

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURA  
PRIMÁRIA DA LECTINA DE SEMENTES DE  
*Pisum arvense* L.

LUZIA IZABEL MESQUITA MOREIRA DA SILVA

N.Cham. T 574.192 S581c

Autor: Silva, Luzia Izabel Mesquita Mo

Título: Caracterizacão bioquímica e estr



787841

Ac. 21952

BCT CAT

FORTALEZA — CEARÁ

1997



CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURA PRIMÁRIA DA LECTINA DE  
SEMENTES DE *Pisum arvense* L.

C411299

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
BCT / UFC CATIVO

LUZIA IZABEL MESQUITA MOREIRA DA SILVA

TESE APRESENTADA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM BIOQUÍMICA PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

T574.192  
S581c

FORTALEZA - 1997

UFC/BU/BCT 05/05/1998



R787841 Caracterizacão bioquímica e  
C411299 estrutura pr  
T574.192 S581c





R787841

Cod. Cat: C411299  
R787841

C  
T574.192  
S581c

574.19245  
S 581<sup>c</sup>

Silva, Luzia Izabel Mesquita Moreira da  
Caracterização bioquímica e estrutura primária da  
lectina de sementes de *Pisum arvense* L. / Luzia Izabel  
Mesquita Moreira da Silva. - Fortaleza, 1997.  
102 f. : il.  
Orientador: Benildo Sousa Cavada  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
1. Lectinas vegetais. 2. *Pisum arvense*. 3. Sequência  
de aminoácidos.  
I. Título

CDD 574.19245



Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas da ética científica.

Luzia Izabel Mesquita Moreira da Silva

Tese aprovada em 24/10/97

Dr. Benildo Sousa Cavada

Orientador da Tese

Presidente

LABLEC - UFC

Dr. Alexandre Holanda Sampaio

Conselheiro

LABLEC - UFC

Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silva

Conselheiro

LABFIX - UFC

Dr. Juan Jose Calvete

Conselheiro

Institut Für Reproduktionsmedizin - Hannover

Dra. Libia Sanz Sanz

Conselheira

Institut Für Reproduktionsmedizin - Hannover

Dr. Márcio Viana Ramos

Conselheiro

Depto. de Biologia - LABLEC - UFC



Ao meu pai , que mesmo não estando mais entre nós, está sempre presente em nossos corações

A minha mãe

A minha irmã

Ao meu esposo

Meus tesouros mais preciosos



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Benildo Sousa Cavada, por todo o apoio e incentivo principalmente nos momentos de desânimo, pelo seu otimismo e confiança, pelo interesse em proporcionar aos seus estudantes oportunidades para o crescimento profissional e pessoal ao trabalhar pelo envio destes ao exterior e por sempre afirmar que “querer é poder”.

Ao Dr. Juan Calvete, Institut für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule, Hannover, Alemanha, pela acolhida em seu laboratório e por toda a atenção dispensada durante minha estadia em Hannover. Pelo seu interesse e competência na orientação de parte do trabalho experimental, pela determinação da sequência de aminoácidos e espectrometria de massa e pelas valiosas sugestões na elaboração desta Tese.

A Dra. Libia Sanz pela atenção e companheirismo durante os meses que estive em Hannover e pela participação na avaliação final deste trabalho.

Ao Dr. M. Raida, Institut für Peptid-Forschung, Hannover, Alemanha, pela determinação das massas moleculares.

Ao Dr. A. Romero, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Espanha, pelos experimentos de cristalização.

Ao Dr. C. Urbanke, Medizinische Hochschule, Hannover, Alemanha, pelos experimentos de ultracentrifugação analítica.

Ao Dr. Manoel Barral-Netto pela acolhida no Laboratório Integrado de Microbiologia e Imuno-regulação em Salvador-BA para determinação da atividade mitogênica.

Ao Dr. Thalles Barbosa Grangeiro por quem tenho grande admiração pela sua competência e simplicidade e pelas valiosas sugestões.

Ao Dr. Márcio Viana Ramos e Dr. Alexandre Holanda Sampaio, pela atenção e importantes sugestões apresentadas na elaboração final deste trabalho.

Ao Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, pelo estímulo constante e interesse demonstrados, e pela participação na avaliação final deste trabalho.

Ao Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, pela atenção e valiosas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Carlos Couto Castelo Branco e Bernadete Maciel, pela amizade e compreensão.



Aos bolsistas de IC-CNPq e amigos João Batista Cajazeiras, Patrícia de Araújo Rodrigues e Carlos Alberto pela valiosa ajuda nos experimentos de germinação e preparação da lectina.

De modo especial, às amigas Cláudia Ferreira Santos e Flávia Andrea Mendonça de Sousa por todos estes anos de amizade e companheirismo, pela ajuda e sugestões durante os experimentos e elaboração da Tese.

As amigas Pat, Iza, Kátia, Creuza e Nádia pela cumplicidade e carinho demonstrados e também a Mazé e ao Ronaldo pela valiosa ajuda.

A Dra. Givanilda Aquino, Dr. José Teodoro, Amélia e Katianne pelo grande incentivo durante o período que trabalhei na Universidade Estadual Vale do Acaraú.

A Dra. Verbena Lima Vale por acreditar e incentivar o término deste trabalho.

Ao Dr. Magno e ao Prof. Luis Antônio pelo interesse, atenção e ajuda durante a elaboração do projeto de pesquisa apresentado no exame de qualificação.

Ao Dr. Renato Azevedo Moreira pelas sugestões apresentadas.

A funcionária Maria Nogueira Lima, pela atenção e interesse.

Aos bolsistas do grupo de lectinas, pelo companheirismo e cooperação. E a todos os professores, bolsistas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, pela cooperação durante a realização deste trabalho.

De maneira muito carinhosa, ao meu esposo pela valiosa colaboração na confecção deste trabalho, a minha mãe, a minha irmã, a minha avó e aos meus cunhados e cunhadas por toda dedicação e apoio sempre demonstrados.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Desenvolvimento Científico e Regional, e pelo convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, e por auxílios de pesquisa ao LABLEC, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da UFC.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio viagem que viabilizou a realização dos experimentos no Institut für Reproduktionsmedizin, Hannover, Alemanha pelo convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, e por auxílios de pesquisa ao LABLEC, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da UFC.

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pela bolsa de Doutorado concedida a candidata através de convênio com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), através de convênio com laboratório de lectinas (LABLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

International Foundation for Science (IFS), através de convênio com laboratório de lectinas LABLEC do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), através do financiamento do projeto Proteínas Vegetais, desenvolvido no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.



## SUMÁRIO

Página

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

### ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

### RESUMO

### ABSTRACT

1 -	<u>INTRODUÇÃO</u> .....	16
1.1 -	<u>Considerações Gerais</u> .....	16
1.2 -	<u>Lectinas de Leguminosas</u> .....	17
1.3 -	<u>Sequência de Aminoácidos e Homologia de Lectinas de Leguminosas</u> .....	22
1.4 -	<u>Síntese e processamento de Lectinas de Leguminosas</u> .....	23
1.5 -	<u>Isolamento de Lectinas da Tribo <i>Vicieae</i></u> .....	25
1.6 -	<u>Papel Fisiológico de Lectinas de Leguminosas</u> .....	26
1.7 -	<u>Objetivos do Trabalho</u> .....	28
2 -	<u>MATERIAIS</u> .....	29
2.1 -	<u>Sementes</u> .....	29
2.2 -	<u>Eritrócitos</u> .....	29
2.3 -	<u>Reagentes</u> .....	29
3 -	<u>MÉTODOS</u> .....	31
3.1 -	<u>Preparação da Farinha</u> .....	31
3.2 -	<u>Análise Elementar</u> .....	31
3.2.1 -	<u>Determinação de Umidade</u> .....	31
3.2.2 -	<u>Determinação do Nitrogênio Total</u> .....	31
3.2.3 -	<u>Determinação de Lipídios Totais</u> .....	32
3.2.4 -	<u>Determinação de Cinzas</u> .....	32
3.3 -	<u>Determinação de Proteínas</u> .....	33
3.4 -	<u>Determinação de Fibras</u> .....	33
3.5 -	<u>Determinação das Características Morfológicas das Sementes e Anatomia das Raízes de <i>Pisum arvense</i></u> .....	34
3.6 -	<u>Determinação da Atividade Hemaglutinante</u> .....	34
3.7 -	<u>Fracionamento das Proteínas</u> .....	35

3.7.1 - Extração das Proteínas.....	35
3.7.2 - Fracionamento do Extrato Protéico por Precipitação com Sulfato de Amônio.....	36
3.8 - <u>Cromatografia de Afinidade em Sephadex G-100</u> .....	36
3.9 - <u>Filtração em Gel da Lectina de <i>P.arvense</i> em coluna de Superose 12 HR 10/30 Acoplada em FPLC</u> .....	36
3.10 - <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e <math>\beta</math>-mercaptoetanol</u> .....	37
3.11 - <u>Ultracentrifugação Analítica</u> .....	37
3.12 - <u>Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares Simples</u> .....	38
3.13 - <u>Espectro de Absorção da Lectina de <i>P.arvense</i></u> .....	38
3.14 - <u>Determinação da Especificidade Sanguínea</u> .....	39
3.15 - <u>Determinação de Carboidratos Totais</u> .....	39
3.16 - <u>Termoestabilidade</u> .....	39
3.17 - <u>Efeito do EDTA Sobre a Atividade Hemaglutinante</u> .....	40
3.18 - <u>Determinação da Sequência N-terminal</u> .....	41
3.19 - <u>Isolamento das Subunidades da Lectina de <i>P.arvense</i></u> .....	41
3.20 - <u>Degradações Proteolíticas</u> .....	41
3.21 - <u>Isolamento dos Peptídios</u> .....	42
3.22 - <u>Determinação da Massa Molecular das Subunidades</u> .....	42
3.23 - <u>Análise de Aminoácidos</u> .....	43
3.24 - <u>Experimentos de Cristalização</u> .....	43
3.25 - <u>Experimentos de Germinação de Sementes de <i>P.arvense</i> na Ausência de Luz</u> .....	44
3.26 - <u>Atividade Mitogênica</u> .....	44
4 - <u>RESULTADOS</u> .....	46
4.1 - <u>Composição Mínima das Sementes de <i>P.arvense</i></u> .....	46
4.2 - <u>Características Morfológicas de Sementes e Anatomia de Raízes</u> .....	46
4.3 - <u>Extração das Proteínas</u> .....	50
4.4 - <u>Fracionamento das Proteínas</u> .....	50
4.5 - <u>Cromatografia de Afinidade em Sephadex G-100</u> .....	50
4.6 - <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e <math>\beta</math>-mercaptoetanol</u> .....	55
4.7 - <u>Determinação da Massa Molecular</u> .....	55



4.8 -	<u>Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante.....</u>	55
4.9 -	<u>Especificidade Sanguínea.....</u>	59
4.10 -	<u>Espectro de Absorção da Lectina de <i>Pisum arvense</i>.....</u>	59
4.11 -	<u>Determinação de Carboidratos.....</u>	59
4.12 -	<u>Termoestabilidade.....</u>	59
4.13 -	<u>Efeito do EDTA na Atividade Hemaglutinante.....</u>	63
4.14 -	<u>Sequência N-Terminal da Lectina de <i>P.arvense</i>.....</u>	63
4.15 -	<u>Isolamento das Subunidades <math>\alpha</math> e <math>\beta</math> da Lectina de <i>P.arvense</i>.....</u>	63
4.16 -	<u>Isolamento dos Peptídios.....</u>	65
4.17 -	<u>Determinação das Massas Moleculares.....</u>	65
4.18 -	<u>Composição de Aminoácidos.....</u>	65
4.19 -	<u>Determinação da Sequência de Aminoácidos.....</u>	72
4.20 -	<u>Experimentos de Cristalização.....</u>	72
4.21 -	<u>Ultracentrifugação Analítica.....</u>	72
4.22 -	<u>Germinação de Sementes de <i>P.arvense</i> na Ausência de Luz.....</u>	75
4.23 -	<u>Atividade Mitogênica.....</u>	75
5 -	<u>DISCUSSÃO.....</u>	79
6 -	<u>CONCLUSÕES.....</u>	86
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	88



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 - Sementes de <i>P.arvense</i> .....	48
2 - Secção transversal (A) e longitudinal (B) da raiz primária.....	49
3 - Esquema de fracionamento das proteínas de sementes de <i>Pisum arvense</i> .....	52
4 - Cromatografia de afinidade da Fração 0/60 em Coluna de Sephadex G-100 (2,4 cm x 26,6 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,2 e eluída com a solução de equilíbrio, seguida do mesmo tampão contendo glicose 0,1 M. Amostra: 10 ml; Fluxo: 20 ml/h; Frações: 3,0 ml.....	54
5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e $\beta$ -mercaptoetanol da lectina de <i>Pisum arvense</i> . A- Marcadores de massa molecular: fosforilase B (98 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), mioglobina (21 kDa) e lisozima (14 kDa). B e C- Lectina de <i>P.arvense</i> .....	56
6 - Determinação da massa molecular aparente da lectina de <i>P.arvense</i> por cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 HR 10/30 acoplada a um sistema de FPLC. Marcadores de peso molecular: 1- tetrâmero (104 kDa) e 2- dímero (52 kDa) da Con A; 3- albumina sérica bovina (66 kDa); 4- ovalbumina (45 kDa) e 5- jacalina (39,5 kDa).....	57
7 - Espectros de absorção das soluções a 1 mg/ml das lectinas de <i>P.arvense</i> (—) e <i>P.sativum</i> (—) dissolvidas em NaCl 0,15 M .....	61
8 - Atividade hemaglutinante residual da lectina de <i>P.arvense</i> após tratamento térmico a 70 °C .....	62
9 - Gráfico de $\ln A/A_0$ versus tempo de aquecimento da lectina de <i>P.arvense</i> na temperatura de 70 °C.....	62
10 - Isolamento das subunidades $\beta$ e $\alpha$ por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Bio Gel P-60 (2,5 x 65,0 cm) equilibrada e eluída com cloridrato de guanidina 6M. Amostra: 30 mg da lectina de <i>Pisum arvense</i> Fluxo: 8,0 ml/h.....	64
11 - Cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna de Nucleosil C 18 dos peptídios obtidos pela digestão da lectina de <i>P.arvense</i> por tripsina. ....	66
12 - Cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna de Nucleosil C 18 dos	

peptídios obtidos pela digestão da lectina de <i>P.arvense</i> por quimotripsina .....	67
13 - Cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna de Nucleosil C 18 dos peptídios obtidos pela digestão da lectina de <i>P.arvense</i> por elastase .....	68
14 - Espectro de massa ESI da subunidade $\beta$ da lectina de <i>Pisum arvense</i> determinado em um aparelho SCIEX modelo API-III .....	69
15 - Espectro de massa ESI da subunidade $\alpha$ da lectina de <i>Pisum arvense</i> determinado em um aparelho SCIEX modelo API-III .....	70
16 - Sequência de aminoácidos das cadeia $\beta$ e $\alpha$ da lectina de <i>P.arvense</i> alinhadas com as sequências da cadeia $\beta$ e $\alpha$ da lectina de <i>P.sativum</i> .....	73
17 - Coeficientes de sedimentação e difusão da lectina de <i>Pisum arvense</i> (1 mg/ml em PBS 20 mM, $\text{CaCl}_2$ 1 mM e $\text{MnCl}_2$ 1 mM pH 7,0). Coeficiente de sedimentação: 4,31S correspondendo a uma massa molecular de 50 kDa.....	74
18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e $\beta$ -mercaptoetanol dos extratos de cotilédones dos diferentes dias de germinação (0-22). A e B: Lectina de <i>P.arvense</i> .....	76
19 - Atividade hemaglutinante e dosagem de proteínas nos extratos de cotilédones obtidos a partir de diferentes dias de germinação.....	77
20 - Incorporação de timidina-3H (CPM) por células mononucleares humanas estimuladas pela lectina de <i>P.arvense</i> nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ (incubação por 2, 4 e 6 dias) comparada a dose de 10 $\mu\text{g/ml}$ da Con Br.....	78
21- Estrutura Tridimensional da Lectina de <i>P.sativum</i> .....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 - Composição centesimal da farinha de sementes de <i>Pisum arvense</i> e de <i>P.sativum</i> .....	47
2 - Determinação da melhor condição de extração da lectina de <i>P.arvense</i> .....	51
3 - Tabela de purificação da lectina de <i>P.arvense</i> .....	53
4 - Inibição da atividade hemaglutinante por diferentes açúcares.....	58
5 - Atividade hemaglutinante da lectina de <i>P.arvense</i> contra diferentes eritrócitos.....	60
6 - Composição de aminoácidos da lectina de <i>Pisum arvense</i> .....	71



## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

**BSA** - Albumina Sérica Bovina

**Con A** - Concanavalina A (lectina de *Canavalia ensiformis*)

**Con Br** - Lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis*

**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético

**FPLC** - Cromatografia líquida de rápida performance

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta performance

**HEPES** - Ácido N-2-hidroxi-etil-piperize-N'-2-etanosulfônico

**PBS** - Tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, contendo NaCl 0,15 M

**R** - Constante dos gases ( $1,9869 \text{ atm.}^\circ\text{K.mol}^{-1}$ )

**K** - Constante de Boltzmann ( $1,37 \times 10^{-16} \text{ ergs.}^\circ\text{K}^{-1}$ )

**h** - Constante de Planck ( $6,62 \times 10^{-27} \text{ ergs.seg}^{-1}$ )

**T** - Temperatura absoluta

**$\Delta G^\circ$**  - Energia Livre Padrão de Ativação

**SDS** - Dodecil sulfato de sódio

**UH** - Unidade de hemaglutinação. Definida como sendo o inverso da maior diluição de uma solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos a 2 %.

## RESUMO

As sementes de *P.arvense* contém uma lectina do tipo glicose/manose que foi purificada por cromatografia de afinidade em Sephadex G-100. A lectina assim obtida apresentou um peso molecular de 50 kDa quando analisada por ultracentrifugação analítica. Este valor foi confirmado por PAGE-SDS, Filtração em gel de Superose e Espectrometria de Massa ESI. Esta lectina apresentou duas cadeias polipeptídicas distintas denominadas de  $\alpha$  e  $\beta$  cujas massas moleculares foram 5.591 Da e 19.986 Da, respectivamente. A lectina é constituída pela associação dessas subunidades formando um dímero do tipo  $(\alpha\beta)_2$ . A análise de aminoácidos mostrou que esta lectina tem composição semelhante aquela de outras lectinas da tribo *Vicieae*. Sua estrutura primária apresentou 100 % de identidade de sequência quando comparada à lectina de *P.sativum*. A lectina apresentou um  $\Delta G^\circ$  de ativação do processo de desnaturação de 23 kcal/mol na temperatura de 70°C e um coeficiente de extinção igual a 14,8. Esta lectina foi capaz de aglutinar eritrócitos humanos do tipo ABO, eritrócitos de coelho e boi, tratados ou não com enzimas proteolíticas. Foi capaz ainda de aglutinar eritrócitos de cabra, porco e galinha. A lectina de *P.arvense* se mostrou mitogênica para linfócitos humanos do sangue periférico. Experimentos de germinação no escuro apontaram que a lectina de *P.arvense* é mobilizada mais tardiamente quando comparada a outras proteínas cotiledonares.



## ABSTRACT

Seeds of the leguminous plant *Pisum arvense* showed to contain a glucose/mannose-specific lectin that was purified by affinity chromatography on Sephadex G-100 column. The purified lectin exhibit a native molecular weight of 50 kDa by analytical centrifugation. This value has been confirmed by SDS-PAGE, size exclusion chromatography on Superose 12 HR 10/30 and Electron Spray Ionization (ESI) experiments. *P.arvense* lectin showed to be constituted of two distinct sub-units,  $\alpha$  and  $\beta$ , with a molecular mass of 5,591 and 19,986 kDa, respectively. The association of these sub-units led to form a dimer with the structural form of  $(\alpha\beta)_2$ . The amino acid composition of *P.arvense* lectin showed to be very similar those reported to the *Vicieae* tribe. The primary structure exhibited 100 % of homology with the lectin of the closely related species *P.sativum*. The  $\Delta G'$  for the desnaturating process was 23 kcal/mol at 70°C and extinction coefficient of 14.8. The lectin was able to agglutinate almost at the same level native and enzyme-human blood groups ABO. The strongest agglutination was observed against rabbit native and enzyme treated erythrocytes. The lectin induced mitogenesis of human peripheral blood lymphocytes. Germination studies without light showed that the lectin is mobilized later when compared with other storage proteins.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações Gerais

O termo lectina (do Latim "legere") significa escolher e foi aplicado devido a propriedade destas proteínas aglutinar seletivamente eritrócitos humanos de um grupo específico. PEUMANS & VAN DAMME (1995) definem lectinas como proteínas vegetais que possuem pelo menos um domínio não-catalítico capaz de ligar-se reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. Como muitas lectinas são capazes de se ligar a diferentes eritrócitos sem apresentar especificidade, a denominação aglutinina, que é usada como sinônimo, seria mais apropriada. Esta definição sugere que estas proteínas sejam necessariamente multivalentes, desta forma muitas proteínas que possuem homologia estrutural e capacidade de ligação a carboidratos, mas que são incapazes de promover a aglutinação de células por possuírem apenas um sítio de ligação a carboidratos não se adequam a esta definição. PEUMANS & VAN DAMME (1995) classificam as lectinas com base em sua estrutura, em três grupos: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. As merolectinas possuem apenas uma cadeia polipeptídica e um único sítio de ligação a carboidratos, não possuindo, portanto, atividade hemaglutinante. As hololectinas são semelhantes às merolectinas, todavia possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, sendo desta forma capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Tanto as merolectinas quanto as hololectinas possuem apenas domínios de ligação a carboidratos, enquanto as quimerolectinas possuem além deste sítio, um outro domínio não relacionado que apresenta



atividade biológica distinta e independente. As quimerolectinas podem ou não, apresentar atividade hemaglutinante, dependendo do número de sítios de ligação a açúcares.

## 1.2 Lectinas de Leguminosas

Muitas lectinas de leguminosas têm sido isoladas e caracterizadas pelo fato de estarem amplamente distribuídas nas espécies pertencentes a esta família como também por serem facilmente purificadas através de cromatografia de afinidade com um grau de pureza bastante elevado. Nestas sementes, as lectinas estão presentes em grandes quantidades nos corpos protéicos e em quantidades menores em outras partes da planta. Uma comparação entre lectinas de leguminosas mostra que elas partilham muitas propriedades. Todas são compostas por monômeros de massa molecular semelhante (25-30 kDa). Cada monômero apresenta apenas um sítio de ligação a carboidratos, desta forma, para que estas proteínas apresentem atividade hemaglutinante é necessária a interação entre os monômeros formando a estrutura quaternária, que pode ser um dímero ou um tetrâmero. As lectinas desta família podem ter apenas uma cadeia polipeptídica ou podem apresentar duas cadeias formando os monômeros. Aquelas extraídas de espécies pertencentes à tribo *Vicieae* são compostas de dois tipos de subunidades, uma cadeia leve ( $\alpha$ ) e uma cadeia pesada ( $\beta$ ) de pesos moleculares em torno de 6 kDa e 20 kDa, respectivamente. As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  interagem formando dímeros do tipo  $(\alpha\beta)_2$  com peso molecular em torno de 52 kDa. Lectinas dos gêneros *Pisum*, *Lathyrus*, *Lens* e *Vicia* pertencem a este grupo, entretanto a lectina de *Lathyrus sphaericus* apresenta atipicamente uma só cadeia polipeptídica (RICHARDSON *et al.*, 1987). Lectinas extraídas de espécies pertencentes a outras tribos desta família apresentam em geral apenas um tipo de subunidade com peso molecular próximo a 25 kDa, que se combinam para formar dímeros ou tetrâmeros.

Quanto a afinidade por açúcares simples, as lectinas foram classificadas em quatro grupos dependendo da configuração relativa dos carbonos 3 e 4 do anel piranosídico: grupo I (L-fucose), grupo II (D-galactose, N-acetil-galactosamina), grupo III (D-glicose, D-manose) e grupo IV (D-idose, L-glicose e L-xilose) (MAKELA, 1957). A especificidade das lectinas tem sido determinada pela combinação de ensaios de inibição e cromatografia de afinidade (DEBRAY & ROUGÉ, 1984; WU *et al.*, 1992; DEBRAY *et al.*, 1994) e pode-se observar que muitas lectinas, apesar de pertencerem a um mesmo grupo, apresentam diferenças na afinidade por carboidratos quando oligossacarídios mais complexos são testados. Esta observação sugere que outros sítios interagem com estes carboidratos fora do sítio de ligação a monossacarídios acarretando a estas diferenças na especificidade fina por açúcares. Lectinas de leguminosas possuem uma região na estrutura tridimensional rica em aminoácidos hidrofóbicos (cavidade hidrofóbica) que liga-se a  $\beta$ -(O-iodofenil)-O-glicopiranosídeo (ROUGÉ *et al.*, 1987).

A maioria das lectinas a uma cadeia é inibida por N-acetil-galactosamina (GalNac), galactose e seus derivados. As lectinas a duas cadeias são inibidas por glicose (Glc), manose (Man) e derivados. Apesar de apresentarem somente uma cadeia, a lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (Con A) e outras lectinas dos gêneros *Canavalia* e *Dioclea* são inibidas por glicose, manose e derivados. Há também casos onde a mesma planta contém lectinas que são totalmente diferentes na especificidade por carboidratos, como observado para a espécie *Vicia cracca*, que contém uma série de isolectinas que se ligam a N-acetil-galactosamina (RÜDIGER, 1977) e ao mesmo tempo uma segunda lectina específica por glicose/manose (BAUMANN *et al.*, 1982). Ao fazer uma comparação da sequência N-terminal de ambas as lectinas de *V. cracca* observamos que estas sequências são similares. Entretanto a semelhança entre a lectina específica por glicose/manose e outras lectinas de mesma especificidade, como as lectinas de ervilha e lentilha, é maior que entre as lectinas obtidas a partir desta espécie (BAUMANN *et al.*, 1979).



Enquanto a sequência de aminoácidos fornece uma idéia da estrutura da proteína, a composição de aminoácidos não diz muito a respeito da estrutura terciária, já que lectinas e outras proteínas da mesma planta podem ter composição de aminoácidos muito parecidas. As lectinas de leguminosas são geralmente ricas em ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico, asparagina, serina e treonina, mas pobres em aminoácidos sulfurados.

A determinação da estrutura de lectinas permite uma caracterização mais detalhada do sítio de ligação a carboidratos, como a sua localização na molécula e mudanças que ocorrem na estrutura em resposta à ligação ao açúcar. Como a função destas moléculas ainda não está completamente elucidada e como tem sido aceito que a capacidade de ligação a açúcares é vital para que a atividade biológica seja expressa, estudos dessa natureza são fundamentais.

Estudos sobre a estrutura tridimensional de várias lectinas de leguminosas têm sido realizados, onde técnicas modernas como difração de raios X (ROUGÉ *et al.*, 1991) e ressonância nuclear magnética (ASENSIO *et al.*, 1995) têm sido empregadas. A Con A foi a primeira lectina a ser isolada e purificada, bem como foi também a primeira a ter a estrutura resolvida por métodos cristalográficos (EDELMAN *et al.*, 1972). Posteriormente a sua estrutura a uma resolução de 2,4 Å (HARDMANN *et al.*, 1972). Para a lectina de ervilha (*P. sativum*) foi publicado um estudo com a estrutura definida a 2,0 Å (EINSPAHR *et al.*, 1983). A lectina de *Canavalia brasiliensis* teve sua estrutura tridimensional e quaternária determinada por SANZ-APARÍCIO *et al.* (1997). Outras lectinas de leguminosas têm sido cristalizadas, como a lectina de ervilha (*Pisum sativum*) (EINSPAHR *et al.*, 1986), *Vicia faba* (REEKE & BECKER, 1986), isolectina I de *Lathyrus ochrus* (BOURNE *et al.*, 1990), cadeia β da toxina de sementes de *Ricinus communis* (RUTEMBER & ROBERTUS, 1991), amendoim (*Arachis hypogea*) (BANERJEE *et al.*, 1994), soja (*Glycine max*) (DESSEN *et al.*,



1995), lentilha (*Lens culinaris*) (LORIS *et al.*, 1994), e de *Griffonia simplicifolia* (DELBAERE *et al.*, 1993).

Apesar das diferenças entre as estruturas primárias das lectinas a uma cadeia (Con A e lectina de *Griffonia simplicifolia*) e a duas cadeias (lectina de *P.sativum* e *V.faba*) e das diferenças na especificidade por carboidratos, a estrutura tridimensional destas proteínas é muito parecida. As subunidades são basicamente formadas de duas folhas  $\beta$  antiparalelas. Quase não ocorre a presença de  $\alpha$ -hélices. Os sítios de ligação a carboidratos, íons metálicos, resíduos hidrofóbicos e até moléculas de água são altamente conservados (LORIS *et al.*, 1994).

Estudos sobre a influência de determinados resíduos de aminoácidos na especificidade por carboidratos têm sido realizados, como por exemplo a substituição da Asn-125 na lectina de ervilha por Asp, elimina completamente a atividade de ligação a carboidratos (VAN EISJDEN *et al.*, 1992), e se os resíduos nas porções vizinhas são trocados, a especificidade é alterada (HOEDEMAKER *et al.*, 1993). A substituição de outros resíduos pode levar a alterações nas características destas proteínas. HOEDEMAKER *et al.* (1993) observou que a substituição da Val 103 por Ala diminui significativamente a estabilidade térmica da lectina de ervilha. Esta substituição tem consequências práticas, já que muitas lectinas são tóxicas para o homem e animais, alterações neste sentido poderiam levar a construção de plantas com lectinas alteradas geneticamente que pudessem exercer seu papel biológico na planta e que também fossem facilmente inativadas no trato digestivo de animais de sangue quente (RÜDIGER, 1997).

Lectinas de uma determinada espécie podem ocorrer como famílias de isolectinas que são idênticas ou quase idênticas na sua especificidade por carboidratos. Geralmente a cromatografia de troca iônica é utilizada para separar estas misturas. Se é utilizada

cromatografia de afinidade, as isolectinas não são separadas, a não ser que gradientes de concentração dos desorventes sejam aplicados (RÜDIGER, 1997; CUNNINGHAM *et al.*, 1972). Podem existir muitas razões para esta heterogeneidade e, uma delas, pode ser o processamento incompleto após a tradução. Há casos típicos como as lectinas de ervilha (HOEDEMAKER *et al.*, 1994) e soja (MANDAL *et al.*, 1994) que diferem no comprimento da extremidade C-terminal. Várias lectinas de uma cadeia sofrem processamento proteolítico na extremidade C-terminal, que resulta em heterogeneidade e está ligado ao aparecimento de isoformas (YOUNG *et al.*, 1995). Uma razão adicional pode ser a glicosilação (NIKRAD *et al.*, 1990), que é complexa o suficiente para permitir variações entre estas isolectinas (FUHRMANN *et al.*, 1985; ELBEIN, 1988; FAYE *et al.*, 1989). Finalmente, algumas plantas podem apresentar heterogeneidade genética e conter mais de um gene codificando a lectina. Já que o mapeamento genético da maioria das plantas cultivadas não é conhecido, sem citar as espécies selvagens, o conteúdo de lectinas e isolectinas pode variar consideravelmente de um cultivar para outro.

Algumas lectinas apresentam açúcares em suas estruturas. A síntese destas proteínas se dá nos ribossomos, em seguida são secretadas no lumen do retículo endoplasmático, indo posteriormente para o complexo de Golgi onde recebem a porção glicana para finalmente serem acumuladas nos corpos protéicos (VAN DRIESCHE, 1988), desta forma a glicosilação ocorre comumente. Mesmo as lectinas que não são glicoproteínas na forma madura, elas o são quando na forma de precursores glicosilados, como por exemplo a Con A (CARRINGTON *et al.*, 1985; HERMAN *et al.*, 1985; SHELDON & BOWLES, 1992) e WGA (MANSFIELD *et al.*, 1988).



### 1.3 Sequência de Aminoácidos e Homologia de Lectinas de Leguminosas

Apesar das lectinas de leguminosas exibirem diferentes propriedades físico-químicas tais como: tamanho, carga, tipo e número de subunidades e afinidade por açúcares, há um alto grau de homologia em suas sequências de aminoácidos (SHARON & LIS, 1989; ROUGÉ *et al.*, 1987) e entre suas estruturas tridimensionais (HOEDEMAEKER *et al.*, 1993). Devido a estas particularidades, tem sido sugerido que as sequências primárias das lectinas seriam ferramentas úteis para a classificação quimiotaxonômica, como sua aplicação para diferenciar várias tribos de Leguminosas ou em estudos de taxonomia (ROUGÉ, 1984).

Nas lectinas da tribo *Vicieae*, a sequência de aminoácidos da subunidade  $\beta$  é quase que totalmente idêntica, enquanto que apenas algumas diferenças podem ser observadas na cadeia  $\alpha$ , principalmente na porção C-terminal das lectinas obtidas de diferentes espécies. Vale ressaltar que esta região da cadeia  $\alpha$  não possui aminoácidos que participam da cavidade hidrofóbica, sítios de ligação a metais e açúcares, exceto pelos resíduos Phe 42 e Ser 44 que fazem parte da cavidade hidrofóbica, mas estão conservados em todas as lectinas de leguminosas (ROUGÉ *et al.*, 1987).

A semelhança entre as lectinas de uma e duas cadeias é melhor evidenciada quando a comparação é feita através de um esquema de homologia circular, pela superposição do aminoácido 121 da Con A com o aminoácido 1 de lectinas a uma cadeia; os aminoácidos 70 e 121 da Con A com os aminoácidos 1 da cadeia leve e da cadeia pesada das lectinas a duas cadeias. As similaridades encontradas sugerem que lectinas a uma e duas cadeias são produtos de genes homólogos que divergiram durante a evolução. Por exemplo, nas lectinas presentes em *Vicia cracca* foi observada a existência de dois genes, um para cada lectina dentro da



mesma planta, que podem ter sido originados por duplicação de um gene ancestral por duplicação (BAUMANN *et al.*, 1979).

#### 1.4 Síntese e Processamento de Lectinas de Leguminosas

A sequência N-terminal das lectinas de uma cadeia e de duas cadeias de leguminosas levou à especulação de que as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  das lectinas a duas cadeias não eram codificadas por genes distintos, mas oriundas de processamentos pós-tradução de uma única cadeia polipeptídica originada a partir de um único gene. Vários trabalhos comprovam a existência de um precursor que após clivagens proteolíticas sucessivas dá origem às subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (BOISSEAU *et al.*, 1984). O processamento que ocorre após a tradução é comum para lectinas de sementes como já foi demonstrado para a Con A que consiste em uma mistura de subunidades intactas e fragmentos de ocorrência natural (LAUWEREYS *et al.*, 1983) por não ter havido a formação de uma ligação peptídica entre os resíduos 118 e 119 (CHRISPEELS *et al.*, 1986). A biossíntese da Con A é um fenômeno complexo que ocorre a partir de um precursor composto de um peptídio sinal de 29 aminoácidos, uma cadeia polipeptídica correspondente aos resíduos 119-237 da Con A, um peptídio de 15 aminoácidos e uma cadeia polipeptídica correspondente aos resíduos 1-118 da Con A. Após clivagem proteolítica, o peptídio sinal e parte do peptídio de 15 aminoácidos são removidos, restando as cadeias correspondentes aos resíduos 119-237 e 1-118 ligada a uma sequência de quatro aminoácidos (AAYN) na extremidade N-terminal. Este tetrapeptídio corresponde à porção C-terminal do peptídio de 15 aminoácidos e à medida que as sementes amadurecem, ele é eliminado, havendo finalmente a ligação das cadeias 1-118 e 119-237 nesta ordem (CARRINGTON *et al.*, 1985). Modificações após a tradução também são observadas para a

favina (*Vicia faba*) (HEMPERLY *et al.*, 1982), para a lectina de lentilha (FORIERS *et al.*, 1981), de soja (VODKIN, 1983) e de ervilha (LAWEREYS *et al.*, 1983 e VAN DRIESSCHE *et al.*, 1988).

A lectina de *Pisum sativum* é sintetizada como uma pré-pro-proteína na direção  $\beta \rightarrow \alpha$ . Este fato foi comprovado através do sequenciamento do cDNA (GATEHOUSE *et al.*, 1987). Com base em estudos feitos a partir da síntese *in vitro* e determinação da sequência do precursor traduzido, a mesma orientação foi proposta para a lectina de *Vicia faba* (HEMPERLEY *et al.*, 1982). O modelo proposto para a favina (BECKER *et al.*, 1983) corresponde a um precursor formado por um peptídeo sinal de 29 aminoácidos, de uma cadeia  $\beta$  e uma cadeia  $\alpha$  ligados covalentemente. Uma primeira clivagem elimina o peptídeo sinal e uma segunda clivagem separa as cadeias leve e pesada.

Um modelo mais complexo é proposto para a lectina de *P.sativum*, onde durante o processamento até a forma madura, uma sequência líder é removida durante a tradução, que ocorre em associação com o retículo endoplasmático, e a pro-lectina resultante migra em direção aos corpos protéicos onde é gradativamente clivada, havendo a remoção de vários resíduos de uma região intermediária para originar as subunidades leve e pesada (VAN DRIESSCHE *et al.*, 1988).

Segundo LAWEREYS *et al.* (1983) e VAN DRIESSCHE *et al.* (1988), um precursor possuindo apenas uma cadeia polipeptídica é sintetizado. Esta cadeia, que apresenta um peso molecular de 28 kDa, é em seguida clivada proteoliticamente para originar a cadeia  $\alpha$  e um segundo fragmento denominado pré- $\beta$ . A perda de fragmentos na porção C-terminal da cadeia pré- $\beta$ , à medida que a semente amadurece resulta na cadeia  $\beta$  com peso molecular em torno de 18 kDa.



O dímero formado de subunidades de 28 kDa apresenta a mesma atividade hemaglutinante específica das moléculas de lectina com estrutura  $(\alpha\beta)_2$  mostrando que o precursor possui sítios de ligação a carboidratos. Neste aspecto, o precursor da lectina de *P.sativum* difere daquele da Con A que não é capaz de ligar-se a carboidratos (CHRISPEELS *et al.*, 1986). Esta diferença é justificada porque para a Con A a sequência derivada da análise do DNA não corresponde à sequência de aminoácidos na proteína devido a reorganização e consequente ligação que os peptídios sofrem após a clivagem proteolítica.

### 1.5 Isolamento de Lectinas da Tribo *Vicieae*

Em 1967, MUSTIER & COULET publicaram que extratos aquosos de sementes de *P.sativum* eram capazes de transformar linfócitos humanos em cultura, levando à blastogênese e mitoses e estas propriedades foram atribuídas à lectina presente nestes extratos. Em 1969, dois grupos de pesquisadores publicaram separadamente o isolamento da lectina de *P.sativum*. BÉTAIL e colaboradores (1969) isolaram esta lectina por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-75 que era eluída utilizando-se uma solução de NaCl 0,15 M contendo glicose 0,1 M. ENTLICHER *et al.* (1969) relataram a presença de lectinas nas sementes de *P.sativum* e *Lens esculenta*. O isolamento destas proteínas era feito segundo a metodologia descrita por LIENER (1953) e em seguida a purificação era obtida por adsorção em Sephadex G-200. A desorção era feita com gradiente de HCl ou tampão glicina-HCl pH 2,0.

Em 1970, ENTLICHER e colaboradores descreveram o isolamento e a caracterização detalhada da lectina de *P.sativum*, onde foi determinada a composição de aminoácidos, a sequência N-terminal, bem como realizados estudos de ultracentrifugação, eletroforese, análise quantitativa de carboidratos e conteúdo de metais. Em 1974, TROWBRIDGE publicou uma



metodologia modificada para o isolamento desta lectina e resultados sobre suas propriedades mitogênicas. Posteriormente, VAN DRIESSE *et al.* (1982) publicaram uma nova metodologia baseada na extração com uma solução de NaCl 1 M contendo  $\text{CaCl}_2$  20 mM e  $\text{MnCl}_2$  20 mM para o isolamento da lectina de *P.sativum*, bem como estudos sobre sua localização na semente.

Várias outras lectinas obtidas a partir de espécies pertencentes à Tribo *Vicieae* foram isoladas, purificadas através de cromatografia de afinidade em Sephadex, como as lectinas de *Lens esculenta* (TICHÁ *et al.*, 1970), *Vicia faba* (ROUGÉ & LASCOMBES, 1973), *Lathyrus odoratus* (KOLBERG, 1978), *Vicia graminea* (PRIGENTE & BOURRILLON, 1981), *Vicia cracca* (BAUMANN *et al.*, 1982), *Vicia villosa* (TOLLEFSEN & KORNFELD, 1983), *Lathyrus ochrus* (ROUGÉ & CAVADA, 1984), *Lathyrus cicera* (CAVADA & ROUGÉ, 1985), *Vicia hircanica* (LIEW & BIRD, 1988), entre outras.

#### 1.6 Papel Fisiológico de Lectinas de Leguminosas

A definição de lectinas é baseada principalmente na sua habilidade de reconhecer e se ligar a carboidratos. Portanto proteínas com diferentes estruturas e especificidades são agrupadas dentro da mesma classe. Apesar do crescente número de lectinas isoladas e caracterizadas, a função destas proteínas nos vegetais ainda não está completamente definida. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar o papel fisiológico destas proteínas. Existem evidências crescentes de que as lectinas desempenhariam um papel importante na defesa contra patógenos, insetos e animais que se alimentam destas plantas, devido sua interação com glicoconjugados desses organismos, interferindo deste modo na sua fisiologia. Também a abundância de lectina nos órgãos de reserva, aponta para este papel, pois as sementes são facilmente atacadas devido ao estado metabólico inativo e quando isto

acontece a viabilidade destas é definitivamente comprometida, enquanto para uma planta já estabelecida este tipo de agressão pode ser, muitas vezes, revertido. Durante muitos anos, pensou-se que a lectina de *P.sativum* ocorresse apenas na semente e plântulas. Com o desenvolvimento de técnicas mais modernas foi evidenciada a presença de lectinas nas raízes, folhas e caules durante todo o ciclo de vida desta espécie (HOSSELET *et al.*, 1985) apesar de não estar claro ainda se estas proteínas são idênticas em diferentes partes da planta. Outro argumento a favor do papel de defesa exercido pelas lectinas é a estabilidade de algumas lectinas em uma faixa larga de pH, temperatura e resistência a proteases de animais e insetos como é observado para outras proteínas de defesa (inibidores de proteases, RIPs e inibidores de  $\alpha$ -amilase). Para alguns pesquisadores, as lectinas têm papel de proteínas de reserva, pois estão presentes em grandes quantidades nos órgãos armazenamento aliado ao fato de muitas delas terem comportamento semelhante a proteínas de reserva. Desta forma podem funcionar como reserva de nitrogênio e ao mesmo tempo como proteína de defesa (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). É possível que nem todas as lectinas tenham papel na defesa de plantas, pois outros trabalhos apontam para funções como a participação em processos de reconhecimento de estruturas próprias ou não dos vegetais, como no processo de interação legume-*Rhizobium* (BOHLHOOL & SCHIMIDT, 1992). *Rhizobium leguminosarum* infecta as raízes de suas plantas hospedeiras (*Pisum*, *Vicia*, *Lens*, *Lathyrus*) iniciando a simbiose com o aparecimento de nódulos fixadores de nitrogênio. O papel da lectina nestas interações seria mediar a ligação específica entre a planta e o *Rhizobium* como foi observado pela ligação específica de *R.trifolii* a raízes de trevo (*Trifolium repens*) DAZZO *et al.* (1982). Foi observada uma especificidade entre a planta e o microorganismo específico para a nodulação (DIAZ *et al.*, 1989; HO & KIJNE, 1991).

A Con A reage com auxina e ácido indolacético via interações hidrofóbicas. Também já foi demonstrado que algumas lectinas interagem com análogos da adenina com atividade citocínica (ROUGÉ *et al.*, 1991).

O estudo estrutural de lectinas de leguminosas e de outras famílias botânicas e a caracterização da interação com receptores específicos, contribuirá significativamente para elucidar as funções biológicas destas proteínas.

### 1.7 Objetivos do Trabalho

O presente trabalho tem como objetivo isolar, caracterizar química e fisico-quimicamente a lectina de sementes de *Pisum arvense* e estabelecer sua estrutura primária bem como estudar a mobilização desta proteína ao longo da germinação das sementes.



## 2 MATERIAIS

### 2.1 Sementes

Sementes quiescentes de *Pisum arvense* L., espécie pertencente à família *Leguminosae*, tribo *Vicieae*, obtidas comercialmente na Cooperativa Agrícola de Cascavel, Paraná.

### 2.2 Eritrócitos

Eritrócitos humanos do sistema ABO foram obtidos de doadores sadios através do centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

Eritrócitos de coelho foram obtidos de animais adultos e saudáveis mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Eritrócitos de boi, porco, galinha e cabra foram coletados de animais pertencentes ao Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

### 2.3 Reagentes

Acrilamida, N,N-metilenobisacrilamida, agarose, albumina sérica bovina, Coomassie Brilliant Blue G-250 e R-250, HEPES, RPMI-1640 (meio de cultura), Tripsina TPCK, quimotripsina, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA. Bio-Gel P-60, Bio-Rad, EUA. Beta-mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio, E. Merk, Darmstadt, Alemanha. Elastase, Boehringer

Mannheim. Sephadex G-100, Superose 12 HR 10/30, Pharmacia, Uppsala, Suécia. Timidina triciada ( $6,7 \mu\text{Ci}/\text{mM}$ ), New England Nuclear Corp., Boston, EUA. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.



### 3 MÉTODOS

#### 3.1 Preparação da Farinha

As sementes de *P.arvense* foram trituradas em multiprocessador, peneiradas e maceradas em gral para obtenção da farinha fina, que foi armazenada em frascos hermeticamente fechados e mantidos à temperatura ambiente.

#### 3.2 Análise Elementar

##### 3.2.1 Determinação de Umidade

Para a determinação do teor de umidade, pesa-filtros previamente tarados contendo 1 g de farinha de *Pisum arvense* foram colocados em uma estufa a 110 °C durante 24 horas. Em seguida foram mantidos em dessecador, pesados e então recolocados na estufa por mais quatro horas até a obtenção de pesos constantes. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo este valor expresso em percentagem.

##### 3.2.2 Determinação do Nitrogênio Total

O nitrogênio total da farinha de *P.arvense* foi determinado pelo método descrito por BAETHGEN e ALLEY (1989). A amostra de farinha de *P.arvense* (20 mg) foi mineralizada

na presença de 1 mg de catalisador ( $\text{KH}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Se) na proporção de 100:10:1 (massa/massa/massa) e 1,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, por 30 minutos após o aparecimento de uma cor esverdeada. Em seguida o volume da amostra foi completado para 50 ml com água destilada. A uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  desta solução foi adicionado 0,9 ml de água destilada, 5,5 ml de tampão  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1M, tartarato de sódio e potássio a 5 % e NaOH a 5,4%, 4 ml de solução de salicilato de sódio - nitroprussiato de sódio (15% - 0,03%) e 2 ml de hipoclorito de sódio a 6%. Após incubação por 15 minutos a 37 °C foi feita a leitura da absorbância a 650 nm em espectrofotômetro Micronal modelo B 343 II. O nitrogênio total foi estimado em relação a uma curva padrão obtida com Sulfato de Amônio. Para o cálculo do teor de proteína bruta foi usado o fator de 6,25 (SÃO PAULO, 1985).

### 3.2.3 Determinação de Lipídios Totais

Para determinação do teor de lipídios totais foi empregada a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985). Amostras contendo 1g de farinha de *P.arvense* foram pesadas em cartuchos de papel de filtro e colocadas em um extrator de Soxhlet com hexana por pelo menos 4 horas. Após a extração, o solvente foi evaporado em banho-maria a 70 °C e o material extraído foi pesado. O teor de lipídios foi calculado pela relação entre o peso do lipídio extraído e o peso inicial da amostra e expresso em percentagem.

### 3.2.4 Determinação de Cinzas

Para determinar o teor de cinzas, cadinhos de porcelana (triplicata), previamente tarados, contendo 1g de farinha de *P.arvense*, foram colocados em mufla a 600 °C durante 4 horas. Em seguida, foram mantidos em um dessecador até que atingissem a temperatura



ambiente, quando então foram pesados. O teor de cinzas foi calculado por diferença e expresso em percentagem do peso seco da amostra.

### 3.3 Determinação de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) usando-se albumina sérica bovina como padrão. A 100 µl de amostra foram adicionados 2,5 ml do reagente de Bradford e após 10 minutos de incubação foram feitas as leituras das absorbâncias a 595 nm em um espectrofotômetro Novaspec II (Pharmacia LKB). A absorbância a 280 nm foi também utilizada para determinação do teor de proteínas nos eluatos das colunas cromatográficas.

### 3.4 Determinação de Fibras

Foram pesados 2 g da farinha de *P.arvense* dessecada e desengordurada e colocados em contato com 200 ml de ácido sulfúrico 1,25%. Em um refrigerador de refluxo, esta mistura foi aquecida até ebulição que foi mantida por 30 minutos. Após filtração, o resíduo foi lavado com água destilada a 100 °C até que a água de lavagem não apresentasse mais acidez. O resíduo foi transferido para um becker com o auxílio de 200 ml de hidróxido de sódio a 1,25% e em refrigerador de refluxo foi levado a ebulição por 30 minutos. Em seguida foi filtrado em papel de filtro quantitativo previamente tarado, e lavado até que as águas de lavagem não apresentassem mais alcalinidade. O resíduo foi em seguida lavado duas vezes com álcool e duas vezes com éter e levado à estufa a 110 °C até peso constante, obtendo-se desta forma a fibra total. A fibra total, juntamente com o papel de filtro, foi incinerada em forno mufla a 550

°C utilizando-se um cadinho de porcelana devidamente tarado. A fração fibra foi obtida por diferença entre a fibra total e a fração mineral obtida.

### 3.5 Determinação das Características Morfológicas das Sementes e Anatomia das Raízes de *Pisum arvense*

Foram escolhidas aleatoriamente 50 sementes de *P.arvense* para determinação das características morfológicas como peso, comprimento, largura, formato, hilo e tegumento. Estas sementes foram colocadas para germinar e para análise da anatomia foram feitas secções transversais e logitudinais da raiz primária, com cortes à mão livre e coloração através de Safrablau (JOHANSEN, 1940).

### 3.6 Determinação da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante nas diversas frações de *P.arvense* foi determinada por diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 200 µl de NaCl 0,15 M. No primeiro tubo foi adicionado 200 µl da amostra e uma série de diluições duplas foram feitas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.), homogeneizando-se completamente antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 200 µl de uma suspensão de eritrócitos a 2% (v/v) lavados exaustivamente com NaCl 0,15 M, e a reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos. O ensaio foi deixado em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente para, em seguida, ser centrifugado a 2.000 x g por 30 segundos. Os resultados foram interpretados macroscopicamente e o título expresso em unidade de hemaglutinação (UH), que é o inverso da maior diluição da amostra que apresentou aglutinação nítida. As hemácias foram também



tratadas com enzimas proteolíticas (bromelaína, papaína e tripsina). Todas as amostras de sangue foram coletadas em recipiente contendo heparina, lavadas três vezes com NaCl 0,15 M, centrifugadas ( $2.000 \times g$ ) e calculada a concentração de células vermelhas em relação ao volume total (hematócrito). As células foram suspensas em solução contendo a enzima (0,1 mg de enzima por 10 ml de NaCl 0,15M) a uma concentração de 2% de eritrócitos. Foram então incubadas a 20°C por 1 hora, e lavadas seis vezes com solução salina gelada. Após centrifugação ( $2.000 \times g$ ), as células foram ressuspensas em NaCl 0,15 M em uma concentração de 2%.

### 3.7 Fracionamento das Proteínas

#### 3.7.1 Extração das Proteínas

A extração das proteínas foi feita a partir da incubação da farinha, obtida conforme o item 3.1, com diferentes soluções: água, NaCl 0,15 M, tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,6; tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0; tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0; tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 8,0; tampão borato de sódio 0,1 M pH 10,0 ( todos os tampões continham NaCl 0,15 M) na proporção de 1:10 (m/v) por três horas à temperatura ambiente sob agitação constante e então centrifugadas a  $33.000 \times g$  por 20 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados em papel de filtro, e os resíduos desprezados. Aliquotas dos sobrenadantes foram usadas para determinação de proteína e atividade hemaglutinante. Em função dos resultados obtidos na extração com diferentes soluções, optou-se por realizar a extração com água seguindo a metodologia adotada por TROWBRIDGE (1974).

### 3.7.2 Fracionamento do Extrato Protéico por Precipitação com Sulfato de Amônio

O extrato protéico foi submetido a precipitação com sulfato de amônio (60 % saturação) por um período de 4 horas à temperatura ambiente com agitação ocasional. Após centrifugação a 15.000 x g por 20 minutos a 4°C, o precipitado obtido foi denominado de P 0/60, redissolvido em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 com NaCl (PBS) e submetido a determinação do teor protéico e da atividade hemaglutinante.

### 3.8 Cromatografia de Afinidade em Sephadex G-100

A fração P 0/60 foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100 (0,5 x 30 cm) previamente equilibrada com PBS. Após a eluição do primeiro pico cromatográfico, que correspondia às proteínas sem atividade hemaglutinante, o material retido, que encerrava toda a atividade hemaglutinante, foi então eluído com PBS contendo glicose 0,1 M. A cromatografia foi realizada a fluxo constante de 30 ml por hora e o eluato coletado em frações de 3 ml que tiveram suas absorbâncias determinadas a 280 nm. Os picos obtidos foram submetidos a dosagens de proteínas e a ensaio de atividade hemaglutinante, sendo então dialisados contra água, liofilizados e estocados para uso posterior.

### 3.9 Filtração em Gel da Lectina de *P.arvense* em Coluna de Superose 12 HR 10/30 Acoplada em FPLC

Uma coluna de Superose 12 HR 10/30 acoplada a um sistema de FPLC (Pharmacia-LKB), foi utilizada para determinação da massa molecular aparente da lectina. Aliquotas de 100 µl de lectina na concentração de 2 mg/ml dissolvidas no tampão de equilíbrio (tampão



fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,5) foram aplicadas ao gel e a eluição feita com o mesmo tampão a um fluxo de 0,3 ml/min. As frações foram recolhidas em um coletor automático FRAC/100 (Pharmacia LKB) e monitoradas a 280 nm. A coluna foi previamente calibrada nas mesmas condições com proteínas de massas moleculares conhecidas.

### 3.10 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e $\beta$ -mercaptoetanol

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol foram realizados segundo a técnica descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para uso de géis de separação em placas. O gel de aplicação (contendo 3,5% de poliacrilamida) continha tampão tris-HCl 25 mM pH 6,8 e SDS 0,1 %. O gel de separação (gradiente de 5 a 20% de poliacrilamida) continha tampão tris-HCl 375 mM pH 8,8 e SDS 0,1%.

As amostras foram dissolvidas em tampão tris-HCl 625 mM pH 8,3 contendo SDS 1% e tratadas a 100°C por 10 minutos. Azul de bromofenol 0,02% e cristais de sacarose foram adicionados às amostras antes das mesmas serem aplicadas ao gel. A corrida eletroforética foi feita à corrente constante (15 mA) por um período de 4 horas. Logo a seguir o gel foi colocado para corar com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,05 %, preparado em uma solução de metanol, ácido acético e água (1:3,5:8) e o excesso retirado com a mesma solução na ausência do corante, permitindo a visualização das bandas protéicas.

### 3.11 Ultracentrifugação Analítica

A ultracentrifugação analítica foi feita em uma temperatura de 20°C usando a lectina (1mg/ml) dissolvida em tampão fosfato 20 mM contendo NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$

1 mM e  $\text{MnCl}_2$  1 mM, pH 7,0 em uma centrífuga modelo Beckman XL-A com absorção ótica. A velocidade de sedimentação foi determinada em células padrão de duplo setor. A massa molecular foi avaliada pela determinação simultânea dos coeficientes de sedimentação e difusão a partir do movimento e alargamento da banda de sedimentação de acordo com a equação de Lamm como previamente descrito por URBANKE *et al.* (1980).

### 3.12 Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares Simples

A inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples foi realizada em tubos de ensaio através de diluições duplas seriadas (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32) do açúcar a ser testado com NaCl 0,15 M, contendo  $\text{CaCl}_2$  5 mM e  $\text{MnCl}_2$  5 mM, em seguida, uma solução de lectina contendo 4 UH foi adicionada em cada tubo. Após 30 minutos de incubação a 37 °C foram adicionados a cada tubo, 400 µl de uma solução de eritrócitos de coelho a 2%. O ensaio foi incubado a 37 °C por 30 minutos e depois deixado em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente, para então ser centrifugado a 2.000 x g por 30 segundos. Paralelamente foi feito um ensaio da atividade hemaglutinante da mesma solução de lectina na ausência de açúcar (branco) e o grau de inibição de cada açúcar determinado por comparação com o branco. Os títulos de hemaglutinação foram determinados como descrito no item 3.6.

### 3.13 Espectro de Absorção da Lectina de *P.arvense*

O espectro de absorção (200 a 340 nm) da lectina foi determinado utilizando-se um espectrofotômetro Genesys 5 (Spectronic), com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A lectina (1 mg/ml) foi dissolvida em NaCl 0,15 M.

### 3.14 Determinação da Especificidade Sanguínea

Para determinar a especificidade sanguínea da lectina (2mg/ml), dissolvida em PBS 0,1 M pH 7,2, foram usados eritrócitos humanos do tipo A, B e O e eritrócitos de coelho, nativos e tratados com as enzimas papaína, tripsina e bromelaína. Também foram usados eritrócitos nativos de boi, porco, galinha e cabra. Para os ensaios de atividade hemaglutinante e determinação dos títulos de hemaglutinação, foi seguida a metodologia descrita no item 3.6.

### 3.15 Determinação de Carboidratos Totais

A técnica descrita por DUBOIS *et al.*, (1956) foi usada na determinação do teor de carboidratos da lectina de *P.arvense*. A lectina (5 mg/ml) foi dissolvida e dialisada contra ácido acético 1 M por 48 horas. A uma alíquota de 0,5 ml desta solução foram adicionados 0,5 ml de fenol 5%, 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado e, após agitação, a mistura foi deixada em repouso por 15 minutos. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância a 490 nm. A concentração de carboidratos foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com glicose.

### 3.16 Termoestabilidade

A estabilidade térmica da lectina (2 mg/ml), dissolvida em NaCl 0,15 M contendo  $\text{CaCl}_2$  5 mM e  $\text{MnCl}_2$  5 mM, foi determinada pela incubação em banho-maria a 70 °C. Aliquotas foram retiradas a intervalos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos, centrifugadas e testadas para atividade hemaglutinante e dosagem de proteínas como previamente descrito.



Para determinação do  $\Delta G'$  de ativação do processo de desnaturação foi calculada a velocidade de reação ( $k_1$ ), que é dada pela inclinação da reta obtida na FIGURA 09 onde:

$$k_1 = -\ln A/A_0 \times 1/t$$

Sendo A a atividade hemaglutinante residual,  $A_0$  a atividade hemaglutinante inicial e t o tempo em segundos.

A velocidade de reação está relacionada com a energia livre padrão do estado ativado pela fórmula abaixo (DAWES, 1972):

$$\Delta G' = RT \times \ln kT$$

$$k_1 h$$

Onde R é a constante dos gases ( $1,9869 \text{ atm.}^\circ\text{K.mol}^{-1}$ ), T é a temperatura absoluta ( $^\circ\text{K}$ ), k é a constante de Boltzmann ( $1,37 \times 10^{-16} \text{ ergs.}^\circ\text{K}^{-1}$ ),  $k_1$  é a velocidade de reação e h é a constante de Planck ( $6,62 \times 10^{-27} \text{ ergs.seg.}^{-1}$ ).

### 3.17 Efeito do EDTA Sobre a Atividade Hemaglutinante

A lectina (2mg/ml) foi dissolvida em NaCl 0,15 M contendo EDTA no intervalo de 0,025 M a 0,25 M. As soluções foram deixadas em repouso por 30 minutos, quando então foi feito o ensaio de atividade hemaglutinante conforme descrito no item 3.6.

### 3.18 Determinação da Sequência N-terminal

A sequência N-terminal de aminoácidos da lectina e das subunidades foi determinada em um sequenciador automático Applied Biosystem 473A seguindo as instruções do fabricante.

### 3.19 Isolamento das Subunidades da Lectina de *P.arvense*

As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da lectina de *P.arvense* foram isoladas por filtração em coluna de BioGel P60 (2,5 x 65,0 cm) equilibrada e eluída com cloridrato de guanidina 6M, utilizando-se um fluxo de 8 ml/h. Foram aplicados ao gel 30 mg da lectina purificada dissolvida em 2 ml da solução de equilíbrio. As frações foram monitoradas a 280 nm. As subunidades isoladas foram dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

### 3.20 Degradações Proteolíticas

A lectina de *P.arvense* (2mg/ml) dissolvida em bicarbonato de amônio 100 mM pH 8,0 contendo cloridrato de guanidina 1 M foi digerida por aproximadamente 15 horas com as enzimas: tripsina - TCPK (Sigma) e quimotripsina (Sigma) na proporção enzima lectina de 1/100 (p/p).

As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  isoladas foram também degradadas com elastase (Boehringer Mannheim) utilizando-se as mesmas condições.

### 3.21 Isolamento dos Peptídios

Os peptídios obtidos enzimaticamente foram separados por cromatografia de fase reversa em HPLC utilizando-se um cromatógrafo composto de um programador/detector Pharmacia-LKB VWM 2141, uma bomba de gradiente Pharmacia-LKB 2249 e uma coluna Nucleosil C18 (25 x 4 mm; partículas de 5  $\mu$ m e poros de 100 Å) da Macherey Nagel. Foi utilizado um fluxo de 1ml/min e uma mistura de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em água (solução A) e acetonitrila (solução B) nas seguintes condições:

- Peptídios obtidos com tripsina: 5% de B por 5 minutos seguido de 5-45 % de B por 120 minutos e 45-70 % de B por 25 minutos.
- Peptídios obtidos com quimotripsina: 5% de B por 5 minutos, seguido de 5-40 % de B por 70 minutos e 40-70 % de B por 30 minutos.
- Peptídios obtidos com elastase: 5 % de B por 5 minutos, seguido de 5-40 % de B por 105 minutos e 40-70 % de B por 30 minutos.

As frações foram monitoradas a 220 nm, coletadas manualmente, secas em SpeedVac (Savant) e submetidas a análise de aminoácidos, a sequenciamento e a espectrometria de massa.

### 3.22 Determinação da Massa Molecular das Subunidades

As massas moleculares das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  foram determinadas por espectrometria de massa do tipo ESI (*Electro Spray Ionization*) utilizando-se um instrumento Sciex API-III. As massas dos peptídios isolados foram determinadas pela espectrometria de massa utilizando-



se a técnica MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) em um aparelho Shimadzu MALDI-I usando-se ácido  $\alpha$ -ciano-cinâmico saturado como matriz.

### 3.23 Análise de Aminoácidos

A composição de aminoácidos da lectina de *P.arvense* e dos peptídios isolados foi determinada em um analisador automático de aminoácidos Pharmacia Alpha Plus após hidrólise das amostras com HCl 6N, a 110 °C, por aproximadamente 15 horas em ampolas seladas e a vácuo. A lectina de *P.arvense* foi também submetida a diferentes tempos de hidrólise (24, 48 e 72 horas) para uma determinação mais precisa da composição de aminoácidos.

### 3.24 Experimentos de Cristalização

Para os experimentos de cristalização foi utilizado o método de “hanging-drop vapour diffusion” em placas de cultura de tecido de 24 poços. A lectina de *P.arvense* na concentração de 15 mg/ml em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, foi submetida a diferentes condições de cristalização misturando-se de 3 a 5  $\mu$ l da solução de lectina com 2 a 5  $\mu$ l dos vários tampões de cristalização utilizados em diferentes concentrações: citrato de sódio, sulfato de amônio, polietilenoglicol de diferentes pesos moleculares, fosfato de sódio e acetato de sódio.

### 3.25 Experimentos de Germinação de Sementes de *P.arvense* na Ausência de Luz

Sementes de *P.arvense* padronizadas em relação ao peso (0,17-0,21g) foram colocadas para germinar entre duas folhas de papel de filtro posicionados verticalmente em recipientes contendo água destilada e mantidos em cubas de germinação no escuro por 22 dias. A cada três dias foram coletadas plântulas, que após padronização quanto ao tamanho, foram separadas em cotilédones e eixo embrionário. Foram determinados o peso fresco e o peso seco dos cotilédones e dos eixos das plântulas ao longo da germinação e estabelecimento da plântula. As amostras obtidas dos diferentes dias foram liofilizadas e maceradas para serem submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, ensaio de atividade hemaglutinante e dosagem de proteínas.

### 3.26 Atividade Mitogênica

Células mononucleares humanas foram separadas do sangue venoso heparinizado por um gradiente de Ficoll-Hypaque e lavadas duas vezes com RPMI 1640 contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (1µg/ml). Após incubação a 37 °C por 1 hora, as células foram lavadas novamente e ressuspensas em RPMI 1640 contendo os antibióticos acima, L-glutamina (2 mM), HEPES (10 mM) e 10 % de soro humano inativado por aquecimento em banho-maria.

Células mononucleares humanas ( $2 \times 10^5$  células em 200 µl) foram colocadas nos poços de placas de microtitulação de fundo chato e estimuladas com soluções de lectina de *P.arvense* e lectina de *Canavalia brasiliensis* (Con Br) nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 µg/ml e Con Br na concentração de 10 µg/ml. Após incubação a 37 °C em atmosfera de 5% de

CO<sub>2</sub> por 2, 4 e 6 dias, a proliferação foi medida por espectrometria de cintilação líquida após pulsar as culturas por 5 horas com timidina triciada 1  $\mu$ Ci.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Composição Mínima das Sementes de *P.arvense*

Os resultados da análise elementar são apresentados na TABELA 1 e comparados à composição mínima das sementes de *Pisum sativum*.

### 4.2 Características Morfológicas de Sementes e Anatomia de Raízes

As sementes apresentaram um peso médio de 0,14 g, um comprimento de 6,3 mm e 6,2 mm de largura, sendo assim caracterizada como uma semente levemente ovalada (FIGURA 1). O hilo de características diminutas tem cor pardacenta e micrópila não visível. As sementes têm uma coloração marrom clara e aspecto liso. Os tegumentos são pouco diferenciados e os cotilédones pequenos, brancos e lisos. Após a germinação, observou-se que o eixo radícula-hipocótilo apresenta articulação. Foi visualizada uma raiz triarca com uma espessa camada de células no periciclo e epiderme uniseriada composta de células quadrangulares de parênquima cortical evidente (FIGURA 2A e 2B).

TABELA 1 - Composição centesimal da farinha de sementes de *Pisum arvense* e de *P.sativum*.

Constituinte	<i>Pisum arvense</i>	<i>Pisum sativum</i> <sup>1</sup>
Umidade	11,95	10,17
Proteína Bruta <sup>2</sup>	25,29	23,61
Cinzas	2,26	3,41
Lipídios	3,78	1,08
Fibras	7,11	5,64
Carboidratos <sup>3</sup>	49,61	56,09

<sup>1</sup> PISULEWSKI *et al.*, 1983<sup>2</sup> Nitrogênio Total x 6,25<sup>3</sup> Calculado por diferença

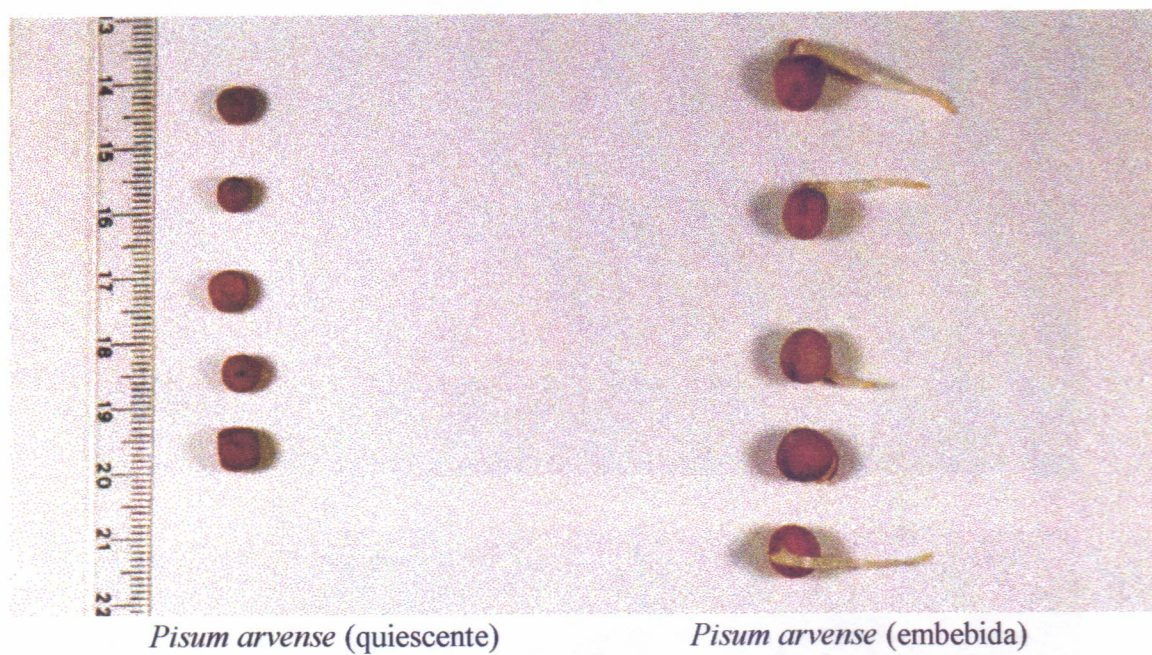
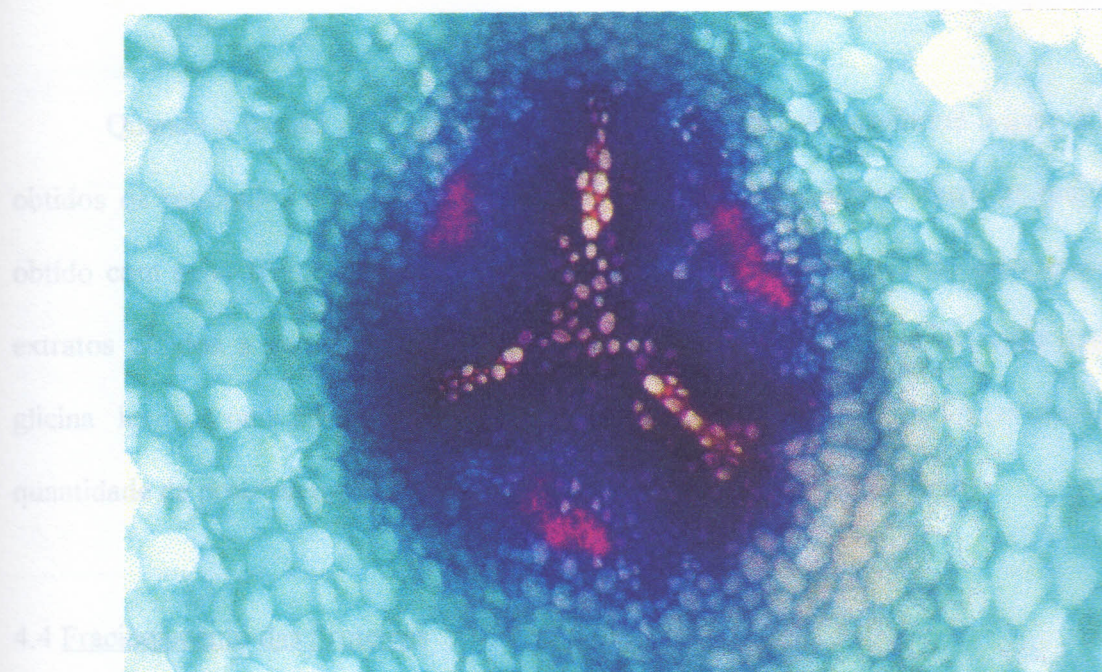


FIGURA 1 - Sementes de *P. arvense*

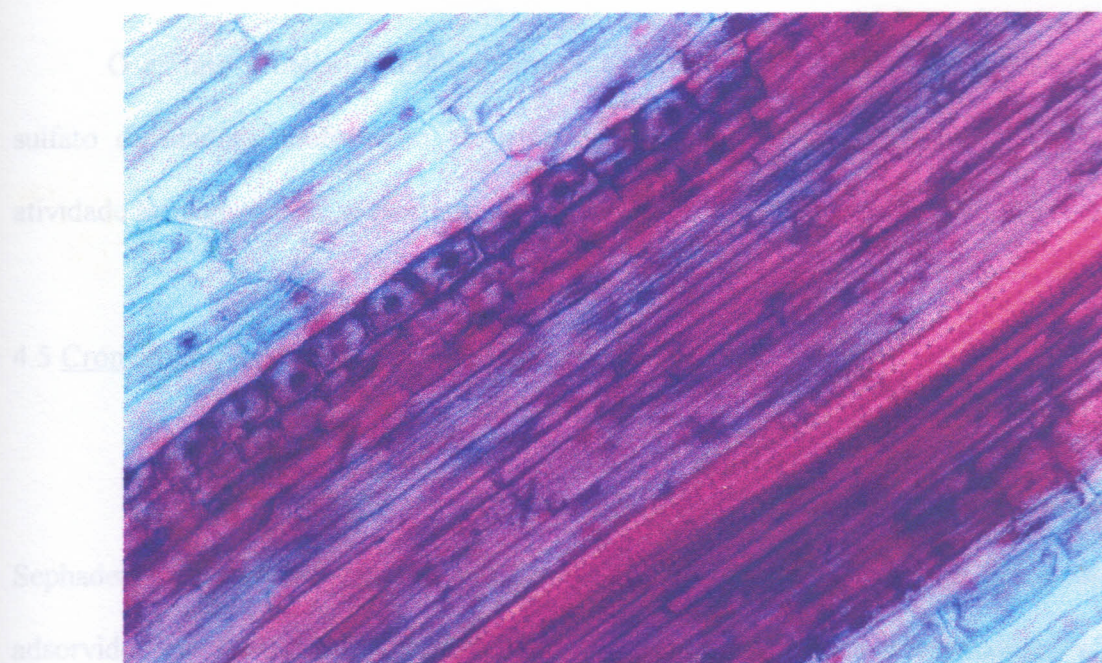


## 4.3 Extração das Proteínas



A

## 4.4 Fração



B

FIGURA 2 -Secção transversal (A) e longitudinal (B) da raiz primária.



#### 4.3 Extração das Proteínas

Quando a farinha de *P.arvense* foi submetida à extração conforme o item 3.7.1 foram obtidos os resultados apresentados na TABELA 2, onde podemos observar que o extrato obtido com água apresentou uma maior atividade total (UH/gF) quando comparado com os extratos obtidos a partir de outras soluções extratoras. Entretanto a extração com tampão glicina levou a uma atividade específica (UH/mgP) mais elevada. Podemos observar que a quantidade de proteína total extraída aumenta com valores crescentes de pH.

#### 4.4 Fracionamento das Proteínas

O extrato protéico (obtido conforme o item 3.7.2) foi submetido à precipitação com sulfato de amônio conforme o esquema mostrado na FIGURA 3. Foi observado que a atividade hemaglutinante se concentra no precipitado da fração 0/60 (TABELA 3).

#### 4.5 Cromatografia de Afinidade em Sephadex G-100

A fração 0/60 quando submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100 apresentou dois picos cromatográficos (FIGURA 4). O primeiro pico não adsorvido era destituído de atividade hemaglutinante, enquanto o segundo pico (lectina), eluído apenas com a solução de PBS contendo glicose 0,1 M, continha toda a atividade hemaglutinante.

TABELA 2 - Determinação da melhor condição de extração da lectina de *P.arvense*

pH	Proteína total (mgP/gF)	Atividade total (UH/gF)	Atividade específica (UH/mgP)
H <sub>2</sub> O	25,76 ± 1,5	1.280	49,9
NaCl	24,11 ± 1,0	1.280	48,2
2,6	7,52 ± 1,2	960	127,7
4,0	9,89 ± 0,3	960	97,1
6,0	59,29 ± 8,5	1.280	21,6
8,0	75,72 ± 8,2	640	8,4
10,0	87,04 ± 6,2	640	7,3



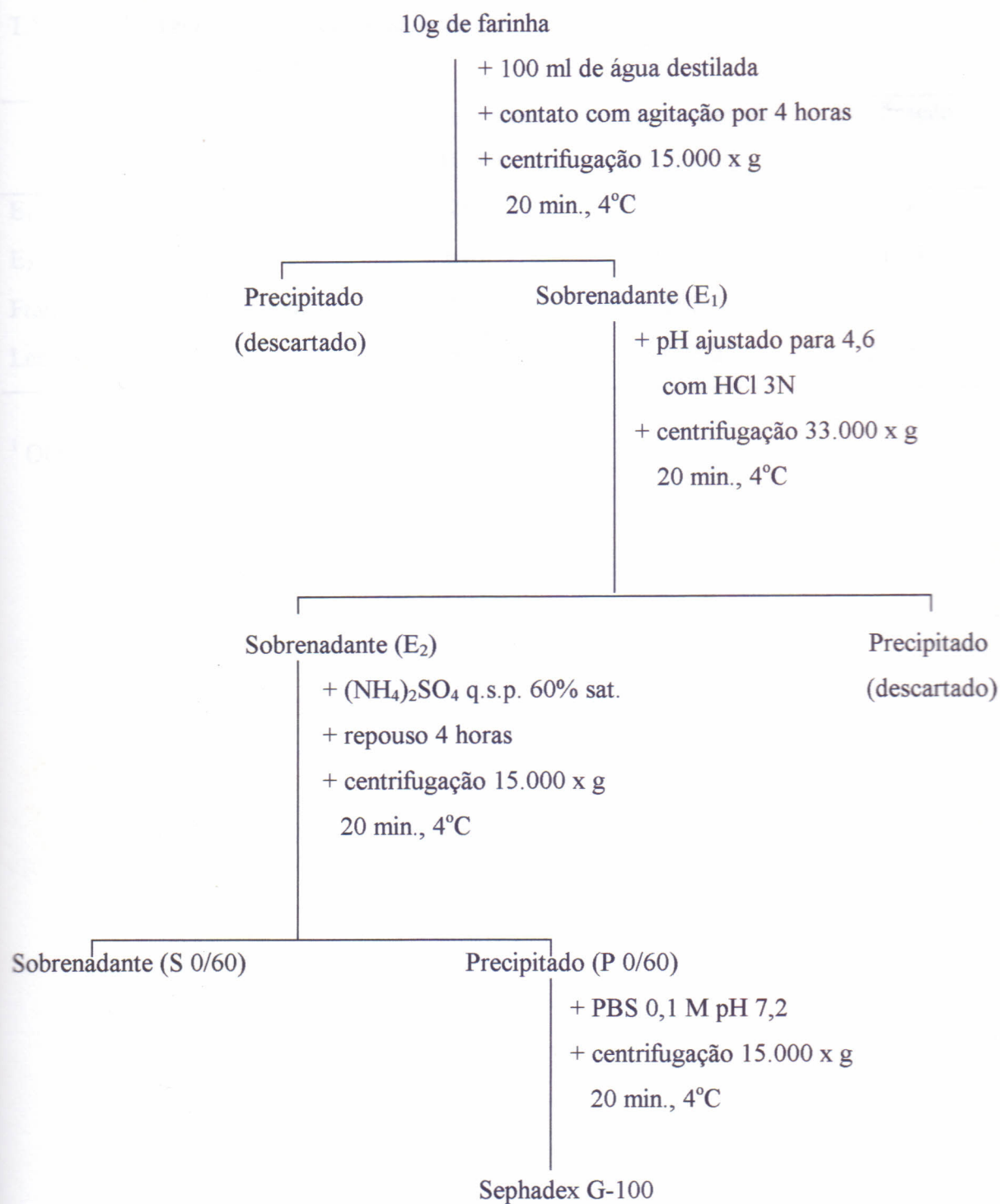


FIGURA 3 - Esquema de fracionamento das proteínas de sementes de *Pisum arvense*.

TABELA 3 - Tabela de purificação da lectina de *P.arvense*

Fração	Proteína Total (mgP/gF)	Atividade total (UH/gF)	Atividade específica (UH/mgP)	Purificação
E <sub>1</sub>	25,17 ± 1,7	1.280	50,9	1,00
E <sub>2</sub>	8,23 ± 1,2	640	77,8	1,53
Fração 0/60	1,98 ± 0,2	400	202,0	3,97
Lectina <sup>1</sup>	1,62 ± 0,2	1.664	1.027,2	20,20

<sup>1</sup> Obtida do Sephadex G-100

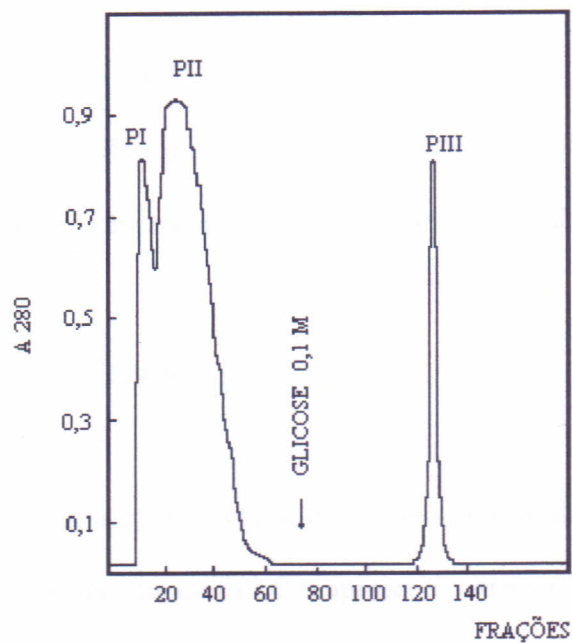


FIGURA 4 - Cromatografia de afinidade da Fração 0/60 em Coluna de Sephadex G-100 (2,4 cm x 26,6 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,2 e eluída com a solução de equilíbrio, seguida do mesmo tampão contendo glicose 0,1 M. Amostra: 10 ml; Fluxo: 20 ml/h; Frações: 3,0 ml.



#### 4.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e $\beta$ -mercaptoetanol

A lectina, quando submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, apresentou 2 bandas principais com pesos moleculares aparentes de 18 e 6 kDa (FIGURA 5) que correspondiam respectivamente às cadeias  $\beta$  e  $\alpha$  de acordo com os padrões eletroforéticos das lectinas pertencentes à tribo *Vicieae*.

#### 4.7 Determinação da Massa Molecular

A lectina foi submetida a cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30, acoplada a um sistema de FPLC e apresentou apenas um pico correspondente a massa molecular aparente de 41 kDa sugerindo uma estrutura dimérica a pH 7,0 (FIGURA 6).

#### 4.8 Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante

A TABELA 4 mostra a concentração mínima de açúcar capaz de inibir uma unidade de hemaglutinação. A atividade hemaglutinante da lectina de *P.arvense* foi melhor inibida por 6,25 mM de D-manose seguida por 18,75 mM de D-glicose.

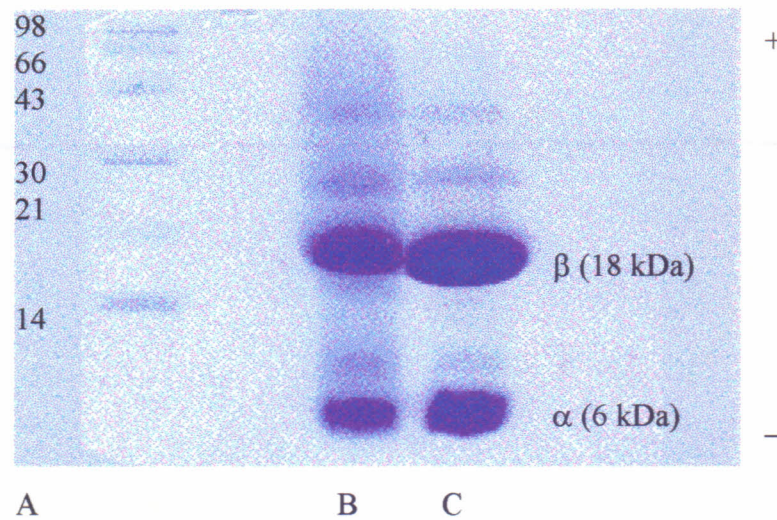


FIGURA 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol da lectina de *Pisum arvense*. A- Marcadores de massa molecular: fosforilase B (98 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), mioglobina (21 kDa) e lisozima (14 kDa). B e C- Lectina de *P. arvense*.

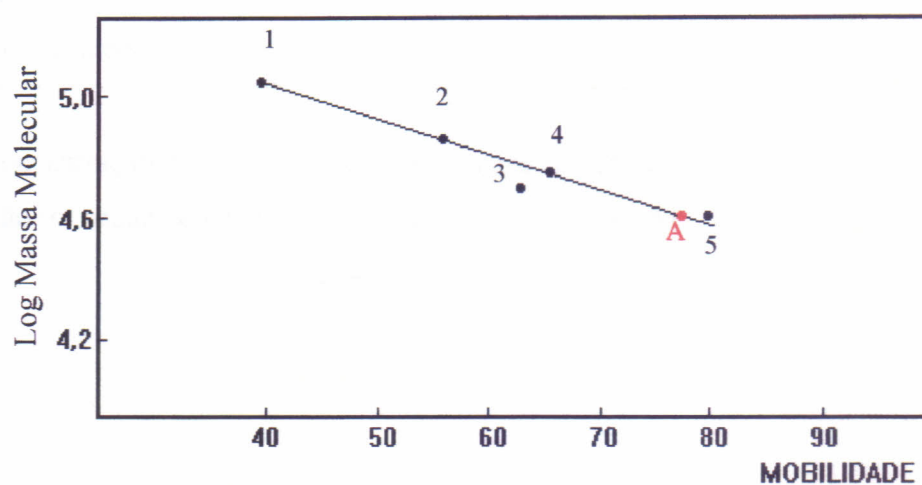


FIGURA 6 - Determinação da massa molecular aparente da lectina de *P.arvense* por cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 HR 10/30 acoplada a um sistema de FPLC. Marcadores de peso molecular: 1- tetrâmero (104 kDa) e 2- dímero (52 kDa) da Con A; 3- albumina sérica bovina (66 kDa); 4- ovalbumina (45 kDa) e 5- jacalina (39,5 kDa). A - Lectina de *Pisum arvense*.



TABELA 4 - Inibição da atividade hemaglutinante por diferentes açúcares

Açúcares	Concentração Mínima (mM) <sup>1</sup>
$\alpha$ -D(+)-Manose	6,25
$\alpha$ -D (+)-Glicose	18,75
$\alpha$ -metil-manosídeo	25,00
D(+)-Glicosamina	100,00
Frutose	100,00
D(+)-Galactose	NI <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Concentração mínima (mM) de açúcar para inibição de 1 UH

<sup>2</sup>Não foi capaz de inibir mesmo na concentração de 1 M

#### 4.9 Especificidade Sanguínea

A lectina se mostrou inespecífica, sendo capaz de aglutinar hemácias do sistema ABO e hemácias de coelho, tratadas ou não com enzimas proteolíticas, bem como hemácias nativas de boi, porco, galinha e cabra (TABELA 5).

#### 4.10 Espectro de Absorção da Lectina de *Pisum arvense*

A FIGURA 7 mostra o espectro de absorção da lectina de *P.arvense* dissolvida (1 mg/ml) em NaCl 0,15 M. O valor encontrado para o coeficiente de extinção molar a 280 nm foi igual a 14,81.

#### 4.11 Determinação de Carboidratos

Pelo método de DUBOIS (1956), a lectina de *P.arvense* não apresentou carboidratos ligados quimicamente a sua estrutura protéica semelhante ao observado para lectina de *P.sativum*.

#### 4.12 Termoestabilidade

A incubação da lectina por diferentes tempos a 70 °C induziu uma redução gradual da atividade hemaglutinante (FIGURA 8). O  $\Delta G^\circ$  de ativação do processo de desnaturação da lectina foi de 23,12 kcal/mol a 70 °C. O cálculo é feito a partir da FIGURA 9.

TABELA 5 - Atividade hemaglutinante da lectina de *P.arvense* contra diferentes eritrócitos.

Eritrócitos (2 %)	Atividade Hemaglutinante (UH/ml)			
	Nativo	Tripsina	Papaína	Bromelaína
Humanos				
A	16	16	32	32
B	32	32	64	128
O	32	32	32	48
Animais				
Boi	32	08	AN <sup>1</sup>	AN
Cabra	32	- <sup>2</sup>	-	-
Porco	64	-	-	-
Galinha	128	-	-	-
Coelho	512	2048	2048	2048

<sup>1</sup>AN: Atividade negativa<sup>2</sup>Não determinado

N - Normal

T - Tripsina

P - Papaina

B - Bromelaina



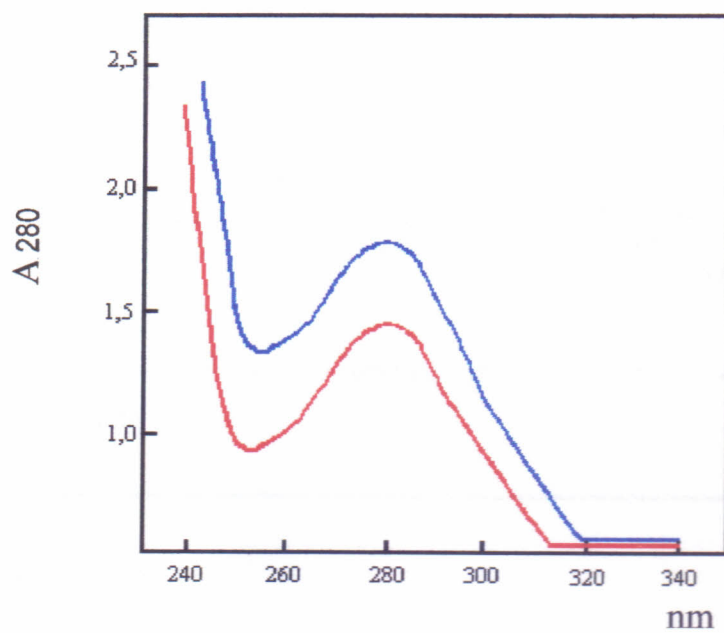


FIGURA 7 - Espectros de absorção das soluções a 1 mg/ml das lectinas de *P.arvense* (—) e *P.sativum* (—) dissolvidas em NaCl 0,15 M.

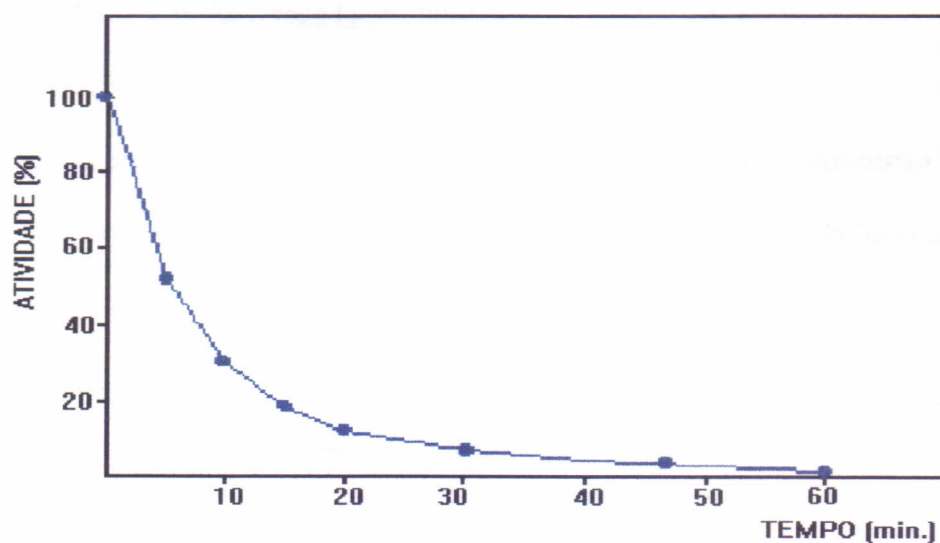


FIGURA 8 - Atividade hemaglutinante residual da lectina de *P.arvense* após tratamento térmico a 70 °C.

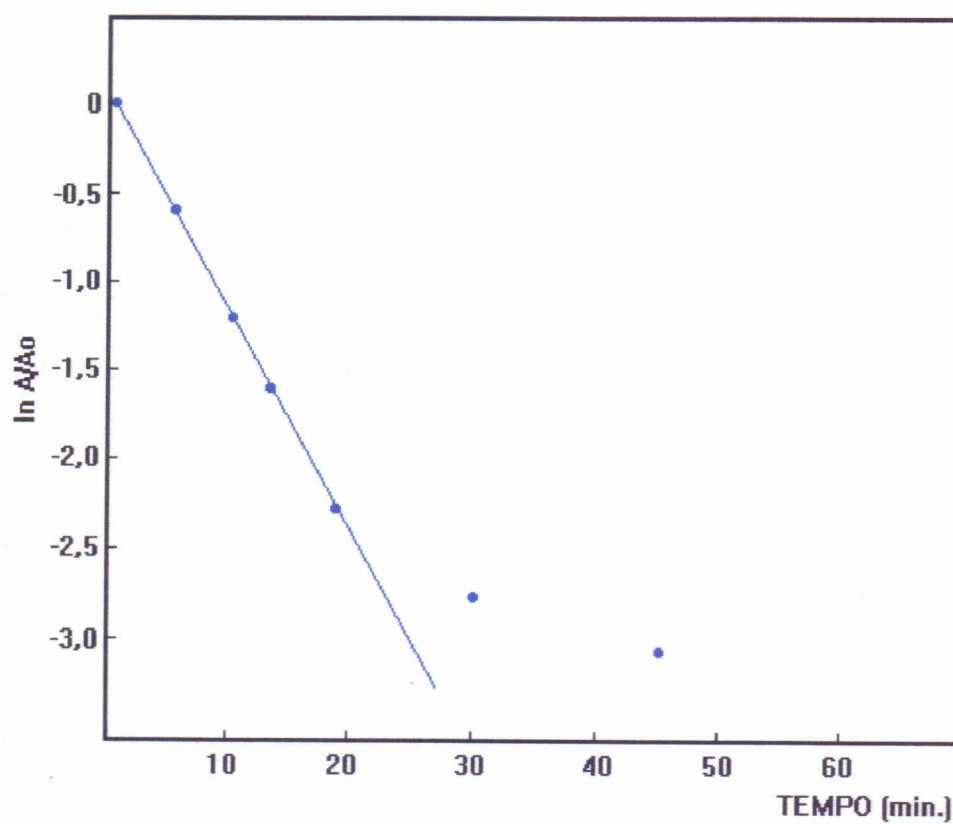


FIGURA 9 - Gráfico de  $\ln A/A_0$  versus tempo de aquecimento da lectina de *P.arvense* na temperatura de 70 °C.

#### 4.13 Efeito do EDTA na Atividade Hemaglutinante

Quando a lectina de *P.arvense* foi submetida ao ensaio de hemaglutinação na presença de EDTA, verificou-se que uma concentração de 0,1 M deste composto aboliu completamente a aglutinação dos eritrócitos.

#### 4.14 Sequência N-Terminal da Lectina de *P.arvense*

A partir da lectina nativa, foram obtidas dois resíduos em cada ciclo de sequenciamento na proporção molar de 1:1

(V,T), (E,T), (S,T), (Y,T), (T,S), (L,F), (L,S), (D,I), (V,T),  
(V,K), (S,F), (S,L), (K,P), (D,X), (V,Q), (V,Q), (N,P), (L,E),  
(W,I), (F,V)

que podem ser alinhadas com as sequências N-terminais das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da lectina de *P.sativum* (Swiss-Prot <http://expasy.hcuge.ch>)

Cadeia $\beta$ ( <i>P.sativum</i> )	Cadeia $\beta$ ( <i>P.sativum</i> )
TETTSFLITKFSPDQQLIF	TETTSFLITKFSPDQQLIF
Cadeia $\alpha$ ( <i>P.sativum</i> )	Cadeia $\alpha$ ( <i>P.sativum</i> )
VTSYTLSDVVSLKDVPPEWV	VTSYTLSDVVSLKDVPPEWV

#### 4.15 Isolamento das Subunidades $\alpha$ e $\beta$ da Lectina de *P.arvense*

Através de filtração em BioGel P-60, dois picos foram obtidos, correspondendo a cadeia  $\beta$  (primeiro pico) e a cadeia  $\alpha$  (segundo pico) (FIGURA 10).



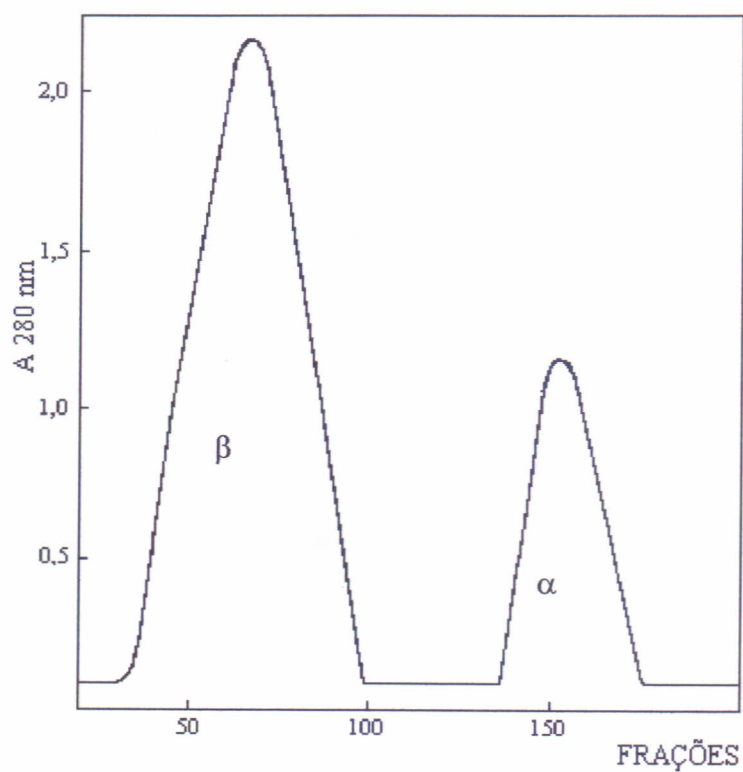


FIGURA 10 - Isolamento das subunidades  $\beta$  e  $\alpha$  por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Bio Gel P-60 (2,5 x 65,0 cm) equilibrada e eluída com cloridrato de guanidina 6M. Amostra: 30 mg da lectina de *Pisum arvense* Fluxo: 8,0 ml/h

#### 4.16 Isolamento dos Peptídios

Através de cromatografia de fase reversa em coluna Nucleosil C18 acoplada a HPLC foram obtidos diferentes peptídios provenientes das hidrólises com as proteases utilizadas (FIGURA 11,12 e 13).

#### 4.17 Determinação das Massas Moleculares

A subunidade  $\beta$  da lectina de *P.arvense* apresentou por espectrometria de massa ESI (electrospray ionization) apresentou cinco íons protonados de +17 (1177 Da) a +13 (1538 Da) a partir dos quais foi calculada a massa molecular de  $19.986 \pm 1,8$  Da (FIGURA 14).

A cadeia  $\alpha$  mostrou uma mistura de íons correspondendo a massas moleculares de  $5.849 \pm 1,4$  Da,  $5.592 \pm 0,3$  Da e  $6.172 \pm 0,3$  Da (FIGURA 15).

As massas moleculares dos peptídios isolados foram determinadas através da espectrometria de massa do tipo MALDI para confirmação da composição de aminoácidos dos respectivos peptídios.

#### 4.18 Composição de Aminoácidos

A composição de aminoácidos da lectina de *P.arvense* é apresentada na TABELA 6. Os aminoácidos encontrados com valores percentuais mais elevados foram ácido aspártico/asparagina e treonina, enquanto que para histidina e arginina foram observados os menores percentuais. Não foram detectados aminoácidos sulfurados.

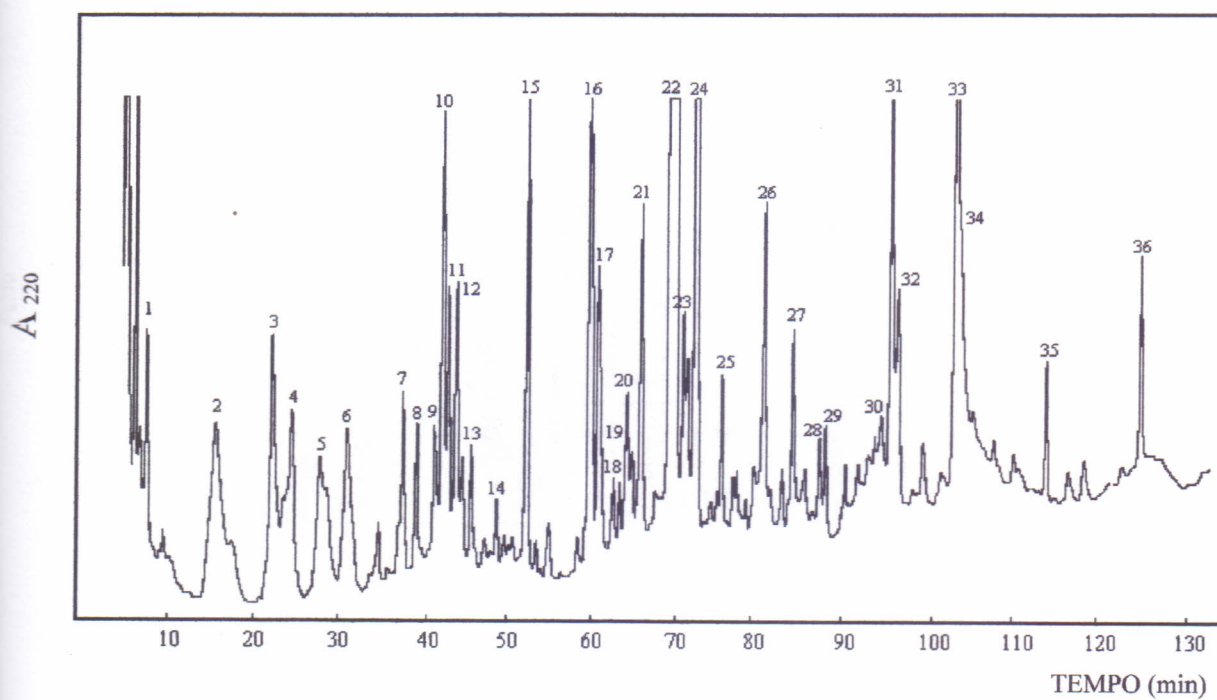


FIGURA 11 - Cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna de Nucleosil C 18 dos peptídeos obtidos pela digestão da lectina de *P.arvense* por tripsina.



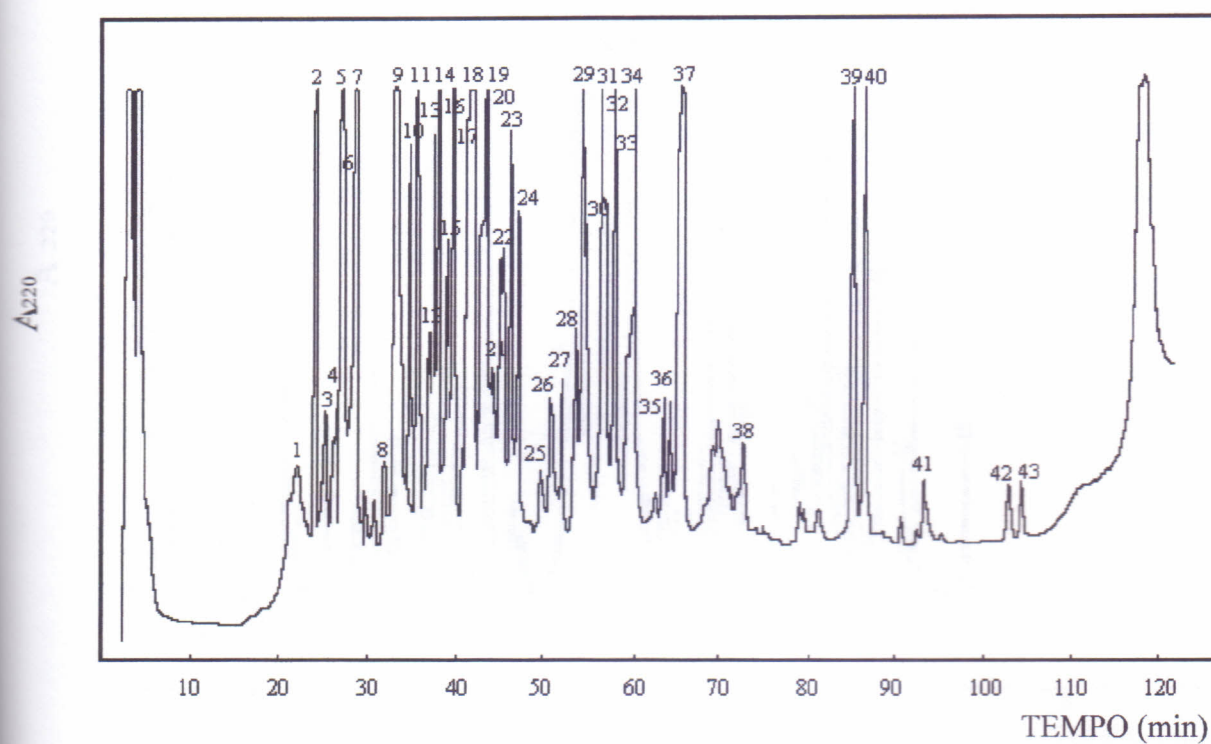


FIGURA 12 - Cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna de Nucleosil C 18 dos peptídios obtidos pela digestão da subunidade  $\beta$  da lectina de *P.arvense* por quimotripsina.

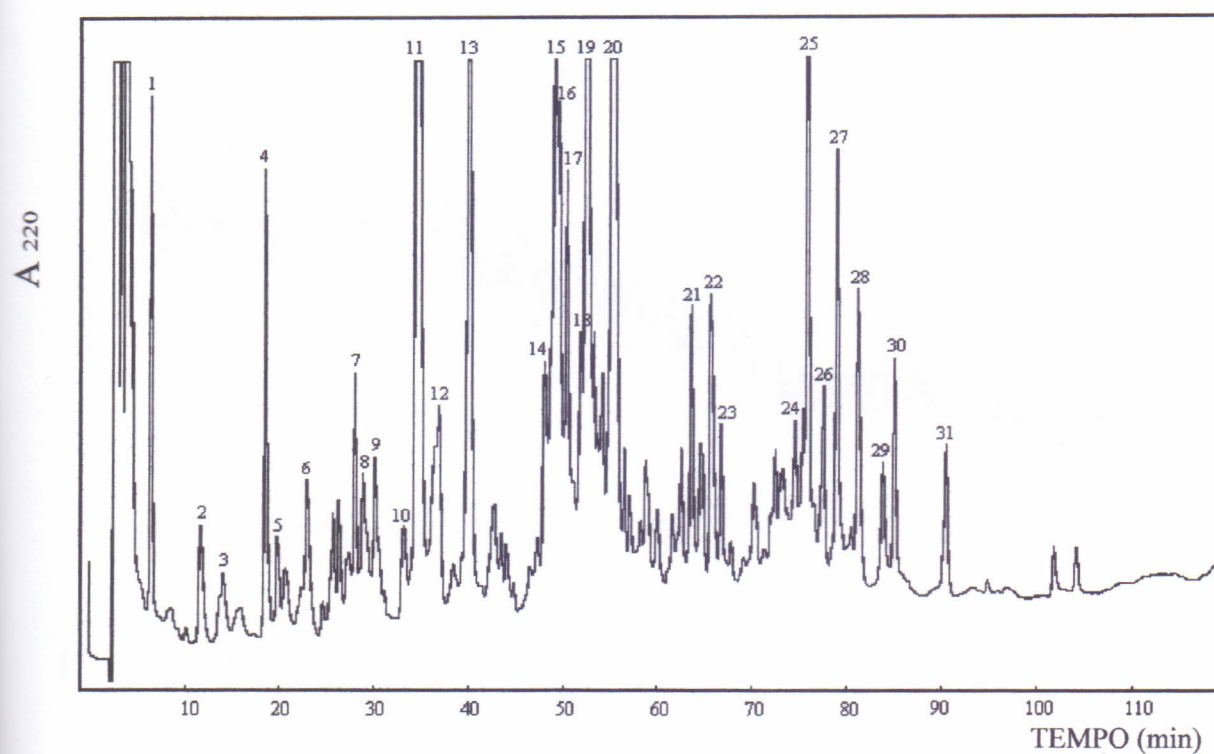


FIGURA 13 - Cromatografia de fase reversa em HPLC em coluna de Nucleosil C 18 dos peptídios obtidos pela digestão da lectina de *P.arvense* por elastase.

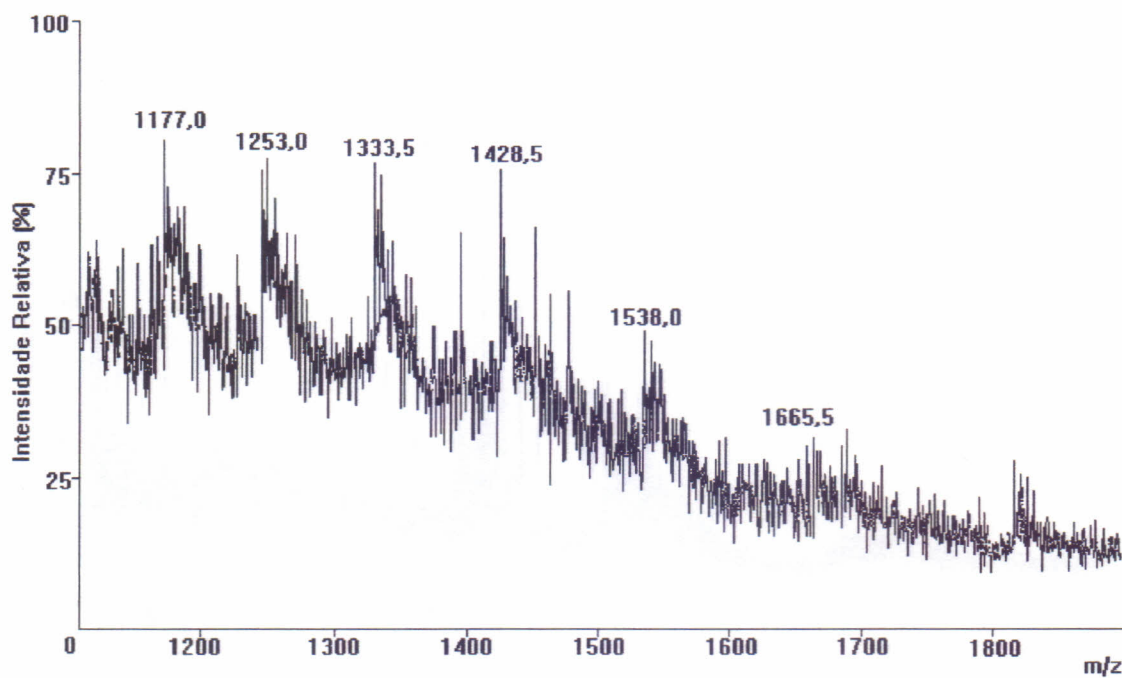


FIGURA 14 - Espectro de massa ESI da subunidade  $\beta$  da lectina de *Pisum arvense* determinado em um aparelho SCIEX modelo API-III.



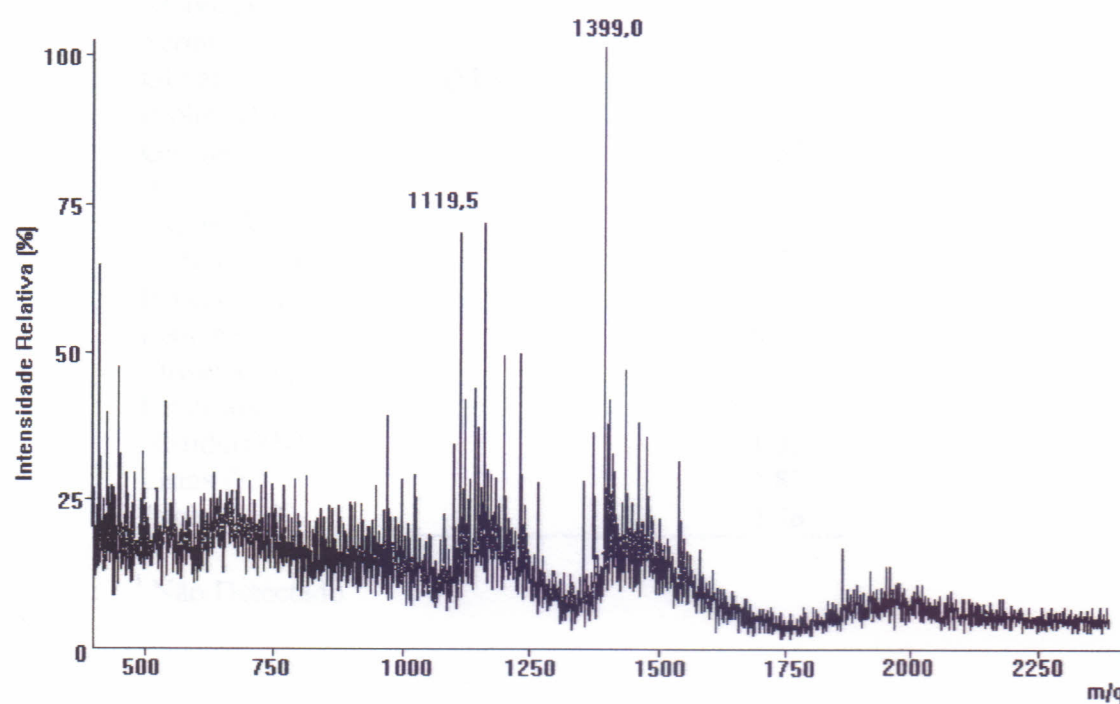


FIGURA 15 - Espectro de massa ESI da subunidade  $\alpha$  da lectina de *Pisum arvense* determinado em um aparelho SCIEX modelo API-III.

TABELA 6 - Composição de aminoácidos da lectina de *Pisum arvense*

AMINOÁCIDO	Mol. %
Asparagina, Aspártico (N,D)	12,09
Treonina (T)	11,33
Serina (S)	9,63
Glutamina, Glutâmico (Q,E)	9,16
Prolina (P)	3,59
Glicina (G)	7,37
Alanina (A)	8,59
Valina (V)	9,35
Metionina (M)	ND <sup>1</sup>
Isoleucina (I)	4,44
Leucina (L)	6,14
Tirosina (Y)	3,97
Fenilalanina (F)	6,80
Histidina (H)	1,32
Lisina (K)	3,87
Arginina (R)	2,36

<sup>1</sup> Não Detectado

#### 4.19 Determinação da Sequência de Aminoácidos

A FIGURA 16 representa a sequência de aminoácidos das subunidades  $\beta$  e  $\alpha$  juntamente com os peptídios a partir dos quais as sequências foram determinadas. Para a cadeia  $\beta$  foram encontrados 181 aminoácidos. Entretanto, para alguns segmentos de aminoácidos da cadeia  $\beta$  não foram encontrados peptídios correspondentes. Com relação à cadeia  $\alpha$  foram encontrados 53 aminoácidos.

#### 4.20 Experimentos de Cristalização

Sob as condições de cristalização utilizadas para a lectina de *P.arvense* foi observado crescimento de microcristais que até o momento não permitem resultados utilizáveis de difração de raios X.

#### 4.21 Ultracentrifugação Analítica

O coeficiente de sedimentação observado por ultracentrifugação analítica para a lectina de *P.arvense* foi de 4,31 S (FIGURA 17), que corresponde a uma massa molecular de 50.000 Da. Este resultado indica que a lectina apresenta-se na forma  $(\alpha\beta)_2$  como outras lectinas pertencentes a mesma tribo.



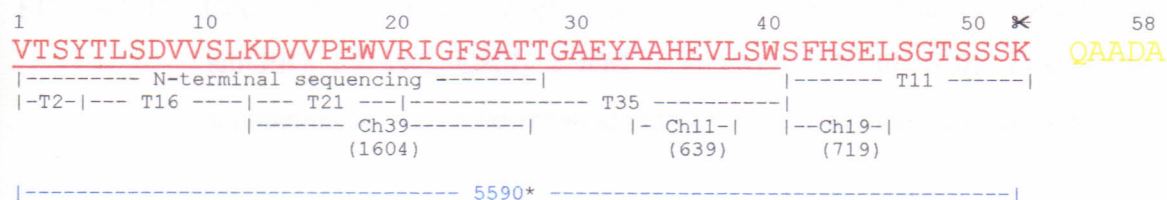
*Pisum arvense* $\beta$  ( $M+H^+ = 19986 \pm 2$  Da)\* $\alpha$  ( $M+H^+ = 5591 \pm 1$  Da)\*

FIGURA16-Sequência de aminoácidos das cadeia  $\beta$  e  $\alpha$  da lectina de *P. arvense* alinhadas com as sequências da cadeia  $\beta$  e  $\alpha$  da lectina de *P. sativum*.. As sequências sublinhadas foram confirmadas pelo sequenciamento automático.

\* Valores determinados por espectrometria de massa ESI.

\*\* Massas moleculares dos peptídios determinadas por espectrometria de massa MALDI.

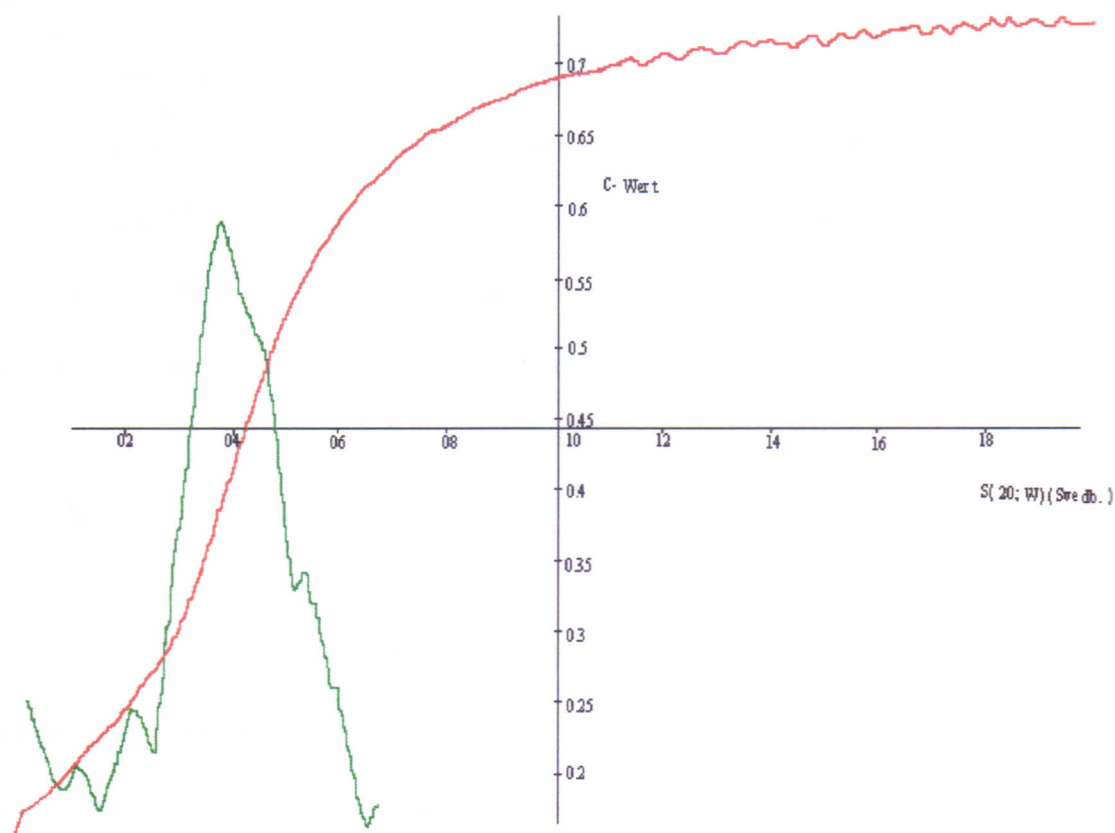


FIGURA 17 - Coeficientes de sedimentação e difusão da lectina de *Pisum arvense* (1 mg/ml em PBS 20 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM e  $\text{MnCl}_2$  1 mM pH 7,0). Coeficiente de sedimentação: 4,31S correspondendo a uma massa molecular de 50 kDa.

#### 4.22 Germinação de Sementes de *P.arvense* na Ausência de Luz

Através de PAGE-SDS dos extratos obtidos a partir dos cotilédones coletados ao longo da germinação no escuro, observou-se que as proteínas de massas moleculares aparentes elevadas foram degradadas ao longo da germinação, enquanto as bandas protéicas correspondentes à lectina persistiram durante o período de germinação e estabelecimento da plântula (FIGURA 18). Ao final deste período, as plântulas apresentavam-se estioladas. De maneira semelhante, a atividade hemaglutinante foi detectada nos extratos de cotilédones obtidos durante a germinação (FIGURA 19).

#### 4.23 Atividade Mitogênica

Os resultados mostrados na FIGURA 20 indicam que a lectina de *P.arvense* foi eficiente em induzir a proliferação de linfócitos humanos. Os melhores resultados foram observados quando foram utilizadas as doses de 50 e 100 µg/ml com o tempo de incubação de 4 dias. A lectina de *P.arvense* mostrou-se um mitógeno menos potente que a Con Br nas doses testadas.



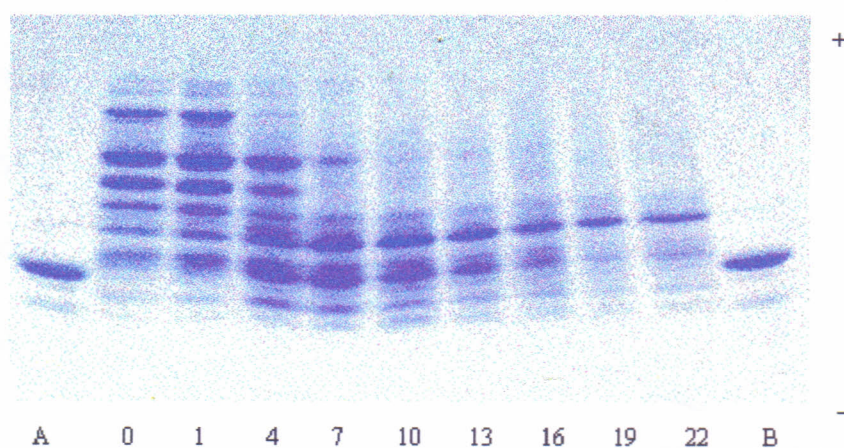


FIGURA 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol dos extratos de cotilédones dos diferentes dias de germinação (0-22). A e B: Lectina de *P.arvense*.

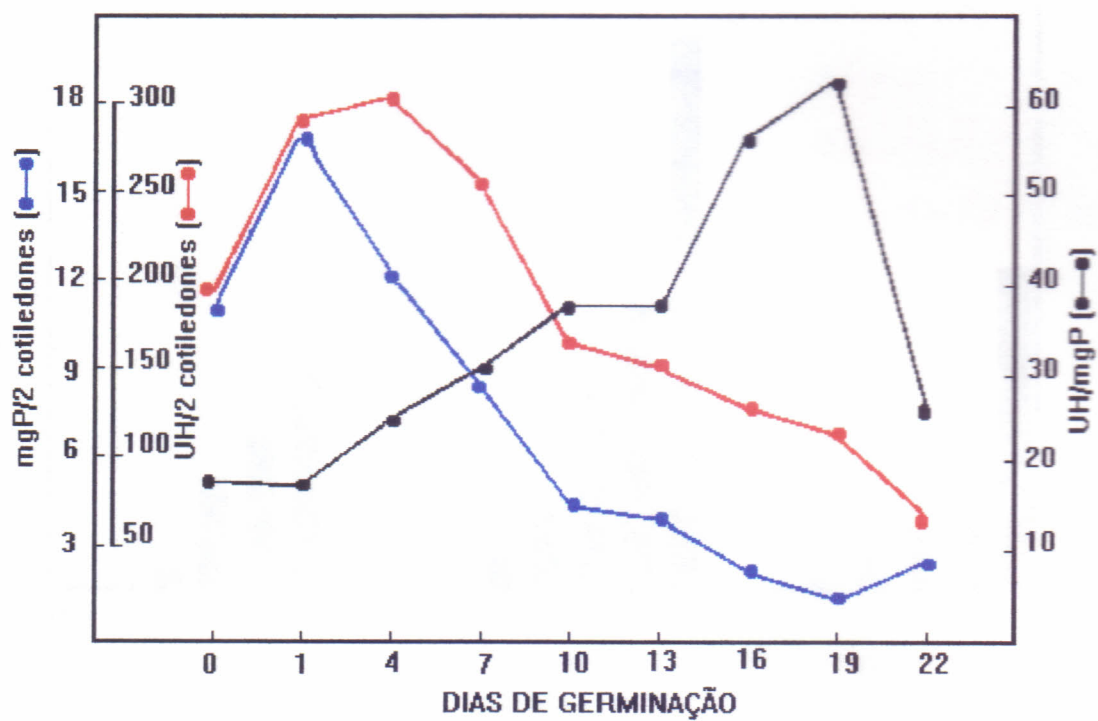


FIGURA 19 - Atividade hemaglutinante e dosagem de proteínas nos extratos de cotilédones obtidos a partir de diferentes dias de germinação.

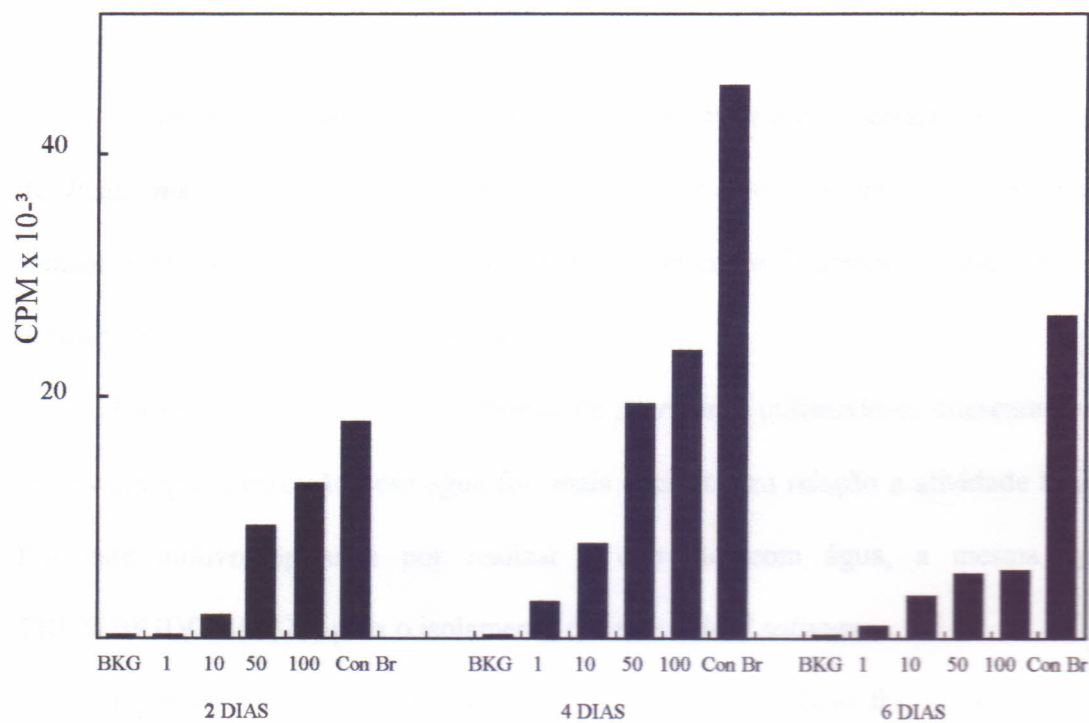


FIGURA 20 - Incorporação de timidina-3H (CPM) por células mononucleares humanas estimuladas pela lectina de *P. arvense* nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 µg/ml (incubação por 2, 4 e 6 dias) comparada a dose de 10 µg/ml da Con Br.



## 5 DISCUSSÃO

A composição centesimal das sementes de *P.arvense* é semelhante àquela das sementes de *P.sativum* (PISULEWSKI *et al.*, 1983). O elevado teor de proteínas observado em sementes de *P.arvense* (25,29 %) é de considerável interesse devido ao fato desta espécie ser utilizada como forragem no sul do Brasil.

Na obtenção de extratos da farinha de *P.arvense*, utilizando-se diferentes soluções, foi observado que a extração com água foi mais eficiente em relação a atividade total (UH/gF). Por este motivo optou-se por realizar a extração com água, a mesma descrita por TROWBRIDGE (1974) para o isolamento da lectina de *P.sativum*.

Durante a etapa de precipitação com sulfato de amônio foi observado que a P0/60 concentra toda a atividade hemaglutinante. Esta fração, quando submetida a cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100, é eluída em dois picos distintos, sendo que o primeiro deles não interage com o gel e o segundo somente é eluído com glicose presente no tampão de eluição ou por diminuição do pH (tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,6). O rendimento obtido é considerado satisfatório, desde que aproximadamente 500 a 600 mg de lectina pura puderam ser obtidos partindo-se de um kg de farinha das sementes. Este rendimento é comparável aqueles obtidos para outras lectinas de espécies vegetais da mesma tribo (CAVADA, 1985).

Em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, a lectina apresenta duas bandas principais, similares àquelas de outras lectinas de *Vicieae*. Estas bandas foram denominadas de  $\beta$  (18 kDa) e  $\alpha$  (6 kDa) como empregado para lectinas de *Pisum*, *Lathyrus*, *Lens* e *Vicia* (ROUGÉ & CAVADA, 1984). Algumas bandas protéicas

minoritárias entre as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  sugerem a presença de fragmentos proteolíticos da cadeia  $\beta$  como já observados para a lectina de *P.sativum* (VAN DRIESSECHE *et al.*, 1982), bem como a presença de uma fração protéica de 28 kDa que corresponde ao precursor da lectina (LAUWEREYS *et al.*, 1983). A lectina apresentou uma massa molecular aparente nativa da ordem de 41 kDa quando submetida a cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12 HR 10/30 acoplada a um sistema de FPLC. O coeficiente de sedimentação de 4,3 S, que corresponde a uma massa molecular de 50 kDa, sugere uma forma dimérica para a lectina em pH 7,0, em concordância com a estrutura da lectina de *P.sativum*, que assume a forma de dímero  $(\alpha\beta)_2$  (EINSPAHR *et al.*, 1986). Os pesos moleculares das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  determinadas por ESI correspondem aqueles estimados por eletroforese em gel de acrilamida em presença de SDS. A diferença encontrada entre o valor de massa molecular determinada por FPLC e o valor encontrado pelos demais métodos, se deve provavelmente as limitações da técnica que determina a mobilidade da proteína na coluna refletindo assim apenas uma aproximação do valor real.

Segundo TROWBRIDGE (1974) a lectina de *P.sativum* apresenta menos que 0,5% de carboidratos enquanto ENTLICHER *et al.* (1970) encontrou um teor de 0,3%. Estes autores, por obterem estes conteúdos baixos de carboidratos, não consideram a lectina de *P.sativum* como sendo glicoproteína. A análise quantitativa de carboidratos (método fenol-sulfúrico) mostrou que a lectina de *P.arvense* não apresenta carboidratos em sua estrutura.

Entre os açúcares testados, foram a glicose e a manose os mais potentes em inibir a atividade hemaglutinante da lectina de *P.arvense* sendo que este último foi mais eficiente que a glicose, como já observado para a lectina de *P.sativum* (HOSSELET *et al.*, 1983; GATEHOUSE & BOULTER, 1980). Esta lectina aglutinou eritrócitos do sistema ABO de modo semelhante à lectina de *P.sativum* (HOSSELET *et al.*, 1983) e foi também capaz de



aglutinar eritrócitos nativos de boi, porco, galinha, cabra e coelho. Estes resultados sugerem que a lectina deve reconhecer nessas membranas eritrocitárias diferentes receptores glicídicos contendo seus monossacarídeos inibidores como manose ou glicose.

A lectina de *P.arvense* mostrou-se eficaz em estimular a proliferação de linfócitos humanos. Entretanto os valores observados nas doses de 50 e 100µg de lectina/ml foram menores do que aqueles apresentados pela Con Br na dose de 10 µg/ml. BARRAL-NETTO *et al.* (1992) observaram diferenças significativas entre a estimulação causada por lectinas de sementes de espécies da mesma tribo, e supõe que estas podem apresentar diferenças na especificidade fina por carboidratos. É possível que a estrutura tridimensional diferente das duas lectinas e portanto do sítio de ligação a carboidratos seja a razão para as diferenças encontradas entre estas lectinas de mesma especificidade.

O tratamento térmico da lectina de *P.arvense* a 70°C, por 10 minutos induziu a perda de 70 % de sua atividade hemaglutinante. A energia de ativação do processo de desnaturação (23,12 kcal/mol), pode ser comparada aquelas encontradas para as lectinas de *Phaseolus vulgaris* e de soja, 23,09 e 25,10 kcal/mol respectivamente (MOREIRA, 1975). Estas lectinas são sensíveis à desnaturação pelo calor. Após ensaio de hemaglutinação na presença de EDTA 0,1 M, a lectina de *P.arvense* não apresentou atividade hemaglutinante, sugerindo que esta proteína, assim como muitas lectinas vegetais ( LIS & SHARON, 1990; VASCONCELOS *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1991), necessita da presença de íons para manutenção da sua atividade biológica. Na lectina de *C.ensiformis* a presença de íons metálicos coordenados na molécula é essencial para a formação e estabilização estrutural do sítio de ligação a carboidratos (SHARON & LIS, 1989). Segundo ENTLICHER *et al.* (1970), a lectina de *P.sativum* também requer íons metálicos em sua estrutura para interagir com carboidratos.



A sequência N-terminal de aminoácidos das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da lectina de *P.arvense* é idêntica àquelas das cadeias  $\beta$  e  $\alpha$  da lectina de *P.sativum*, este fato evidencia um elevado grau de identidade em suas sequências primárias, fato comum entre as lectinas de leguminosas (CAVADA *et al.*, 1993).

A composição de aminoácidos da lectina de *P.arvense* é similar a composição de outras lectinas da tribo *Vicieae*, sendo particularmente rica em ácido aspártico e treonina e não apresentando resíduos de metionina e cisteína. Após a degradação proteolítica da lectina de *P.arvense* com tripsina, quimotripsina e elastase, a sequência de aminoácidos foi determinada a partir da superposição dos peptídios obtidos com a sequência de aminoácidos da lectina de *P.sativum*. Para alguns segmentos de aminoácidos da cadeia  $\beta$  não foram encontrados peptídios correspondentes. A cadeia  $\alpha$  da lectina de *P.arvense* é constituída de 53 aminoácidos. Toda a sequência de aminoácidos para a qual foram encontrados peptídios é idêntica à sequência de aminoácidos da lectina de *P.sativum*. A subunidade  $\beta$  apresentou uma massa molecular de  $19.986 \pm 1,8$  Da, correspondendo ao valor encontrado para a cadeia  $\beta$  da lectina de *P.sativum* dos resíduos 1 a 181. Para a subunidade  $\alpha$  foi encontrado o valor de  $5.592 \pm 0,3$  Da que equivalente a massa molecular dos resíduos 1 ao 53 da cadeia  $\alpha$  daquela lectina. Durante o processamento das lectinas de espécies pertencentes a Tribo *Vicieae*, a prolectina é clivada pela ação enzimática de uma após a tradução originando as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  endopeptidase (HIGGINS *et al.*, 1983<sup>a</sup>; HIGGINS *et al.*, 1983<sup>b</sup>). Durante esta clivagem, vários resíduos são removidos da região de ligação entre as duas cadeias. Segundo RICHARDSON *et al.* (1978) e HEMPERLY *et al.* (1979), o aminoácido C-terminal da cadeia  $\beta$  da lectina de *P.sativum* é Asn-187. O aminoácido C-terminal encontrado para a lectina de *P.arvense* foi Asn-181 em concordância com os resultados obtidos por EINSPAHR *et al.* (1986) para o resíduo C-terminal da cadeia  $\beta$  da lectina de *P.sativum*. Entretanto, o resíduo C-

terminal encontrado para a cadeia  $\alpha$  de *P.arvense* foi Lys-234 diferindo daquele encontrado para a lectina de *P.sativum* por RICHARDSON *et al.* (1978) e HEMPERLY *et al.* (1979) que foi Gln-234 e também daquele encontrado por EINSPAHR *et al.*, 1986, que foi Ser-239. A porção C-terminal das lectinas pertencentes a tribo *Vicieae* é bastante variável devido a possível remoção de vários resíduos de aminoácidos (EINSPAHR *et al.*, 1986).

Os coeficientes de extinção ( $E_{1\text{cm}, 1\%}$ ) encontrados para as lectinas de *P.arvense* e de *P.sativum* foram de 14,8 e 16,8 respectivamente. O valor encontrado para a lectina de *P.sativum* foi semelhante aquele encontrado por VAN DRIESSECHE *et al.* (1982). Como estas proteínas apresentaram estrutura primária semelhante sendo observado apenas a ausência de alguns aminoácidos em ambas as cadeias esperava-se que os coeficientes de extinção fossem iguais. Entretanto a composição de aminoácidos da porção C-terminal da lectina de *P.sativum* não apresentada pela lectina de *P.arvense* possui aminoácidos carregados negativamente em valores próximos a neutralidade podendo refletir em uma melhor solubilização da proteína. Por outro lado, a lectina de *P.sativum* utilizada para esta determinação foi obtida comercialmente, e sabendo-se que preparações protéicas diferentes podem exibir solubilidade diferenciada, este fato pode ter levado a uma concentração diferente da lectina em solução, diminuindo o  $E_{1\text{cm}, 1\%}$ .

A controvérsia se os taxa *P.sativum* e *P.arvense* constituem uma única espécie é antiga e ainda pertinente. Em relação a lectina podemos afirmar que apresentam proteínas semelhantes, restando entretanto, a resolução da estrutura de *P.arvense* por difração de raios X de seus cristais. A FIGURA 17 representa a estrutura tridimensional da lectina de *P.sativum*. Como a lectina de *P.sativum* e a lectina de *P.arvense* são idênticas a nível de sequência de aminoácidos, suas estruturas tridimensionais também o são.

Após a germinação das sementes de *P.arvense* no escuro, foi observado através de eletroforese em gel de poliacrilamida, que as proteínas de massas moleculares aparentes mais



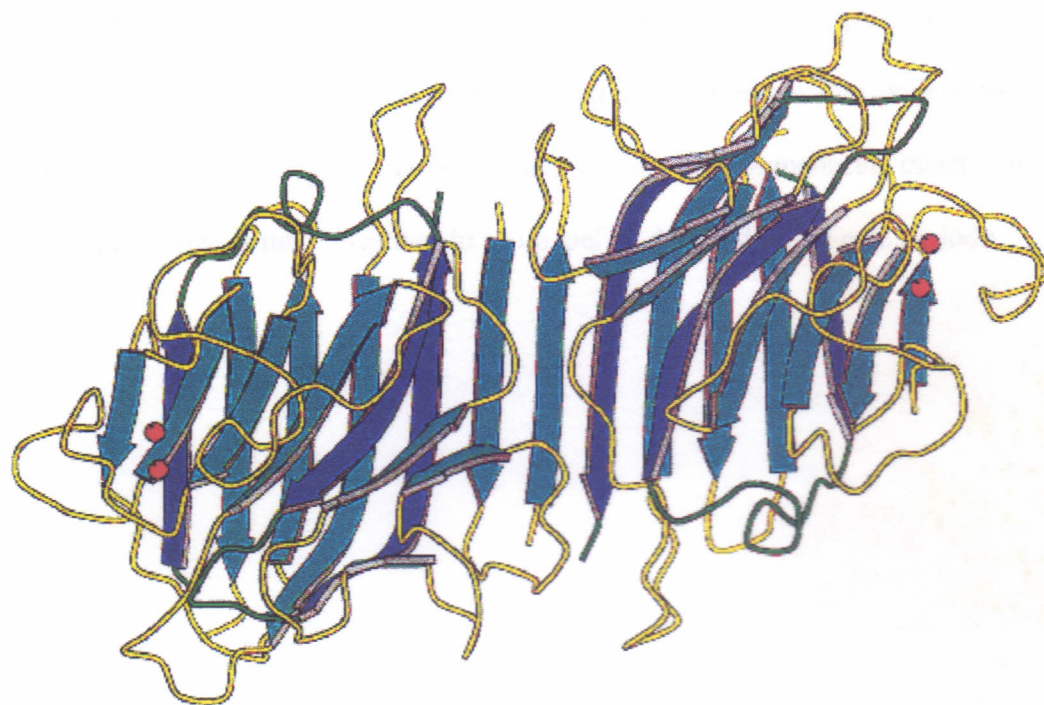


FIGURA 17 - Estrutura tridimensional da lectina de *P. sativum*.



elevadas eram mobilizadas ao longo da germinação, enquanto as bandas protéicas correspondentes à lectina persistiram durante todo o experimento que teve 22 dias de duração. A presença da lectina foi confirmada pela atividade hemaglutinante durante o mesmo período. A lectina parece então ser metabolizada mais lentamente que outras proteínas encontradas nos cotilédones. Segundo PEUMANS & VAN DAMME (1995), as plantas acumulam parte do nitrogênio na forma de proteínas que se ligam a carboidratos que podem ser usadas como proteínas de defesa passiva. Desta forma o fato de permanecer intacta até o final da germinação pode ser um indicativo do seu papel de defesa durante este período.

## 6 CONCLUSÕES

1. A lectina presente em sementes de *Pisum arvense* é do tipo glicose/manose e apresenta uma massa molecular de 50 kDa.
2. A lectina estrutura-se como um dímero  $(\alpha\beta)_2$ , sendo desta forma composta de duas cadeias polipeptídicas distintas denominadas  $\alpha$  e  $\beta$  que associadas por interações não covalentes constituem a subunidade estrutural da proteína. As massas moleculares para estas cadeias polipeptídicas foram determinadas como sendo 5.591 e 19.986 Da, respectivamente.
3. A lectina de *P.arvense* apresenta um  $\Delta G'$  de ativação do processo de desnaturação de 23 kcal/mol na temperatura de 70 °C, um coeficiente de extinção de 14,8, possui íons metálicos associados a sua estrutura e não apresenta carboidratos ligados covalentemente.
4. A lectina de *P.arvense* aglutinou eritrócitos humanos do sistema ABO, coelho e boi não tratados e tratados com enzimas proteolíticas. Aglutinou também hemácias nativas de cabra, porco e galinha bem como mostrou ser mitogênica para linfócitos humanos do sangue periférico.
5. A composição de aminoácidos da lectina de *P.arvense* foi similar a composição de aminoácidos de outras lectinas da tribo *Vicieae*, se mostrando particularmente rica em ácido aspártico + asparagina e treonina. A identidade de sequência de aminoácidos das lectinas de *P.arvense* e *P.sativum* é de 100 %.

6. De acordo com o estudo da germinação das sementes de *P.arvense* na ausência de luz, os resultados sugerem que a lectina não é uma proteína de reserva clássica e que pode ter uma outra função durante a germinação da planta.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASENSIO, J. L., CANADA, F. J., BRUIX, M., ROMERO, A. R., BARBERO, J. J. The interaction of hevein with N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. Solution structure of hevein complexed to chitobiose. **Eur. J. Biochem.**, v.230, p.621-633, 1995.
- BAETHGEN, W. E., ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant kjeldahl digests. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v.20, n.9, p.961-969, 1989.
- BANERJEE, R., MANDE, S. C., GANESH, V., DAS, K., DHANARAJ, V., MAHANTA, S. K., SUGUNA, K., SUROLIA, A., VIJAYAN, M. Crystal structure of peanut lectin, a protein with unusual quaternary structure. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.227-231, 1994.
- BARRAL-NETTO, M., SANTOS, S. B., BARRAL, M., MOREIRA, L. I. M., SANTOS, C. F., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunol. Invest.**, v.21, n.4, p.297-303, 1992.
- BAUMANN, C., RÜDIGER, H., STROSBERG, A. D. A comparison of the two lectins from *Vicia cracca*. **FEBS LETT.**, v.102, p.216-218, 1979.

- BAUMANN, C. M., STROSBERG, D., RÜDIGER, H. Purification and characterization of a manose/glucose-specific lectin from *Vicia cracca*. **Eur. J. Biochem.**, v.122, p.105-110, 1982.
- BÉTAIL, G., GUILLOT, J., COULET, M. Essai de séparation de l'hémagglutinine de *Pisum sativum* L. sur gel de dextran. **C. R. Soc. Biol.**, v.163, p.150-153, 1969.
- BOISSEAU, C., CAUSSE, H., MOISAND, A. PERE, D., CAVADA, B.S., ROUGÉ, P. Localization and biosynthesis of *Lathyrus ochrus* seed lectins. In: ARNAUD, P., BIENVENU, J., LAURENT, P. (Eds): **Marker proteins in inflammation**. Berlin: Walter de Gruyter, 1984. v.2, p.651-654.
- BOYD, W. C. The Lectins: their present status. **Vox Sang.**, v.8, p.1-32, 1963.
- BOHLHOOL, B. B., SCHMIDT, E. L. Lectins as a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. **Science**, v.185, p.269-271, 1992.
- BOURNE, Y., ABERGEL, C., CAMBILLAU, C., FREY, M., ROUGÉ, P., FONTECILLA-CAMPS, J. C. X-rays crystal structure determination and refinement at 1.9 Å resolution of isolectin I from the seeds of *Lathyrus ochrus*. **J. Mol. Biol.**, v.214, p.571-584, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

CARRINGTON, D. M., AUFFRET, A., HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, v.313, p.64-67, 1985.

CAVADA, B.S. **Lectinas de *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolamento, caracterização parcial e comportamento durante a germinação.** Fortaleza, 1980. Dissertação (Mestrado) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, 87 p.

CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., GANGEIRO, T. B. Primary structures and functions of plant lectins. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.5, n.2, p.193-201, 1993.

CAVADA, B. S., ROUGÉ, P. Partial characterization of two isolectins isolated from *Lathyrus cicera*. **Arq. Biol. Tecnol.** v.28, n.3, 1985.

CHRISPEELS, M. J., HARTL, P. M., FAYE, L. Characterization of the endoplasmic reticulou-associated precursor of Concanavalin A. **J. Biol. Chem.**, v.261, n.22, p.10021-10024, 1986.

CHRISPEELS, M. J., RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**, v.3, p.1-9, 1991.

CLAUSEN, J. Immunochemical techniques for the identification of macromolecules. In: WORK, T. S., WORK, E. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology.** Amsterdam: North-Holland, 1969. v. 1.



- CUNNINGHAM, B. A., LANG, J. L., PFLUMM, M. N. et al., Isolation and proteolytic cleavage of the intact subunit of Concanavalin A. **Biochemistry**, v.11, p.3233-3239, 1972.
- DAWES, E. A. **Quantitative problems in biochemistry**. 5 ed. Baltimore: Wiliams and Wilkins, 1972. 470 p.
- DAZZO, F. B., HUBBELL, D. H. Control of root hair infection. In: BROUGHTON, W. J. (Ed.) **Nitrogen fixation**, 1982, v.2, p.274-310, 1982.
- DELBAERE, L. T. J., VANDONSELAAR, M., PRASAD, L., QUAIL, J. W., WILSON, K. S., DALTER, Z. Structures of lectin IV of *Griffonia simplicifolia* and its complex with Lewis B human blood group determinants at 2 Å resolution. **J. Mol. Biol.** v.230, p.950-965, 1993.
- DESSEN, A., GUPTA, V. D., SABESAN, S., BREWER, C. F., SACCHETTINI, J. C. Structure of the soybean agglutinin crosslinked with a biantenary analogous of the blood group I carbohydrate antigen. **Biochemistry**, v.34, p.4933-4942, 1995.
- DIAZ, C. L., MELCHERS, L. S., HOOYKAAS, P. J. J., LUGTEMBERG, B. J. J., KIJNE, J. W. Root lectin as determinante of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Nature**, v.338, p.579-581, 1989.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K. et al., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, n.3. p.350-356, 1956.

EDELMAN, G. M., CUNNINGHAM, B. A., REEKE, G. N., BECKER, J. W., WAXDAL, M. J., WANG, J. L. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.69, n.9, p.2580-2584, 1972.

EINSPAHR, H., PARKS, E. H., SUGUNA, K. SUBRMANIAN, E., SUDDATH, F. L. The crystal structure of pea lectin at 3.0 Å resolution. **J. Biol. Chem.** v.261, n.35, p.16518-16527, 1986.

ELBEIN, A. D. Glycoprotein processing and glycoprotein processing inhibitors, **Plant Physiol.**, v.87, p.291-295, 1988.

ENTLICHER, G., KOSTÍR, J. V., KOCOUREK, J. Studies on phytohemagglutinins III. Isolation and characterization of hemagglutinins from the pea (*Pisum sativum* L.). **Biochim. Biophys. Acta**, v.221, p.272-281, 1970.

ENTLICHER, G., TICHÁ, M., KOSTÍR, J. V., KOCOUREK, J. Studies on phytohemagglutinins II. Phytohemagglutinins of *Pisum sativum* L. and *Lens esculenta* Moench: Specific Interactions with carbohydrates. **Experientia** v.25, p.17-19, 1969.

FAYE, L., JOHNSON, K. D., STURM, A. *et al.* Structure, biosynthesis, and function of asparagine-linked glycans of plant glycoproteins. **Physiol. Plant.**, v.75, p.309-314, 1989.

FORIERS, A., LEBRUN, E., VAN RAPENBUSCH, R. DE NEVE, R., STROSBERG, A. D.

The structure of the lentil (*Lens culinaris*) lectin. Amino acid sequence determination and prediction of the secondary structure. **J. Biol. Chem.**, v.256, n.11, p.5550-5560, 1981.

FUHRMANN, U., BAUSE, E., PLOEGH, H. Inhibitors of oligosaccharide processing.

**Biochim. Biophys. Acta** v.825, p.95-110, 1985.

GATEHOUSE, J. A., BOULTER, D. Isolation and properties of a lectin from the roots of

*Pisum sativum* (Garden pea) **Physiol. Plant.**, v.49, p.37-442, 1980.

GATEHOUSE, J. A., BOWN, D., EVANS, I. M., GATEHOUSE, L. N., JOBES, D.,

PRESTON, P., CROY, R. R. Sequence of the seed lectin gene from pea (*Pisum sativum* L.)

**Nucl. Acids Res.**, v.15, n.18, p.7642, 1987.

GRANGEIRO, T. B. **Clonagem, sequenciamento e expressão do gen da lectina (Con Br)**

**de sementes de *Canavalia brasiliensis***. Fortaleza, 1996. Tese (Doutorado) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 133 p.

HARDMANN, K. D., AINSWORTH, C. F. Structure of Concanavalin A at 2,4 Å resolution.

**Biochemistry**, v.11, n.26, p.4910-4919, 1972.

HEMPERLY, J. J., MOSTOV, K. E., CUNNINGHAM, B. A. *In vitro* translation and

processing of a precursor form of favin, a lectin from *Vicia faba*. **J. Biol. Chem.** v.257, n.13, p.7903-7909, 1982.



HERMAN, E. M., SHANNON, L. M., CHRISPEELS, M. J. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. **Planta**, v.165, p.23-29, 1985.

HIGGINS, T. J. V., CHRISPEELS, M. J., CHANDLER, P. M., SPENCER, D. Intracellular sites of synthesis and processing of lectin in developing pea cotyledons. **J. Biol. Chem.**, v.258, n.15, p.95559-95552, 1983<sup>a</sup>.

HIGGINS, T. J. V., CHANDLER, P. M., ZURAWSKI, G., BUTTON, S. C., SPENCER, D. The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin. **J. Biol. Chem.**, v.258, n.15, p.9544-9549, 1983<sup>b</sup>.

HO, S. C., KIJNE, J. W. Lectins in *Rhizobium*-legume symbiosis. In: KILPATICK, D. C., VAN DRIESSE, E., BOG-HANSEN, T. C. (Eds.) **Lectins Reviews**, Sigma Company, 1991. 281 p., p. 171-182.

HOSSELET, M., VAN DRIESSE, E., VAN POUCKE, M., KANAREK, L. Purification and characterization of an endogenous root lectin from *Pisum sativum* L. In BOG-HANSEN, T.C. Eds. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1983, v.3: p.549-558.

HOSSELET, M., VAN DRIESSE, E., VAN POUCKE, M., KANAREK, L. The occurrence of lectin during the life-cycle of *Pisum sativum* L. In: BOG-HANSEN, T.C. (Eds.) In BOG-HANSEN, T.C. Eds. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1985, v.4: p.583-590.

HOEDEMAEKER, F. J., EIJSDEN, R. R., DÍAZ, C. L., PATER, B. S., KIJNE, J. W.

Destabilization of pea lectin by substitution of a single amino acid in a surface loop. **Plant Mol. Biol.**, v.22, p.1039-1046, 1993.

HOEDEMAEKER, F. J., RICHARDSON, M., DÍAZ, C. L. *et al.* Pea (*Pisum sativum* L.) seed

isoelectins 1 and 2 and pea root lectin result from carboxypeptidase-like processing of a single gene product. **Plant Mol. Biol.**, v.24, p.75-81, 1994.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechniques**. New York: McGraw Hill, 1940. 523 p.

KOLBERG, J. Isolation and partial characterization of a mitogenic lectin from *Lathyrus*

*odoratus* seeds. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v.86, p.99-104, 1978.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t<sub>4</sub>.

**Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAUWEREYS, M., VAN DRIESCHE, E., STROSBERG, A., DEJAEGERE, R.,

KANAREK, L. The  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of pea lectin are result of a post translational cleavage of a precursor chain. In: BOG-HANSEN, T.C. (Eds.) **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1983, v.3: p.603-610.

LIENER, I. E. Soyin, a toxic protein from the soybean. **J. Nutr.**, v.49, p.527-539, 1953.

LIEW, Y. W., BIRD, G. W. G. *Vicia hyrcanica* seeds contain separable anti-T and anti-Tk lectins. In: BOG-HANSEN, T.C. (Eds.) **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1988, v.6: p.317-320.

LORIS, R., STAS, P. P. G., WYNE, L. Conserved waters in legume lectin crystal structures. The importance of bound water for the sequence-structure relationship within the legume lectin family. **J. Biol. Chem.** v.269, p.26722-26733, 1994.

MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of *Leguminosae* seeds. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.** v.35, n.11, p.1-156, 1957.

MANDAL, D. K., NIEVES, E., BHATTACHARYYA, L. et al. Purification and characterization of three isoelectins of soybean agglutinin. Evidence for C-terminal truncation by electrospray ionization mass spectrometry. **Eur. J. Biochem.** v.221, p.547-553, 1994.

MANSFIELD, M. A., PEUMANS, W. J., RAIKEL, N. V. Wheat-germ agglutinin is synthesized as a glycosylated precursor. **Planta** v.173, p.482-489, 1988.

MOREIRA, R. A. **Isolamento e caracterização de uma lectina de *Phaseolus vulgaris***. Tese (Doutorado) Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1975. 111 p.

MOREIRA, R. A., AINOUS, I. L., OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.86, n.2, p.211-218, 1991.



- MOREIRA, R. A., CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biol. Plant.**, v.26, n.2, p.113-120, 1984.
- NIKRAD, P. V., PEARLSTONE, J. R. CARPENTER, M. R. *et al.* Molecular mass heterogeneity of *Griffonia simplicifolia* lectin IV subunits. **Biochem. J.** v.272, p.343-350, 1990.
- PEUMANS, W. J., STINISSEN, H. M. *Gramineae* lectins: occurrence, molecular biology and physiological function. In: GOLDSTEIN, J. I., ETZLER, M. E. (Eds.) **Chemical Taxonomy, Molecular Biology and Function of Lectins**, p.99-116, 1983.
- PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v.109, p.347-352, 1995.
- PISULEWSKI, P., PISULEWSKA, E., HANCZAKOWSKI, P., ERNEST, T. The chemical composition and nutritive value of pea (*Pisum sativum* L.) and field pea (*Pisum arvense* L.) seeds. **Rocz. Nauk. Zootech.** v.10, n.2, p.111-116, 1983.
- PRIGENT, M. J., BOURRILLON, R. Purification and characterization of *Vicia graminea* lectin. Interaction of labeled lectin with native and enzyme-modified human M and N erythrocytes. In: BOG-HANSEN, T.C. (Eds.) **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1981, v.1: p.101-109.
- PUSZTAI, A. **Plant Lectins**. Cambridge: Cambridge University Press. 1991. 263 p.

- REEKE Jr., G. N., BECKER, J. W., EDELMAN, G. M. The covalent and three dimensional structure of fawn: saccharide binding-cyclic permutation in leguminous lectins. **Science**, v.234, p.1108-1111, 1986.
- RICHARDSON, M., YARWOOD, A., ROUGÉ, P. The amino acid sequence of an atypical single-chain lectin from seeds of *Lathyrus sphaericus* (Retz). **FEBS Letters**, v.216, n.1, p.145-150, 1987.
- ROUGÉ, P. Etude de la phytohémagglutinine des graines de Lentille au cours de la germination et des premiers stades du développement de la plante. Evolution dans les cotylédons. **Physiologie Végétale C. R. Acad. Sc. Paris**, v.278, 1974.
- ROUGÉ, P. Phylogenetic implications of the physicochemical and biological comparison of eight *Lathyrus* lectins. **Biochem. System. and Ecol.**, v.12, n.1, p.47-51, 1984.
- ROUGÉ, P., CAMBILLAU, C., BOURNE, Y. The three dimensional structure of legume lectins. In: KILPATRICK, D. C., VAN DRIESSE, E., BOG-HANSEN, T. C. (Eds.) **Lectins Reviews**, 1991, Sigma Chemical, v.1, p.143-160
- ROUGÉ, P., CAVADA, B. S. Isolation and partial characterization of two isolectins from *Lathyrus ochrus* (L.) DC. seeds. **Plant Sci. Lett.**, v.37, p.21-27, 1984.
- ROUGÉ, P., LASCOMBES, S. Isolement et purification de la phytohémagglutinine des graines de Fève (*Vicia faba* L.) par chromatographie d'affinité sur gel de dextran. **Science**, 1973.

- ROUGÉ, P., RICHARDSON, M., RANFAING, P., YARWOOD, A., CAVADA, B. S.  
Single- and two-chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. **Biochem. System. Ecol.**, v.15, n.3, p.341-348, 1987.
- ROUGÉ, P., PÈRE, D. Occurrence of lectin during the life cycle of *Lathyrus* species. In:  
BOG-HANSEN, T.C. (Eds.) **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**,  
1981, v.2: p.137-150, 1982.
- RÜDIGER, H., Purification and properties of blood group specific lectins from *Vicia cracca*.  
**Eur. J. Biochem.**, v.72, p.317-322, 1977.
- RÜDIGER, H. Structure and function of plant lectins. In GABIUS, H. J., GABIUS, S. (Eds.)  
**GLycosciences. Status and perspectives**, 1997. p. 415-438
- RUTEMBER, E., ROBERTUS, J. D. Structure of ricin  $\beta$ -chain at 2,5 Å resolution. **Proteins: Stuct., Func. Genet.**, v.10, p.260-269, 1991.
- SANZ-APARICIO, J., HERMOSO J., GRANGEIRO, T. B., CALVETE, J.J., CAVADA, B. S.  
S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties comparing with Con A. **FEBS Lett.**, v.405, n.1, p.114-118, 1997.



SÃO PAULO, Instituto Adolfo Lutz. **Método químicos e físicos para análise de alimentos.**

São Paulo, 1985. v.1, 530 p.

SEEGERS, R., LARUE, T. A. Legume agglutinins that bind to *Rhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, p.784-789, 1985.

SHARON, N., LIS, H. **Lectins**. London: Chapman and Hall, 1989. 126p.

SHARON, N., LIS, H. Legume lectins- a large family of homologous proteins. **FASEB J.**, v.4, p.3198-3208, 1990.

SHELDON, P. S., BOWLES, D. J. The glycoprotein precursor of concanavalin A is converted to an active lectin by deglycosylation. **EMBO J.**, v.11, p.1297-1301, 1992.

TICHÁ, M., ENTLICHER, G., KOSTÍR, J. V., KOCOUREK, J. Studies on phytohemagglutinins IV. Isolation and characterization of a hemagglutinin from the lentil, *Lens esculenta*, Moench. **Biochim. Biophys. Acta**, v.221, p.282-289, 1970.

TOLLEFSEN, S. E., KORNFIELD, R. Isolation and characterization of lectins from *Vicia villosa*. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p.5165-5171, 1983.

TROWBRIDGE, I. S. Isolation and Chemical Characterization of a Mitogenic Lectin from *Pisum sativum*. **J. Biol. Chem.**, v.249, n.18, p.6004-6012, USA, 1974.

- URBANKE, C., ZIEGLER, B., STIEGLITZ, K. Complete evaluation of sedimentation velocity experiments in the analytical ultracentrifuge. **Frezenius Z. Anal. Chem.** v.301, p.139-140, 1980.
- VAN DRIESSCHE, E., BEECKMANS, S., DEJAEGERE, R., KANAREK, L. Isolation of the pea lectin precursor and characterization of its processing products. In: BOG-HANSEN, T.C. (Eds.) **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1988, v.6: p.355-362, 1982.
- VAN DRIESSCHE, E., SMETS, G., DEJAEGERE, R., KANAREK, L. The isolation, further characterization and localization of pea seed lectin (*Pisum sativum* L.). In: BOG-HANSEN, T.C. (Eds.) **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1981, v.2: p.729-741, 1982.
- VAN EIJSSEN, R. R., HOEDEMAEKER, F. J., DÍAZ, C. L. *et al.* Mutational analysis of pea lectin. Substitution of Asn125 for Asp in the monosaccharide binding site eliminates mannose/glucose-binding activity. **Mol. Biol.**, v.20, p.1049-1058, 1992.
- VASCONCELOS, I. M., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **J. Food Biochem.**, v.15, p.137-154, 1991.
- VODKIN, L. O., RHODES, P., GOLDBERG, R. B. A lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. **Cell**, v.34, p.1023-1031, 1983.

YOUNG, N. M., WATSON, D. C., YAGUCHI, M. ADAR, R., ARANGO, R., RODRIGUEZ-ARANGO, R., SHARON, N., BLAY, P. K. S., THIBAUT, P. C-terminal post translational proteolysis of plant lectins and their recombinant forms expressed in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** v.270, n.6, p.2563-2579, 1995.