *BMC Struct. Biol.*, 7: 52.
- DENNIS, J.W., GRANOVSKY, M., WARREN, C.E. (1999). Protein glycosylation in development and disease. *BioEssay*, 21:412–21.
- DREISEWERD, K. (2003) The Desorption Process in MALDI. *Chem. Rev.*, 103, 395.
- DUBOIS, M. et al. (1956). Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-356.
- ECHEMENDIA-BLANCO D, VAN DRIESSCHE E, NCUBE I, READ JS, BEECKMANS S.(2009)Stability, subunit interactions and carbohydrate-binding of the seed lectin from *Pterocarpus angolensis*.*Protein Pept Lett*. 16(9):1120-34.
- ELIAS, J.E., HAAS, W., FAHERTY, B.K. & GYGI, S.P.(2005)Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nat. Methods* 2, 667–675.
- FELDSTED, R., EGORIN, M., LEAVITT, R., & BAUCHUR, N. Recombination of subunits of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 252, p. 2967–2971. 1977.
- FENG, X.; LIU, X.; LUO, Q.; LIU, B. F. (2008) Mass spectrometry in systems biology: an overview. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 27, n. 6, p. 635-60.

- FENSELAU, C.; DEMIREV, P. A. (2001) Characterization of intact microorganism by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 20, n. 4, p. 157-171.
- FERRIGE, A.G., SEDDON, M.J., GREEN, B.N., JARVIS, S.A., SKILLING, J., (1992). Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6, 707–711.
- FIGUEIREDO JG, DA SILVEIRA BITENCOURT F, BESERRA IG, TEIXEIRA CS, LUZ PB, BEZERRA EH, MOTA MR, ASSREUY AM, DE QUEIROZ CUNHA F, CAVADA BS, DE ALENCAR NM.(2009)Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice.*Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 380(5):407-14.
- FREIRE, M.G.M., DESOUZA, I.A., SILVA, A.C.M., MACEDO, M.L.R., LIMA, M.S., TAMASHIRO, W.M.S.C., ANTUNES, E., MARANGONI, S. (2003). Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. *Toxicon.* 42: 275-280.
- GABIUS, H.J. & GABIUS, S. (1997). *Glycoscience. Status and Perspectives.* Chapman & Hall, Weinheim, Germany.
- GABIUS,H.J. (2000) Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code, *Naturwissenschaften*, v.87, p.108–121.
- GADELHA CA, MORENO FB, SANTI-GADELHA T, CAJAZEIRAS JB, ROCHA BA, ASSREUY AM ET AL (2005) Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. *Journal Structural Biology* 152:185–194.
- GALEGO DEL SOL, F., NAGANO, C.S., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J. (2005). The First Crystal Structure of a Mimosoideae Lectin Reveals a Novel Quaternary Arrangement of a Widespread Domain. *J. Mol. Biol.*, 353: 574–583.
- GARCIA-PINO A, BUTS L, WYNS L, IMBERTY A, LORIS R. (2007)How a plant lectin recognizes high mannose oligosaccharides.*Plant Physiol.* 144(4):1733-41.
- GARCIA-PINO A, BUTS L, WYNS L, LORIS R.(2006)Interplay between metal binding and cis/trans isomerization in legume lectins: structural and thermodynamic study of *P. angolensis* lectin.*J Mol Biol.* 361(1):153-67.
- GENTRY, A.H. A field guide to the families and genera of woody plants of northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru) with supplementary notes on herbaceous taxa. The University of Chicago Press, p. 895. 1993.
- GOLDSTEIN IJ, HUGHES RC, MONSIGNY M, OSAWA T, SHARON N. What should be called a lectin? (1980) *Nature*;285:66.
- GUZMAN-PARTIDA AM, ROBLES-BURGUENO MR, ORTEGA-NIEBLAS M, VAZQUEZ-MORENO I. (2004) Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. *Biochimie.* 86:335–42.

- HAMELRYCK, T.W., LORIS, R., BOUCKAERT, J., WYNS, L. (1998) Properties and structure of the legume lectin family. *Trends in Glycoscience and Glycobiology*, 10: 349-404.
- HAN, C. H.; LIU, Q. H.; NG, T. B.; WANG, H. X. A novel homodimeric lactose-binding lectin from the edible split gill medicinal mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 14, p. 336. 2005.
- HERNANDEZ P, DEBRAY H, JAEKEL H, GARFIAS Y, JIMENEZ MD MDEL C, MARTINEZ-CAIRO S, ZENTENOO E. (2001) Chemical characterization of the lectin from *Amaranthus leucocarpus* syn. *Hypocondriacus* by 2-D proteome analysis. *Glycoconj J*. 18:321-9.
- HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3. Ed. West Sussex, England: Wiley-Interscience, 2007. 502.
- JANCARIK, J.; KIM, S. H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography*, 24, 409-411.
- JOUBERT, F.J., SHARON, N., MERRIFIELD, E. H. (1986). Purification and properties of a lectin from *Lonchocarpus capassa* (apple-leaf) seed. *Phytochemistry*.
- KARAS M, HILLENKAMP F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*. 60(20):2299-301.
- KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SEXANA, A. K.; PANDITA, R. M.; SHAMNUGAVEL. (2005) M. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. *Phytochemistry*, v. 66, p. 16.
- KIEDA, C. (1998). Role of lectin-glycoconjugate recognitions in cell-cell interactions leading to tissue invasion. *Adv. Exp. Med. Biol*. 435: 75-82.
- KLITGAARD, B.B. A new species and nomenclatural changes in neotropical *Platymiscium* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae). *Kew Bulletin*, v. 54, p. 967-973. 1999.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685. 1970.
- LANSEN, G.L.; HENSON, P.M. Mediators of inflammation. *Rev. Immunol* ., v. 1, p.335-359, 1993.
- LEWIS, G.P., B. SCHRIRE, B. MACKINDER & M. LOCK. (2005). *Legumes of the world*. Royal Botanical Gardens, Kew.
- LIMA, M. E. P.; CARNEIRO, M. E.; NASCIMENTO, A. E.; GRANGEIRO, T. B.; HOLANDA, M. L.; AMORIM, R. C. N. AND BENEVIDES, N. M. B. Purification of a Lectin from the Marine Red Alga *Gracilaria cornea* and Its Effects on the Cattle Tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 6414-6419. 2005.

- LORENZI, H.(1998) árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do brasil, vol 2. Nova Odessa. ed. Plantarum Ltda.
- LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1572, p. 198-208. 2002.
- LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J., WYNS, L. Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1383, p. 9-36. 1998.
- LORIS, R., IMBERTY, A., BEECKMANS, S., VAN DRIESSCHE, E., READ, J. S., BOUCKAERT, J. ET AL. (2003). Crystal structure of *Pterocarpus angolensis* lectin in complex with glucose, sucrose and turanose. *J. Biol. Chem.* 278, 16297–16303.
- LORIS, R.; VAN WALLE, I.; DE GREVE, H.; BEECKMANS, S.; DEBOECK, F.; WYNS, L.; BOUCKAERT, J. Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. *Journal of Molecular Biology*, v. 335, p. 1227. 2004.
- MACEDO, M.L.R., FREIRE, M.G.M., SILVA, M.B.R., COELHO, L.C.B.B. (2007). Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes fubsasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Pruchidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 146: 486–498.
- MAKHLOF A, FUJIMOTO S, TOZUKA Y, TAKEUCHI H (2010).In vitro and in vivo evaluation of WGA-carbopol modified liposomes as carriers for oral peptide delivery. *Eur J Pharm Biopharm.*
- MANN, K., FARIAS, C. M. S. A., GALLEGO DEL SOL, F., SANTOS, C. F., GRANGEIRO, T. B., NAGANO, C. S., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J. (2001). The amino-acid sequence of the glucose/ mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveal three tandemly arranged jacalin related domains. *Eur. J. Biochem.*, 218, 4414–4422.
- MARONDEDZE C., CHIDZWONDO F., SITHOLE-NIANG I., READ J.S. (2004). *Pterocarpus rotundifolius* lectin gene.Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- MARTINS AM, MONTEIRO AM, HAVT A, BARBOSA PS, SOARES TF, EVANGELISTA JS, DE MENEZES DB, FONTELES, MC, TEIXEIRA EH, PINTO, VP, NASCIMENTO, KS, ALENCAR NM, CAVADA BS (2005) Renal effects induced by the lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds. *J Pharm Pharmacol* 57:1329–1333.
- McGEER, P.L. & McGEER, E.G. (2000). Autotoxicity and Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 57:789-790.
- MOLINA, M. C.; VINCENTE, C. Correlationships between enzymatic activity of lectins, putrescine content and chloroplast damage in *Xanthoria parietina phycobionts*. *Cell Communication and Adhesion*, v. 3, p. 1-12. 1995
- MOREIRA, R. A. & PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, v. 59, p. 783-787. 1977.

- NAEEM A, KHAN RH, VIKRAM H, AKIF M.(2001)Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques.Arch Biochem Biophys. 396(1):99-105.
- NAGANO, C.S., CALVETE, J.J., BARETTINO, D., PÉREZ, A., CAVADA, B.S., SANZ, L. (2008). Insights in to the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer Equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. Biochem. J., 409: 417 – 428.
- NAGANO, C. S.; MORENO, F. B. M. B.; BLOCH JUNIOR, C; PRATES, M. V.; CALVETE, J. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L.; TAVARES, T. D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. Protein and Peptide Letters, p. 159-165, 2002.
- NAPIMOGA, M. H.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M.; MOTA, M. L.; BITTENCOURT, F. S.; ALVES-FILHO, J. C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R. B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; DE FREITAS, A.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.. (2007) Lonchocarpus sericeus lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. Int Immunopharmacol., 824–835,
- NUNES BS, RENSONNET NS, DAL-SECCO D, VIEIRA SM, CAVADA BS, TEIXEIRA EH, MOURA TR, TEIXEIRA CS, CLEMENTE-NAPIMOGA JT, CUNHA FQ, NAPIMOGA MH.(2009)Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects.Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 379(6):609-16.
- OHIZUMI Y, GAIDAMASHVILI M, OHWADA S, MATSUDA K, KOMINAMI J, NAKAMURA-TSURUTA S, HIRABAYASHI J, NAGANUMA T, OGAWA T, MURAMOTO K. (2009). Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae).J Agric Food Chem. 57(7):2896-902.
- PADMA, P.; KOMATH, S. S.; NADIMPALLI, S. K.; SWAMY, M. J. Purification in high yield and characterization of a new galactose-specific lectin from the seds of *Trichosanthes cucumerina*. Phytochemistry, v. 50, p. 363-371. 1999.
- PEREIRA-JUNIOR FN. Purificação e Caracterização Parcial de uma Lectina Isolada de Sementes de *Platymiscium floribundum* Vogel. Crato: Monografia de graduação, URCA, 45 p., 2008.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiology, v. 109, p. 347-352. 1995.
- PEUMANS, W.J., H.C., WINTER, V., BEMER, F., VAN LEUVEN, I.J., GOLDSTEIN, P., TRUFFA-BACHI, E.J.M., VAN DAMME. Isolation of a novel plant lectin with and unusual specificity from *Calystegia sepium*. Glycoconjugate journal, v. 14, p. 259-265. 1997.

- PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J., BARRE, A. & ROUGÉ, P. (2001). Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 491:27-54.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant Lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 15, p. 199-227, 1998.
- PINTO, L.S., NAGANO, C.S., OLIVEIRA, T.M., MOURA, T.R., SAMPAIO, A.H., DEBRAY, H., PINTO, V.P., DELLAGOSTIN, O.A., CAVADA, B.S. (2008). Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. *J. Biosci.*, 33: 355–363.
- PRAKASHKUMAR, R., PUSHPANGADAN, P., VIJAYA KUMAR, T. Search for lectins in seeds of tropical trees of Kerala, India *Biologia Plantarum*, v. 40, p. 155-58. 1998.
- PUSTZAI, A. *Plant Lectins*. Cambridge University Press. 1991.
- RAMOS, M.V., MOREIRA, R.A., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., ROUGE, P. (1996). Interaction of lectins from the sub tribe Diocleinae with specific ligands. *R.Bras.Fisiol.Veg.*, 8(3): 193-199.
- RAMOS MV, BOMFIM LR, CAVADA BS, ALENCAR NMN, GRANGEIRO TB, DEBRAY H (2000) Further characterization of the glycan-binding specificity of the seed lectin from *Vatairea macrocarpa* and its dependence of pH. *Protein Peptide Letters* 7:241–248.
- RANG, H.P., DALE, M.M. & RITTER, J.M. (2001). *Pharmacology*. New York.
- RANGEL, T.B.A., CARVALHO, A.U., NASCIMENTO, K.S., CAVADA, B.S., FERNANDES, P.M.B.(2003) Isolamento e caracterização parcial de lectina proveniente de sementes da espécie vegetal *Andira fraxinifolia* (LEGUMINOSAE-FABACEAE). *Anais/Resumos da 61ª Reunião Anual da SBPC-ISSN 2176-1221*.
- RATANAPO, S., NGAMJUNYAPORN, W., CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. *Plant Science*, v. 160, p. 739-744. 2001.
- SAMPIETRO, A.R., ISLÃ, M.I., QUIROGA, E.N., VATTUONE, M.A. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. *Fruits. Plant Science*, v. 160, p. 659-667. 2001.
- SANTOS AF, CAVADA BS, ROCHA BA, NASCIMENTO KS, SANT'ANA AE. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*.(2010). *Bioresour Technol.* 101(2):794-8.
- SHARON, N. & LIS, H.(2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* vol. 14 no. 11: 53–62.
- SHARON, N. & LIS, H.(1989) *Lectins*. Chapman and Hall, London, v.126.

- SHARON, N. & LIS, H. (1990) Legume Lectins – A large family of homologous proteins. In FASEB Journal, v. 4, p. 3198-3208.
- SHARON, N. (1993) Lectins- carbohydrates complexes of plants and animals. Na atomic. Trends Biochem. Science, v. 18, p. 221-6.
- SHARON, N.; LIS, H. (1993) Carbohydrates in cell recognition. Scientific American, Jan., 74-80.
- SILVA HC, BARI AU, PEREIRA-JUNIOR FN, DA C SIMÕES R, NETO IL, NOBRE CB, PEREIRA MG, NASCIMENTO KS, ROCHA BA, DELATORRE P, NAGANO CS, ASSREUY AM, CAVADA BS. (2010) Purification and Partial Characterization of a New Pro-inflammatory Lectin from *Bauhinia bauhinioides* Mart (Caesalpinoideae) Seeds. Protein Pept Lett.
- SILVA, J. A.; DAMICO, D.C.S.; BALDASSO, P. A.; MATTIOLI, M. A.; WINCK, F. V.; FRACETO, L. F.; NOVELLO, J. C.; MARAGONI, S. Isolation and Biochemical Characterization of a Galactoside Binding Lectin from *Bauhinia variegata* Candida (BvCL) Seeds. The Protein Journal, v. 26, n. 3. 2007.
- SILVA, A. L. C. ; HORTA, A. C. G. ; MOREIRA, R. A. .(2001) Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (bong) vog. Ex. Steua.. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal JCR, v. 13, n. 3, p. 1.
- SIQUEIRA, J.R.; DANTAS, C.J.S. Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação. Rio de Janeiro: Medsi , p. 238, 2000.
- STEEN H, MANN M (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Nat Rev Mol Cell Biol 5: 699–711.
- STUMP, M.J., FLEMING, R.C., GONG, W.-H. et al. (2002). Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. Appl. Spectrosc. Rev., 37, 275.
- SUSEELAN, K.N., MITRA, R., PANDEY, R., SAINIS, K.B., AND KRISHNA, T.G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 407, p. 241-247. 2002.
- VAN DAMME EJ, BARRE A, SMEETS K, TORREKENS S, VAN LEUVEN F, ROUGE P, ET AL. (1995)The bark of *Robinia pseudoaccacia* contains a complex mixture of lectins. Plant Physiol;107:833–43.
- VAN DAMME, E.J.M., BRIKÉ, F., WINTER, H.C., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I.J. AND PEUMANS, W.J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. European journal of biochemistry, v. 236, p. 419-427. 1996.
- VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., BARRE, A. AND ROUGÉ, P. Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. Critical Reviews in Plant Sciences, v. 17, p. 575-692, 1998.

- VAN DAMME, E.J.M., S., GOUSSAERT, D., CHARELS, I.J., GOLDSTEIN, W.J., PEUMANS (1997). The mannose/maltose-specific Convolvulaceae lectins. *European Journal of Cell Biology*, v. 74, p. 7. 1997.
- VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I.J. & PEUMANS, W.J. Hevein: An antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, v. 183, p. 258-264. 1991.
- VILCEK, J.; FELDMAN, M. (2004) Historical review: cytokines as therapeutic and targets of therapeutics . *trends Pharmacologic sciences* . v.25, n. 4, p. 201-209.
- WALJUNO, K., SCHOLMA, R.A., BIENTEM, J., MARIONO, A. & HAHN, A.M. (1975). Amino acid sequence of heveine. *Proc. Int. Rubber Conf.*, Kuala Lumpur, 2:518-531.
- WEIS, W.I. AND DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*, v. 65, p. 441-473. 1996.
- WONG, J. H.; NG, T. B. (2005) Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 38, p. 234-43.
- YOUNG, N. M., WATSON, D. C. & THIBAUT, P. Mass spectrometric analysis of genetic and post-translational heterogeneity in the lectins jacalin and *Maclura pomifera* agglutinin. *Glycoconjugate Journal*, v. 12, p. 135-141. 1995.