

**LECTINA DE COTILÉDONES DE *Luetzelburgia auriculata* DUCKE E  
SEU POSSÍVEL PAPEL NA DEFESA DA PLANTA**

**VÂNIA MARIA MACIEL MELO**

**FORTALEZA-CEARÁ**

**2001**

**LECTINA DE COTILÉDONES DE *Luetzelburgia auriculata* DUCKE E  
SEU POSSÍVEL PAPEL NA DEFESA DA PLANTA**

**VÂNIA MARIA MACIEL MELO**

**TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM BIOQUÍMICA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FORTALEZA-CEARÁ**

**2001**

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 de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

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

---

VÂNIA MARIA MACIEL MELO

Tese aprovada em:

---

Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira  
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará  
**Orientador**

---

Dra. Leila Maria Beltramini  
Instituto de Física de São Carlos  
Universidade de São Paulo  
**Examinadora**

---

Dra. Valdirene Moreira Gomes  
Centro de Biologia e Biotecnologia  
Universidade Estadual do Norte Fluminense  
**Examinadora**

---

Dr. Joaquim Albenísio Gomes Silveira  
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará  
**Examinador**

---

Dra. Ilka Maria Vasconcelos  
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará  
**Examinadora**

*À minha família,*

*Erivan, Jorge, Manuela, Marcela e Erivan Júnior,*

*Dedico com carinho*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, pela orientação criteriosa, por todos os ensinamentos de conduta científica e pela valiosa amizade.

À Dra. Ilka Maria Vasconcelos, pelas sugestões, críticas, ajuda na realização de experimentos e formatação da tese e, o mais importante, pela nossa amizade.

À Dra. Valdirene Moreira Gomes, da UENF, pela valiosa ajuda na realização de vários experimentos, pelas sugestões e críticas e, sobretudo, pelo carinho e amizade.

À Dra. Leila Maria Beltramini, do Instituto de Física da USP-SC, pela análise da estrutura secundária da lectina e pelas críticas e sugestões ao trabalho.

À Dra. Olga Lima Tavares Machado, da UENF, pela realização da seqüência N-terminal da lectina, pelo carinho e amizade.

À Dra. Maura Cunha, da UENF, pela realização da microscopia eletrônica e pelo carinho e amizade.

Ao Dr. Arnaldo R. Façanha, da UENF, pela contribuição no estudo da função endógena da lectina, pela atenção e carinho.

Ao Dr. José Xavier Filho, Chefe do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos da UENF, pela amizade e ensinamentos.

Ao Dr. Lev Okorocok, Chefe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos da UENF, pela colaboração e gentileza com que me recebeu em seu laboratório.

À Dra. Arlete Soares, do Depto. de Biologia da UFC, pela ajuda na microscopia e por sua amizade.

À Profª. Aparecida Oliveira Alves, do Depto. de Biologia da UFC, pela ajuda na realização do cariótipo da planta e por sua amizade.

Ao Prof. Edson Paula Nunes, responsável pelo Herbário Prisco Bezerra da UFC, pelos esclarecimentos sobre a classificação e identificação da planta.

À doutoranda Ana Cristina de Oliveira Monteiro, pela ajuda na realização da composição de aminoácidos.

Ao Prof. João Luiz Pinheiro Bastos, do Depto. de Biologia da UFC, pela ajuda com a botânica, pelo carinho e amizade.

Ao Dr. Joaquim Albenísio G. Silveira, pelas críticas, sugestões e atenção dispensada.

Às minhas queridas amigas e companheiras de trabalho, Profas. Ana de Fátima F. U. Carvalho e Suzana Cláudia S. Martins, pelo estímulo constante, carinho e convivência prazerosa.

À bibliotecária Mônica B. Aquino, pela ajuda com as referências bibliográficas e pela nossa velha amizade.

Aos colegas Cláudio e Paulo, pela ajuda na análise estatística e pelo companheirismo.

A todos os companheiros dos Laboratórios de Proteínas de Defesa de Plantas e Proteínas Tóxicas, pela ajuda diária, carinho e amizade. Um justo destaque para os amigos Cléberson, pela ajuda com as atividades enzimáticas, Silvano, pela cooperação em vários

experimentos, Fernanda e Daniele pela ajuda no ensaio de Kjeldahl e Gina Gláucia pelo carinho e ajuda no laboratório.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, em especial ao Fábio, pela amizade e ajuda na preparação da apresentação deste trabalho.

Às funcionárias, Maria Nogueira e Rivalda, pela amizade e ajuda na rotina do laboratório.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Departamento de Biologia da UFC, pelo excelente ambiente de trabalho e cooperação.

Aos meus pais, Geraldo e Araci, à minha sogra Wanda, a meus irmãos, sobrinhos e cunhados, pela torcida e carinho constantes.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para execução deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do Estado do Ceará (FUNCAP).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ce.

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

Laboratório de Química e Função de Peptídeos e Proteínas da Universidade do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

Laboratório de Física e Espectroscopia do Departamento de Física e Informática do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, SP.

Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ce.



## SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xv
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xix
<u>ABREVIATURAS</u>	xx
<u>RESUMO</u>	xxi
<u>ABSTRACT</u>	xxiii
<b>CAPÍTULO I</b>	1
<b>1– INTRODUÇÃO</b>	2
1.1 – <u>Lectinas Vegetais: Definições</u>	2
1.2 – <u>Especificidade por Açúcar</u>	3
1.3 – <u>Estrutura Molecular</u>	4
1.4 – <u>Biossíntese de Lectinas</u>	10
1.5 – <u>Estratégia de Purificação de Hololectinas</u>	11
1.6 – <u><i>Luetzelburgia auriculata</i> Ducke: Descrição Botânica</u>	13
<b>2 – OBJETIVOS</b>	15
<b>3 – MATERIAIS</b>	16
3.1 – <u>Material Vegetal</u>	16
3.2 – <u>Coelhos</u>	16
3.3 – <u>Reagentes e Outros Materiais</u>	16
<b>4 – MÉTODOS</b>	18
4.1 – <u>Purificação da Lectina de <i>L. auriculata</i></u>	18
4.1.1 – <u>Preparação da Farinha</u>	18

4.1.2 – Extração de Proteínas	18
4.1.3 – Fracionamento de Proteínas com Sulfato de Amônio	19
4.1.4 – Atividade Hemaglutinante	19
4.1.5 – Cromatografia de Afinidade	20
4.1.6 – Cromatografia de Troca Iônica	20
4.2 – <u>Caracterização Físico-Química e Estrutural da Lectina de <i>L. auriculata</i></u>	21
4.2.1 – Estimativa da Massa Molecular por PAGE-SDS	21
4.2.2 – Extração das Subunidades da Lectina do Gel de Eletroforese	21
4.2.3 – Determinação da Massa Molecular por Filtração em Gel	22
4.2.4 – Composição de Aminoácidos	23
4.2.5 – Determinação de Carboidratos	23
4.2.6 – Especificidade da Lectina	24
4.2.7 – Determinação do Ponto Isoelétrico	24
4.2.8 – Determinação da Sequência de Aminoácidos N-terminal	25
4.2.9 – Estabilidade Térmica	25
4.2.10 – Influência do pH na Estrutura Quaternária	26
4.2.11 – Espectro de Absorção	26
4.2.12 – Espectro de Fluorescência	27
4.2.13 – Estrutura Secundária Estimada por Dicroísmo Circular	27
4.3 – <u>Determinação de Número de Cromossomos de <i>L. auriculata</i></u>	27
4.4 – <u>Preparação de Anticorpos</u>	28
4.5 – <u>Dot Blot</u>	29
4.6 – <u>Western Blot</u>	29
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>

6 – CONCLUSÕES	53
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
<b>CAPÍTULO II</b>	69
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	70
1.1 – <u>Função das Lectinas: Considerações Gerais</u>	70
1.1.1– Funções Intrínsecas	71
1.1.2 – Funções Extrínsecas	73
1.2 – <u>Interação de Lectinas com Fungos Fitopatogênicos</u>	75
1.3 – <u>Considerações sobre Fungos Fitopatogênicos</u>	78
<b>2 – OBJETIVOS</b>	82
<b>3 – MATERIAIS</b>	83
3.1 – <u>Fungos</u>	83
3.2 – <u>Coelhos</u>	84
3.3 – <u>Reagentes Diversos</u>	84
3.4 – <u>Material para Microscopia</u>	84
<b>4 – MÉTODOS</b>	85
4.1– <u>Ensaio de Exsudação</u>	85
4.2 – <u>Cromatografia de Afinidade</u>	86
4.3 – <u>Localização da Lectina na Semente</u>	86
4.3.1 – <i>Tissue Print</i>	86
4.3.2 – Imunolocalização	87
4.3.2.1 – Conjugação do Anticorpo com FITC	87
4.3.2.2 – Preparação de Lâminas	88
4.3.2.3 – Ensaio de Imunofluorescência	88

4.4 – <u>Atividade Enzimática</u>	89
4.4.1 – Atividade Peroxidásica	89
4.4.2 – Atividade $\beta$ -1,3-glucanásica	89
4.4.3 – Atividade Quitinásica	90
4.5 – <u>Atividade Antifúngica</u>	91
4.5.1 – Manutenção das Culturas	91
4.5.2 – Ensaio de Difusão com Discos	91
4.5.3 – Ensaio de Inibição em Meio Líquido	92
4.5.3.1 – Extração de Esporos de Fungos Filamentosos	92
4.5.3.2 – Preparação de Células de Levedura	92
4.5.3.3 – Ensaio de Inibição	93
4.6 – <u>Extração de Lectina Associada à Levedura</u>	93
4.7 – <u>Efeito da Lectina na Acidificação do Meio</u>	94
4.8 – <u>Microscopia de Fluorescência</u>	95
4.8.1 – Preparação de Lâminas	95
4.8.2 – Preparação da Amostra	95
4.8.3 – Ensaio de Imunofluorescência	96
4.9 – <u>Microscopia Eletrônica de Transmissão</u>	96
4.9.1 – Preparação da Amostra	96
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	98
<b>6 – CONCLUSÕES</b>	116
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	117
<b>8 – APÊNDICE</b>	127
<b>CAPÍTULO III</b>	130

<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	131
1.1 – <u>Considerações Gerais</u>	131
1.2 – <u>Interação Planta-Patógeno</u>	132
1.3 – <u>Mecanismos de Defesa de Plantas</u>	132
1.4 – <u>Elicidores de Resposta de Defesa de Plantas</u>	134
<b>2 – OBJETIVOS</b>	137
<b>3– MATERIAIS</b>	138
3.1 – <u>Sementes</u>	138
3.2 – <u>Fungo</u>	138
3.3 – <u>Hemácias</u>	138
3.4 – <u>Reagentes</u>	138
<b>4 – MÉTODOS</b>	139
4.1 – <u>Germinação de Sementes</u>	139
4.2 – <u>Tratamento com Elicidores</u>	139
4.3 – <u>Determinação de Proteína Bruta</u>	140
4.4 – <u>Preparação de Extrato Bruto</u>	140
4.5 – <u>Determinação de Proteínas Solúveis</u>	141
4.6 – <u>Atividade Hemaglutinante</u>	141
4.7 – <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida</u>	141
4.8 – <u>Western Blot</u>	142
4.9 – <u>Quantificação de Lectina por ELISA</u>	142
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	144
<b>6 – CONCLUSÕES</b>	159
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	160

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

	Página
1 – Cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-N-acetilgalactosamina da F <sub>40-60%</sub> de <i>L. auriculata</i> .	33
2 – Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100 da lectina de <i>Luetzelburgia auriculata</i> .	37
3 – Célula de ponta de raiz de <i>Luetzelburgia auriculata</i> em metáfase revelando o número de cromossomos da espécie 2n=26.	39
4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS da lectina de <i>Luetzelburgia auriculata</i> (LAL).	40
5 – <i>Western blot</i> das lectinas de <i>Luetzelburgia auriculata</i> (LAL) e <i>Vatairea macrocarpa</i> (VML), revelado com o anticorpo anti-LAL.	43
6 – Oligomerização dependente de pH da lectina de <i>Luetzelburgia auriculata</i> determinada por filtração em coluna de Superdex 200 HR 10/30.	45
7 – Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-celulose da lectina de <i>L. auriculata</i> .	47
8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da lectina de <i>L. auriculata</i> corada com ácido periódico de Schiff.	48
9 – Espectros de absorção da lectina de <i>Luetzelburgia auriculata</i> na ausência (LAL) e presença de galactose (LAL + Gal 100 mM).	50
10 – Espectro de dicroísmo circular da lectina de <i>L. auriculata</i> dissolvida em água (0,085 mg/ml).	51

- 11 – Espectro de emissão de fluorescência da lectina de *L. auriculata* nativa dissolvida em água (0,085 mg/ml). 52

## CAPÍTULO II

	Página
1 – Cromatografia de afinidade em coluna de Goma de Guar do material exsudado de sementes de <i>L. auriculata</i> .	99
2 – <i>Western blot</i> da lectina e do exsudado de cotilédones de <i>L. auriculata</i> .	101
3 – <i>Tissue print</i> do cotilédone de <i>L. auriculata</i> mostrando a localização da lectina na região da epiderme.	102
4 – Imunofluorescência direta em corte transversal de cotilédones de <i>L. auriculata</i> mostrando a localização da lectina na região epidérmica.	103
5 – Curva de crescimento do fungo <i>Colletothricum lindemuthianum</i> na presença da lectina de <i>L. auriculata</i> .	105
6 – Curva de crescimento do fungo <i>Fusarium solani</i> na presença da lectina de <i>L. auriculata</i> .	106
7 – Curva de crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> na presença da lectina de <i>L. auriculata</i> .	107
8 – Curva de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na presença da lectina de <i>L. auriculata</i> .	111

9 –	<i>Western blot</i> mostrando a lectina extraída após interação com levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	112
10 –	Imunofluorescência em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivadas em meio contendo a lectina de <i>L. auriculata</i> .	113
11 –	Eletromicrografias de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivadas em meio contendo a lectina de <i>L. auriculata</i> (A) e em meio sem lectina (B).	114

### CAPÍTULO III

		Página
1 –	Proteína total (% N x 6,25) de tecidos de <i>L. auriculata</i> provenientes de plantas após 96 h de tratamento com ácido salicílico 5 mM e com esporos do fungo <i>Fusarium solani</i> (10 <sup>6</sup> /ml), expressa em grama por 100 g de farinha de tecido.	145
2 –	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e $\beta$ -mercaptoetanol de extratos de hipocótilos, cotilédones e de raízes de <i>L. auriculata</i> provenientes de plantas controle e de plantas tratadas com ácido salicílico e com o fungo <i>F. solani</i> .	147
3 –	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e $\beta$ -mercaptoetanol de extratos de epicótilos e de folhas de <i>L. auriculata</i> provenientes de plantas controle e de plantas tratadas com ácido salicílico e com o fungo <i>F. solani</i> .	148
4 –	<i>Western blot</i> de extratos de hipocótilos, cotilédones e raízes de <i>L. auriculata</i> obtidos de plantas controles e tratadas com ácido salicílico e com o fungo <i>F. solani</i> .	149



5 –	<i>Western blot</i> de extratos de epicótilos e folhas de <i>L. auriculata</i> obtidos de plantas controles e tratadas com ácido salicílico e com o fungo <i>F. solani</i> .	150
6 –	Teores de proteína solúvel e de lectina de raízes obtidas a partir de plantas de <i>L. auriculata</i> tratadas com salina (controle), ácido salicílico 5 mM e com o fungo <i>Fusarium solani</i> ( $10^6$ esporos/ml), expressos em mg por grama de tecido seco (mg/gT).	153
7 –	Teores de proteína solúvel e de lectina de hipocótilos obtidos a partir de plantas de <i>L. auriculata</i> tratadas com salina (controle), ácido salicílico 5 mM e com o fungo <i>Fusarium solani</i> ( $10^6$ esporos/ml), expressos em mg por grama de tecido seco (mg/gT).	154
8 –	Teores de proteína solúvel e de lectina de cotilédones germinantes obtidos a partir de plantas de <i>L. auriculata</i> tratadas com salina (controle), ácido salicílico 5 mM e com o fungo <i>Fusarium solani</i> ( $10^6$ esporos/ml), expressos em mg por grama de tecido seco (mg/gT).	156
9 –	Teores de proteína solúvel e de lectina de epicótilos obtidos a partir de plantas de <i>L. auriculata</i> tratadas com salina (controle), ácido salicílico 5 mM e com o fungo <i>Fusarium solani</i> ( $10^6$ esporos/ml), expressos em mg por grama de tecido seco (mg/gT).	157
10 –	Teores de proteína solúvel e de lectina de folhas obtidas a partir de plantas de <i>L. auriculata</i> tratadas com salina (controle), ácido salicílico 5 mM e com o fungo <i>Fusarium solani</i> ( $10^6$ esporos/ml), expressos em mg por grama de tecido seco (mg/gT).	158

## LISTA DE TABELAS

	Página
1 – Purificação da Lectina de Cotilédones de <i>Luetzelburgia auriculata</i> .	32
2 – Atividade hemaglutinante da lectina cotiledonária de <i>L. auriculata</i> e inibição da hemaglutinação por mono, di- e trissacarídeos.	35
3 – Propriedades físico-químicas e moleculares da lectina cotiledonária de <i>L. auriculata</i> .	38
4 – Comparação da sequência de aminoácidos N-terminal da banda de 15 kDa da lectina de <i>Luetzelburgia auriculata</i> (LAL) com seqüências polipeptídicas internas de lectinas de sementes de <i>Vatairea macrocarpa</i> (Vm), <i>Maackia amurensis</i> (Maa), <i>Ulex europaeus</i> (Uea), <i>Griffonia simplicifolia</i> (GS-IV), <i>Robinia pseudoacacia</i> (Rp), <i>Sophora japonica</i> (Sj) e <i>Erythrina variegada</i> (Ev).	42

## ABREVIATURAS

BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato
BPA	Lectina de <i>Bauhinia purpurea</i>
ConA	Lectina de <i>canavalia ensiformis</i>
ConBr	Lectina de <i>C. brasiliensis</i>
DMAB	Ácido $\rho$ -aminobenzaldeído
Ev	<i>Erythrina variegada</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GNA	Lectina de <i>Galanthus nivalis</i>
GLS	Lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i>
kDa	Quilodaltos
LAL	Lectina de <i>Luetzelburgia auriculata</i>
Maa	Lectina de <i>Maackia amurensis</i>
Mr	Massa molecular
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
pI	Ponto isoelétrico
PNA	Lectina de amendoim
PR	Proteínas relacionadas à patogênese
RIPs	Proteínas inativadoras de ribosomos
Rp	<i>Robinia pseudoacacia</i>
SBA	Lectina de soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sj	<i>Sophora japonica</i>
TEMED	N,N,N',N', tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UDA	Lectina de <i>Urtiga dioica</i>
Uea	Lectina de <i>Ulex europaeus</i>
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
WGA	Lectina de trigo

## RESUMO

Este trabalho descreve a purificação e a caracterização físico-química e estrutural da lectina de cotilédones da leguminosa *Luetzelburgia auriculata* e discute o envolvimento desta lectina na defesa da planta contra patógenos. Esta lectina, denominada LAL, foi purificada em coluna de agarose-N-acetilgalactosamina. LAL se revelou uma potente aglutinina contra eritrócitos de coelho, sendo também capaz de aglutinar eritrócitos humanos, mas foi inativa contra eritrócitos de boi, carneiro e cabra. A aglutinação dos eritrócitos de coelho foi inibida por galactose, rafinose, melibiose, lactose e, principalmente, por N-acetil-D-galactosamina e ácido N-acetil-neuramínico. A massa molecular aparente da lectina, determinada por filtração em Sephadex G-100, a pH 7,6, foi 123,5 kDa. A lectina, entretanto, assume diferentes conformações a diferentes pHs. Por PAGE-SDS, a lectina apresentou duas bandas de massas moleculares aparentes de 28 e 15 kDa, não associadas por pontes dissulfeto. A banda de 28 kDa corresponde ao monômero (cadeia  $\alpha$ ) e a banda de 15 kDa compreende as suas subunidades  $\beta$  e  $\gamma$ . LAL é uma glicoproteína (3,2 % de carboidratos) e sua cadeia  $\alpha$  possui a seguinte seqüência N-terminal SEVVVSFSFTKFNPNQKDII. LAL é rica em aminoácidos ácidos e hidroxilados, justificando o pI de 5,8. LAL se mostrou relativamente estável ao calor, requerendo cerca de 104,75 kJ/mol de energia para iniciar o processo de desnaturação. O espectro de absorção da lectina mostrou um máximo a 280 nm, com  $\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}}$  de 5,2, observando-se um aumento desse valor na presença de galactose. A análise da estrutura secundária da lectina mostrou um alto conteúdo de folhas- $\beta$ . Por espectroscopia de fluorescência observou-se que a excitação de uma solução aquosa de LAL, a 280 nm, provocou uma emissão máxima a 334,5, que é típico da contribuição de resíduos de triptofano enterrados no interior da molécula. LAL está localizada na porção mais externa da epiderme do cotilédone de *L. auriculata*, justificando a facilidade com que é exsudada para o meio durante a germinação da semente. LAL retardou o crescimento dos fungos filamentosos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* e *Aspergillus niger* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Essa atividade foi prevenida por galactose, com exceção da inibição do fungo *F.*

*solani*, sugerindo a interação da lectina com um outro tipo de receptor glicoconjugado, que a galactose não foi capaz de reverter. A lectina inibiu a acidificação do meio de cultura da levedura, estimulada por glicose, sugerindo uma atuação sobre os mecanismos de transporte de íons através da membrana plasmática. A lectina efetivamente se ligou a superfície da levedura, como demonstrado por microscopia de fluorescência e eletrônica, observando-se uma interação direta com a membrana plasmática. A lectina detectada em raízes, hipocótilos, cotilédones germinantes, epicótilos e folhas de *L. auriculata* foi reconhecida pelo anticorpo anti-LAL, demonstrando uma homologia entre si. Aparentemente, LAL sofre processamento por enzimas ativadas durante a germinação, já que o padrão proposto para esta lectina, ou seja, cadeia  $\alpha$  e suas subunidades  $\beta$  e  $\gamma$ , foi observado nos cotilédones germinantes. O tratamento de plantas de *L. auriculata* com ácido salicílico e com esporos do fungo *F. solani* promoveu alterações no conteúdo de lectina de raízes, hipocótilos, cotilédones germinantes, epicótilos e folhas sugerindo o envolvimento da lectina na defesa contra agressores.

## ABSTRACT

This work describes the purification, physico-chemical and structural characterisation of the lectin from cotyledons of *Luetzelburgia auriculata*. In addition, we discuss the involvement of this lectin in plant defense against pathogens. This lectin, named LAL, was purified on agarose-N-acetylgalactosamine column. LAL is a potent agglutinin for rabbit erythrocytes, reacts against human A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup> and O<sup>+</sup> red cells, but is inactive against cow, sheep and goat erythrocytes. Hemagglutination of rabbit red cells was inhibited by galactose, raffinose, mellibiose, lactose, and mainly, by N-acetyl-D-galactosamine and N-acetylneuraminic acid. The apparent molecular mass determined by gel filtration in Sephadex G-100, at pH 7.6, was 123.5 kDa. However, the lectin assumed different conformation by varying the pH. By SDS-PAGE the lectin showed two bands of apparent molecular masses of 28 e 15 kDa, not associated by disulfide bonds. The 28 kDa band corresponds to the monomer ( $\alpha$  chain) and that of 15 kDa the two subunits  $\beta$  e  $\gamma$ . LAL is a glycoprotein (3.2 % carbohydrates) and the  $\alpha$  chain has the following N-terminal sequence SEVVSFSFTKFNPNQKDII. LAL is rich in acidic and hydroxy amino acids, which justifies the pI of 5.8. LAL is relatively heat stable. It requires about 104.75 kJ/mol of energy for denaturation to initiate. The absorption spectrum showed maximum at 280 nm, with  $\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}}$  of 5.2 and an increase in the extinction coefficient was observed in the presence of the inhibiting sugar D-galactose. The secondary structure of the lectin showed a high content of  $\beta$ -sheet. In the fluorescence spectroscopy, excitation of the lectin solution at 280 nm gave an emission spectrum in the 285-445 nm range. The wavelength maximum emission was in 334.5 nm, which is typical for tryptophan residues buried inside the protein. LAL is located on the outer epidermis of *L. auriculata* cotyledon, what justifies the ease of exsudation to the medium during seed germination. LAL slowed the growth of the filamentous fungi *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, and *Aspergillus niger*, and of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This activity was inhibited by galactose, except for the inhibition of *F. solani*, suggesting the interaction of the lectin with another type of glycoconjugated receptor, which galactose can not counteract. The lectin inhibited the acidification of the yeast culture medium stimulated by glucose, suggesting an action upon

ion transport mechanism across plasmatic membrane. The lectin was bound effectively to yeast surface, as shown by fluorescence and electron microscopy, interacting also with plasmatic membrane. The lectin detected in roots, hypocotyls, germinating cotyledons, epycotyls and leaves of *L. auriculata* was recognized by anti-LAL antibody, showing an homology between LAL and the lectin present in the tissues. It appears that LAL is under processing by enzymes activated during germination, since the proposed pattern for this lectin,  $\alpha$  chain and  $\beta$  e  $\gamma$  subunits, was observed in germinating cotyledons. The treatment of *L. auriculata* with salicylic acid and *F. solani* caused alterations in lectin content in roots, hypocotyls, germinating cotyledons, epycotyls and leaves, suggesting the involvement of the lectin in plant defense against aggressors.

# **CAPÍTULO I**

---

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA  
E ESTRUTURAL DA LECTINA DE COTILÉDONES DE  
*Luetzelburgia auriculata* DUCKE**



## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – Lectinas Vegetais: Definições

Da descoberta das aglutininas por Stilmarch (1888) aos dias atuais, várias denominações e definições foram dadas a essas proteínas. Inicialmente, foram chamadas de fitohemaglutininas, por terem sido detectadas em extratos vegetais e aglutinarem hemácias. Este termo foi substituído por lectina (do latim “legere”, escolher), devido à capacidade de algumas dessas proteínas aglutinar seletivamente eritrócitos humanos (BOYD & SHAPLEIGH, 1954). Outras definições ampliaram o conceito de lectinas destacando a interação específica e reversível a carboidratos (GOLDSTEIN *et al.*, 1980; KOCOUREK & HOREJSI, 1981; GOLDSTEIN & PORETZ, 1986).

O termo fitohemaglutinina foi abandonado quando se descobriu que as lectinas não eram exclusivas das plantas, sendo também encontradas em espécies de todos os reinos da natureza, inclusive em vírus (SHARON & LIS, 1989).

Uma atualização da definição de lectinas foi recentemente proposta por PEUMANS & VAN DAMME (1995). Segundo os autores, a presença de, no mínimo, um domínio não catalítico de ligação reversível a carboidrato é o único pré-requisito para uma proteína ser chamada de lectina. Essa nova definição inclui várias proteínas que se comportam bastante diferente do ponto de vista das propriedades aglutinantes e/ou precipitantes de glicoconjugados.

Devido a peculiar característica de interação específica e reversível com carboidratos comumente encontrados nas superfícies celulares, já foi relatado o envolvimento de lectinas em vários processos biológicos, tais como interações célula-célula, interações planta-patógeno, *turnover* de proteínas séricas, respostas imunológicas, interações simbióticas entre bactérias fixadoras de nitrogênio e leguminosas, dentre outras (SEQUEIRA & GRAHAM, 1977; BROEKAERT *et al.*, 1989; DIAZ *et al.*, 1989; SHARON & LIS, 1989; PUSZTAI *et al.*, 1991; LIS & SHARON, 1998).

Atualmente, mais de 200 estruturas tridimensionais de lectinas isoladas de plantas, animais, bactérias e vírus são conhecidas (<http://www.cermav.cnrs.fr/databank/lectin>) e mais da metade desse número pertence a lectinas de plantas (VIJAYAN & CHANDRA, 1999).

Embora já tenha sido demonstrado o envolvimento de lectinas vegetais em vários fenômenos biológicos, e já se conheça em detalhes as estruturas de muitas delas, a função intrínseca das lectinas ainda é muita especulativa. Esse fato, por si só, seria suficiente para justificar o interesse nessas proteínas, não fosse o potencial que elas representam para as pesquisas básica e aplicada.

## 1.2 – Especificidade por Açúcar

A especificidade por carboidratos é uma das características utilizadas para classificar as lectinas e, segundo a afinidade por açúcares simples, as lectinas vegetais 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-D-galactosamina), grupo III (D-glucose, D-manose) e grupo IV (D-idose, L-glucose e L-xilose) (MAKELA, 1957). Três novos grupos foram acrescentados por GOLDSTEIN & PORETZ (1986): N-acetil-D-glucosamina, ácido siálico e estruturas complexas.

A afinidade das lectinas por monossacarídeos é geralmente fraca, mas bastante seletiva. Por exemplo, lectinas galactose-específicas não reagem com glucose ou manose, nem aquelas específicas para manose se ligam à galactose. De forma semelhante, com exceção da lectina isolada do trigo (WGA), lectinas específicas para N-acetil-D-glucosamina não interagem com N-acetil-D-galactosamina e vice-versa. A seletividade, contudo, não é absoluta, e algumas lectinas toleram variação no carbono 2 do anel piranosídico. Por exemplo, lectinas manose-específicas podem interagir com glucose (seu epímero) e vice-versa. A maioria das lectinas com especificidade para galactose interage, também, com N-acetil-D-galactosamina, em alguns casos, de forma preferencial. A lectina de soja (SBA), por exemplo, interage com N-acetil-D-galactosamina com uma afinidade

25-50 vezes maior do que com galactose. Por outro lado, a aglutinina isolada de amendoim (PNA), que é galactose-específica, não reage com N-acetil-D-galactosamina (LIS & SHARON, 1998).

Os aspectos topográficos dos haptenos também influenciam a interação com lectinas. Assim, algumas lectinas específicas para N-acetil-D-glucosamina podem interagir com o ácido N-acetil-neuramínico, um monossacarídeo que não ocorre em plantas, tal como acontece com a WGA (PETERS *et al.*, 1979). A análise da estrutura tridimensional desses açúcares revelou a presença de grupamentos químicos semelhantes em posições críticas para o contato com sítios das lectinas (LIS & SHARON, 1998).

Algumas lectinas pertencentes a um mesmo grupo demonstram especificidade pelo anômero  $\alpha$  ou  $\beta$ -glicosídico do respectivo monossacarídeo, enquanto outras não fazem essa distinção e interagem igualmente com as duas formas. Finalmente, algumas lectinas demonstram preferência por glicosídeos aromáticos ao invés de alifáticos, sugerindo a presença de uma região hidrofóbica próxima ao sítio de ligação a carboidrato (LIS & SHARON, 1998).

Apesar da validade da classificação das lectinas com base na especificidade por monossacarídeos, sabe-se, agora, que a maioria das lectinas apresenta especificidade por oligossacarídeos, com constantes de associação cerca de 1000 vezes maiores do que com monossacarídeos (WEIS & DRICKAMER, 1996; RUDIGER, 1998).

### 1.3 – Estrutura Molecular

PEUMANS & VAN DAMME (1995) classificaram as lectinas vegetais em três grupos com base em suas estruturas: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. As merolectinas possuem apenas uma cadeia polipeptídica e um único sítio de ligação a carboidratos, não possuindo, portanto, atividade hemaglutinante ou precipitante. São exemplos de merolectinas, a heveína, isolada de *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS *et al.*, 1991) e as proteínas monoméricas ligantes a manose, isoladas de orquídeas. As hololectinas possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, que podem ser idênticos ou

homólogos. Este grupo compreende todas as lectinas que possuem múltiplos sítios de ligação e, portanto, são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas possuem além do sítio de ligação a carboidratos, um outro domínio não relacionado, que apresenta atividade catalítica ou outra atividade biológica e que age independentemente do domínio de ligação a carboidrato. Dependendo do número de domínios ligantes a carboidratos, as quimerolectinas se comportam como merolectinas ou hololectinas. Alguns exemplos deste grupo são as quitinases da classe 1 e as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) tipo 2.

Muitas lectinas são glicoproteínas e, portanto, apresentam resíduos de aminoácidos ligados covalentemente a cadeias glicídicas, como acontece com a SBA (DESSEN *et al.*, 1995) e com a lectina de *Erythrina corallodendron* (SHAANAN *et al.*, 1991). Outras são glicoproteínas em sua forma pré-nativa, como no caso da lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA), que perde sua porção glicídica durante o processamento (BOWLES *et al.*, 1986), sendo esse passo essencial para a atividade da lectina.

As lectinas de plantas mais detalhadamente estudadas são aquelas isoladas de leguminosas. Essa preferência pode ser justificada pelo grande número de espécies de leguminosas existentes, pela disponibilidade de suas sementes e pela abundância relativa de lectina nas sementes. Das cerca de 50 lectinas comercialmente disponíveis, a maioria (31) foi isolada de leguminosas (RUDIGER, 1998).

Embora as lectinas de leguminosas difiram profundamente em suas especificidades por carboidratos, a análise de suas seqüências de aminoácidos revela um alto grau de homologia (STROSBERG *et al.*, 1986; SHARON & LIS, 1990), donde se pode inferir que a preservação dessas seqüências, ao longo da evolução, deva estar ligada a funções específicas e de grande importância para o metabolismo geral da planta. Os dados de homologia são tão consistentes que é possível utilizá-los na construção de árvores filogenéticas para essas proteínas (ROUGÉ *et al.*, 1992).

Tipicamente, as lectinas de leguminosas são formadas por subunidades de massa molecular ao redor de 30 kDa. Cada subunidade ou monômero apresenta um único sítio de ligação a carboidrato. 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. Lectinas que são compostas de

subunidades de mesmo tamanho são chamadas lectinas a uma cadeia (FORIERS *et al.*, 1979). Em algumas lectinas, entretanto, a cadeia de 30 kDa sofre clivagem produzindo duas subunidades diferentes (cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ ), originando as chamadas lectinas a duas cadeias. São exemplos de lectinas a duas cadeias, as de ervilha e lentilha, da tribo *Vicieae* (RUDIGER, 1998). Esse critério de classificação, entretanto, não deve ser generalizado, haja vista que as duas estruturas já foram encontradas em espécies de um mesmo gênero, tal como acontece com o gênero *Lathyrus* (ROUGÉ *et al.*, 1990). Na realidade, a ocorrência de lectinas a duas cadeias parece depender muito mais da presença de proteases ativas, capazes de clivar a lectina em duas subunidades diferentes, durante a maturação da semente, do que propriamente da seqüência de aminoácidos (ROUGÉ *et al.*, 1989).

Muitas lectinas podem ser encontradas em diferentes formas moleculares. A lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA), por exemplo, é formada por dois tipos de subunidades denominadas E e L, que se associam em várias proporções dando origem a uma família de 5 isolectinas tetraméricas; E4, E3L, E2L2, EL3 e L4 (FELSTED *et al.*, 1981). A ocorrência de isoformas pode ser atribuída a processamentos pós-traducionais incompletos (YOUNG *et al.*, 1995) ou a heterogeneidade genética, isto é, mais de um gene codificando a lectina (SHARON & LIS, 1989).

Estudos de estruturas tridimensionais de lectinas e de complexos lectina-carboidrato têm sido realizados através de sofisticadas técnicas de difração de raios X, ressonância magnética nuclear e, em alguns casos, por modelamento molecular. Através desses estudos é possível caracterizar com mais detalhes essas proteínas e desvendar as mudanças que ocorrem na molécula em resposta à ligação ao carboidrato.

A determinação da estrutura tridimensional de lectinas tem contribuído para demonstrar que o sítio de ligação a carboidrato parece ser pré-formado, já que ocorrem poucas mudanças conformacionais após a acomodação do ligante. Independentemente do ligante ser um monossacarídeo simples ou um glicano complexo, uma única unidade monossacarídica se liga ao sítio específico da lectina. A acomodação do ligante no sítio da lectina é estabelecida por pontes de hidrogênio, em alguns casos, mediadas por moléculas de água e interações hidrofóbicas entre as moléculas reagentes (LIS & SHARON, 1998). A resolução de vários complexos lectina-carboidrato, além de permitir a determinação dos resíduos de aminoácidos que participam desta interação, revelou que alguns resíduos são

altamente conservados (SHARON & LIS, 1990; DELBAERE *et al.*, 1993; VAN EIJSDEN *et al.*, 1994). A importância da preservação dos resíduos de aminoácidos do sítio de ligação a carboidrato foi demonstrada por mutagênese direta, provando que a substituição desses aminoácidos resulta na perda da capacidade de ligação a carboidrato (ARANGO *et al.*, 1993; VAN EIJSDEN *et al.*, 1994; NAGAH *et al.*, 1995). A simples substituição de um resíduo aromático por um alifático, por exemplo, aboliu a capacidade de ligação a carboidrato das lectinas galactose-específicas isoladas de *E. corallodendron* (ADAR & SHARON, 1996) e *Robinia pseudoacacia* (NISHIGUCHI *et al.*, 1997). Pode acontecer, também, de ocorrer uma mudança na especificidade da lectina. Por exemplo, como já mencionado anteriormente, PNA é específica para galactose, não interagindo com N-acetil-D-galactosamina (GalNAc). Todavia, quando o resíduo de ácido glutâmico (129) foi substituído por ácido aspártico, PNA adquiriu a capacidade de interagir com os dois monossacarídeos (SHARMA *et al.*, 1998).

Os sítios de ligação a carboidratos das lectinas de leguminosas localizam-se em uma depressão numa alça associada com a face côncava de uma folha- $\beta$  de sete segmentos. Dois resíduos altamente conservados, Asp e Asn, são cruciais para o reconhecimento do carboidrato e, juntamente com o NH de um resíduo de Gly (ou Arg), participam de quatro pontes de hidrogênio com o monossacarídeo. Além disso, a interação com o açúcar é estabilizada por interações com um resíduo hidrofóbico (Phe, Tyr, Trp ou Leu). A conservação estrutural de resíduos de aminoácidos em lectinas de diferentes especificidades ressalta a habilidade única dessas proteínas de utilizarem um conjunto comum de resíduos para ligar e, ainda, discriminar os diferentes monossacarídeos. Assim, as lectinas de *C. ensiformis*, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Lathyrus ochrus* e *Lens culinaris* ligam glucose ou manose de tal forma que o ácido aspártico ( $O^{\delta 1}$  e  $O^{\delta 2}$ ) funciona como acceptor nas ligações de hidrogênio com as OH-C6 e OH-C4, enquanto Asn ( $N^{\delta 2}$ ) e Gly (ou Arg) atuam como doadores nas ligações de hidrogênio com as OH-C4 e OH-C3, respectivamente. Nas lectinas isoladas de amendoim, soja e *E. corallodendron*, que interagem com galactose ou N-acetil-galactosamina, entretanto, o Asp ( $O^{\delta 1}$  e  $O^{\delta 2}$ ) atua como acceptor nas ligações de hidrogênio estabelecidas com as OH-C4 e OH-C3, enquanto Asn ( $N^{\delta 2}$ ) e Gly (ou Arg) são doadores nas ligações com a OH-C3. Assim, o mesmo núcleo de resíduos nas lectinas de leguminosas garante a infraestrutura para acessar uma coleção de monossacarídeos. Esse

potencial notável das lectinas de leguminosas vem de sua habilidade de usar um conjunto conservado de resíduos, nas ligações de hidrogênio com um par distinto de grupos hidroxila do monossacarídeo, enquanto lança mão da variabilidade de outras regiões para conseguir sua especificidade (SHARMA & SURROLIA, 1997).

Até o momento, resultados obtidos por mutagênese de resíduos dos sítios de ligação a carboidratos indicaram uma inflexibilidade para mudanças (VAN EIJSDEN *et al.*, 1992). Assim, a inexplicável diversidade da especificidade das lectinas de leguminosas parece ter origem na hipervariabilidade de regiões adjacentes ao sítio de ligação a carboidrato, que influencia o tamanho e a abertura do sítio (YOUNG & OOMEN, 1992; SHARMA & SURROLIA, 1997; VIJAYAN & CHANDRA, 1999).

Já foi demonstrada a presença de outros sítios que também são importantes para a estabilização do complexo lectina-carboidrato. A presença de uma cavidade rica em aminoácidos hidrofóbicos, denominada sítio hidrofóbico, já foi constatada em várias lectinas (MALIARIK & GOLDSTEIN, 1988, ROUGÉ *et al.*, 1991). Através dos sítios hidrofóbicos, lectinas podem interagir com moléculas não polares, como acontece, por exemplo, entre a ConA e o ácido indolacético, um hormônio vegetal (EDELMAN & WANG, 1978). Muitas lectinas apresentam também sítios para ligação de cátions divalentes (HARDMAN *et al.*, 1982; MARCOS *et al.*, 2000), sendo a presença desses íons fundamental para essas lectinas exibirem suas atividades (MOREIRA *et al.*, 1991).

A resolução da estrutura tridimensional de lectinas de leguminosas por cristalografia de raios X (DESSEN *et al.*, 1995; RINI, 1995; HAMELRYCK *et al.*, 1996; WEIS & DRICKAMER, 1996) tem mostrado que essas proteínas apresentam uma grande diversidade de estruturas quaternárias, embora suas estruturas terciárias sejam praticamente idênticas (PRABU *et al.*, 1999). A topologia das lectinas de leguminosas é complexa e estruturalmente se parece com um rolo de gelatina (*jelly-roll*). A arquitetura dos monômeros usualmente consiste de três folhas- $\beta$ : uma folha- $\beta$  de seis segmentos, voltada para a face posterior; uma folha- $\beta$  de sete segmentos, voltada para a face anterior; e uma folha de cinco segmentos, chamada folha-S, que mantém as duas folhas- $\beta$  unidas (BANERJEE *et al.*, 1996). A oligomerização das unidades individuais das lectinas de leguminosas para formação de dímeros ou tetrâmeros envolve, primariamente, interações entre seis segmentos de duas folhas- $\beta$  antiparalelas. Na ConA (HARDMAN &

AINSWORTH, 1972; BECKER *et al.*, 1975) e em muitas outras lectinas de leguminosas analisadas subsequentemente (LIS & SHARON, 1998; LORIS *et al.*, 1998), a formação de dímeros simétricos envolve o alinhamento, lado a lado, de seis segmentos de duas folhas- $\beta$ , formando uma folha- $\beta$  contínua de 12 segmentos. Isto é denominado “modo canônico de dimerização” (VIJAYAN & CHANDRA, 1999). Entretanto, nem todas as lectinas de leguminosas apresentam o modo canônico de dimerização. Em algumas lectinas, a associação dos monômeros ocorre de forma diferente devido a impedimentos estéricos provocados pela presença de carboidratos estruturais, como acontece nas lectinas de *Griffonia simplicifolia* (GS-IV) e *E. corallodendron* (EcorL) (SHAANAN *et al.*, 1991). A presença de sítios de glicosilação, entretanto, parece não ser o único fator de impedimento para a dimerização canônica (PRABU *et al.*, 1998), pois algumas lectinas não glicosiladas, também, não apresentam o modo canônico de dimerização, como, por exemplo, a lectina de amendoim (BANERJEE *et al.*, 1996).

A formação de dímeros e tetrâmeros em lectinas de leguminosas pode ser satisfatoriamente descrita em termos de arranjos que acontecem entre segmentos das folhas- $\beta$ . Na ConA, por exemplo, a formação do tetrâmero envolve partes centrais dos dímeros e os contatos são feitos, principalmente, através de alças (*loops*) de conexão. Na SBA (DESSEN *et al.*, 1995) e na PHA-L (HAMELRYCK *et al.*, 1996), entretanto, as interações entre os segmentos da folha- $\beta$  acontecem entre pontos mais externos, criando um canal no meio do tetrâmero. A PNA tem uma estrutura mais aberta, e o aspecto mais interessante é a ausência de simetria do tetrâmero (BANERJEE *et al.*, 1996).

Vale ressaltar que a estrutura quaternária de algumas lectinas pode ser influenciada pelo pH. A ConA, por exemplo, assume uma estrutura tetramérica em pH acima de 7,0 (KALB & LUSTIG, 1968) e dimérica em pH abaixo de 5,0 (AGRAWAL & GOLDSTEIN, 1968). Interessantemente, a lectina isolada de *C. brasiliensis* (ConBr), que tem uma sequência de aminoácidos 99% idêntica a da ConA (GRANGEIRO, 1996), sofre uma oligomerização diferente, em função do pH. A massa molecular da ConBr aumenta continuamente com o aumento do pH, indo de 55,3 kDa (pH 2,5) a 87,6 kDa (pH igual ou superior a 6,5) (GRANGEIRO *et al.*, 1997). É digno de nota que o aminoácido da posição 58, Gly em ConBr e Asp em ConA, é o único resíduo diferente envolvido na formação do tetrâmero (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Outro exemplo que ressalta a importância do



resíduo 58 na formação do tetrâmero é o da lectina isolada de *Dioclea grandiflora* (Dgr), uma espécie pertencente à mesma sub-tribo (*Diocleinae*) das canavalias. Esta lectina é um tetrâmero a qualquer valor de pH (MOREIRA *et al.*, 1983; RICHARDSON *et al.*, 1984) e tem Ala na posição 58. Assim, acredita-se que este resíduo possa estabilizar a interfase dímero-dímero através de interações hidrofóbicas (GRANGEIRO *et al.*, 1997). As estruturas quaternárias da SBA e da PHA-L, como a de Dgr, não são alteradas pelo pH (LORIS *et al.*, 1998).

#### 1.4 – Biossíntese de Lectinas

As lectinas de leguminosas são, geralmente, sintetizadas na forma de um precursor, que após sofrer processamentos co- e/ou pós-traducionais origina a proteína madura. Este processamento pode consistir na perda de um peptídeo sinal, na clivagem proteolítica da cadeia precursora, na perda da extremidade C-terminal, na remoção de carboidrato estrutural e na ligação das extremidades C e N-terminais originais. Dependendo da lectina, a forma precursora pode ou não possuir habilidade de ligação a carboidratos (LORIS *et al.*, 1998).

A mais complexa forma de processamento ocorre com a ConA. Esta lectina é sintetizada na forma de um precursor glicosilado de 34 kDa que possui um peptídeo sinal, seguido de uma região que codifica para os aminoácidos 119-237, intercalada por uma região que codifica 15 aminoácidos, não encontrados na lectina madura, seguida da região correspondente aos aminoácidos 1-118 e, finalmente, da porção C-terminal (CARRINGTON *et al.*, 1985). Após remoção do peptídeo sinal, a proteína é deglicosilada e o peptídeo central é removido, gerando dois fragmentos. Estes polipeptídeos são re-ligados por uma asparagil endopeptidase, num processo denominado transpeptidação, para formar a proteína madura (30 kDa, cadeia  $\alpha$ ), de forma que o alinhamento dos resíduos 1-118 e 119-C-terminal é exatamente o contrário daquele encontrado no precursor (MIN *et al.*, 1994). Desde que esse processo não é quantitativo, as ocorrências dos fragmentos 1-118 (cadeia  $\beta$ ) e 119-237 (cadeia  $\gamma$ ) (CUNNINGHAM *et al.*, 1975) devem-se, provavelmente, a

peptídeos não re-ligados, ao invés de serem produtos proteolíticos do polipeptídeo de 30 kDa. Mecanismo semelhante parece ocorrer em lectinas da sub-tribo *Diocleinae*, desde que, por PAGE-SDS, estas proteínas exibem essencialmente o mesmo padrão de bandas, apresentando a cadeia  $\alpha$  e seus fragmentos  $\beta$  e  $\gamma$  (AINOUZ *et al.*, 1987).

Recentemente, foi sugerido que o processamento pós-traducional de lectinas de leguminosas é um processo muito antigo, tendo surgido na raiz desta família. Essa hipótese foi levantada a partir da análise do processamento de uma lectina galactose-específica isolada da leguminosa *Vatairea macrocarpa* (CALVETE *et al.*, 1998). Ao contrário da maioria das lectinas a duas cadeias de leguminosas, que são produzidas por remoção pós-traducional de um polipeptídeo interno, o processamento da lectina de *V. macrocarpa* (VML) envolve a clivagem de uma única ligação peptídica. VML é uma glicoproteína composta de uma cadeia- $\alpha$  de 240 resíduos de aminoácidos, que sofre clivagem entre os resíduos 114-115 produzindo dois fragmentos; a cadeia- $\gamma$ , não glicosilada (1-114), e uma mistura de cadeias- $\beta$  glicosilada e não glicosilada (115-239). Aqui, ao contrário do que ocorre na ConA, o processamento não envolve permutação circular, ou seja, os fragmentos são re-ligados segundo o mesmo alinhamento da cadeia- $\alpha$ . Como VML pertence a uma tribo (*Dalbergieae*) mais antiga do que a tribo (*Phaseoleae*), a que pertence a ConA, os autores sugeriram que a clivagem pós-traducional apareceu muito cedo nesse ramo (sub-família *Papilionoideae*) das leguminosas e que a permutação circular se originou tardiamente e deve ser restrita aos membros da tribo *Phaseoleae* (CALVETE *et al.*, 1998).

### 1.5 – Estratégia de Purificação de Hololectinas

A estratégia para o isolamento de hololectinas, ou lectinas que possuem dois ou mais domínios ligantes a carboidratos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995), envolve, inicialmente, sua detecção em extratos brutos através de ensaios de hemaglutinação ou precipitação de glicoconjugados. O ensaio de hemaglutinação, o mais rotineiramente utilizado, é influenciado por vários fatores. Considerando os fatores relativos à lectina, podemos destacar a especificidade, a valência e o tamanho da molécula; no que diz respeito à

célula, influenciam o tipo, seu estado metabólico e propriedades de sua superfície, tais como a natureza, o número, a distribuição, a exposição e a mobilidade dos receptores, bem como a presença de cargas (NICHOLSON, 1974). Ainda deve ser observado que algumas lectinas necessitam de íons metálicos para exibir suas atividades (VASCONCELOS *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1991).

Alguns pré-tratamentos das células reagentes podem aumentar a atividade aglutinante de lectinas. O tratamento com enzimas hidrolíticas é largamente empregado com essa finalidade. As enzimas parecem atuar removendo cadeias peptídicas da superfície celular que impedem o contato perfeito entre a lectina e o carboidrato. De forma semelhante, o tratamento das células com neuraminidase também aumenta a atividade hemaglutinante de certas lectinas, ao retirar resíduos de ácido siálico terminais, negativamente carregados, reduzindo, assim, possíveis repulsões eletrostáticas, além de expor novos receptores (PUSZTAI, 1991).

Na realização de um ensaio de hemaglutinação, deve-se atentar para o uso de um painel variado de eritrócitos visando atender à especificidade da lectina que se pretende isolar e, finalmente, para evitar interferências externas, o tempo, a concentração de células, a temperatura e o pH devem ser padronizados (MOREIRA & PERRONE, 1977).

A atividade hemaglutinante promovida por um extrato biológico é apenas um indício da presença de lectina, pois outras substâncias também podem aglutinar células, tais como taninos, alguns lipídeos e cátions metálicos, quando em altas concentrações (RUDIGER, 1998). A confirmação pode ser feita lançando-se mão de carboidratos que podem inibir, especificamente, a atividade hemaglutinante promovida por lectinas. Tal inibição é possível porque a ligação entre o açúcar e a lectina é relativamente fraca, isto é, não envolve a formação de ligações covalentes, sendo, portanto, reversível. A especificidade por açúcares é rotineiramente determinada pela técnica de inibição por hapteno de Landsteiner (GOLDSTEIN & HAYES, 1978). A capacidade inibitória de um determinado carboidrato é estabelecida com base na sua concentração mínima requerida para inibir ou a reação de hemaglutinação ou a precipitação de polissacarídeos ou glicoconjugados, em solução, mediada pela lectina.

A purificação de lectinas se tornou uma tarefa relativamente fácil depois da descoberta de que essas proteínas podiam interagir reversivelmente com adsorventes

específicos. A cromatografia de afinidade faz uso quer dos carboidratos presentes na matriz (por ex., Sephadex, Sepharose, Quitina), quer de matrizes modificadas pela adição de grupos ligantes (FREIER *et al.*, 1985). A eluição do material adsorvido à matriz pode ser conseguida através de competição com o hapteno específico ou por abaixamento do pH.

#### 1.6 – *Luetzelburgia auriculata* Ducke – Descrição Botânica

*Luetzelburgia auriculata* Ducke, popularmente conhecida como Pau-mocó, pertence à família *Leguminosae*, sub-família *Papilionoideae*, tribo *Sophoreae*. Esta espécie é nativa do Brasil e de ocorrência predominante no Nordeste, particularmente nos estados do Ceará e Piauí (DUCKE, 1979). Trata-se de uma árvore pequena da caatinga do Sertão e, principalmente, do “Pé de Serra”. As árvores, no verão, destacam-se por sua folhagem verde brilhante, no meio da caatinga desfolhada; as flores, de um róseo quase branco, aparecem no começo do verão em ramos desfolhados. As folhas têm de 5 a 11 folíolos coriáceos, peninervados e reticulados, de até 9 cm, de forma muito variável, elíptico-oblongas ou ovais, de base aguda ou arredondada, com ápice obtuso, agudo ou retuso; as pétalas são iguais em comprimento, o estandarte é obovado-oblongo, não apendiculado; os estames são livres até a base; o ovário densamente piloso, mas o estilo é glabro; o estigma muito pequeno, é terminal. Tem raízes tuberosas, feculentas, aproveitadas no ano de escassez de alimento. Seu fruto seco e indeiscente possui uma aurícula, daí o nome da espécie. A semente, uma por fruto, possui 35% de lipídeos, 37% de proteínas e 16% de carboidratos (CÂMARA, 1994).

Dizem que a fumaça de seus galhos provoca cegueira, fato também verificável nos animais que lhe comem as folhas (PIO CORREA, 1974). A madeira é própria para mobiliário e acabamentos internos em construção civil. A árvore é extremamente ornamental, principalmente pela copa perfeitamente globosa de folhas verde-escura brilhantes; é excelente para o paisagismo, principalmente para arborização de ruas e avenidas e nos plantios mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1984).

De acordo com o número de cromossomos, a tribo *Sophoreae* situa-se na base da sub-família *Papilionoideae* e é a partir dela que se irradiam todas as demais tribos desta sub-família (CUSTÓDIO, 1991).

Apesar da grande maioria das lectinas de leguminosas ter sido isolada de espécies pertencentes às tribos *Vicieae* e *Phaseoleae* (LORIS *et al.*, 1998), algumas já foram isoladas a partir de espécies da tribo *Sophoreae*, como as lectinas de sementes (PORETZ *et al.*, 1974), folhas (HANKINS *et al.*, 1987) e casca (HANKINS *et al.*, 1988) de *Sophora japonica*. Estas lectinas interagem com galactose e N-acetil-D-galactosamina e, apesar de serem estruturalmente muito semelhantes, são produtos de genes diferentes. Outros exemplos são as lectinas isoladas das espécies *Maackia amurensis* (VAN DAMME *et al.*, 1997) e *Cladratis lutea* (VAN DAMME *et al.*, 1995).

CÂMARA (1994) detectou atividade hemaglutinante em extratos de sementes, raízes, hipocótilos, epicótilos, folhas e casca da leguminosa *Luetzelburgia auriculata*. Nesse trabalho, foi demonstrado, também, que substâncias de natureza lectínica exsudavam das sementes durante a germinação, sendo sugerido o envolvimento destas substâncias na proteção da plântula nos seus estágios iniciais do desenvolvimento. Assim, a hipótese de participação de lectina(s) no sistema de defesa de *L. auriculata* serviu de motivação para a realização deste trabalho.

Para testar a hipótese supracitada, o trabalho esteve voltado inicialmente para a obtenção da lectina pura e descrição de suas características físico-químicas e estruturais, aspectos abordados no Capítulo I. O Capítulo II analisa o efeito da lectina sobre o cultivo de fungos fitopatogênicos sob condições *in vitro*, e discute a relação entre a localização da lectina no cotilédone e seu papel na defesa da planta. Por fim, o Capítulo III aborda a participação da lectina na resposta da plântula ao desafio com eliciadores biótico e abiótico.

## 2 – OBJETIVOS

Purificação e caracterização físico-química e estrutural da lectina de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* Ducke.

### 3 – MATERIAIS

#### 3.1 – Material Vegetal

Sementes quiescentes de *Luetzelburgia auriculata* DUCKE foram obtidas de plantas coletadas em diversos municípios no estado do Ceará. A identificação botânica foi feita pelo Professor Edson Paula Nunes, sistemata do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### 3.2 – Coelhos

Coelhos albinos da raça Nova Zelândia, com três meses de idade, foram usados para imunização e obtenção de eritrócitos. Estes animais foram provenientes do plantel do Departamento de Zootecnia da UFC e, ao longo dos experimentos, foram mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

Eritrócitos humanos foram obtidos de doadores sadios através do Centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

Eritrócitos de boi, cabra e carneiro foram coletados de animais do plantel do Departamento de Zootecnia da UFC.

#### 3.3 – Reagentes e Outros Materiais

Albumina sérica bovina (BSA), marcadores de massa molecular, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, ácido N-acetil-D-neuramínico, D-galactose, D-glucose, D-lactose, D-manose, melibiose, rafinose, sacarose, Agarose-N-acetil-D-

galactosamina, Goma de Guar, Sephadex G-100, CM-celulose, glicina, acrilamida, bis-acrilamida, lauril sulfato de sódio, persulfato de amônio, Tris-base, TEMED,  $\beta$ -mercaptoetanol, kit para detecção de glicoproteínas em gel, membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF), membranas de nitrocelulose, anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase ou com fosfatase alcalina e os substratos para peroxidase e fosfatase alcalina foram adquiridos da Sigma Co., St. Louis, USA. Superdex 200 HR 10/30 foi adquirida da Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia.

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.



## 4 – MÉTODOS

### 4.1 – Purificação da Lectina de *L. auriculata*

#### 4.1.1 – Preparação da Farinha

Sementes quiescentes, livres de tegumento e do eixo embrionário, foram fragmentadas e delipidadas com éter de petróleo (1:10, m/v). Após evaporação do solvente, os fragmentos foram triturados em moinho elétrico até obtenção de uma farinha de fina granulação. A farinha foi armazenada em frasco hermeticamente fechado e mantida à temperatura ambiente.

#### 4.1.2 – Extração de Proteínas

A extração de proteínas foi feita segundo a metodologia descrita por CÂMARA (1994). Proteínas da farinha foram extraídas com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo NaCl 150 mM (1:10, m/v), sob agitação constante, à temperatura ambiente, durante 4 h. A suspensão foi filtrada em tecido de náilon e centrifugada a 20.000 g por 30 min, a 4 °C. O sobrenadante obtido, denominado extrato bruto, foi utilizado nos passos subsequentes de purificação.

#### 4.1.3 – Fracionamento de Proteínas com Sulfato de Amônio

Visando a obtenção de uma fração rica em lectina, o extrato bruto foi fracionado com sulfato de amônio nos intervalos de 0-40 e 40-60% de saturação (CÂMARA, 1994). As frações, F<sub>0-40%</sub> e F<sub>40-60%</sub>, foram ressuspensas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo NaCl 150 mM, dialisadas contra água destilada e liofilizadas. O sobrenadante final também foi dializado contra água destilada e liofilizado. O extrato bruto e as frações foram submetidos a dosagens de proteínas e ensaios de hemaglutinação.

#### 4.1.4 – Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante do extrato bruto e das frações protéicas foi determinada segundo a metodologia descrita por MOREIRA & PERRONE (1977), adaptada para o uso de tubos de ensaio. As amostras (1mg/ml) foram diluídas seriadamente com NaCl 150 mM (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; etc.) e cada diluição foi misturada (1:1) com uma suspensão de eritrócitos a 2 %. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 30 min e, depois, por mais 30 min à temperatura ambiente. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 2.000 g por 1 min e a aglutinação visualizada a olho nu. Os resultados foram expressos como título de hemaglutinação, o qual foi definido como o recíproco da maior diluição que é capaz de provocar aglutinação visível, ou como a quantidade mínima de proteína (µg/ml) capaz de induzir aglutinação visível. Essa concentração foi denotada como uma unidade de atividade hemaglutinante (UH).

Concomitantemente, foi realizado ensaio para confirmar a inibição da hemaglutinação por galactose, descrita por CÂMARA (1994). Para tanto, as amostras foram pré-incubadas com galactose (50 mM e 100 mM) a 37 °C durante 30 min e, em seguida, procedeu-se como descrito no ensaio de aglutinação. A inibição da aglutinação foi visualizada a olho nu.

#### 4.1.5 – Cromatografia de Afinidade

Sendo a atividade hemaglutinante inibida por galactose, optou-se por usar as matrizes de goma de guar ou agarose-N-acetil-D-galactosamina para purificação da lectina.

A fração de maior título de hemaglutinação, F<sub>40-60%</sub>, foi escolhida para purificação da lectina. Assim, 250 mg desta fração foram dissolvidas em 10 ml de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo NaCl 150 mM, centrifugada a 20.000 g, a 4 °C, por 10 min e o sobrenadante aplicado à coluna previamente equilibrada com o mesmo tampão. O pico I, concentrando as proteínas que não se ligaram à matriz, foi eluído com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, NaCl 150 mM até não haver mais leitura de absorbância a 280 nm, quando foi aplicado o mesmo tampão, contendo galactose 200 mM, para eluição da lectina. A cromatografia foi realizada a um fluxo constante de 30 ml/h, sendo coletados 2,5 ml por tubo. Os eluatos foram monitorados através de medidas da absorbância a 280 nm. Os tubos correspondentes aos picos I e II foram reunidos, dialisados contra água destilada, liofilizados e submetidos à determinação de proteínas e atividade hemaglutinante.

#### 4.1.6 – Cromatografia de Troca Iônica

Para verificar a existência de isoformas da lectina, o pico II, obtido na coluna de afinidade, foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de CM-celulose (2,1 x 17 cm), equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0. A lectina (1,0 mg/ml) foi dissolvida no tampão de equilíbrio, centrifugada a 10.000 g (centrífuga “Eppendorf”), durante 5 min, e o sobrenadante aplicado à coluna. Inicialmente a coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio, sendo em seguida, aplicado um gradiente de 0-1 M de NaCl, para eluição do material adsorvido. A cromatografia foi realizada a um fluxo de 20 ml/h, sendo coletados 2 ml por tubo.

## 4.2 – Caracterização Físico-Química e Estrutural da Lectina de *L. auriculata*

### 4.2.1 – Estimativa da Massa Molecular por PAGE-SDS

A massa molecular da lectina foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, seguindo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para o uso de placas. Os géis de aplicação e separação encerravam 3,95% e 12,5% ou 15% de acrilamida, respectivamente. A lectina (1mg/ml) foi dissolvida em Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, contendo 1% de SDS, na presença ou ausência de 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, aquecida a 100 °C, durante 10 min, e centrifugada a 10.000 g (centrífuga “Eppendorf”), durante 5 min, a 10 °C. O sobrenadante, antes de ser aplicado no poço, recebeu alguns cristais de sacarose e azul de bromofenol, para aumentar a densidade da amostra e permitir a visualização da corrida, respectivamente. Foram aplicados 20  $\mu$ l por poço e a corrida conduzida a corrente constante de 20 mA por placa, durante 1 h. As bandas protéicas foram visualizadas corando-se os géis com uma solução a 0,25% de azul brilhante de Coomassie R-250. Em seguida, fez-se a descoloração com uma mistura de ácido acético, metanol e água (1: 3: 7). A massa molecular aparente da lectina foi estimada a partir de uma curva-padrão construída com os seguintes marcadores de massa molecular: albumina sérica bovina (66,0 kDa); ovalbumina (45,0 kDa); gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36,0 kDa); anidrase carbônica (29,0 kDa); tripsinogênio (24,0 kDa); inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lactalbumina (14,2 kDa).

### 4.2.2 – Extração das Subunidades da Lectina do Gel de Eletroforese

Para extração das subunidades da lectina diretamente do gel, alíquotas de 20  $\mu$ l de uma solução encerrando 1mg/ml da lectina foram aplicados em todos os poços de uma placa de eletroforese. Após a corrida, retirou-se, com o auxílio de um estilhete, a raia

correspondente ao primeiro poço, que foi corada com uma solução a 0,25% de azul brilhante de Coomassie R-250, durante 10 min, para visualização das bandas da lectina. Durante esse tempo, o restante do gel foi mantido em uma câmara úmida no refrigerador. Em seguida, a raia com as bandas protéicas já coradas e o gel remanescente foram colocados lado a lado e as regiões do gel contendo as subunidades da lectina, identificadas com o auxílio da raia corada, excisadas. As subunidades isoladas foram maceradas em gral com um pouco de água grau milli-Q, centrifugadas a 10.000 g (centrífuga “Eppendorf”), durante 10 min, e os sobrenadantes dialisados contra água destilada e liofilizados. Este procedimento foi repetido várias vezes para acumular as subunidades individuais da lectina. Essas subunidades foram testadas quanto à capacidade de aglutinar eritrócitos de coelho a 2% e usadas para preparar anticorpos anti-subunidades da lectina.

#### 4.2.3 – Determinação da Massa Molecular por Filtração em Gel

A massa molecular da lectina nativa foi determinada por filtração em gel de Sephadex G-100, em uma coluna (1,5 x 90 cm) previamente calibrada com marcadores de massa molecular. A lectina (2,5 mg/0,5 ml) foi dissolvida em Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM, centrifugada a 10.000 g (centrífuga “Eppendorf”), durante cinco min a 4 °C, filtrada em membrana de 0,45 µm (Millipore), e o sobrenadante aplicado à coluna previamente equilibrada com o mesmo tampão. O fluxo da cromatografia foi regulado para 24 ml/h, sendo coletados 2 ml por tubo. A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorvância a 280 nm. Os eluatos apresentando leituras positivas foram reunidos em uma única fração que foi dialisada contra água destilada e liofilizada.

#### 4.2.4 – Composição de Aminoácidos

A análise de aminoácidos da lectina foi conduzida em Sistema Biochrom 20 da Pharmacia-LKB. A amostra (1 mg) foi hidrolisada com HCl 6 N (1 ml), contendo 1% (m/v) de fenol. A hidrólise foi feita em ampolas de vidro seladas, sob atmosfera de Nitrogênio, a 110 °C em estufa, durante 22 h. Após a hidrólise, a ampola foi aberta e o HCl e fenol evaporados, sob pressão reduzida, em presença de NaOH. O hidrolisado foi lavado com água grau milli-Q e secado sob pressão reduzida, em presença de pentóxido de fósforo. Depois de seca, a amostra foi redissolvida em tampão citrato de sódio pH 2,2, filtrada em membrana de 0,45 µm (Millipore) e submetida à análise. O conteúdo de aminoácidos foi determinado pelo método de SPACKMAN *et al.* (1958), adaptado para o uso do Sistema Biochrom 20 da Pharmacia-LKB. O triptofano foi determinado seguindo a metodologia descrita por GOODWIN & MORTON (1946).

#### 4.2.5 – Determinação de Carboidratos

O conteúdo de carboidrato da lectina foi quantificado pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), usando-se glucose como padrão. A amostra de lectina (10 mg/ml) utilizada no ensaio foi previamente dialisada contra ácido acético 1 M, por 2 h, sob agitação constante, para remoção de açúcar não estrutural e, depois, dialisada exaustivamente contra água destilada, durante 24 h.

A natureza glicoprotéica da lectina foi confirmada por coloração pelo ácido periódico de Schiff, realizada após eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo o protocolo do “Kit de detecção de glicoproteína da Sigma”.

#### 4.2.6 – Especificidade da Lectina

A reatividade da lectina purificada frente a mono, di e trissacarídeos foi investigada por ensaios de inibição da hemaglutinação (GOLDSTEIN & HAYES, 1978). Inicialmente, foram preparadas soluções a 100 mM dos açúcares a serem testados: D-galactose, D-glucose, D-manose, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, ácido metil-N-acetil-D-neuramínico, sacarose,  $\alpha$ -lactose, D-rafinose e D-melibiose. Essas soluções foram diluídas seriadamente (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512; 1:1024) com NaCl 150 mM e, em seguida, foi adicionado a cada tubo o mesmo volume de uma solução de lectina contendo 2 UH. A mistura foi incubada a 37 °C durante 30 min, após o que foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2%. Os tubos foram novamente incubados a 37 °C por 30 min e, depois, por mais 30 min à temperatura ambiente, sendo, então, centrifugados a 2.000 g por 1 min. Concomitantemente, foi feito um ensaio de atividade hemaglutinante da mesma solução de lectina na ausência de açúcar (controle) e o grau de inibição de cada açúcar determinado por comparação com esse controle. Os títulos de hemaglutinação foram determinados como descrito no item 4.1.4.

#### 4.2.7 – Determinação do Ponto Isoelétrico

A determinação do ponto isoelétrico da lectina foi feita em um gel pré-fabricado de poliacrilamida (*Phast gel*, PHARMACIA), enriquecido com anfólitos formando um gradiente de pH com valores de 3,0 a 9,0. Foram aplicados cerca de 25  $\mu$ g da lectina dissolvida em NaCl 150 mM. A corrida foi realizada a 2000 V, 2,5 mA, a 20 °C, por 30 min. O gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250 e o ponto isoelétrico (pI) da lectina determinado a partir de uma curva padrão construída a partir de marcadores de pI conhecidos.

#### 4.2.8 – Determinação das Seqüências de Aminoácidos N-Terminal

A seqüência de aminoácidos N-terminal da lectina foi determinada num seqüenciador automático de proteínas (Shimadzu PPSQ-10), do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Para tanto, uma amostra da lectina (1 mg/ml) foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (LAEMMLI, 1970) e, em seguida, eletrotransferida, através de um sistema “Trans blot” semi-seco (MULTIPHOR II, Pharmacia-LKB) para uma membrana de PVDF. A eletrotransferência foi conduzida a  $0,8 \text{ V/cm}^2$  de gel durante 1,5 h. Ao término, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau, para verificar a eficiência da transferência, lavada com água grau milli-Q e secada. As subunidades individuais da lectina foram recordadas da membrana e submetidas ao seqüenciamento. Os derivados feniltioindantoína dos aminoácidos (PTH-aminoácidos) foram detectados a 269 nm, após separação em uma coluna de fase reversa  $C_{18}$  (4,6 x 2,5mm), conduzida sob condições isocráticas de acordo com as instruções do fabricante. As seqüências selecionadas foram submetidas a alinhamento automático através do sistema NCBI-BLAST.

#### 4.2.9 – Estabilidade Térmica

Para avaliar a estabilidade térmica da lectina e calcular a energia de ativação necessária para promover sua desnaturação, uma amostra de lectina (encerrando 1 mg/ml) foi dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo NaCl 150 mM e aquecida a 60, 65, 70, 75 e 80 °C. A cada 5 min, durante o intervalo de 1 h, foram retiradas alíquotas, que após serem imediatamente resfriadas, foram centrifugadas a 10.000 g (“Eppendorf”), por 5 min, e os sobrenadantes utilizados em ensaios de hemaglutinação. A cada ensaio, uma amostra de lectina não aquecida foi usada como controle. Os resultados foram expressos como percentagem de aglutinação em relação ao controle.



A energia de ativação do processo de desnaturação foi calculada usando a equação de Arrhenius:

$$\Delta G' = RT \ln (kT/k_1h)$$

onde  $\Delta G'$  é a energia livre padrão,  $k$  é a constante de Boltzman ( $1.381 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta (K),  $h$  é a constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34} \text{ J.s}$ ),  $R$  é a constante dos gases ( $8.315 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) e  $k_1$  é a velocidade da reação, dada por  $k_1 = (\ln A/A_0)s^{-1}$ .  $A_0$  e  $A$  são as atividades hemaglutinantes inicial e residual, respectivamente.

#### 4.2.10 – Influência do pH na Estrutura Quaternária

Para investigar a influência do pH na estrutura quaternária da lectina, amostras da proteína (3 mg/ml) foram dissolvidas em diferentes tampões, centrifugadas a 10.000 g (“Eppendorf”), durante 5 min, filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) e submetidas à cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30 (1,0 x 30 cm), acoplada a um sistema de FPLC (Pharmacia-LKB). A cada cromatografia, a coluna foi equilibrada com o tampão-teste e calibrada com os seguintes marcadores de massa molecular: albumina sérica bovina (66,0 kDa); anidrase carbônica (29,0 kDa); citocromo c (12,0 kDa) e aprotinina (6,5 kDa). Os tampões utilizados foram: glicina-HCl, pH 3,0; acetato de sódio, pH 5,0; Tris-HCl, pH 7,6; glicina-NaOH, pH 9,0 e fosfato de sódio, pH 11,0; todos na concentração de 50 mM, contendo NaCl 150 mM.

#### 4.2.11 – Espectro de Absorção

O espectro de absorção da lectina foi determinado em um espectrofotômetro Ultrospec III (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia), usando uma cubeta de quartz de 1 cm de caminho óptico. A lectina (1 mg) foi dissolvida em água grau milli-Q (1 ml) e a absorção

medida na presença e ausência de galactose 100 mM, na região de 210-330 nm do ultravioleta.

#### 4.2.12 – Espectro de Fluorescência

As medidas de fluorescência foram feitas no Laboratório de Biofísica Molecular e Espectroscopia, do Instituto de Física de São Carlos da USP, em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, em cubetas de quartz (1 cm de caminho óptico) de 1 ml. Amostras da lectina (0,085 mg/ml em água deionizada) foram excitadas a 280 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 300-440 nm.

#### 4.2.13 – Estrutura Secundária Estimada por Dicroísmo Circular (CD)

O espectro de CD foi determinado no Laboratório de Biofísica e Espectroscopia do Instituto de Física de São Carlos da USP, em um espectropolarímetro Jasco, modelo J-720, no intervalo de 185 a 260 nm, sob N<sub>2</sub> constante, de acordo com as instruções do fabricante. As medidas foram feitas em amostras da lectina dissolvidas em água deionizada (0,085 mg/ml), em cubetas de quartz de 1 mm de caminho óptico. A análise do espectro de CD, em termos do conteúdo de estrutura secundária (decomposição), foi feita usando o método Selcon-2 desenvolvido por SREERAMA & WOODY (1993).

#### 4.3 – Determinação do Número de Cromossomos de *L. auriculata*

Neste trabalho, o número de cromossomos de *L. auriculata* e suas características morfológicas foram utilizados como parâmetros de identificação, haja vista que foram

utilizados exemplares selvagens da planta, coletados em diferentes regiões do estado do Ceará.

A contagem e análise dos cromossomos foram feitas pela observação de pró-metáfases e metáfase mitóticas, obtidas a partir de pontas de raízes. O procedimento experimental foi realizado no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Inicialmente, sementes de *L. auriculata* foram postas para germinar em papel de filtro, à temperatura ambiente. Quando as raízes apresentavam pelo menos 0,5 cm de comprimento, as sementes foram imersas em uma solução de 8-hidroxiquinoleína 2 mM, por um período de 1 h, à temperatura ambiente, seguida por 23 h a 4 °C. Após esse tempo, as raízes foram fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1), à temperatura ambiente, por 3 a 20 h. As raízes fixadas foram estocadas a - 20°C até o uso.

A preparação das lâminas para visualização das metáfases seguiu a metodologia descrita por GUERRA (1988). O tecido foi hidrolisado com HCl 5 N por 20 min, à temperatura ambiente, esmagado em ácido acético 45% e corado com uma solução de Giemsa 2%. As lâminas foram observadas ao microscópio óptico e as melhores células fotografadas no filme Copex Pan (Agfa) em ASA 25 e copiadas em papel Kodabromide F3 ou F5 Kodak.

#### 4.4 – Preparação de Anticorpos

Anticorpos policlonais anti-lectina e anti-subunidades da lectina foram preparados em coelhos albinos, de três meses de idade, de acordo com o protocolo descrito por RIOS *et al.* (1996). As subunidades da lectina usadas nas imunizações foram obtidas como descrito no item 4.2.1.

#### 4.5 – *Dot Blot*

Os títulos dos anticorpos foram estimados como se segue: 10 µl de soluções da lectina e de suas respectivas subunidades [1mg/ml em fosfato de sódio 100 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM (PBS)] foram aplicados sobre membranas de nitrocelulose e deixados secar. Em seguida, as membranas contendo os antígenos foram imersas em soluções de seus respectivos anticorpos primários, isto é, anticorpo anti-lectina; anticorpo anti-subunidade 1 e anticorpo anti-subunidade 2, Os anticorpos foram testados nas diluições de 1:500, 1:1000 e 1:2000, preparadas em PBS. As membranas foram incubadas a 37 °C por 2 h. Após esse tempo, foram feitas lavagens com PBS (5x ), a intervalos de 10 min. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada com fosfatase alcalina), a 37 °C, por 1h. Foram feitas novas lavagens e ao término, foi adicionado o substrato da fosfatase alcalina. As membranas foram lavadas com água grau milli-Q, secadas, e os títulos estimados. Provas em branco foram feitas substituindo-se os imunossoros pelos soros pré-ímmunes.

#### 4.6 – *Western Blot*

A existência de homologia entre as lectinas galactose-específicas isoladas de *L. auriculata* e *Vatairea macrocarpa* foi investigada por *Western blotting*. A lectina de *V. macrocarpa* (VML) utilizada neste trabalho foi purificada de acordo com a metodologia descrita por CAVADA *et al.* (1998). Também foi investigada a reatividade da lectina frente aos anticorpos anti-subunidades 1 e 2 e o inverso, a reatividade das subunidades frente ao anticorpo anti-lectina.

O estudo dessas relações imunológicas foi feito usando a metodologia descrita por TOWBIN *et al.* (1979), como se segue. Após eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF em uma unidade de transferência semi-seca (MULTIPHOR II, Pharmacia), usando como tampão Tris-base 25 mM, glicina 198 mM, pH 9,4, contendo 20% de metanol. A eletrotransferência foi feita a corrente constante de 0,8 V/cm<sup>2</sup>, por 1,5 h. A eficiência da transferência foi checada corando-se as membranas com vermelho de Ponceau, até o aparecimento das bandas protéicas. Em seguida, as membranas foram lavadas com água grau milli-Q, para remoção do corante, procedendo-se o ensaio imunológico.

As membranas foram bloqueadas durante 1 h, à temperatura ambiente, com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e leite em pó desnatado 2% (m/v). Em seguida, elas foram incubadas com o anticorpo primário diluído (1:1000) no tampão bloqueador, por 16 h, sob refrigeração. Após a incubação, as membranas foram lavadas quatro vezes, a intervalos de 10 min, com o mesmo tampão, isento de leite. As membranas foram, então, incubadas com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada com fosfatase alcalina, da Sigma), diluído (1:2000) no tampão bloqueador, por 2 h, à temperatura ambiente, após o que, foram lavadas como anteriormente. A reação foi visualizada após adição do substrato da enzima, composto de um tablete de BCIP/NBT, preparado de acordo com as instruções do fabricante (Sigma Fast). Após o desenvolvimento da cor, as membranas foram lavadas com água grau milli-Q, secadas e guardadas ao abrigo da luz, até serem fotografadas. Provas em branco foram incluídas, substituindo-se o imunossoro pelo soro pré-imune.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 – Purificação da Lectina de *L. Auriculata* Ducke

Este Capítulo descreve a purificação e caracterização físico-química e estrutural da lectina de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata*, uma leguminosa pertencente à tribo *Sophoreae*.

A estratégia de purificação utilizada está sumarizada na TABELA 1. Como pode ser visto, o extrato bruto de cotilédones contém uma quantidade apreciável de lectina. Esta lectina foi quantitativamente purificada (46,4 vezes) a partir de uma fração enriquecida com sulfato de amônio (F<sub>40-60%</sub>), por cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-N-acetil-D-galactosamina, sendo recuperada de forma bastante homogênea com galactose 200 mM (FIGURA 1). A lectina foi completamente adsorvida à matriz como indicado pela ausência de atividade hemaglutinante no pico não retido. Alternativamente, a lectina pode ser purificada em coluna de Goma de Guar, uma matriz de galactomanano. Essas matrizes são rotineiramente utilizadas para obter-se lectinas galactose-específicas com alto grau de pureza (PEREZ, 1995; MORAES *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 1998; CAVADA *et al.*, 1998).

A sigla LAL (*L. auriculata lectin*) foi arbitrariamente adotada para designar a lectina e será doravante empregada na nossa discussão.

O conteúdo de lectina, aproximadamente 112 mg por 100 g de farinha de cotilédones (TABELA 1), foi comparável aos teores de lectinas isoladas de sementes de *Dolichos biflorus* (110 mg de lectina por 100 g de sementes) e *Pisum sativum* (140 mg de lectina por 100 g de sementes) (FREIER *et al.*, 1985). Deve ser ressaltado, no entanto, que a quantidade de lectina em sementes de leguminosas é bastante variado, indo de um valor tão baixo quanto 9 mg de lectina por 100 g de sementes de *Ulex europeus* até 2.100 mg de lectina por 100 g de sementes de *Canavalia ensiformis* (FREIER *et al.*, 1985).

TABELA 1 – Purificação<sup>a</sup> da Lectina de Cotilédones de *Luetzelburgia auriculata*

Fração	Proteína total (mg)	Atividade específica (UH <sup>d</sup> /mgP)	Teor de lectina <sup>b</sup> (µg/mL)	Índice de purificação <sup>c</sup>
Extrato bruto <sup>e</sup>	1416,20 ± 68,47	4,35 ± 0,33	230,76 ± 17,16	1
F <sub>40-60</sub>	269,18 ± 21,08	79,97 ± 6,45	12,56 ± 0,97	18,4
Lectina (LAL) <sup>f</sup>	11,16 ± 0,24	201,72 ± 3,60	4,96 ± 0,09	46,4

<sup>a</sup>Estágios de purificação como descritos em Métodos.

<sup>b</sup>Concentração mínima de lectina capaz de causar aglutinação visível de uma suspensão a 2% de eritrócitos de coelho.

<sup>c</sup>Índice de purificação calculado a partir da razão entre a concentração mínima de proteína do extrato bruto e da fração protéica capaz de causar aglutinação visível.

<sup>d</sup>UH, Unidade de Hemaglutinação.

<sup>e</sup>Extrato bruto preparado a partir de 10 g de farinha de cotilédones.

<sup>f</sup>Lectina isolada por cromatografia de afinidade em gel de Agarose-N-acetil-D-galactosamina.

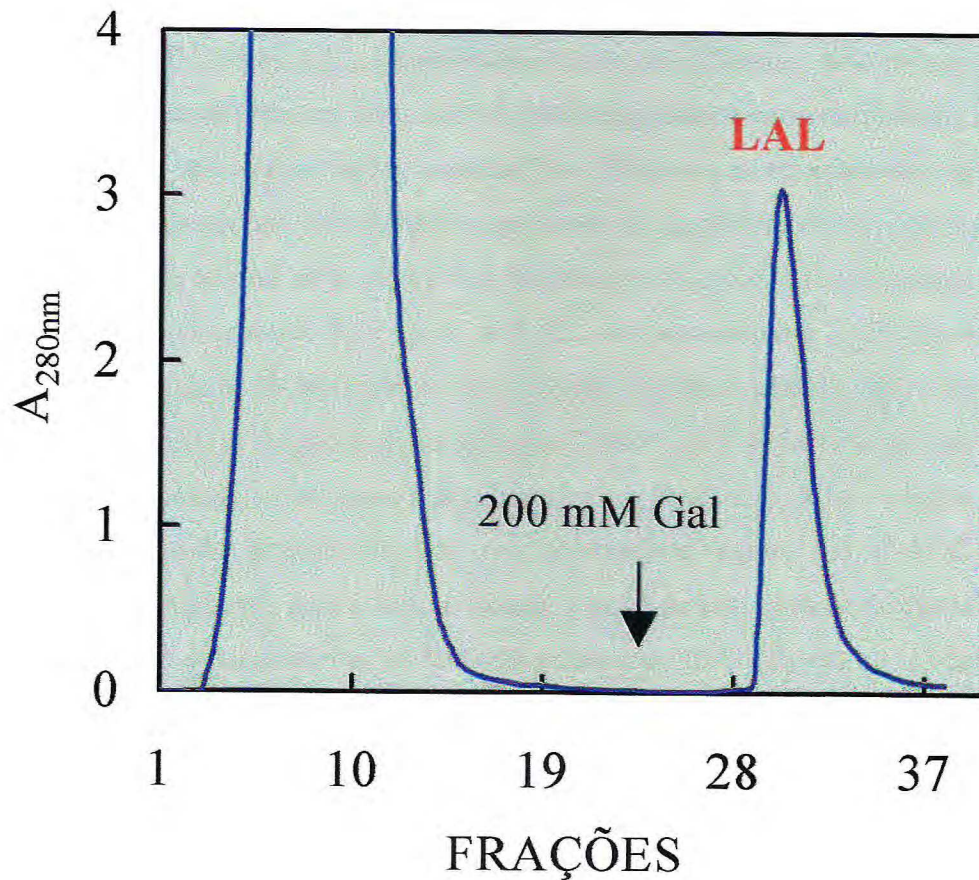


FIGURA 1 – Cromatografia de afinidade em coluna de Agarose-N-acetil-D-galactosamina da F<sub>40-60%</sub> de *L. auriculata*. 250 mg da fração foram dissolvidas em 10 ml de acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo NaCl 150 mM e aplicadas à coluna (2,5 x 5,0 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A lectina (PII) foi eluída com galactose 200 mM incluída no tampão. Foram coletadas frações de 2,5 ml a um fluxo constante de 30 ml/h.



LAL é uma potente aglutinina e essa atividade ocorre instantaneamente frente aos eritrócitos de coelho e humano A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup> e O<sup>+</sup> (TABELA 2). Assim, de acordo com PEUMANS & VAN DAMME (1995), LAL é uma hololectina e deve possuir, pelo menos, dois sítios de ligação a carboidratos. Não foi detectada atividade aglutinante contra eritrócitos nativos de boi, carneiro e cabra, nas concentrações testadas. Essa diferença na atividade hemaglutinante pode ser devido à natureza das glicoproteínas presentes na superfície dessas células, que não são reconhecidas pela lectina ou o são apenas fracamente. A aglutinação de eritrócitos de coelho por uma solução encerrando 9,92 µg/ml de LAL, correspondente a 2 UH, foi inibida por 0,39 mM de ácido N-acetil-D-neuramínico ou N-acetil-D-galactosamina, 12,5 mM de lactose ou melibiose e 50 mM de D-galactose ou rafinose (TABELA 2). A partir desse estudo, é possível concluir que a lectina possui uma afinidade maior por N-acetil-D-galactosamina do que por D-galactose, indicando preferência por um substituinte neutro no C-2. Comportamento semelhante foi observado para a lectina isolada a partir de sementes de *Moluccella laevis*, para a qual N-acetil-D-galactosamina foi 300-600 vezes mais inibitório do que D-galactose (LIS *et al.*, 1988) e para VML (RAMOS *et al.*, 1999). É interessante destacar a grande afinidade de LAL pelo ácido N-acetilneuramínico, um monossacarídeo que não ocorre no reino das plantas, mas é ubíquo em glicoconjugados animais. Várias lectinas de leguminosas demonstram afinidade por este monossacarídeo, como por exemplo, WGA (ZENG & GABIUS, 1992), VML (RAMOS *et al.*, 1999) e a lectina de *Maackia amurensis* (KNIBBS *et al.*, 1991), uma leguminosa que, como *Luetzelburgia*, pertence à tribo *Sophoreae*. A hemaglutinação não foi inibida por D-glucose, N-acetil-D-glucosamina, D-manose ou sacarose, mesmo na concentração de 100 mM (TABELA 2).

Os resultados mostram claramente que a LAL pode ser classificada como galactose/N-acetil-D-galactosamina-específica (LIS & SHARON, 1998).

TABELA 2 – Atividade hemaglutinante da lectina cotiledonária de *L. auriculata* e inibição da hemaglutinação por mono, di- e trissacarídeos

Eritrócitos	Concentração mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	Eritrócitos	Concentração mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>
<i>Humano</i>		<i>Animal</i>	
A <sup>+</sup>	5,52	Coelho	4,96
B <sup>+</sup>	15,62	Boi	ND <sup>b</sup>
O <sup>+</sup>	62,50	Carneiro	ND
		Cabra	ND
Açúcar	Concentração mínima (mM) <sup>c</sup>		
N-acetil-D-galactosamina	0,39		
Ácido N-acetil-neuramínico	0,39		
Lactose	12,5		
D-melibiose	12,5		
D-galactose	50,0		
D-rafinose	50,0		
Sacarose	NI <sup>d</sup>		
D-glucose	NI		
N-acetil-D-glucosamina	NI		
D-manose	NI		

<sup>a</sup> Concentração mínima de proteína capaz de causar aglutinação visível de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2%.

<sup>b</sup> Aglutinação não detectada na concentração de 1 mg/ml da lectina.

<sup>c</sup> Concentração mínima de açúcar requerida para inibir 2 UH.

<sup>d</sup> Não inibiu.

## 5.2 – Caracterização Físico-Química e Estrutural da Lectina de *L. auriculata* Ducke

Por cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G-100, a pH 7,6, LAL foi resolvida num único pico, bem definido, com massa molecular de 123,5 kDa (FIGURA 2; TABELA 3). Esse valor é muito próximo à massa molecular (122-130 kDa) de VML, calculada por ultracentrifugação analítica (CALVETE *et al.*, 1998). Ambas, *L. auriculata* e *V. macrocarpa* pertencem à família *Leguminosae*, sub-família *Papilionoideae*. Entretanto, *L. auriculata* é uma espécie da tribo *Sophoreae* enquanto *V. macrocarpa* pertence à tribo *Dalbergieae*, que evoluiu a partir da *Sophoreae* (CUSTÓDIO, 1991).

É interessante destacar neste momento, que o número de cromossomos encontrado para *L. auriculata*,  $2n=26$  (FIGURA 3), foi o mesmo encontrado para *V. macrocarpa* (CUSTÓDIO, 1991). Surpreendentemente, dentre 60 espécies analisadas da tribo *Dalbergieae*, esse número de cromossomos só foi encontrado para *V. macrocarpa*. Como *Vatairea* é um dos gêneros mais primitivos de sua tribo, o valor encontrado sugere o início de uma série aneuplóide na evolução de *Sophoreae* (CUSTÓDIO, 1991).

Por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, na presença ou ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, LAL apresentou uma banda principal de massa molecular aparente de 28 kDa, e duas outras bandas, bem próximas uma da outra, ao redor de 15 kDa, não ligadas por pontes dissulfeto (FIGURA 4).

A análise das seqüências de aminoácidos N-terminal das bandas de 28 kDa e 15 kDa (banda dupla), revelou que ambas possuem a seguinte seqüência SEVVSFSFTKFNPNQKDII (TABELA 3). Além dessa, foi detectada uma segunda seqüência, KFNQIVAVEEDTDXESQPQ, para a banda de 15 kDa (TABELA 4), comprovando a existência de dois polipeptídeos nesta região.

A seqüência N-terminal da LAL exibe 94% de identidade com VML, a qual, por eletroforese em gel de poliacrilamida, apresenta um padrão de quatro bandas; duas bandas de massas moleculares ao redor de 34 - 32 kDa (cadeias  $\alpha$ ), e dois fragmentos de 22 e 13 kDa, que correspondem às cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente, resultado da clivagem pós-traducional da cadeia  $\alpha$  (CAVADA *et al.*, 1998). As bandas de 34, 32 e 13 kDa de VML possuem seqüências

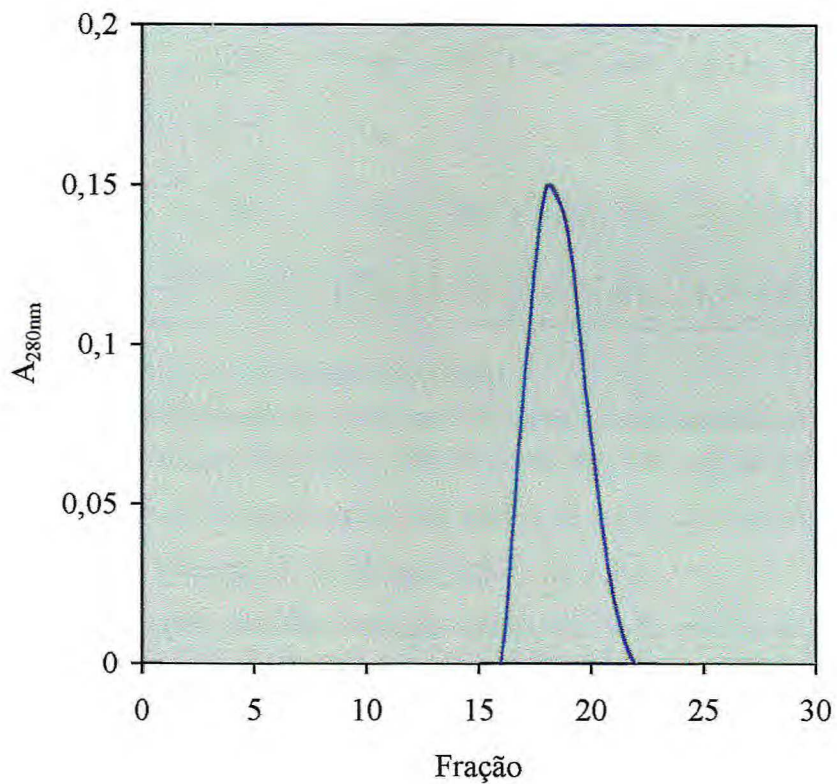


FIGURA 2 – Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100 (1,5 x 90 cm) da lectina de *Luetzelburgia auriculata*. A coluna foi calibrada com os seguintes marcadores de massa molecular: albumina sérica bovina (66,0 kDa); anidrase carbônica (29,0 kDa) e citocromo C (12 kDa). A lectina (2,5 mg/0,5 ml) foi dissolvida em Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e aplicada à coluna previamente equilibrada com o mesmo tampão. O fluxo da cromatografia foi regulado para 24 ml/h, sendo coletados 2 ml por tubo.

TABELA 3 – Propriedades<sup>a</sup> físico-químicas e moleculares da lectina cotiledonária de *L. auriculata*

Propriedades		Composição de aminoácidos (nM%)					
$M_r$ Nativa	123,5 kDa <sup>b</sup>	Asx	13,79 ± 0,32	Val	8,45 ± 0,20	Lys	5,10 ± 0,13
$M_r$ Subunidades	15; 28 kDa	Glx	9,99 ± 0,58	Met	0	Pro	5,51 ± 0,13
Carboidrato (%)	3,2	Trp	2,07 ± 0,02	Ile	4,11 ± 0,09	Arg	1,58 ± 0,40
Ponto isoelétrico	5,8	Ala	6,22 ± 1,07	Leu	6,82 ± 0,13	Ser	12,32 ± 0,28
$\epsilon^{1\%}$ (280 nm) <sup>c</sup>	5,2	Tyr	3,47 ± 0,13	Gly	4,79 ± 0,90	Phe	6,52 ± 0,18
$\Delta G^d$	104,75 kJ/mol	1/2Cys	0,53 ± 0,07	His	1,46 ± 0,18	Thr	7,28 ± 0,23

Seqüência N-terminal: SEVVVSFSFTKFNPNQKDII

<sup>a</sup> Propriedades físico-químicas e moleculares obtidas como descrito em Métodos.

<sup>b</sup> Obtido por cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G-100.

<sup>c</sup> Coeficiente de extinção (280 nm, 1% de lectina, cubeta de 1 cm).

<sup>d</sup> Energia de ativação requerida para desnaturação da lectina de *L. auriculata*.

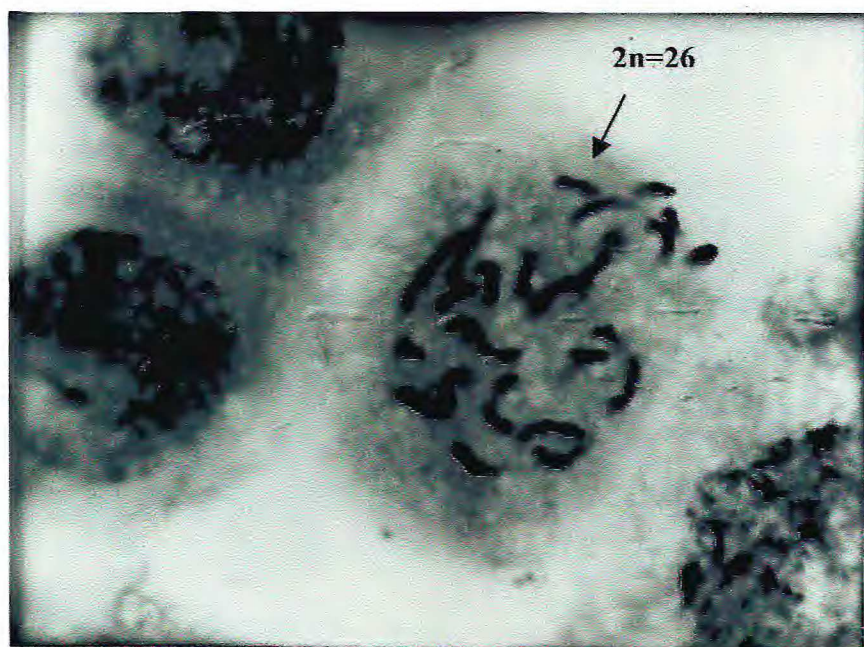


FIGURA 3 – Célula de ponta de raiz de *Luetzelburgia auriculata* em metáfase revelando o número de cromossomos da espécie  $2n=26$ .

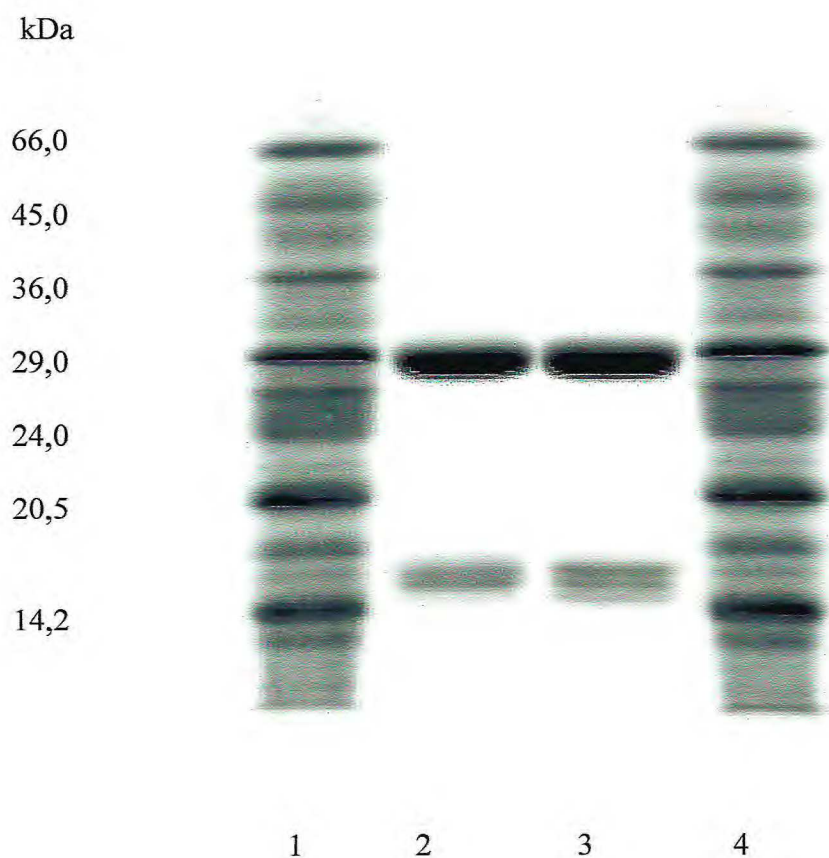


FIGURA 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS da lectina de *Luetzelburgia auriculata* (LAL). Raias 1 e 4- Marcadores de massa molecular. Raia 2 – LAL na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, Raia 3– LAL na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol (10  $\mu$ g/poço).

N-terminal idênticas (SEVVSFSFTKFNPNPKDII), enquanto a banda de 22 kDa (cadeia  $\beta$ ) possui a seguinte seqüência N-terminal KS(I/V)QTVAVEFDT (CALVETE *et al.*, 1998), que apresenta homologia com a segunda seqüência da banda de 15 kDa da LAL.

É interessante destacar que quando as bandas de 28 kDa e 15 kDa (dupla banda) da LAL foram extraídas separadamente do gel de poliacrilamida, dissolvidas com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo NaCl 150 mM e submetidas a ensaio de atividade hemaglutinante, promoveram a aglutinação de eritrócitos de coelho instantaneamente. Esse resultado é uma prova indireta da presença de dois polipeptídeos na banda de 15 kDa, como demonstrado anteriormente pela análise da seqüência de aminoácidos N-terminal. As subunidades reunidas correspondem, portanto, à cadeia principal (cadeia  $\alpha$ ) da lectina.

A partir desses resultados, é possível inferir que como VML, LAL é formada de uma cadeia  $\alpha$  (28 kDa) e de seus fragmentos, cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente.

A seqüência N-terminal da LAL (SEVVSFSFTKFNPNQKDII), também, apresenta homologia com várias outras lectinas de leguminosas, destacando-se aqui aquelas isoladas de sementes de espécies pertencentes à tribo *Sophoreae* tais como *Sophora japonica*, *Cladrastis lutea* e *Maackia amurensis* (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

O alinhamento da segunda seqüência N-terminal da LAL (banda de 15 kDa) com seqüências polipeptídicas internas de lectinas de leguminosas mostra claramente a conservação de vários resíduos de aminoácidos (TABELA 4).

A partir da homologia de seqüência de vários grupos de lectinas vegetais foi formulada a hipótese de que essas lectinas, independentemente de suas especificidades por carboidratos, devem ter preservado suas estruturas primárias durante a evolução por exercerem funções específicas e de grande importância para o metabolismo geral da planta (ROUGÉ *et al.*, 1987).

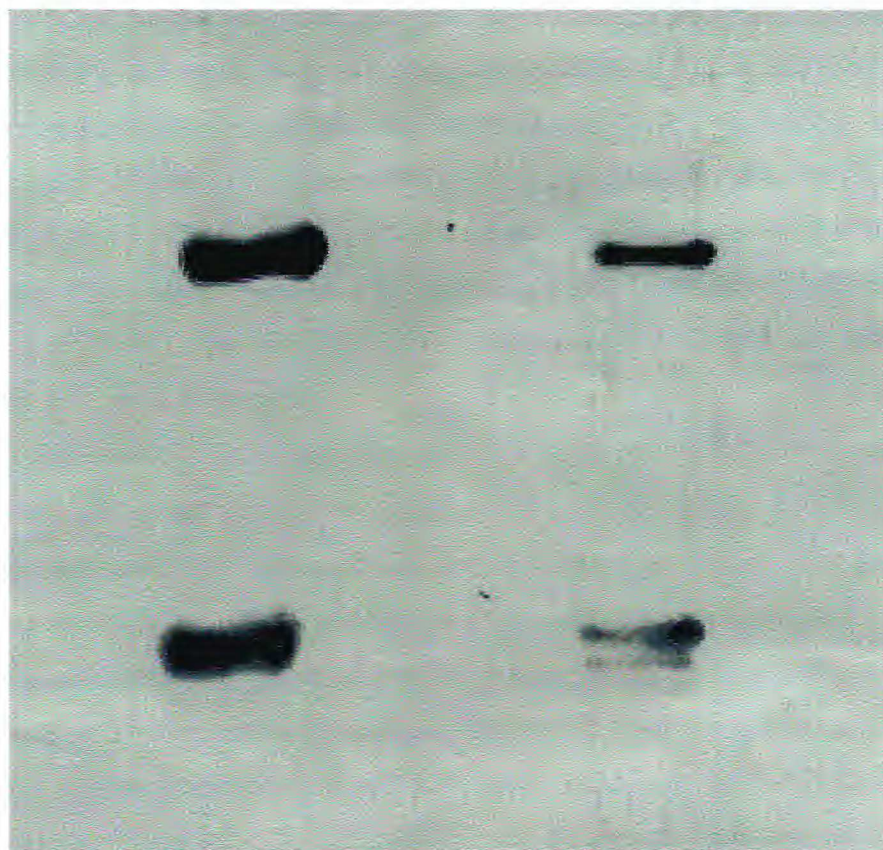
Tendo em mente as semelhanças entre LAL e VML, não surpreendentemente, o anticorpo policlonal anti-LAL reconheceu VML, como mostrado por *Western blotting* (FIGURA 5). De forma semelhante, os anticorpos anti-lectina e anti-subunidades reagiram, indiscriminadamente, com a lectina e com as suas subunidades.

Assim, considerando a massa molecular, o número de subunidades e a seqüência N-terminal, podemos sugerir que a LAL é um homotetrâmero de 123,5 kDa, composta de uma cadeia intacta de 28 kDa e de seus fragmentos.



TABELA 4 – Comparação da seqüência de aminoácidos N-terminal da banda de 15 kDa da lectina de *Luetzelburgia auriculata* (LAL) com seqüências polipeptídicas internas de lectinas de sementes de *Vatairea macrocarpa* (Vm), *Maackia amurensis* (Maa), *Ulex europaeus* (Uea), *Griffonia simplicifolia* (GS-IV), *Robinia pseudoacacia* (Rp), *Sophora japonica* (Sj) e *Erythrina variegada* (Ev).

LAL 15 kDa	1	K F N Q I V A V E E D T D X E S Q P Q
Vm (cadeia-β)	116	K S V Q T V A V E F D T
Maa	121	N Q I V A V E D T
Uea	120	N Q I I A V E D T
GS-IV	123	N Q V V A V E D T
Rp	150	N Q I V A V E D T
Sj	158	Q I I A V D D T
Ev	122	Q T L A V E D T



LAL

VML

FIGURA 5 – *Western blot* das lectinas de *Luetzelburgia auriculata* (LAL) e *Vatairea macrocarpa* (VML), revelado com anticorpo anti-LAL.

A estrutura quaternária da LAL foi drasticamente influenciada pelo pH, quando examinada por filtração em gel, apresentando-se em forma monomérica a pH 3,0, dimérica a pH 5,0 e tetramérica a pH 7,6 (FIGURA 6). Acima de pH 7,6, observou-se um decréscimo na massa molecular, provavelmente devido a alterações na forma espacial da lectina e não na associação, *per si*, da subunidade principal e seus fragmentos. A oligomerização dependente de pH tem sido relatada para várias lectinas de leguminosas (CALVETE *et al.*, 1999).

Por cromatografia de exclusão molecular a pH 7,6, VML exibiu uma estrutura predominantemente dimérica (70 kDa), embora tetrâmero e grandes agregados também tenham sido observados (CAVADA *et al.*, 1998). Por ultracentrifugação analítica, entretanto, VML apresentou uma forma tetramérica, de 122-130 kDa, a qualquer valor de pH entre 2,5 e 8,5 (CALVETE *et al.*, 1998). Essa discrepância de resultados pode ser atribuída as características intrínsecas das técnicas empregadas.

Os resultados demonstram que embora LAL e VML guardem muitas semelhanças, suas diferenças estruturais, ainda que porventura pequenas, são suficientes o bastante para justificar seus diferentes processos de oligomerização, sob as mesmas condições hidrogeniônicas. Essa possibilidade vem à tona quando se analisam os comportamentos da ConA e da ConBr. Embora estas duas lectinas difiram em apenas três resíduos de aminoácidos, os monômeros da ConBr se associam em dímeros e tetrâmeros de maneira diferente da ConA. Enquanto a ConA apresenta-se como um dímero homogêneo a pH 5,0 (AGRAWALL & GOLDSTEIN, 1968) e um tetrâmero a pH acima de 7,0 (KALB & LUSTIG, 1968), a massa molecular da ConBr aumenta continuamente com o aumento do pH (GRANGEIRO *et al.*, 1997).

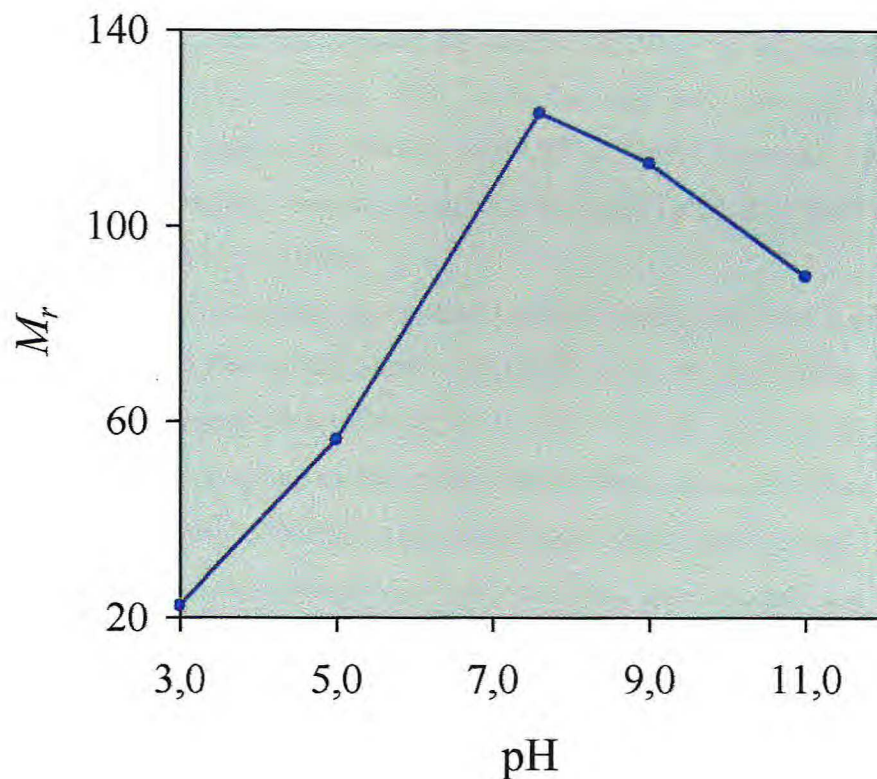


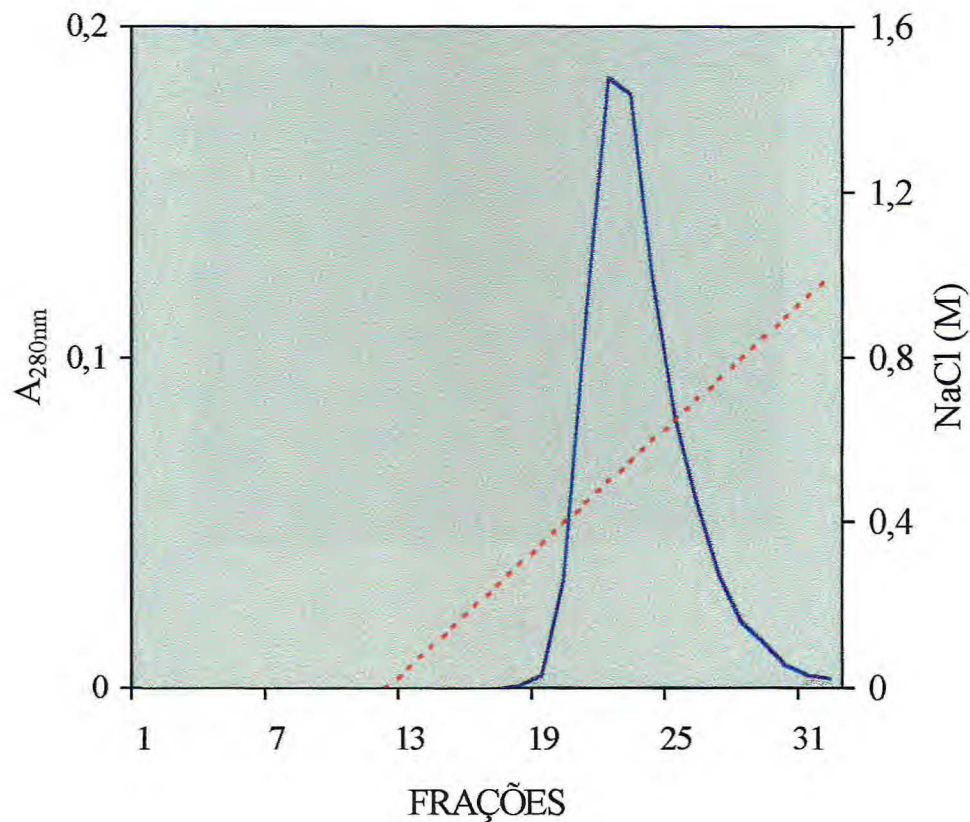
FIGURA 6 – Oligomerização dependente de pH da lectina de *Luetzelburgia auriculata* determinada por filtração em coluna de Superdex 200 HR 10/30. A lectina foi dissolvida nos seguintes tampões: glicina-HCl, pH 3,0; acetato de sódio, pH 5,0; Tris-HCl, pH 7,6; glicina-NaOH, pH 9,0 e fosfato de sódio, pH 11,0, todos contendo NaCl 150 mM. Foram aplicados 250  $\mu$ l de amostra (3 mg/ml) e o fluxo foi ajustado para 30 ml/h sendo coletados 2 ml por tubo.

LAL contém um alto teor de aminoácidos ácidos e hidrofóbicos, sendo, entretanto, pobre em aminoácidos sulfurados (TABELA 3). Este perfil de aminoácidos é característico da maioria das lectinas de leguminosas (MORAES *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 1998).

O ponto isoelétrico ( $pI=5,8$ ) está de acordo com o alto teor de aminoácidos ácidos presentes na molécula e com a observação de que quando a proteína foi tamponada com 50 mM de acetato de sódio, pH 4,0, e aplicada à matriz de CM-celulose, foi completamente adsovida e eluída como um único pico a 520 mM de NaCl (FIGURA 7). Valores ácidos de  $pI$  têm caracteristicamente sido encontrados para várias lectinas galactose-específicas, tais como aquelas isoladas de sementes de *Erythrina* (BHATTACHARYYA *et al.*, 1986; MORAES *et al.*, 1996), *Maclura pomifera*, *Sophora japonica* (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986) e de *V. macrocarpa* (CAVADA *et al.*, 1998).

LAL é uma glicoproteína como revelado por coloração com o ácido periódico de Schiff (FIGURA 8) e contém 3,2% de carboidratos (DUBOIS *et al.*, 1956) (TABELA 3). Como LAL, muitas lectinas são glicoproteínas (SHARON & LIS, 1989) e, portanto, apresentam cadeias glicídicas ligadas covalentemente a resíduos de aminoácidos, como acontece com as lectinas de soja (DESSEN *et al.*, 1995) e *Erythrina coralloidendron* (SHAANAN *et al.*, 1991). Outras, são glicoproteínas em sua forma pré-nativa, como a ConA, mas perdem sua porção glicídica durante o processamento (BOWLES *et al.*, 1986), sendo esse passo essencial para a atividade da lectina.

LAL foi relativamente estável ao calor, preservando 100% de sua atividade hemaglutinante quando tratada a 60 °C por 25 min. Entretanto, a 80 °C a atividade foi completamente abolida dentro de 5 min. A energia de ativação do processo de desnaturação ( $\Delta G^\circ$ ) para LAL foi estimada em 104,75 kJ/mol (TABELA 3), que corresponde a valores encontrados para as lectinas galactose-específicas isoladas de *Erythrina velutina* forma *aurantiaca* (104,08 kJ/mol) (MORAES *et al.*, 1996), *Artocarpus incisa* (99,81 kJ/mol) (MONTEIRO, 1998) e *V. macrocarpa* (108,81 kJ/mol) (CAVADA *et al.*, 1998), tratadas sob as mesmas condições.



**FIGURA 7** – Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-celulose (2,1 x 17,0 cm) da lectina de *L. auriculata*. A amostra (1 mg/ml) foi dissolvida em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 e aplicada à coluna previamente equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi inicialmente percolada com o tampão de equilíbrio, após o que foi aplicado um gradiente linear de NaCl (0-1 M) para eluição do material retido. O fluxo foi ajustado para 20 ml/h sendo coletadas frações de 2 ml.

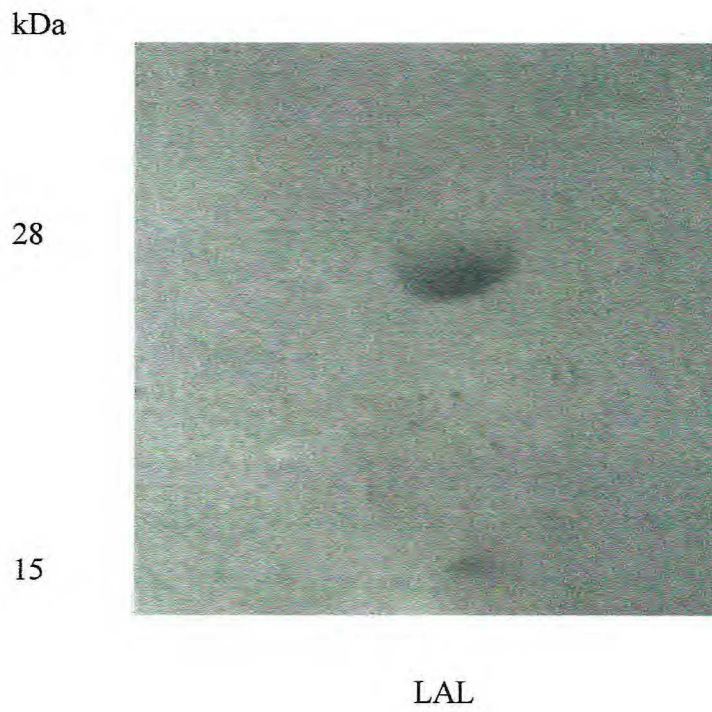


FIGURA 8 – Eletroforese em gel de poliacrilamida da lectina de *L. auriculata* (20 µg/poço) corado com ácido periódico de Schiff.

O espectro de absorção de uma solução aquosa de LAL, encerrando 1 mg/ml, revelou uma absorção máxima a 280 nm (FIGURA 9). O coeficiente de extinção,  $\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}} = 5,2$ , calculado ficou muito próximo,  $\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}} = 5,6$ , ao encontrado para a VML (CAVADA *et al.*, 1998). Na presença de galactose, mas não de glucose, que não é capaz de inibir a lectina, houve um aumento no coeficiente de extinção ( $\epsilon^{1\%}_{1\text{cm}} = 8,6$ ), indicando que o triptofano e/ou tirosina tomam parte ou estão próximos ao sítio de ligação a carboidratos. Resultado semelhante foi encontrado para a lectina de *Phytolacca americana* (PL-D1), após adição do seu ligante (YAMAGUCHI *et al.*, 1996).

O espectro de dicroísmo circular (CD) da LAL caracteriza-se por uma banda negativa com mínimo próximo a 228 nm, uma banda positiva máxima a 196 nm e uma passagem do negativo para positivo a 210 nm (FIGURA 10). Este perfil é característico de uma proteína não helicoidal. De fato, o conteúdo de estrutura secundária da LAL foi estimado em: 1% de  $\alpha$ -hélice, 5% de folhas- $\beta$  paralelas, 43% de folhas- $\beta$  antiparalelas, 14% de volta- $\beta$ , e 37% de estrutura não ordenada e outras contribuições (resíduos aromáticos e pontes dissulfeto), com um desvio médio quadrático (RMS) de 1%. Esse alto conteúdo de folhas- $\beta$  antiparalela e praticamente ausência de  $\alpha$ -hélice, tem sido encontrado para outras lectinas de leguminosas (MONTEIRO, 1998; BELTRAMINI *et al.*, 2000), sugerindo ser uma característica comum entre elas.

O espectro de fluorescência revelou que a excitação de uma solução da LAL a 290 nm produz uma emissão na região de 285-445 nm, com emissão máxima,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{emis}}$ , em 334,5 nm (Figura 11), o que é típico de contribuições de resíduos de triptofano enterrados no interior da molécula (EFTINK, 1991; BURSTEIN *et al.*, 1973). Isto sugere que a lectina esteja na sua forma nativa, pois o triptofano, sendo um aminoácido hidrofóbico, encontra no interior da proteína o seu ambiente natural.



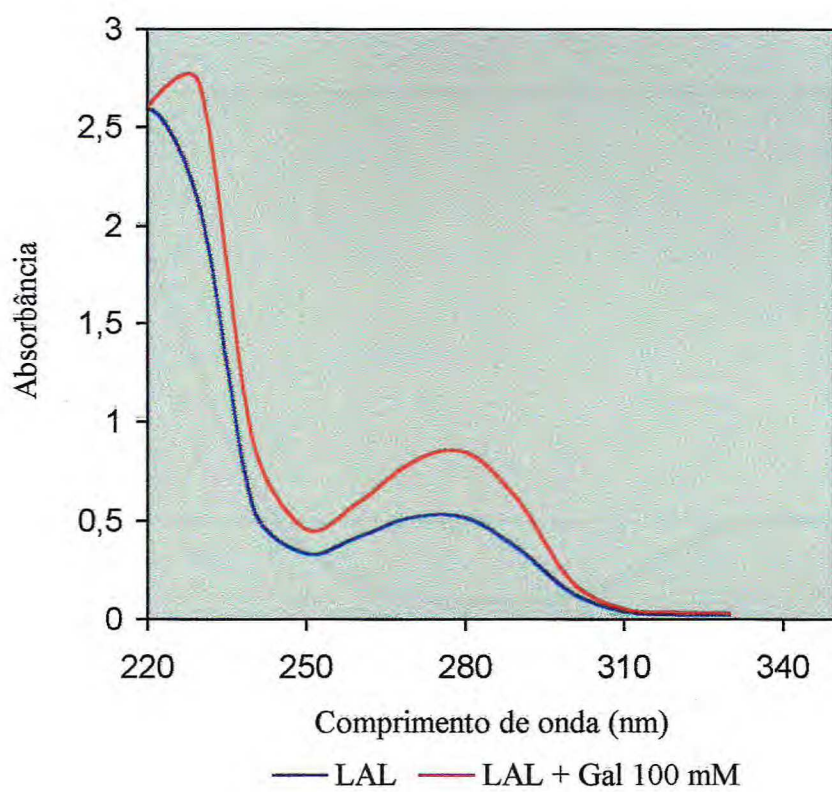


FIGURA 9 – Espectros de absorção da lectina de *Luetzelburgia auriculata* na ausência (LAL) e presença de galactose (LAL + Gal 100 mM). As absorbâncias das amostras (1 mg/ml) foram registradas na faixa de 230 a 330 nm.

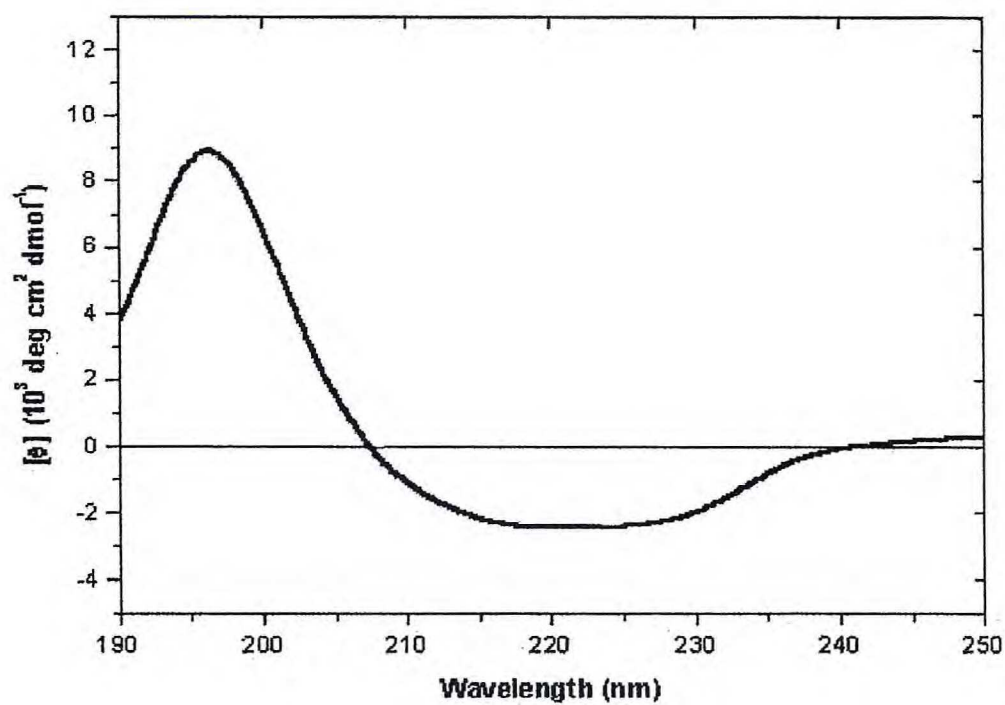


FIGURA 10 – Espectro de dicroísmo circular da lectina de *L. auriculata* nativa dissolvida em água (0,085 mg/ml). O espectro foi registrado entre 185 e 260 nm.

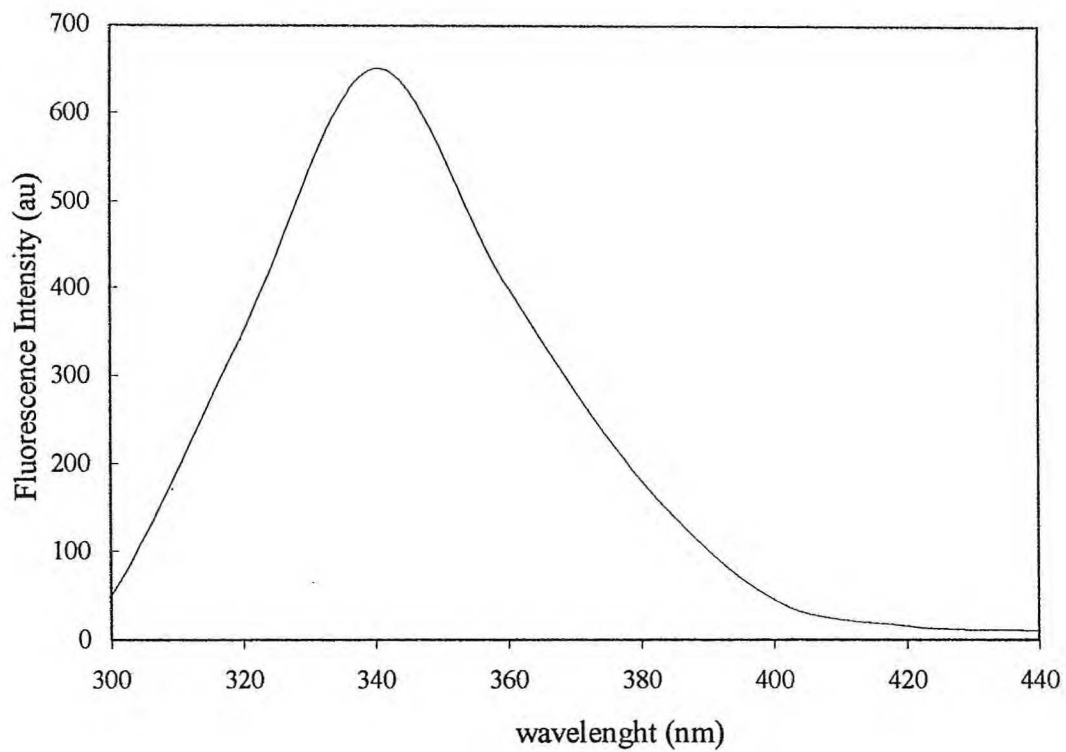


FIGURA 11 – Espectro de emissão de fluorescência da lectina de *L. auriculata* nativa dissolvida em água (0,085 mg/ml). A amostra foi excitada a 290 nm e o espectro registrado na faixa de 300 a 440 nm.

## 6 – CONCLUSÕES

Os cotilédones da leguminosa *Luetzelburgia auriculata* Ducke (*Sophoreae*) contêm uma hololectina galactose/N-acetil-D-galactosamina-específica, formada pela associação não covalente de sua subunidade principal (cadeia  $\alpha$ , 28 kDa) e dos seus fragmentos (cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ ). Sua unidade monomérica (28 kDa) se associa em dímeros e tetrâmeros de maneira dependente do pH, assumindo uma conformação homotetramérica de 123,5 kDa, a pH 7,6.

A lectina de *L. auriculata* apresenta várias características comuns as lectinas de leguminosas, como a natureza glicoprotéica, perfil de aminoácidos, coeficiente de extinção, estabilidade térmica e estrutura secundária, predominantemente de folhas- $\beta$ . Esta lectina apresenta grande homologia com a lectina galactose-específica, isolada de *Vatairea macrocarpa*, uma leguminosa pertencente à tribo aparentada, *Dalbergieae*.

A seqüência de aminoácidos N-terminal da LAL guarda homologia com as seqüências N-terminais das outras lectinas isoladas de espécies da tribo *Sophoreae*, as quais estão na base da árvore filogenética das leguminosas papilionóideas, sugerindo que ao longo da especiação muitas características foram conservadas, evidenciando um importante papel fisiológico para essa classe de proteínas.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAR, R., SHARON, S. Mutational studies of the amino acid residues in the combining site of *Erythrina corallodendron* lectin. **Eur. J. Biochem.**, v. 239, p. 668-674, 1996.

AGRAWAL, B. B. L., GOLDSTEIN, I. J. Protein-carbohydrate interaction. VII. Physical and chemical studies on concanavalin A, the hemagglutinin of the jack bean. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 124, p. 218-229, 1968.

AINOUZ, I. L., MOREIRA, R. A., CAMPOS, F. A. P., RICHARDSON, M., BEGBIE, R., STEWART, J. C., WATT, W. B., PUSZTAI, A. The isolation and amino acid sequence of the beta and gama subunits of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*. **Phytochem.**, v. 26, n. 5, p. 1435-1440, 1987.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucl. Acid Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARANGO, R., RODRÍGUEZ-ARANGO, E., ADAR, R., BELENKY, D., LOONTIENS, F. G., ROZENBLATT, S., SHARON, N. Modification by side-directed mutagenesis of the specificity of *Erythrina corallodendron* lectin for galactose derivatives with bulky substituents at C-2. **FEBS**, v. 330, n. 2, p. 133-136, 1993.

BANERJEE, R., DAS, K., RAVISHANKAR, R., SUGUNA, K., SUROLIA, A., VIJAYAN, M. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. **J. Mol. Biol.**, v. 259, p. 281-296, 1996.

BECKER, J. W., REEKE, G. N. J. R., WANG, J. L., CUNNINGHAM, B. A., EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **J. Biol. Chem.**, v. 250, n. 4, p. 1513-1524, 1975.

BELTRAMINI, L. M., MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O., MOREIRA, R. A. Secondary structure and fluorescence emission of lectins from the sub-tribe *Diocleinae* (*Leguminosae* - *Phaseolae*). 2000, (submitted).

BHATTACHARYYA, L., GHOSH, A., SEM, A. A comparative study on lectins from four *Erythrina* species. **Phytochem.**, v. 25, p. 2117-2122, 1986.

BOWLES, D. J., MARCUS, S. E., PAPPIN, D. J. C., FINDLAY, J.B.C., ELIOPOULOS, E., MAYCOX, P. R., BURGESS, J. Posttranslational processing of concanavalin A precursors in jackbean cotyledons. **J. Cell Biol.**, v.102, p.1284-1297, 1986.

BOYD, W. C., SHAPLEIGH, E. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). **Blood**, v. 9, p. 1195-1198, 1954.

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.

BROEKAERT, W. F., VAN PARIJS, J., LEYNS, F., OJOS, H., PEUMANS, W. J. A chitin-binding lectin from stinging rhizomes with antifungal properties. **Science**, v. 245, p. 1100-1102, 1989.

BURSTEIN, E. A., VEDENKINA, N. S., IVKOVA, M. N. Fluorescence and location of tryptophan residues in protein molecules. **Photochem. Photobiol.**, v. 18, n. 4, p. 263-279, 1973.

CALVETE, J. J., SANTOS, C. F., MANN, K., GRANGEIRO, T. B., NIMTZ, M., URBANKE, C., CAVADA, B. S. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. **FEBS Lett.**, v. 425, p. 286-292, 1998.

CALVETE, J. J., THOLE, H. H., RAIDA, M., URBANKE, C., ROMERO, A., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., ALMEIDA DA ROCHA, I. M., GUIMARÃES, F. N., CAVADA, B. S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1430, p. 367-375, 1999.

CÂMARA, M. F. L. **Lectinas de *Luetzelburgia auriculata* Ducke: Purificação, caracterização parcial e estudos de mobilização durante o desenvolvimento da plântula.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará – Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, 1994. 119 p.

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., SANTOS, C. F., GRANGEIRO, T. B., NUNES, E. P., SALES, P. V. P., RAMOS, R. L., DE SOUZA, F. A. M., CRISOSTOMO, C. V., CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochem.**, v.49, n. 3, p. 675-680, 1998.

CREIGHTON, T. E. **Proteins: Structure and Molecular Properties**. 2 ed. NY: Freeman, W. H. and Company, 1993, 507 p.

CUNNINGHAM, B. A., WANG, J. L., WAXDAL, M. J., EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F<sub>2</sub>. **J. Biol. Chem.**, v. 250, n. 4, p. 1503-1512, 1975.

CUSTÓDIO, A. V. C. **Citoevolução em leguminosas**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia, 1991. 196 p.

DELBAERE, L. T. J., VANDONSELAAR, M., PRASAD, L., QUAIL, J. W., WILSON, K. S., DAUTER, Z. Structures of the lectin IV of *Griffonia simplicifolia* and its complex with the Lewis b human blood group determinant at 2.0 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 230, p. 950-965, 1993.

DESSEN, A., GUPTA, D., SABESAN, S., BREWER, C.F., SACCHETTINI, J.C. X-ray crystal structure of soybean agglutinin cross-linked with a biantennary analog of blood group I carbohydrate antigen. **Biochem.**, v. 34, p. 4933-4942, 1995.

DIAZ, C. L., MELCHERS, L. S., HOOYKAAS, P. J. J., LUGTENBERG, E. J. J., KIJNE, J. W. Root lectins as a determinant of host-plant specificity in *Rhizobium*-legume symbiosis. **Nature**, v. 338, p. 579-581, 1989.

DUBOIS, M., GILLES K. A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.



DUCKE, A. **Estudos Botânicos no Ceará**. Mossoró – RN: Escola Superior de Agricultura, 1979. 104 p. (Coleção Mossoroense, v. 90)

EDELMAN, G. M., WANG, J. L. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 9, p. 3016-3022, 1978.

EFTINK, M. R. Fluorescence techniques for studying protein structure. In: **Methods of Biochemical Analysis: Protein Structure Determination**. London: John Wiley & Sons, 1991. p. 128-205.

FELSTED, R. L., LEAVITT, R. D., CHEN, C., BACHUR, N. R., DALE, R. M. K. Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 668, p. 132-140, 1981.

FORIERS, A., DE NEVE, R., STROSBERG, A.D. Lectin sequences as a tool for chemotaxonomic classification. **Physiol. Veg.**, v. 17, p. 597-606, 1979.

FREIER, T., FLEISCHMANN, G., RUDIGER, H. Affinity chromatography on immobilized hog gastric mucin and ovomucoid. A general method for the isolation of lectins. **Biol. Chem.**, v. 366, p. 1023-1028, 1985.

GOLDSTEIN, I. J., HAYES, C. E. The lectins: carbohydrate binding proteins of plant and animals. **Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.**, v. 35, p. 127-340, 1978.

GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

GOLDSTEIN, I. J., PORETZ, R. D. Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I. E., SHARON, N., GOLDSTEIN, I. J. **The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine**. Orlando: Academic Press, 1986. 600 p.

GOODWIN, T.W., MORTON, R. A. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. **Biochem. J.**, v. 40, p. 628-632, 1946.

GRANGEIRO, T. B. **Clonagem, sequenciamento e expressão do gen da lectina (Con Br) de sementes de *Canavalia brasiliensis***. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, 1996. 133 p.

GRANGEIRO, T. B., SCHRIEFER, A., CALVETE, J. J., RAIDA, M., URBANKE, C., BARRAL-NETO, M., CAVADA, B. S. Molecular cloning and characterization of Con Br, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **Eur. J. Biochem.**, v. 248, p. 43-48, 1997.

GUERRA, M. S. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988, 144 p.

HAMELRYCK, T. W., DAO-THI, M., POORTMANS, F., CHRISPEELS, M. J., WYNY, L., LORIS, R. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 20479-20485, 1996.

HANKINS, C. N., KINDINGER, J. I., SHANNON, L. M. The lectins of *Soph japonica*. I. Purification, properties and N-terminal amino acid sequences of two lectins from leaves. **Plant Physiol.**, v. 83, p. 825-829, 1987.

HANKINS, C. N., KINDINGER, J. I., SHANNON, L. M. The lectins of *Soph japonica*. II. Purification, properties and N-terminal amino acid sequences of five lectins from bark. **Plant Physiol.**, v. 86, p. 67-70, 1988.

HARDMAN, K. D., AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochem.**, v. 11, n. 26, p. 4910-4919, 1972.

HARDMAN, K. D., AGRAWAL, R. C., FREISER, M. J. Manganese and calcium binding sites of concanavalin A. **J. Mol. Biol.**, v. 157, p. 9-86, 1982.

KALB, A. J., LUSTIG, A. The molecular mass of concanavalin A. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 168, p. 366-367, 1968.

KNIBBS, R. N., GOLDSTEIN, I. J., RATCLIFFE, R. M., SHIBUYA, N. Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leukoagglutinin from *Maackia amurensis*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 83-88, 1991.

KOCOUREK, J., HOREJSI, V. Defining a lectin. **Nature**, v. 290, p.188, 1981.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LIS, H., LATTEK, H., ADAR, R., SHARON, N. Isolation of 2 blood type-A and type-N specific isolectins from *Molucella laevis* seeds. **FEBS Lett.**, v. 233, n. 1, p. 191-195, 1988.

LIS, H., SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.**, v. 98, p.637-674, 1998.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. São Paulo: Plantarum, 1984, v.1, 352 p.

LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J., WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1383, p. 9-36, 1998.

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

MALIARIK, M., GOLDSTEIN, I. J. Photoaffinity labeling of the adenine binding site of the lectins from lima beans, *Phaseolus lunatus*, and kidney bean, *P. vulgaris*. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 23, p.11274- 11279, 1988.

MARCOS, M. J., VILLAR, E., GAVILANES, F., ZHADAN, G. G., SHNYROV, V. L. Compact residual structure in lentil lectin at pH 2. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 2127-2132, 2000.

MIN, W., DUNN, A. J., JONES, D. H. In vitro splicing of con A is catalysed by asparaginyl endopeptidase. **Nature Struct. Biol.**, v. 1, p. 502-504, 1994.

MONTEIRO, A C O. **Características químicas, fisico-químicas e estruturais da frutalina, uma lectina D-galactose ligante de *Artocarpus incisa***. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, 1998. 151 p.

MORAES, S. M. D., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., ROQUE-BARREIRA, M. C., SANTOS-DE-OLIVEIRA, R., PINTO, V. P. T., OLIVEIRA, J. T. A. Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* f. *aurantiaca* seeds. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v, 29, p. 977-985, 1996.

MOREIRA, R. A., PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol.**, v. 59, p. 783-787, 1977.

MOREIRA, R. A., BARROS, A. C. H., STEWART, J. C., PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* Mart. **Planta**, v. 158, p. 63-69, 1983.

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. II, p. 211-218, 1991.

MOREIRA, R. A., CASTELO-BRANCO, C. C., MONTEIRO, A. C. O., TAVARES, R. O., BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochem.**, v. 47, p. 1183-1188, 1998.

NAGAHORA, H., HARATA, K., MURAKI, M., JIGAMA, Y. Site-directed mutagenesis and sugar-binding properties of the wheat germ agglutinin mutants Tyr 73 Phe and Phe 116 Tyr. **Eur. J. Biochem.**, v. 233, p. 27-34, 1995.

NICHOLSON, G. L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. **Int. Rev. Cytol.**, v. 39, p. 89-190, 1974.

NISHIGUCHI, M., YOSHIDA, K., SUMIZONO, T., TAZAKI, K. Studies by site-directed mutagenesis of the carbohydrate-binding properties of a bark lectin from *Robinia pseudoacacia*. **FEBS Lett.**, v. 403, p. 294-298, 1997.

PEREZ, G. Purification and characterization of a lectin from the seeds of *Erythrina costaricensis*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 27, p. 857-863, 1995.

PETERS, B. P., EBISU, S., GOLDSTEIN, I. J., FLASHNER, M. Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. **Biochem.**, v.18, p. 5505-5511, 1979.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v. 109, p. 347-352, 1995.

PIO CORREA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1974. v. 5, 393 p.

PORETZ, R. P., RISS, H., TIMBERLAKE, J. W., CHIEN, S. Purification and properties of the hemagglutinin from *Soph japonica* seeds. **Biochem.**, v. 13, p. 256, 1974.

PRABU, M. M., SANKARANARAYANAN, R., PURI, K. D., SHARMA, V., SUROLIA, A., VIJAYAN, M., SUGUNA, K. Carbohydrate specificity and quaternary association in basic winged bean lectin: X-ray analysis of the lectin at 2.5 Å. **J. Mol. Biol.**, v. 276, p. 787-796, 1998.

PRABU, M. M., SUGUNA, K., VIJAYAN, M. Variability in quaternary association of proteins with the same tertiary fold: a case study and rationalization involving legume lectins. **Proteins**, v. 35, p. 58-69, 1999.

PUSZTAI, A., EWEN, S. W. B., GRANT, G., PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M., RUBIO, L. A., BARDOCZ, S. Plant (food) lectins as signal molecules: effects on the morphology and bacterial ecology of the small intestine. In: KILPATRICK, D. C., VAN DRIESSCHE, E., BOG-HANSEN, T. C. **Lectin Reviews**. USA, 1991. v. 1, p. 1-15.

RAMOS, M. V., CAVADA, B. S., CALVETE, J. J., SAMPAIO, A. H., MAZARD, A. M., BARRE, A., GRANGEIRO, T. B., FREITAS, B. T., LEITE, K. B., ROUGÉ, P. Specificity of the *Vatairea macrocarpa* lectin towards glycans exhibiting exposed Gal/GalNac residues. **Protein. Pep. Lett.**, v. 6, n. 3, p. 163-171, 1999.

RICHARDSON, M., CAMPOS, F. A. P., MOREIRA, R. A., AINOUIZ, I. L., BEGBIE, R., WATT, W. B., PUSZTAI, A. The complete amino acid sequence of the major alfa subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* Mart. **Eur. J. Biochem.**, v. 144, p. 101-111, 1984.

RINI, J. M. Lectin structure. **Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 24, p. 551-557, 1995.

RIOS, F. J. B., CAVADA, B. S., MEDEIROS, D. A., MOREIRA, R. A., VASCONCELOS, I. M., OLIVEIRA, J. T. A. Digestibility of plant lectins from *Canavalia*, *Cratylia*, *Dioclea* and *Artocarpus* genera. In: VAN DRIESSCHE, E., ROUGE, P., BEECKMANS, S., BOG-HANSEN, T. C. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**: 1996. v. 11, p. 277-284.

ROUGÉ, P., RICHARDSON, M., RANFAING, P., YARWOOD, A., CAVADA, B. S. Single- and two- chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. **Biochem. Systemat. Ecol.**, v. 15, n. 3, p. 341-348, 1987.

ROUGÉ, P., PÈRE, D., BOURNE, Y., CABBILLAU, C. In vitro cleavage of the *Lathyrus nissolia* isolectin. **Plant Sci.**, v. 62, p.181-189, 1989.

ROUGÉ, P., PÈRE, D., BOURNE, Y., CABBILLAU, C., RICHARDSON, M. Single and two chain lectins: A revisited question. In: KOCOUREK, J., FREED, D.I.J. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**: 1990. v. 7, p. 105-112.

ROUGÉ, P., CAMBILLAU, C., BOURNE, Y. The three-dimensional structure of legume lectins. In: KILPATRICK, D. C., VAN DRIESSCHE, E., BOG-HANSEN, T. C. **Lectins Reviews: USA**, 1991. v. 1, p. 143-159.

ROUGÉ, P., BARRE, A., CHATELAIN, C., PORTHÉ, G. Leguminous lectins as phenetic and phylogenetic tools. **Adv. Lectin Res.**, v. 5, p. 95-122, 1992.

RUDIGER, H. Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta Anat.**, v. 161, p. 130-152, 1998.

SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J., GRANGEIRO, T.B., CALVETE, J. J., CAVADA, B. S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties form Concanavalin A. **FEBS Lett.**, v. 405, p. 114-118, 1997.

SEQUEIRA, L., GRAHAM, T. L Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 11, p. 43-54, 1977.

SHAANAN, B., LIS, H., SHARON, N. Structure of a lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose. **Science**, v. 254, p. 862-866, 1991.

SHARMA, V., SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: Size of the combining site loops and their primary specificity. **J. Mol. Biol.**, v. 267, p. 433-445, 1997.



SHARMA, V., SRINIVAS, V. R., ADHIKARI, P., VIJAYA, M., SUROLIA, A. Molecular basis of recognition by Gal/GalNac specific legume lectins: influence of Glu 129 on the specificity of peanut agglutinin (PNA) towards C2-substituents of galactose. **Glicobiol.**, v. 8, p. 1007-1012, 1998.

SHARON, N., LIS, H. **Lectins**. NY: Chapman and Hall, 1989, 127p.

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

SPACKMAN, D. H., STEIN, N. H., MOORE, E. S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Anal. Chem.**, v. 30, p. 1190-1198, 1958.

SREERAMA, N., WOODY, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular-dichroism. **Anal. Biochem.**, v. 209, n. 1, p. 32-44, 1993.

STROSBERG, A. D., BUFFARD, D., LAUWEREYS, M., FORIERS, A. Legume lectins, a large family of homologous proteins. In: LIENER, I. E., SHARON, N., GOLDSTEIN, I. J. **The Lectins, Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**: Orlando, Academic Press, 1986, p.249-264.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 76, n. 9, p. 345-4354, 1979.

VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., BEMER, V., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W. J. A lectin and a lectin-related protein are the most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). **Plant Mol. Biol.**, v. 29, p. 579-598, 1995.

VAN DAMME, E. J. M., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W. J. Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. **Glycoconj. J.**, v. 14, n. 4, p. 449-456, 1997.

VAN EIJSDEN, R. R., HOEDEMAEKER, F. J., DIAZ, C. L., LUGTENBERG, B. J., DePATER, B. S., KIJNE, J. W. Mutational analysis of pea lectin. Substitution of Asn125 for Asp in the monosaccharide-binding site eliminates mannose/glucose binding activity. **Plant. Mol. Biol.**, v. 20, p. 1049-1058, 1992.

VAN EIJSDEN, R. R., DE PATER, B. S., KIJNE, J. W. Mutational analysis of the sugar-binding site of pea lectin. **Glycoconj. J.**, v. 11, p. 375-380, 1994.

VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W. F., GOLDSTEIN, I. J., PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p.258-264, 1991.

VASCONCELOS, I. M., CAVADA, B. S., MORREIRA, 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.

VIDAL, B. C., CARVALHO, H. F. A reevaluation on the Coomassie blue G-protein binding assay. **Arq. Biol. Tecnol.**, 31: 163 (Abstract), 1988.

VIJAYAN, M., CHANDRA, N. Lectins. **Cur. Op. Struct. Biol.**, v. 9, p. 707-714, 1999.

WEIS, W. I., DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **An. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 441-473, 1996.

YAMAGUCHI, K., MORI, A., FUNATSU, G. Amino acid sequence and some properties of the lectin-D from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*). **Biosc. Biotech. Biochem.**, v. 60, p. 1380-1382, 1996.

YOUNG, N. M., OOMEN, R. P. Analysis of sequence variation among legume lectins. A ring of hipervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. **J. Mol. Biol.**, v. 228, p. 924-934, 1992.

YOUNG, N.M., WATSON, D.C., YAGUCHI, M., ADAR, R., ARANGO, R., RODRIGUEZ-ARANGO, E., 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. 2563-2570, 1995.

ZENG, F.Y., GABIUS, H.J. *Apud* RUDIGER, H (1998). Sialic acid-binding proteins: characterization, biological function and application. **Z. Naturforsch**, v. 47, p. 641-653, 1992.

# CAPÍTULO II

---

**LECTINA DE COTILÉDONES DE *Luetzelburgia auriculata* E SEU PAPEL NA DEFESA DA PLANTA**

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 – Função das Lectinas: Considerações Gerais

A despeito do volume de conhecimento acumulado sobre lectinas de plantas, o papel dessas proteínas na natureza ainda é muito especulativo. A literatura registra vários fenômenos biológicos, observados *in vitro*, associados as lectinas, e tem sido a partir desses resultados que algumas funções foram sugeridas, tais como: armazenamento e transporte de carboidratos, interação célula-célula, proteína de reserva, reconhecimento e/ou ligação de bactérias simbiotes, defesa contra fungos, bactérias e herbívoros, regulação hormonal, entre outras (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1993; 1995; RUDIGER, 1998).

Desde que as lectinas possuem a habilidade de interagir específica e reversivelmente com carboidratos, é lógico imaginar que a função dessas proteínas passe por essa interação. Em princípio, qualquer reação ou processo mediado por lectina depende de sua ligação específica a um receptor glicoconjugado, independentemente desse receptor estar localizado dentro ou fora do hospedeiro. Portanto, a pesquisa sobre o papel fisiológico das lectinas sempre esteve intimamente ligada à procura por seus receptores naturais. Esses receptores podem ser definidos como glicoconjugados cuja porção glicídica é complementar ao sítio de ligação da lectina. Isso implica que glicoconjugados de diferentes naturezas tais como glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos, mas com estrutura glicídica idêntica, podem atuar como receptores para a mesma lectina.

Em vista do potencial das lectinas para interagir com carboidratos, é razoável supor que não exista uma função universal para todas as lectinas de plantas. Provavelmente, uma dada lectina pode ter diferentes funções, dependendo de sua ocorrência temporal e espacial no ciclo de vida da planta.

A ocorrência ubíqua de lectinas e a habilidade para distinguir entre sacarídeos em solução ou na superfície de células, justificam o interesse em se descobrir seu(s) papel(éis) fisiológico(s). O argumento principal a favor das lectinas desempenharem funções vitais na

natureza é o fato delas terem sido conservadas como famílias homólogas ao longo da evolução (LIS & SHARON, 1998).

Muitas são as funções propostas para as lectinas de plantas, incluindo funções intrínsecas e extrínsecas, todavia, essas informações geralmente provêm de resultados obtidos *in vitro*, carecendo de confirmação *in vivo*.

### 1.1.1 – Funções Intrínsecas

O fato das lectinas estarem amplamente distribuídas no reino vegetal e, serem detectadas em vários tecidos e órgãos de plantas, constitui fortes evidências de que essas proteínas desempenham alguma(s) função(ões) relevante(s) na fisiologia das plantas onde são encontradas (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991).

Uma das funções defendida para as lectinas é a de proteína de reserva. Esta hipótese surgiu a partir da observação de que várias lectinas de leguminosas são encontradas nos corpos protéicos e, em alguns casos, serem mobilizadas ao mesmo tempo das proteínas reconhecidamente de reserva (PEUMANS & VAN DAMME, 1993). Muitas lectinas, como outras proteínas das sementes, são degradadas durante a germinação e contribuem para a nutrição da planta. Todavia, tem sido observado que a degradação de outras lectinas, geralmente, não segue o padrão típico das proteínas de reserva, isto é, elas persistem por mais tempo durante a germinação (MOREIRA & CAVADA, 1984; OLIVEIRA *et al.*, 1998), sugerindo uma função adicional. Contra a hipótese das lectinas serem unicamente proteínas de reserva, pesa o fato dela não explicar o porquê dessas proteínas possuírem sítios de ligação a carboidrato e outros ligantes.

Alguns trabalhos sugerem que a função das lectinas seria a de regular a síntese das proteínas de reserva. Estudos realizados com sementes de ervilha, arroz e soja demonstraram que existe uma ordem cronológica para o aparecimento de vicilinas e outras globulinas durante a maturação da semente e, que, possivelmente, lectinas estariam envolvidas na regulação da deposição dessas proteínas (WENZEL *et al.*, 1993; PARADEZ-LOPEZ *et al.*, 1990).

As proteínas de reserva não são os únicos componentes que podem interagir com as lectinas. Já foi demonstrada uma interação, dependente de pH, entre a lectina de ervilha e preparações de membrana dos corpos protéicos (GERS-BARLAG *et al.*, 1993; WENZEL *et al.*, 1995), e ainda, que esta lectina pode se inserir na camada lipídica da membrana (DE PATER *et al.*, 1995). Esses resultados suportam a hipótese do envolvimento da lectina de ervilha na interação entre as raízes da planta e bactérias nodulantes, já que a lectina localiza-se na face externa da membrana plasmática da extremidade das raízes. Ao contrário desse sistema, onde a interação da lectina com componentes da membrana dos corpos protéicos é independente do sítio de ligação a carboidratos, em soja a interação da lectina com glicoproteínas da membrana plasmática ocorre via sítio de ligação a carboidratos (HEIDENREICH & RUDIGER, 1997). Essa interação sugere algum envolvimento com a estruturação dos corpos protéicos.

As lectinas também são capazes de interagir com várias hidrolases presentes nos corpos protéicos (EINHOFF & RUDIGER, 1986a, B; RUDIGER & BARTZ, 1993; SMEETS *et al.*, 1997). FERENC & MORAWIECKA (1985) demonstraram que a atividade de uma fosfatase de centeio (*Secale cereale*) é aumentada em 140% na presença da lectina da mesma planta, e que essa ativação é suprimida pela adição do açúcar inibidor, N-acetil-D-glucosamina. Os autores hipotetizaram que a ativação da enzima deva servir para acelerar a mobilização das reservas da semente.

Análises estruturais de algumas lectinas demonstraram a existência de sítios hidrofóbicos capazes de interagir com fitohormônios tais como o ácido indolacético e citocininas, sugerindo que as lectinas poderiam atuar como reguladores hormonais do crescimento e desenvolvimento das plantas (RUDIGER, 1998).

Também já foi atribuída uma função crioprotetora às lectinas (KOMAROVA *et al.*, 1997). Foi observado que preparações de membranas de tilacóides de espinafre (*Spinacia oleracea*) ficavam protegidas de danos causados por congelamento após ligação com lectinas galactose-específicas. A estabilização foi atribuída a redução da fluidez e permeabilidade da membrana (HINCHA *et al.*, 1997a).

### 1.1.2 – Funções Extrínsecas

Duas funções extrínsecas são correntemente defendidas para as lectinas de plantas. A primeira propõe que as lectinas participam da simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e leguminosas. Contra essa hipótese pesa o fato desse fenômeno se restringir a uma única família de planta. A outra função é mais geral e propõe que as lectinas vegetais são agentes de defesa contra predadores e patógenos.

Segundo PEUMANS & VAN DAMME (1995) existem argumentos moleculares, bioquímicos, celulares, fisiológicos e evolucionários a favor da hipótese de defesa. As lectinas, como algumas quitinases, glucanases e glicosidases, são proteínas capazes de reconhecer e interagir com glicoconjugados presentes na superfície de microrganismos ou expostos ao longo do trato intestinal de insetos ou de mamíferos herbívoros. Além disso, embora muitas lectinas de plantas sejam capazes de ligar açúcares simples tais como glucose, manose ou galactose, elas demonstram uma afinidade muito maior por oligossacarídeos que não são comuns ou que não ocorrem normalmente em plantas. Como exemplos, têm-se as lectinas que interagem com quitina, um polímero de N-acetilglucosamina encontrado na parede celular de fungos e em algumas estruturas de invertebrados e as lectinas que interagem com o ácido siálico, principal carboidrato encontrado em glicoproteínas animais. As lectinas são geralmente resistentes a temperaturas elevadas, a extremos de pH e a proteases de insetos e de outros animais e, por último, a ocorrência estratégica de lectinas na planta, isto é, em órgãos ou tecidos que são mais suscetíveis ao ataque de predadores ou patógenos, pode significar adaptações desenvolvidas ao longo da evolução para a função de defesa.

A simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio presentes no solo representa uma relação bem sucedida, mas não completamente entendida. Embora o processo de infecção das raízes pela bactéria ainda não esteja completamente elucidado, sabe-se que este processo requer uma associação altamente específica entre a bactéria e a superfície dos pêlos radiculares. Por exemplo, espécies de *Rhizobium* que infectam e nodulam a soja não conseguem nodular a ervilha ou o trevo e vice-versa (BOHLOOL & SCHMIDT, 1974). Foi sugerido que a simbiose ocorra através de lectina presente nas raízes



da planta e carboidratos da superfície da bactéria (JAYARAMAN & DAS, 1998). Essa hipótese é ainda muito controversa e, para a maioria dos sistemas simbiotes, não existe prova da presença de lectinas ou de seus receptores nas raízes da planta e da bactéria, respectivamente. Além disso, vários mutantes de soja que não possuem lectinas são nodulados normalmente por *Rhizobium* (LIS & SHARON, 1998). Resultados conflitantes têm sido obtidos com plantas transformadas geneticamente. A transformação de plantas de trevo com o gene da lectina de ervilha, por exemplo, conferiu ao trevo a capacidade de estabelecer simbiose com a bactéria nodulante da ervilha (DIAZ *et al.*, 1995). Por outro lado, a transformação de plantas de *Lotus* e alfafa com o gene da lectina de soja, conferiu ao *Lotus* à capacidade de ser nodulada pelo *Bradyrhizobium japonicum*, o simbiote da soja, mas o mesmo não foi observado para a alfafa (HIRSCH *et al.*, 1999).

Acredita-se que a participação de lectinas na simbiose *Rhizobium*-leguminosa deva ter evoluído a partir da habilidade original dessas proteínas de aglutinar e imobilizar bactérias como uma resposta de defesa (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991).

As informações sobre o efeito tóxico de lectinas de plantas a animais foram obtidas, principalmente, a partir de experimentos nutricionais conduzidos em ratos alimentados com dietas contendo a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA). A ingestão de PHA provoca uma série de efeitos indesejáveis em ratos, e o desconforto chega a ser tão severo que os animais rejeitam a dieta contendo PHA (OLIVEIRA *et al.*, 1988). Outras lectinas provocam efeitos tóxicos semelhantes em animais, como por exemplo, as lectinas de *Robinia pseudoacacia* e *Sambucus nigra*. Esses exemplos ilustram o potencial de lectinas na proteção contra herbívoros e justificam o fato das plantas que possuem lectinas tóxicas serem evitadas pelos predadores (LIS & SHARON, 1998).

Algumas lectinas, particularmente aquelas com especificidade para quitina, um constituinte importante da parede celular de fungos, do exoesqueleto e do trato digestivo de invertebrados, possuem alguma atividade tóxica contra insetos. Experimentos *in vitro* demonstraram que a WGA tem efeito inibitório sobre o desenvolvimento de duas importantes pragas do arroz, *Ostrinia nubilalis* e *Diabrotica undecimpunctata* (CZAPLA & LANG, 1991). De forma semelhante, as lectinas de arroz e de *Urtica dioica* (UDA) são tóxicas para as larvas do gorgulho do feijão, *Callosobruchus maculatus*. Embora o mecanismo da toxicidade de lectinas contra insetos não tenha sido elucidado, tem sido

especulado que os efeitos deletérios observados são provocados pela ligação da lectina à quitina da membrana peritrófica intestinal, com a conseqüente interferência na absorção de nutrientes (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991). Genes de lectinas tóxicas têm sido usados para construir plantas transgênicas com o intuito de impedir a fecundidade e o desenvolvimento de insetos (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; ZHU *et al.*, 1996). Todavia, a atividade inseticida de lectinas tem sido questionada desde que se mostrou que com o tempo os insetos se acostumam com a lectina (POWELL *et al.*, 1993). Assim, como o desenvolvimento de resistência não pode ser ignorado, a estratégia sugerida é a construção de plantas transgênicas que carreguem não somente o gene da lectina inseticida, mas também genes de outras proteínas tóxicas, tais como quitinases ou inibidor de proteases (RUDIGER, 1998).

## 1.2 – Interação de Lectinas com Fungos Fitopatogênicos

A participação de lectinas na defesa contra fungos fitopatogênicos ganhou repercussão com o trabalho de MIRELMAN *et al.* (1975). Esses pesquisadores demonstraram que a WGA, específica para quitina, inibia a germinação dos esporos e o crescimento dos fungos *Trichoderma viride* e *Fusarium solani*. Neste trabalho foi demonstrado, por microscopia de fluorescência, que a WGA se ligava exclusivamente aos septos e extremidades das hifas, e que a pré-incubação da lectina com quitotriose prevenia a atividade inibitória. Os autores sugeriram que a ligação de WGA a extremidade das hifas provocava um desequilíbrio entre a síntese e a deposição de quitina e isto seria responsável pelo o efeito fungistático (inibidor do crescimento) da lectina.

A fim de descobrir se lectinas com outras especificidades, também, apresentavam toxicidade contra fungos, BARKAI-GOLAN *et al.* (1978) investigaram o efeito da SBA, PNA e WGA sobre os fungos *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* e *Penicillium italicum*. Os resultados mostraram que essas lectinas se ligaram às hifas dos fungos, confirmando a presença de polissacarídeos contendo seus açúcares específicos nessas estruturas. Interessantemente, ao contrário da WGA (quitina específica) que se ligou

preferencialmente às extremidades das hifas, a marcação por PNA (galactose específica) e SBA (galactose/N-acetil-galactosamina específica) ocorreu ao longo das hifas, refletindo diferenças na arquitetura da parede celular em regiões distintas das hifas. Estas lectinas, na concentração de 5 mg/ml, inibiram a germinação dos esporos dos fungos, embora essa inibição tenha sido verificada apenas nos estágios iniciais do processo de germinação, isto é, antes da emissão do tubo germinativo. O efeito, na realidade, foi interpretado como um prolongamento da fase de latência que precede a germinação. Essas observações estão de acordo com o fato de que a composição química da parede celular dos esporos se altera marcadamente com a idade do fungo, ocorrendo à substituição de resíduos de quitina ou de galactose da superfície dos esporos jovens por outros compostos, como por exemplo, melanina, que por sua vez previne a interação com a lectina (BARKAI-GOLAN *et al.*, 1978). Esses resultados serviram para reforçar a hipótese de que as lectinas estão envolvidas na defesa de plantas contra fungos fitopatogênicos, preconizada previamente por MIRELMAN *et al.* (1975), bem como para desmistificar a idéia de que apenas lectinas quitina-específica poderiam desempenhar esse papel.

A idéia da participação de lectinas na defesa contra fungos, entretanto, foi seriamente abalada com a publicação do trabalho de SCHLUMBAUM *et al.* (1986). Os autores contestaram os resultados de MIRELMAN *et al.* (1975), demonstrando que a WGA não era a responsável pela inibição do fungo *T. viride*, e sim quitinases contaminantes na preparação da lectina. Os autores demonstraram, ainda, que outras preparações comerciais de lectinas quitina-específicas, tais como as de tomate, batata, *Phytolacca americana* e *Ulex europeus* só apresentavam atividade antifúngica quando contaminadas com quitinases, concluindo, portanto, que quitinases, e não lectinas, eram as responsáveis pela atividade antifúngica.

Na realidade, a lectina de batata é capaz de lisar esporos e hifas de seu principal patógeno, o fungo *Phytophthora infestans* (GARAS & KUC, 1981), todavia, foi demonstrado que além da atividade hemaglutinante, a lectina apresenta atividade  $\beta$ -glicosidásica (ANDREU & DALEO, 1988), sendo, na realidade, uma quimerolectina segundo a definição de PEUMANS & VAN DAMME (1995).

A hipótese do envolvimento de lectinas na defesa contra fungos foi retomada com o trabalho de BROEKAERT *et al.* (1989). Os autores demonstraram que a lectina, quitina

específica, isolada do rizoma de *Urtica dióica* (UDA), e livre de contaminação por quitinase, inibia o crescimento dos fungos *Trichoderma hamatum*, *Botrytis cinerea* e *Phycomyces blakesleeanus*. 120µg/ml de UDA provocaram 50% de inibição do crescimento do fungo *P. blakesleeanus*. O mecanismo exato da ação fungistática não foi elucidado, mas, certamente, a atividade não foi devido à quitinase. Uma investigação minuciosa sobre o efeito da UDA na germinação dos esporos do fungo *P. blakesleeanus* foi realizada por VAN PARIJS *et al.* (1992). Os autores acompanharam os pesos fresco e seco dos esporos, os conteúdos de proteína, ácidos nucléicos, ATP, cAMP, glicerol e poliaminas, além da taxa de respiração, durante a germinação dos esporos. Surpreendentemente, nenhum desses parâmetros foi afetado pela UDA, sugerindo que a lectina não causa mudanças dramáticas no metabolismo do fungo. Assim, a única explicação para a inibição do crescimento do fungo provocado por UDA parece ser uma alteração na reorientação do crescimento e, talvez, na deposição da parede celular.

Recentemente, DOES *et al.* (1999) conseguiram transformar plantas de fumo com o gene precursor da isolectina I de UDA. A lectina isolada a partir das plantas transgênicas foi corretamente processada e exibiu atividade semelhante àquela isolada de plantas de *Urtiga dioica*. A lectina inibiu o crescimento micelial dos fungos *B. cinerea*, *T. viride* e *Colletotrichum lindemuthianum* de forma tempo e concentração dependentes, sugerindo um mecanismo de adaptação desses microrganismos. Adaptação de fungos a proteínas de ligação a quitina já foi demonstrada por SELA-BUURLAGE (1996). A lise de *Fusarium solani* por quitinase do tipo I de fumo, por exemplo, depende totalmente do estágio de germinação dos esporos, não se observando nenhuma ação se a aplicação da enzima for feita antes da fase de pré-germinação, o que demonstra uma habilidade do esporo de adaptar-se à quitinase (SELA-BUURLAGE, 1996).

Heveína, uma merolectina isolada do látex de *Hevea brasiliensis*, é uma outra proteína de reconhecida atividade antifúngica. Essa lectina possui apenas 43 resíduos de aminoácidos e um único domínio de ligação à quitina. Heveína inibiu o crescimento *in vitro* de vários fungos fitopatogênicos, tais como *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *P. blakesleeanus*, *Pyrenophora tritici-repensis*, *Pyricularia oryzae*, *Septoria nodorum* e *Trichoderma hamatum* (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

Embora UDA e heveína sejam capazes de inibir o crescimento de vários fungos, não existem evidências conclusivas sobre o mecanismo desta ação. Como são duas proteínas pequenas, de 8,5 e 5 kDa, respectivamente, sugere-se que elas sejam capazes de penetrar no fungo e dessa forma, afetar a síntese de sua parede celular (BROEKAERT *et al.*, 1989; VAN PARIJS *et al.*, 1992). Um argumento a favor dessa hipótese surgiu a partir da observação do efeito da UDA sobre o crescimento dos fungos *B. cinerea*, *T. viride* e *C. lindemuthianum*. Destes, *C. lindemuthianum* foi o mais afetado pela lectina, apresentando cerca de 80-90% de inibição do crescimento em 48 h. Como *C. lindemuthianum* cresce lentamente, acredita-se que isso deva ter dado tempo para que a lectina penetrasse na célula e afetasse a síntese de sua parede celular (DOES *et al.*, 1999).

Recentemente, CIOPRAGA *et al.* (1999) publicaram um trabalho tentando reabilitar a WGA como uma proteína antifúngica. Neste trabalho, foi demonstrado que uma preparação de WGA, isolada em coluna de quitina e repassada em coluna de Sepharose-fetúina, livre de qualquer contaminação com quitinase, era deletéria para os fungos *Fusarium graminearum* e *F. oxysporum*. Os principais sintomas observados, através de microscopia óptica, foram intumescimento de hifas, vacuolização do conteúdo celular e lise de parede celular. A ligação da lectina a estruturas fúngicas não foi espécie-específica, já que não se observou diferença na interação com as duas espécies de fungos. Os autores sugeriram que a ligação da WGA à superfície do fungo, possivelmente, provoca um distúrbio entre o estado de equilíbrio dinâmico de hidrólise e síntese de polímeros da parede.

### 1.3 – Considerações sobre Fungos Fitopatogênicos

Os fungos são organismos eucarióticos, e em maioria filamentosos, que ocorrem no solo como células ou estruturas de repouso (esporos), e como hifas (filamentos microscópicos) ou micélio (conjunto de hifas). Não possuem clorofila, sendo, portanto heterotróficos, obtendo energia e carbono de compostos orgânicos. Embora não sejam predominantes em termos numéricos, representam 70-80% da biomassa microbiana da

maioria dos solos. Sua ocorrência está diretamente relacionada ao teor de matéria orgânica, sendo também influenciada pelo pH e umidade do solo. Predominam em solos ricos em matéria orgânica e com pH na faixa ácida. Milhares de espécies, pertencentes a todas as classes, já foram isoladas do solo, sendo a maioria pertencente à classe *Deuteromycetes*, também chamados de fungos imperfeitos. Os fungos mais representativos do solo são espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phytium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Phycomyces*, *Verticillium*, *Pilobulos*, *Humicola*, *Gaeumannomyces* e *Chaetomium* (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

A principal função dos fungos resulta da sua atividade heterotrófica sobre os restos vegetais depositados no solo e a formação de relações simbióticas mutualistas denominadas micorrizas e parasíticas (doenças) com as plantas. São ainda importantes agentes de controle biológico de outros fungos e nematóides fitopatogênicos (TORTORA *et al.*, 2000).

A unidade propagativa dos fungos, o esporo, tem função semelhante à de uma semente, diferindo dela por não conter um embrião pré-formado. São produzidos em ramificações especializadas da hifa, chamados, esporóforos. Os esporos podem ser formados de forma exógena ou endógena. No primeiro caso, eles são formados lateralmente na extremidade de esporóforos simples ou ramificados. No segundo, eles são formados dentro de estruturas especializadas. Os esporos germinam, sob condições favoráveis, emitindo o tubo germinativo, ou hifa primária, que se ramifica formando o micélio. Hifas especializadas para a nutrição, chamadas hifas vegetativas, penetram no substrato em busca de alimentos, enquanto hifas reprodutivas ou aéreas, se especializam na produção de esporos ou conídios (TORTORA *et al.*, 2000).

A parede celular dos fungos é altamente versátil, sendo continuamente expandida durante o crescimento e extensivamente remodelada durante o desenvolvimento. Quimicamente, a parede contém 80 a 90% de polissacarídeos, com o restante consistindo de proteínas e lipídeos. Em algumas espécies são encontrados quantidades apreciáveis de pigmentos (melanina), polifosfatos e íons inorgânicos. Fisicamente, a parede celular é formada por microfibrilas entrelaçadas, embebida em uma matriz amorfa. Quitina e celulose são os principais componentes microfibrilares da maioria dos fungos filamentosos, enquanto nas leveduras, ou fungos unicelulares, a parede contém principalmente glucanas não celulósicas. Proteínas e vários polissacarídeos (glucanas, mananas, galactanas e

heteropolissacarídeos) são as principais substâncias cimentantes. Os monossacarídeos mais freqüentemente encontrados na parede celular dos fungos são: D-glucose, N-acetil-D-glucosamina, D-manose, D-galactose, D-galactosamina, L-fucose, D-glucosamina, xilose e ácido D-glucorônico. Desses, glucose, N-acetil-D-glucosamina e manose são encontrados na maioria dos fungos. Ocasionalmente, são encontradas ramnose, ribose e arabinose (BARTINICKI-GARCIA, 1968).

Várias lectinas têm, satisfatoriamente, sido utilizadas para estudar a composição da parede celular de esporos e estruturas fúngicas. Esses estudos têm revelado a dinâmica da arquitetura da parede celular no ciclo de vida de alguns fungos.

Um estudo realizado com as lectinas isoladas de germe de trigo (WGA), *Griffonia simplicifolia* (GSI-B4), *Galanthus nivalis* (GNA) e *Bauhinia purpurea* (BPA), específicas para quitina, D-galactose, D-manose e D-galactose/N-acetil-D-galactosamina, respectivamente, revelou a presença de sítios de ligação para WGA na superfície do esporo, tubo germinativo, apressório e hifa intracelular do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Tubos germinativos e apressórios foram marcados com todas as lectinas enquanto os esporos reagiram apenas com BPA e WGA. As hifas intracelulares só não reagiram com GSI-B4 (O'CONNELL *et al.*, 1996). Esses resultados demonstram, claramente, a contínua alteração na composição química das estruturas fúngicas.

Lectinas de diferentes especificidades também foram utilizadas para estudar a composição da parede do esporo de vários isolados de *Fusarium oxysporum*. Os resultados demonstraram a presença de resíduos de N-acetil-D-glucosamina, manose e N-acetil-D-galactosamina e ausência de resíduos de L-fucose, embora essa composição tenha variado quantitativamente entre as cepas testadas (RECORBET *et al.*, 1996).

Esses trabalhos além de mostrar o valor do uso de lectinas para decifrar a composição química de estruturas fúngicas, servem para provar à existência de sítios potenciais para atuação de lectinas fungitóxicas.

Os resultados sobre a atividade antifúngica de lectinas, ainda que escassos, apontam na direção de uma participação dessas proteínas no arsenal de defesa das plantas. Foi na tentativa de acrescentar subsídios a esse tema que esse trabalho foi desenvolvido.

Os seguintes argumentos justificam o interesse em investigar o envolvimento da lectina isolada de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* na defesa contra fungos: 1)

*Luetzelburgia* é uma leguminosa evolutivamente primitiva (Tribo *Sophoreae*), que vive exposta às intempéries de uma região semi-árida e que, portanto, deve guardar adaptações que garantiram sua sobrevivência ao longo da evolução; 2) foi detectada atividade hemaglutinante em todos os seus tecidos (CÂMARA, 1994), o que é curioso e raro, pois existem poucos exemplos de plantas que apresentam lectinas assim de forma disseminada; 3) a lectina isolada de cotilédones é mobilizada tardiamente em relação às proteínas de reserva (CÂMARA, 1994), sugerindo uma função adicional e, finalmente, 4) as sementes exsudam lectina durante a embebição, sugerindo uma localização estratégica e, possivelmente, um envolvimento na proteção da semente durante a germinação.



## 2 – OBJETIVOS

Investigar o efeito da lectina isolada de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos e tentar estabelecer seu papel na defesa da planta.

### 3 – MATERIAIS

#### 3.1 – Fungos

Os fungos filamentosos utilizados neste trabalho foram provenientes da coleção do Departamento de Micologia da Universidade Rural de Pernambuco. A seguir, uma breve descrição das doenças provocadas por esses fitopatógenos.

*Fusarium solani* (3708) - causa a podridão de raízes, resultando como sintoma reflexo, o aparecimento de murcha da parte aérea da planta afetada. Formas especiais do patógeno são comumente encontradas contaminando batata, maracujá, feijão, ervilha e pimenta-do-reino.

*Colletotrichum lindemuthianum* (3114) - responsável pela antracnose do feijoeiro. Esta doença provoca manchas necróticas, queima e queda de flores, podridão e queda de frutos, cancro e secamento de ramos, tombamento de plantas jovens etc.

*Aspergillus niger* (3292) - espécies de *Aspergillus* ocorrem freqüentemente em sementes armazenadas, podendo prejudicar a germinação. São encontrados principalmente em bulbos e grãos. *A. niger* é conhecido como o mofo negro dos bulbos de cebola, devido à cor escura das estruturas do patógeno.

*Rhizoctonia solani* - causa podridão de raízes e *damping-off* em várias culturas (algodão, alface, amendoim, arroz, cafeeiro, cebola, ervilha, fumo etc).

A levedura utilizada, *Saccharomyces cerevisiae* foi oriunda da micoteca do Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal do Ceará.

### 3.2 – Coelhos

Coelhos da raça Nova Zelândia, de três meses de idade, machos, provenientes do plantel do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, foram utilizados para preparação do anticorpo anti-lectina de *L. auriculata*.

### 3.3 – Reagentes Diversos

Ágar Sabouraud, bacto-peptona, albumina sérica bovina, D-galactose, anticorpo conjugado com fosfatase alcalina, substrato para fosfatase alcalina, membranas de nitrocelulose e de difluoreto de polivinilideno (PVDF) foram adquiridos da Sigma Co., St. Louis, USA.

Substrato para revelação por quimioluminescência (Kit ECL) foi obtido da Amersham International plc, UK. Filmes, fixadores e reveladores foram comprados da Kodak Co.

### 3.4 – Material para Microscopia

Lâminas, lamínulas, grades de níquel e kit para inclusão “LR Gold” foram adquiridos da Sigma Co., St. Louis, USA.

Todos os demais reagentes foram de grau analítico e adquiridos comercialmente.

## 4 – MÉTODOS

### 4.1 – Ensaio de Exsudação

Sementes de *L.auriculata* foram desinfectadas com solução de hipoclorito de sódio a 2%, durante 5 minutos, após o que foram lavadas com água destilada estéril (5 x). 20 sementes foram colocadas para germinar em pequenos vasos contendo Goma de Guar, equilibrada em tampão acetato de sódio 50 mM M, pH 6,0 contendo NaCl 150 mM, como substrato (2 sementes para 20 ml de gel), durante 4 dias, em câmara asséptica. Após esse tempo, as sementes foram descartadas e o gel utilizado na montagem de colunas cromatográficas.

Alternativamente, sementes foram postas para embeber em água ou em solução de galactose, sendo posteriormente realizados ensaios de detecção de lectina nesses meios. Para tanto, 10 sementes de *L. auriculata* foram colocadas em um erlenmeyer contendo 50 ml de água estéril (grau milli-Q) e outras 10 sementes foram colocadas em 50 ml de uma solução de galactose 0,5 M, esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm. Os frascos foram mantidos assepticamente em um banho a 30 °C, sob agitação constante, durante 48 horas. Ao final, as sementes foram descartadas e as soluções tratadas com sulfato de amônio no intervalo de 0-60% de saturação, na tentativa de concentrar a lectina possivelmente exsudada. As suspensões foram centrifugadas a 20.000 g, por 30 minutos a 4 °C, e os precipitados recuperados em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo NaCl 150 mM, dialisados contra água destilada e liofilizados. Os liofilizados foram submetidos a ensaios de hemaglutinação (MOREIRA & PERRONE, 1977) e análise por *Western blot* (TOWBIN *et al.*, 1979).

#### 4.2 – Cromatografia de Afinidade

A Goma de Guar, enriquecida com o exsudado de sementes, foi eluída com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo NaCl 150 mM, até não haver mais leitura de absorbância a 280 nm, após o que foi aplicado galactose 200 mM para eluição do material retido. O pico I foi dialisado contra água destilada e liofilizado. O pico II foi primeiramente dialisado contra ácido acético 100 mM e, em seguida, contra água destilada e liofilizado. Os dois picos foram submetidos a ensaios de hemaglutinação.

#### 4.3 – Localização da Lectina na Semente

##### 4.3.1 – *Tissue Print*

A localização da lectina em cotilédones de *L. auriculata* foi feita pela técnica de *tissue print* descrita por TERRAS *et al.* (1995). Nesta técnica, a eletrotransferência de proteínas é feita diretamente a partir de cortes ultrafinos do tecido para a membrana de nitrocelulose ou de difluoreto de polivinilideno (PVDF), seguindo o método de TOWBIN *et al.* (1979).

Inicialmente, foram feitos cortes longitudinais, a mão livre, de cotilédones quiescentes. Em seguida, o sanduíche foi montado sobre a célula de transferência na seguinte ordem: seis folhas de papel de filtro umedecidas com o tampão de (Tris 25 mM, glicina 198 mM e metanol 20%); a membrana de PVDF (previamente equilibrada em metanol 100% (15 segundos), água grau milli-Q (2 min) e tampão de transferência, por 5 min); os cortes do tecido e, finalizando o sanduíche, mais seis folhas de papel de filtro. A célula de transferência (sistema *Trans-blot* semi-seco) foi fechada e a eletrotransferência conduzida a uma corrente constante de 0,8 V/cm<sup>2</sup> de membrana, durante 1,5 h. Após a transferência, o sanduíche foi desfeito e a membrana corada com vermelho de Ponceau 2%, para verificação da eficiência da transferência. A membrana foi lavada para remoção do

corante e, então, bloqueada com tampão fosfato de sódio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6, contendo leite em pó desnatado 2%, por um período de 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi submetida a quatro lavagens com tampão fosfato de sódio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6 (PBS), a intervalos de 10 minutos. Após a lavagem, a membrana foi incubada com o anticorpo primário, anti-lectina (1:1000), preparado em tampão bloqueador, por 16 horas a 4 °C. Após nova lavagem, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugada com fosfatase alcalina, 1:2000), durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, procedeu-se a revelação, mergulhando-se a membrana na solução do substrato específico para a fosfatase alcalina (BCIP-NBT), preparado de acordo com as recomendações do fabricante (Sigma). Após o desenvolvimento da reação, a membrana foi lavada com água grau milli-Q, secada e guardada ao abrigo da luz.

#### 4.3.2 – Imunolocalização

##### 4.3.2.1 – Conjugação do Anticorpo com FITC

A conjugação do anticorpo anti-lectina ao FITC foi realizada segundo o protocolo descrito por JOHNSON (1989). 10 mg do anticorpo foram dissolvidos em 1ml de tampão de conjugação (bicarbonato de sódio 100 mM, pH 8,5) e, então, adicionado FITC (50 µg/ml). A mistura foi incubada por 4 horas, à temperatura ambiente, no escuro, sendo agitada ocasionalmente. Ao final, foi centrifugada a 10000 g, durante 5 minutos, ao abrigo da luz.

O conjugado foi recuperado através de cromatografia de filtração em gel de Sephadex G25, previamente equilibrada com solução de NaCl 150 mM. O pico I, concentrando o conjugado, foi eluído com solução de NaCl 150 mM e coletado visualmente. A cromatografia foi conduzida a um fluxo constante de 60 ml/h, ao abrigo da luz. Após a retirada do conjugado, a coluna continuou sendo lavada para remoção de FITC

livre. O soro pré-imune também foi conjugado com FITC para ser usado como controle no ensaio de imunofluorescência.

A eficiência da conjugação foi estimada a partir da razão entre as absorbâncias medidas a 495 nm (FITC) e a 280 nm (proteína).

#### 4.3.2.2 – Preparação de Lâminas

Inicialmente, cotilédones de *L auriculata* foram fixados em solução de glutaraldeído 1% e paraformaldeído 4%, durante 12 horas. Após a fixação, o material foi desidratado em série etílica e, em seguida, incluído em historresina (LEICA). Seções transversais e longitudinais de 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo (LEICA SUPERCUT 206 S) com navalha de tungstênio. Os cortes foram coletados em banho-maria com auxílio de um pincel e montados sobre lâminas para análise histoquímica.

#### 4.3.2.3 – Ensaio de Imunofluorescência

As lâminas foram inicialmente incubadas com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM (PBS), durante 20 minutos e, depois, com o soro pré-imune por mais 20 minutos. Ao final, foi adicionado o imunossoro conjugado com FITC (1:100) por um período de 2 horas. O material foi lavado com PBS (10 x, 10 minutos). Após as lavagens, o material foi incubado com água grau milli-Q, por 20 minutos. O excesso de água foi removido e as lâminas cobertas com lamínulas, evitando-se a formação de bolhas (SMETS *et al.*, 1985). O controle foi tratado da mesma maneira, substituindo-se o imunossoro-FITC pelo soro pré-imune-FITC. Todo o procedimento experimental foi realizado ao abrigo da luz.

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (OLYMPUS B202) com aumento de 400 x e fotografadas com filme Kodak colorido, Asa 400.

#### 4.4 – Atividade Enzimática

A fim de verificar se lectina purificada a partir de cotilédones de *L. auriculata* possuía algum domínio catalítico, foram feitos ensaios de atividade peroxidásica,  $\beta$ -1,3-glucanásica e quitinásica. A opção por pesquisar estas atividades deveu-se ao fato das mesmas participarem efetivamente na defesa contra fungos (GOMES *et al.*, 1996; XUE *et al.*, 1998; BORKOWSKA *et al.*, 1998).

##### 4.4.1 – Atividade Peroxidásica

A determinação da atividade peroxidásica foi realizada seguindo a metodologia descrita por URBANEK *et al.* (1991). Nesse procedimento, guaiacol e peróxido de hidrogênio foram utilizados como doador e receptor de prótons, respectivamente. A mistura reacional consistiu de 0,975 ml de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, contendo NaCl 1000 mM, 0,5 ml de guaiacol 20 mM, 0,5 ml de peróxido de hidrogênio 60 mM e alíquotas da solução de lectina (1mg/ml). Essa mistura foi incubada a 30 °C, por 10 min sendo, em seguida, feita a leitura de sua absorvância a 480 nm (espectrofotômetro tipo Novaspec II da Pharmacia). A variação de 1 (uma) unidade de absorvância por min foi assumida como sendo 1 Unidade de Atividade Peroxidásica (1 UAP).

##### 4.4.2 – Atividade $\beta$ -1,3-glucanásica

A atividade  $\beta$ -1,3-glucanásica foi determinada seguindo-se a metodologia descrita por XUE *et al.* (1998). A uma alíquota de 100  $\mu$ l da solução de lectina (1mg/ml) foram adicionados 100  $\mu$ l do tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 e 900  $\mu$ l de laminarina (substrato) na concentração de 2 mg/ml. Em seguida, essa mistura reacional foi incubada a



50 °C, por 30 min, e a ela adicionados 1 ml de uma solução constituída por 1 ml do reagente A e 25 ml do reagente B preparada no momento do ensaio. Decorrido o tempo necessário, alíquotas (1 ml) foram retiradas, incubadas a 100 °C, por 20 min, e postas para reagir com 1 ml do reagente C. Os tubos foram agitados vigorosamente até a eliminação de gases e as absorbâncias verificadas a 520 nm. A atividade  $\beta$ -1,3-glucanásica foi expressa em nkat/g de farinha, onde 1 nkat equivale a 1 nmol de glucose liberado por segundo. As composições dos reagentes A, B e C estão descritas no APÊNDICE 1.

#### 4.4.3 – Atividade Quitinásica

As atividades endo- e exoquitinásicas foram determinadas de acordo com REISSIG *et al.* (1955) e LEGRAND *et al.* (1987). Tubos “Eppendorf” contendo 250  $\mu$ l da solução de lectina (1mg/ml), 100  $\mu$ l de uma solução de quitina (preparada de acordo com BERGERS & REYNOLDS, 1958) na concentração de 2 mg/ml e 150  $\mu$ l de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, foram incubados a 37 °C, por 1 h e, em seguida, aquecidos a 98 °C, por 5 min, e centrifugados a 10.000 g, por 30 min. Para determinação da atividades exoquitinásica e endoquitinásica, respectivamente, 10  $\mu$ l de uma solução de glucuronidase (98,7 Unidades/ml) e 10  $\mu$ l de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, foram adicionados a 300  $\mu$ l do sobrenadante. As misturas foram incubadas por 1 h a 37 °C e, posteriormente, aquecidas por 5 min a 98 °C. Logo após, 200  $\mu$ l de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 e 100  $\mu$ l de tetraborato de potássio 600 mM foram adicionados. As soluções foram novamente incubadas por 5 min, a 98 °C, e 1 ml de uma solução contendo DMAB (APÊNDICE 2) foi adicionado. Por último, os tubos “Eppendorf” foram colocados em banho-maria a 37 °C, por 20 min, e a leitura feita a 585 nm. A atividade quitinásica foi expressa em nkat/g de farinha, onde 1 nkat equivale a 1 nmol de N-acetil-D-glucosamina liberado por segundo.

#### 4.5 – Atividade Antifúngica

##### 4.5.1 – Manutenção das Culturas

Os fungos *F. solani*, *C. lindemuthianum*, *A. niger* e *R. solani* foram crescidos em meio de ágar Sabouraud, em placas de Petri, à temperatura ambiente, durante uma semana. As culturas foram usadas para preparação de *pellets* (discos de 8 mm de diâmetro), feitos com o auxílio de um perfurador esterilizado. Esses *pellets* foram mantidos em tubos com solução de NaCl 150 mM, estéril, a 4 °C, sendo renovados a cada mês.

A cultura da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi mantida em ágar Sabouraud inclinado, em tubo de ensaio, a 4 °C, e renovada mensalmente.

##### 4.5.2 – Ensaio de Difusão com Discos

Os ensaios para detecção de atividade antifúngica da lectina de *L. auriculata* foram feitos seguindo a metodologia descrita por ROBERTS & SELITRENNIKOFF (1988). *Pellets* dos fungos foram colocados no centro de placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo ágar Sabouraud, e as placas incubadas à temperatura ambiente para dar início ao crescimento. Quando a colônia atingiu cerca de 40 mm de diâmetro, discos de papel de filtro estéreis, de 6,0 mm de diâmetro, foram embebidos com 30 µl de uma solução da lectina de *L. auriculata* (10 mg/ml), preparada em solução salina e esterilizada em filtro de membrana (0,22 µm, Millipore). Os discos foram distribuídos sobre o meio de cultura com o auxílio de uma pinça estéril, e as placas novamente incubadas para os fungos completarem o crescimento. Ao final, a presença de um halo ao redor dos discos foi tomada como indicativo de inibição do crescimento, sendo o resultado expresso pela medida do diâmetro do halo.

O ensaio com a levedura *S. cerevisiae* foi realizado como descrito, exceto que a inoculação do meio de cultura foi feita com o auxílio de um *swab* estéril, umedecido em

uma cultura de 24 horas ( $10^7$  UFC/ml). Os ensaios foram feitos em triplicata e utilizou-se o antifúngico comercial Nistatina como controle positivo.

#### 4.5.3 – Ensaio de Inibição em Meio Líquido

Para a realização desse ensaio, são necessários esporos e células viáveis, livres de meio e de hifas, obtidos como se segue.

##### 4.5.3.1 – Extração de Esporos de Fungos Filamentosos

Para obtenção de esporos, foram adicionados 10 ml de água estéril sobre a superfície da cultura, após o que, com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril passada levemente sobre o micélio, os esporos foram liberados. A suspensão de esporos foi coletada com pipeta e filtrada em camadas de gaze estéril, para remoção de hifas. A suspensão foi lavada, sob centrifugação a 10.000 g, por 5 minutos, a 4 °C (centrífuga para tubos “Eppendorf”), para obtenção de esporos, livres de meio. Ao final, os esporos foram quantificados em câmara de Neubauer, com aumento de 400 vezes, em microscópio óptico.

##### 4.5.3.2 – Preparação de Células de Levedura

Células de levedura, obtidas a partir de uma cultura de 48 horas, foram transferidas para uma solução de NaCl 150 mM estéril, lavadas e quantificadas como descrito anteriormente.

#### 4.5.3.3 – Ensaio de Inibição

Os ensaios de inibição do crescimento de fungos em meio líquido foram feitos em placas de poliestireno estéreis (Nunc), de 96 poços, segundo a metodologia descrita por (BROEKAERT *et al.*, 1990). A solução estoque de lectina (2 mg/ml) foi dissolvida em água peptonada 1%, pH 6,0, esterilizada através de membrana filtrante de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) e aliqotada em tubos “Eppendorf” estéreis.

Esporos de fungos filamentosos ( $2 \times 10^4/\text{ml}$ ) e células de levedura ( $2 \times 10^4/\text{ml}$ ) foram incubados com a solução de lectina, a diferentes concentrações, por até 72 horas. O desenvolvimento das culturas foi monitorado através de leituras da absorbância a 630 nm, em um leitor de Elisa, a cada 12 horas. Culturas controle foram preparadas substituindo-se a lectina por albumina sérica bovina (BSA).

Para investigar se a interação ocorria via sítio de ligação a carboidratos, esporos e células foram concomitantemente incubados, nas mesmas condições, na presença da lectina previamente inibida por galactose 200 mM.

Para evitar contaminações, todo o procedimento experimental foi feito sob condições assépticas, dentro de uma câmara de fluxo laminar, onde também foi instalado o leitor de ELISA.

#### 4.6 – Extração de Lectina Associada à Levedura

Ao final do ensaio de inibição, a lectina foi tentativamente extraída, a partir da levedura, seguindo à metodologia descrita por GOMES (1997). Inicialmente, a cultura foi centrifugada em tubo “Eppendorf” a 10.000 g por 2 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado exaustivamente, sob centrifugação, com Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 até não haver mais detecção de proteínas solúveis no sobrenadante, determinado pelo método de BRADFORD (1976). O precipitado foi ressuspenso com 1,0 ml de uma solução de D-galactose 500 mM e a suspensão

centrifugada como descrito. Foi feita a determinação de proteína no sobrenadante e o precipitado celular foi re-extraído com 1,0 ml de HCl 0,1 N. Mais uma vez, o sobrenadante foi usado para determinação de proteína. Os sobrenadantes de cada extração (tampão, galactose e ácido) foram dialisados, liofilizados e analisados por *western blotting* (TOWBIN *et al.*, 1979). A reação foi visualizada por quimioluminescência seguindo a metodologia descrita pelo fabricante do kit de revelação (Amersham International, UK).

#### 4.7 – Efeito da Lectina na Acidificação do Meio

O experimento foi conduzido seguindo-se a metodologia descrita por GOMES (1997). Inicialmente, células de levedura foram crescidas em meio de ágar Sabouraud, por um período de três dias, a 30 °C. Após esse tempo, 2 ml de salina 150 mM, estéril, foram vertidos sobre a cultura e as células homogeneizadas com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, 100 µl desta suspensão foram transferidos para 200 ml de caldo Sabouraud. A cultura foi incubada em banho-maria, a 30 °C, sob agitação constante, por 16 horas. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada a 3.000 g por 5 minutos, a 4 °C. As células precipitadas foram lavadas três vezes com água grau milli-Q, sob centrifugação, nas mesmas condições. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em água e utilizadas no ensaio.

Células de *S. cerevisiae* ( $10^7$  cél/ml) foram pré-incubadas em 4 ml de uma solução aquosa de lectina (500 µg/ml), em um banho de gelo, por uma hora. Após esse período, a cultura foi acoplada a um potenciômetro e o pH medido. Em seguida, adicionou-se 1 ml de uma solução de glucose 500 mM e, imediatamente, fez-se nova medição do pH. As alterações do pH da cultura foram, então, registradas de cinco em cinco minutos, por um período de uma hora. Uma cultura controle, sem lectina, foi submetida ao mesmo tratamento.

Ao final do ensaio, os valores de pH foram utilizados para calcular a variação das concentrações hidrogeniônicas,  $\Delta [H^+]$ , nas culturas controle e experimental.

#### 4.8 – Microscopia de Fluorescência

##### 4.8.1 – Preparação de Lâminas

Lâminas de vidro foram lavadas com extran neutro, submersas em álcool 70% (v/v) e secadas sem contato manual. Em seguida, foram imersas em uma solução de poli-L-lisina 0,1% (p/v), preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3 durante 10 minutos, e secadas em estufa a 37 °C, para facilitar a impregnação. Após o tratamento, foram novamente lavadas com água destilada e secadas à temperatura ambiente.

##### 4.8.2 – Preparação da Amostra

Células de *Saccharomyces cerevisiae* ( $2 \times 10^4$ /ml), pré-incubadas com a lectina de *L. auriculata* (500 µg/ml) por 48 h, foram, inicialmente, submetidas a cinco lavagens, sob centrifugação, com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Após este procedimento, o material foi tratado como se segue:

1. Lavagem com tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,3 (3 x 10 min);
2. Fixação em paraformaldeído 4 %, preparado em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,3, durante 1 hora, à temperatura ambiente;
3. Lavagem como descrito em 1;
4. Adesão do material às lâminas: uma suspensão celular foi colocada sobre lâminas previamente tratadas e posta para secar em estufa a 37 °C. O excesso de material não aderido foi cuidadosamente removido.

#### 4.8.3 – Ensaio de Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado como se segue:

1. Incubação do material com tampão fosfato de sódio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3 (PBS), contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA), durante 20 minutos;
2. Incubação com soro pré-imune diluído em PBS (1:300), durante 20 minutos;
3. Incubação com anticorpo primário (anticorpo anti-lectina, 1:300, diluído em PBS), durante 2 horas;
4. Lavagem (10 x) com PBS-BSA, 10 minutos cada;
5. Incubação com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugada com FITC, 1:300, diluído em PBS), durante 2 horas;
6. Lavagem como em 4;
7. Incubação em PBS, durante 20 minutos;
8. Incubação em água deionizada, durante 20 minutos;
9. Observação em microscópio de fluorescência (OLYMPUS B202);
10. Provas de autofluorescência foram realizadas substituindo-se o anticorpo primário pelo anticorpo pré-imune.

#### 4.9 – Microscopia Eletrônica de Transmissão

##### 4.9.1 – Preparação da Amostra

Para visualização da interação da lectina de *L. auriculata* com a levedura *S. cerevisiae*, procedeu-se como se segue:

1. As células pré-incubadas com a lectina (500 µg/ml) foram lavadas, sob centrifugação, com Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 (5x);
2. Em seguida, procedeu-se 3 lavagens (10 min) com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3;
3. As células foram fixadas com uma solução que encerrava 0,1% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído, preparada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,3, durante 2 horas, à temperatura ambiente;
4. Procedeu-se uma lavagem como descrito em 2;
5. O material foi desidratado em uma série de metanol a 30% (30 min), 70% (1 h) e 90% (1 h), à temperatura ambiente;
6. O material foi infiltrado em resina LR *Gold*: 50% de metanol e 50 % de resina, por 1 hora; 30 % de metanol e 70 % de resina, por 7 horas e 100 % de resina, durante 12 h. Durante a infiltração, o material foi mantido em câmara fria a -20 °C;
7. O material foi incluído em resina contendo catalisador, por um período de 4 dias, a -20 °C , realizando-se trocas a cada 24 horas. Após este tratamento, o material foi polimerizado na presença de luz ultravioleta, a -20 °C;
8. A amostra foi cortada em secções ultrafinas (60 nm) e colocadas sobre grades de níquel forradas com filme *formvar* cobertas com carbono, para utilização no ensaio imunocitoquímico, realizado seguindo-se a metodologia descrita por PAIN *et al.* (1994), como segue;
9. Incubação do material com PBS-BSA, por 30 minutos;
10. Incubação com o anticorpo primário (soro anti-lectina, título 1:100, por duas horas);
11. Lavagem (5x) com PBS-BSA, 10 minutos cada;
12. Incubação com o anticorpo secundário, anti-IgG-*gold* ( título 1:50, por duas horas);
13. Lavagem (5x) com PBS-BSA, 10 minutos cada;
14. Lavagem (5x) com água deionizada, 5 minutos cada;
15. Provas de automarcação foram feitas substituindo-se o anticorpo primário pelo anticorpo pré-imune.
16. A observação e confecção das micrografias foram feitas em um microscópio eletrônico de transmissão (ZEISS 900).



## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A localização de lectinas em partes da planta mais suscetíveis ao ataque de patógenos, como sementes e órgãos vegetativos de reserva, é, geralmente, usada como argumento a favor da função de defesa atribuída a essas proteínas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). WGA, por exemplo, é encontrada na epiderme da coifa, que é a estrutura que primeiro entra em contato com o solo (RAIKHEL & LERNER, 1991). Assim, mesmo que não ocorra uma inibição direta de um fitopatógeno pela WGA, há uma chance enorme de ocorrer algum processo de reconhecimento antes da infecção.

A exsudação de lectinas a partir de sementes ou de raízes é outro argumento a favor da participação dessas proteínas na defesa da planta (CAMMUE *et al.*, 1990; SINGH *et al.*, 1996; GUO *et al.*, 1997).

Assim, baseado nesses argumentos, o primeiro passo deste trabalho foi à busca dessas evidências em sementes de *L. auriculata*.

CÂMARA (1994) relatou a presença de atividade hemaglutinante em exsudado de sementes de *L. auriculata*, entretanto, não realizou nenhum experimento adicional para confirmar a presença de lectina. Assim, seguindo seu protocolo, sementes de *L. auriculata* foram postas para germinar diretamente em Goma de Guar, uma matriz comumente utilizada para isolar lectinas com especificidade para galactose. O perfil cromatográfico do material exsudado está mostrado na FIGURA 1. O pico I, rico em um exsudado pigmentado, foi eluído com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo NaCl 150 mM. Esse material não apresentou atividade hemaglutinante. O pico II, eluído com o mesmo tampão, adicionado de galactose 200 mM, após diálise contra ácido acético e água, aglutinou eritrócitos de coelho, com um título de 2<sup>4</sup>. A confirmação da natureza lectínica desse material foi obtida através da inibição da hemaglutinação por galactose.

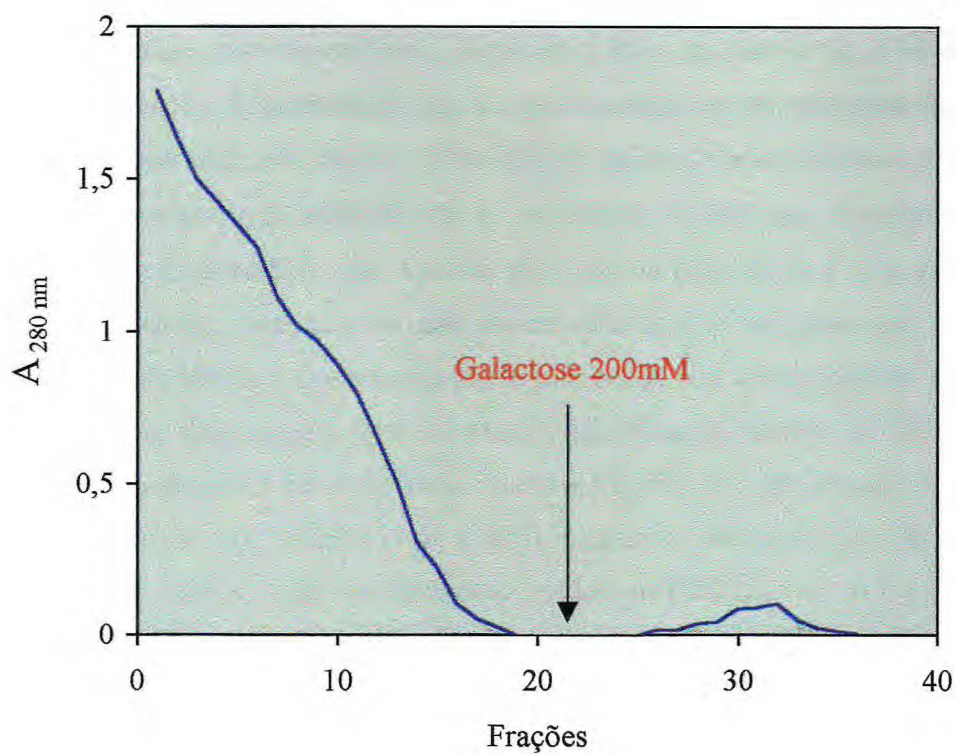


FIGURA 1 - Cromatografia de afinidade em coluna de Goma de Guar (5,0 x 40 cm) do material exsudado de sementes de *L. auriculata*. O pico I foi eluído com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo NaCl 150 mM, e o pico II eluído com o mesmo tampão, contendo galactose 200 mM. A cromatografia foi conduzida a 60 ml/h sendo coletados 4 ml por tubo.

A exsudação também foi investigada em sementes germinadas em água ou em solução de galactose 0,5 M. Ao final do período de embebição, os meios foram tratados com sulfato de amônio, no intervalo de 0-60%, para concentrar as proteínas. As frações foram submetidas à análise por *Western blot*, usando-se o anticorpo anti-LAL. A lectina foi detectada nas duas frações, demonstrando que a sua exsudação ocorre naturalmente, sem necessidade de nenhum estímulo externo (FIGURA 2). Assim, é possível sugerir que a exsudação de lectina a partir de sementes de *L. auriculata*, na natureza, represente um mecanismo de defesa inespecífico, que atua na proteção da plântula nos seus estágios iniciais do desenvolvimento, quando ela é mais suscetível ao ataque de patógenos.

A exsudação da lectina é apenas uma prova indireta de sua localização em regiões periféricas da semente. Essa confirmação foi obtida, inicialmente, através da técnica de *tissue print* realizada em cortes de cotilédones. Embora esta técnica não ofereça uma boa resolução, como discutido por SMETS *et al.* (1985), é possível perceber que o anticorpo reagiu mais fortemente com a região epidérmica do cotilédone (FIGURA 3). A localização da lectina também foi revelada por imunofluorescência, como mostrado na FIGURA 4. Observa-se uma marcação acentuada na região da protoderme do cotilédone e ausência de marcação do parênquima.

VAN DRIESSCHE *et al.* (1981) demonstraram que a lectina de ervilha encontra-se nos corpos protéicos da epiderme de sementes maduras. SMETS *et al.* (1985) confirmaram esse resultado e acrescentaram que a lectina também é encontrada em associação com a parede celular da epiderme da radícula. Segundo os autores, essa localização pode representar um *pool* de moléculas destinadas a exsudação.

A exsudação e a localização na epiderme de sementes podem, portanto, ser usados como argumentos a favor do envolvimento da lectina de *L. auriculata* (LAL) com a microbiota do solo.



FIGURA 2 – *Western blot* da lectina (raia 1) e do exsudado de cotilédones (raia 2) de *L. auriculata*. Reação revelada com o anticorpo anti-LAL.

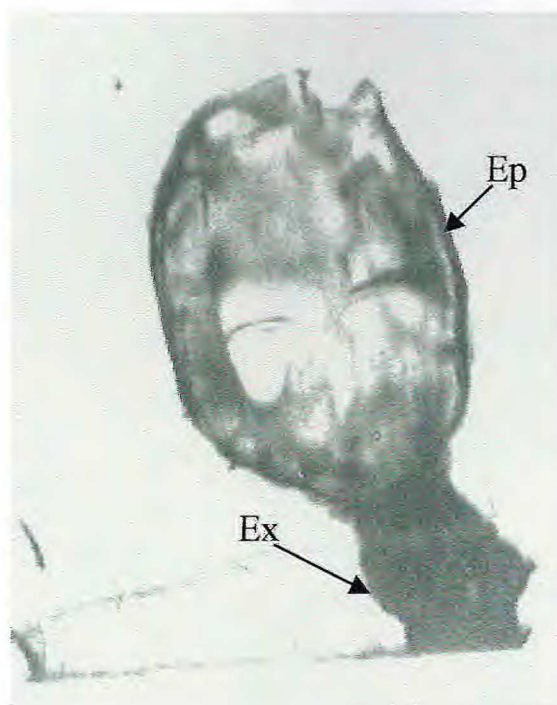


FIGURA 3 – *Tissue print* do cotilédone de *L. auriculata* mostrando a localização da lectina na região da epiderme (Ep). Lectina exsudada (Ex). Reação revelada com anticorpo anti-LAL.

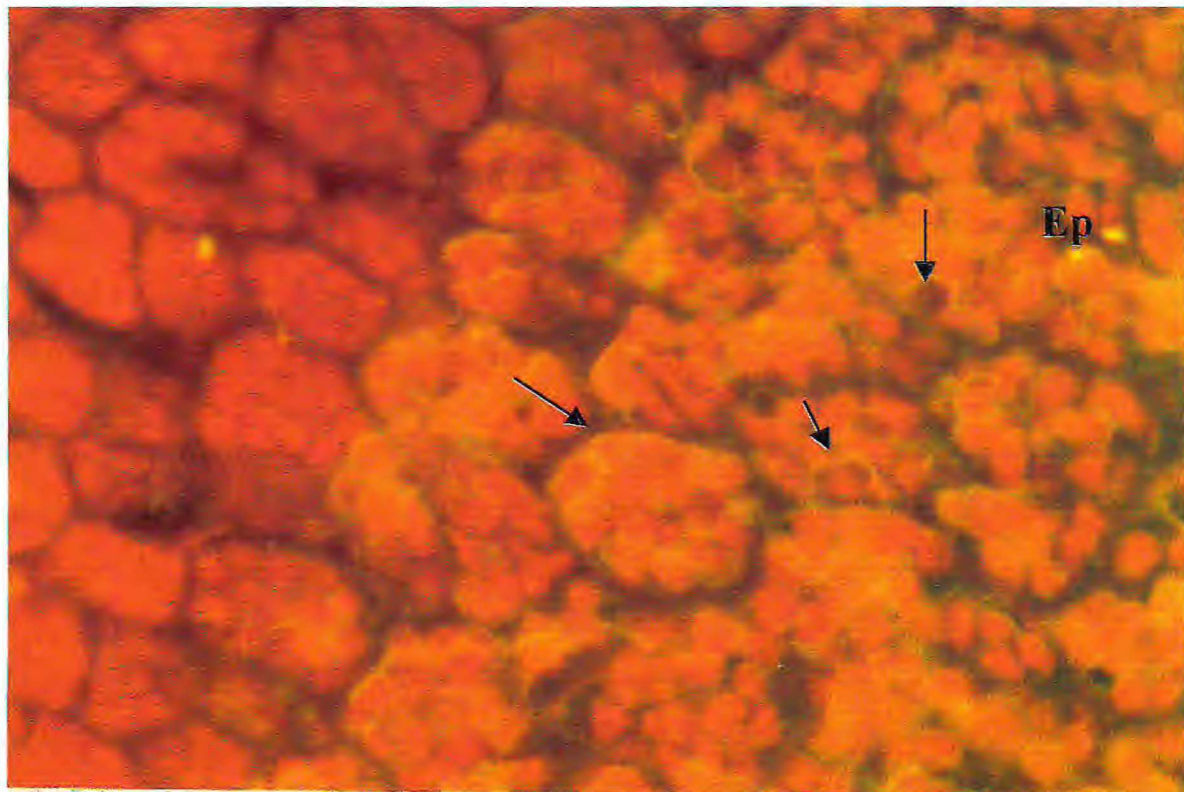


FIGURA 4 – Imunofluorescência direta em corte transversal de cotilédone de *L. auriculata* mostrando a localização da lectina (setas) na região epidérmica (Ep). Reação revelada como anticorpo anti-LAL conjugado com FITC. Aumento 20 x.

O próximo passo foi à realização de ensaios *in vitro* para verificar se LAL possuía atividade antifúngica. Antes disso, porém, foram realizados ensaios de atividades quitinásica, glucanásica e peroxidásica, para eliminar qualquer suspeita da presença dessas enzimas na preparação da lectina. Embora, o risco de contaminação por essas enzimas, que reconhecidamente estão envolvidas na defesa contra fungos (GOMES, 1996), durante a purificação da lectina, não proceda, LAL poderia ser uma quimerolectina, isto é, uma proteína que possui um domínio catalítico (ou uma outra atividade biológica), além do domínio de ligação a carboidrato (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). A lectina isolada de batata, por exemplo, causa a lise de esporos do fungo *Phytophthora infestans*, seu principal patógeno (GARAS & KUC, 1981), todavia, foi demonstrado que a atividade  $\beta$ -glucosidásica associada à lectina, provavelmente é a responsável pela resistência ao fungo (ANDREU & DALEO, 1988).

Não foi detectada atividade quitinásica, glucanásica ou peroxidásica na solução de lectina até a concentração de 1mg/ml. Isto, portanto, exclui qualquer participação de quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e peroxidases nas atividades doravante descritas para a LAL.

Quando esporos dos fungos *Aspergillus niger*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium solani* foram incubados na presença da lectina de *L. auriculata*, observou-se uma inibição do crescimento, quando comparado com o respectivo controle, cultivado na presença de albumina sérica bovina (BSA) (FIGURAS 5, 6 e 7). A inibição foi traduzida a partir da quantidade de massa micelial produzida (biomassa), medida em termos de absorbância, a 630 nm.

Os fungos *C. lindemuthianum* (FIGURA 5) e *F. solani* (FIGURA 6) mostraram-se mais suscetíveis, sendo inibidos a partir de 250  $\mu$ g/ml de lectina, enquanto o *A. niger* (FIGURA 7) revelou-se mais resistente, sendo necessários 1mg/ml de lectina para inibir seu crescimento.

Aparentemente, não é possível fazer generalizações sobre a potência de lectinas antifúngicas. Comparando-se o efeito das lectinas isoladas de *Hevea brasiliensis* (heveína) e de *Urtica dioica* (UDA), sobre o fungo *Botrytis cinerea*, por exemplo, tem-se que são necessários 500  $\mu$ g/ml de heveína e 40  $\mu$ g/ml de UDA para inibir 50% de seu crescimento, já para o fungo *Phycomyces blakesleeanus*, são necessários 300  $\mu$ g/ml e 100  $\mu$ g/ml de

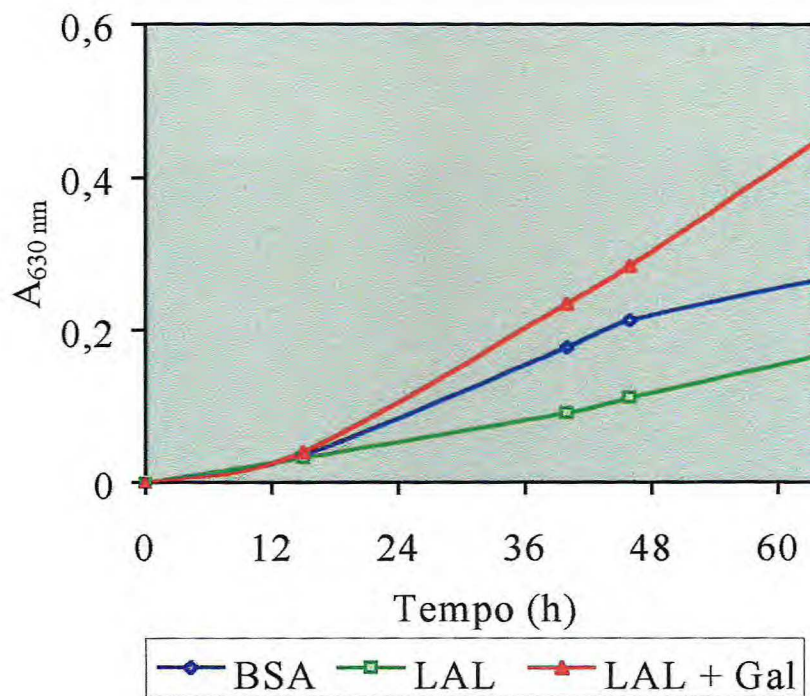


FIGURA 5 – Curva de crescimento do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* na presença da lectina de *L. auriculata* (LAL), LAL inibida por galactose 200 mM (LAL + Gal) e BSA, todas na concentração de 250  $\mu\text{g/ml}$ .



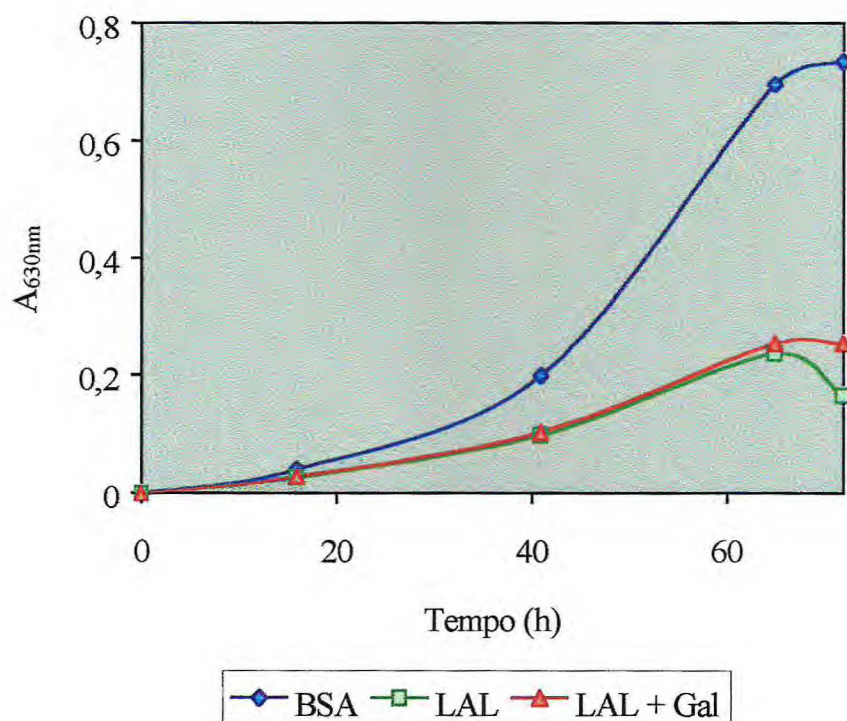


FIGURA 6 – Curva de crescimento do fungo *Fusarium solani* na presença da lectina de *L. auriculata* (LAL), LAL inibida por galactose 200 mM (LAL + Gal) e BSA, todas na concentração de 250  $\mu\text{g/ml}$ .

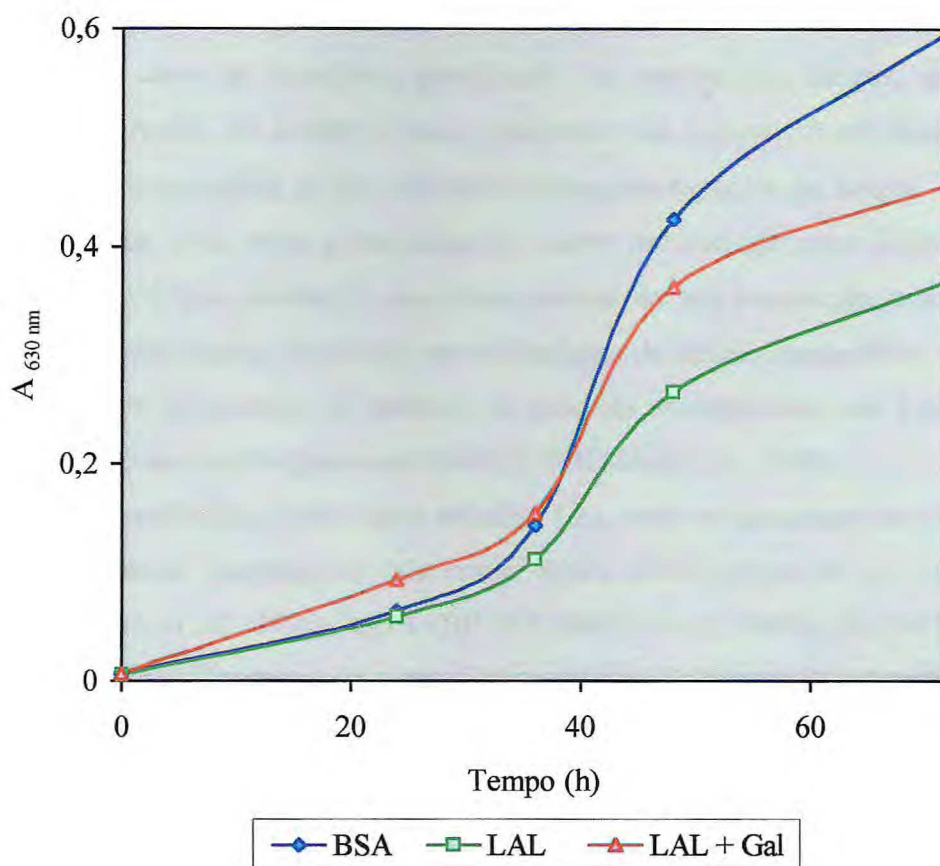


FIGURA 7 – Curva de crescimento do fungo *Aspergillus niger* na presença da lectina de *L. auriculata* (LAL), LAL inibida por galactose 200 mM (LAL + Gal) e BSA, todas na concentração de 1mg/ml.

heveína e UDA, respectivamente, para produzir o mesmo efeito (VAN PARIJS *et al.*, 1992). As lectinas de soja (SBA) e amendoim (PNA) são capazes de inibir a germinação de esporos de alguns fungos somente na concentração de 5 mg/ml (BARKAI-GOLAN, 1978). Parece, portanto, que além da interação com o açúcar específico, outras interações devam contribuir para a maior ou menor suscetibilidade dos fungos.

LAL não foi capaz de impedir a germinação de esporos dos fungos, mas a interação, de alguma forma, foi deletéria para o progresso das culturas. A atividade da lectina não foi espécie-específica, já que ela inibiu diferentes espécies de fungos. Isto reforça a idéia de que LAL seria potencialmente capaz de interagir com diferentes patógenos na natureza e que, de fato, a ocorrência natural de sua exsudação, como já mostrado, durante a germinação, representa um mecanismo de defesa inespecífico. Esta inespecificidade advém da presença de resíduos de açúcares reconhecidos pela LAL na superfície da maioria desses microrganismos (BARTINICKI-GARCIA, 1968).

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, LAL pode ser agrupada com outras lectinas reconhecidamente antifúngicas tais como WGA (CIOPRAGA *et al.*, 1999), heveína (VAN PARIJS *et al.*, 1992), UDA (BROEKAERT *et al.*, 1989), SBA e PNA (BARKAI-GOLAN, 1978). Todas inibem o crescimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos, de forma não letal. A ação dessas lectinas, portanto, não caracteriza uma ação fungistática, como observado para muitas drogas utilizadas no controle de infecções fúngicas. Na presença de lectinas, os fungos suscetíveis conseguem crescer, embora de forma mais lenta. Ao contrário, na presença de drogas fungistáticas, os fungos não morrem, mas também não crescem. Como o que se deseja em alguns tipos de controle microbiano é apenas retardar a infecção, o resultado poderia ser o mesmo.

Recentemente, CIOPRAGA *et al.* (1999) demonstraram que a WGA causa vários efeitos morfológicos em espécies de *Fusarium*, incluindo suscetibilidade à lise de parede celular de hifas, provocada por choque osmótico. Este resultado, em particular, é bastante interessante, pois demonstra que a interação prévia com a lectina torna os fungos mais vulneráveis. Isto reforça a idéia de que mesmo não sendo letal aos microrganismos, a lectina poderia retardar o processo infeccioso, dando tempo para que outros mecanismos de defesa da planta fossem acionados.

A incubação de esporos dos fungos na presença de LAL, previamente inibida por galactose, previniu a inibição do crescimento dos fungos *C. lindemuthianum* (FIGURA 5) e *A. niger* (FIGURA 7). A prevenção da inibição pelo hapteno sugere uma proximidade ou participação do sítio de ligação da lectina a carboidrato na interação LAL x patógeno. Surpreendentemente, a inibição da LAL por galactose não impediu a ação negativa da lectina sobre o desenvolvimento do *F. solani* (FIGURA 6). A não reversão do crescimento do *F. solani* pela galactose sugere uma interação com outro tipo de açúcar ou glicoconjugado, que a simples presença do hapteno não é capaz de neutralizar. Como LAL possui uma afinidade muito maior por outros açúcares, N-acetilgalactosamina, por exemplo, é provável que a interação com este fungo tenha envolvido esse receptor.

Por outro lado, a inibição do *C. lindemuthianum* (FIGURA 5) não só foi prevenida, como o crescimento foi estimulado, sugerindo que o fungo deva ter usado o excesso de galactose utilizado para inibir a lectina (200 mM), como fonte de carbono e energia, já que o meio continha apenas peptona 1%.

DOES *et al.* (1999) demonstraram que a BSA inibe, parcialmente, o crescimento do *C. lindemuthianum*, revelando uma sensibilidade do fungo a substâncias de natureza protéica. Isto ressalta o efeito da LAL, já que ela promoveu uma inibição mais acentuada do que a BSA, nas mesmas condições (FIGURA 5).

A lectina não mostrou nenhum efeito sobre o crescimento micelial dos fungos *A. niger*, *F. solani*, *C. lindemuthianum* e *R. solani*. Isso significa que a lectina não encontra sítios de interação disponíveis na superfície desses organismos, ou porque eles não estão presentes nesta fase do desenvolvimento ou não estão acessíveis. Considerando a complexidade química e estrutural da parede celular do micélio, que comumente é recoberta por matrizes extracelulares, ricas em substâncias de natureza protéica, pigmentos etc (GOODAY, 1994), é possível creditar esse resultado a impedimentos estéricos.

Os efeitos provocados por lectinas de plantas sobre fungos fitopatogênicos parecem, portanto, limitar-se a um retardamento da germinação de esporos e/ou inibição do desenvolvimento de hifas jovens. O mecanismo de inibição de fungos por lectinas não foi elucidado em nenhum dos exemplos citados na literatura, especulando-se que esse deva envolver alterações na reorientação do crescimento de hifas e, talvez, na deposição da

parede celular (DOES *et al.*, 1999; CIOPRAGA *et al.*, 1999; VAN PARIJS *et al.*, 1992; BROEKAERT *et al.*, 1989).

A fim de aprofundar o conhecimento sobre o efeito antifúngico da LAL, utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* como modelo experimental. Essa opção fundamentou-se nos seguintes argumentos: a) a atividade antifúngica da lectina não é espécie-específica; b) a natureza unicelular da levedura, o que facilita sobremaneira a manipulação, e c) a presença de resíduos de galactose/N-acetil-galactosamina na parede celular.

LAL inibiu o crescimento da levedura e essa inibição foi prevenida por galactose (FIGURA 8). A lectina, efetivamente, se ligou à superfície da célula, já que foi satisfatoriamente recuperada a partir do tratamento da levedura com galactose e também com HCl, como demonstrado por *Western blot* e revelado por quimioluminescência (FIGURA 9). A recuperação com HCl foi particularmente interessante, pois sugere que aqui, da mesma forma que com o *F. solani*, a lectina provavelmente interage com outros glicoconjugados presentes na superfície da levedura, que a galactose não foi capaz de reverter.

A interação da lectina com a superfície da levedura foi visualizada por microscopia de fluorescência (FIGURA 10) e a resolução do sítio de interação demonstrado por microscopia eletrônica de transmissão (FIGURA 11). A marcação por partículas de ouro evidenciou dois sítios de interação, um na face interna, adjacente à membrana plasmática e outro na porção externa da parede celular.

Na tentativa de descobrir algum fato novo sobre o mecanismo de ação antifúngica de lectinas, já que a maioria dos trabalhos se concentra apenas na dinâmica da interação (DOES *et al.*, 1999), ou com seus aspectos morfológicos (VAN PARIJS *et al.*, 1992; CIOPRAGA *et al.*, 1999), investigou-se o efeito da lectina na acidificação do meio de células de levedura, estimulada por glicose. A variação na concentração de prótons ( $H^+$ ) para a cultura controle foi  $\Delta[H^+] = 143,7 \times 10^{-7}$  e para a cultura experimental, isto é, na presença da lectina (500  $\mu\text{g/ml}$ ), foi  $\Delta[H^+] = 56,7 \times 10^{-7}$ . Concluiu-se, portanto, que a lectina inibiu a acidificação do meio de leveduras, sendo esta inibição de 60%. A inibição da acidificação do meio pode significar uma atuação da lectina sobre componentes da membrana plasmática, como glicoproteínas, tais como bombas de prótons.

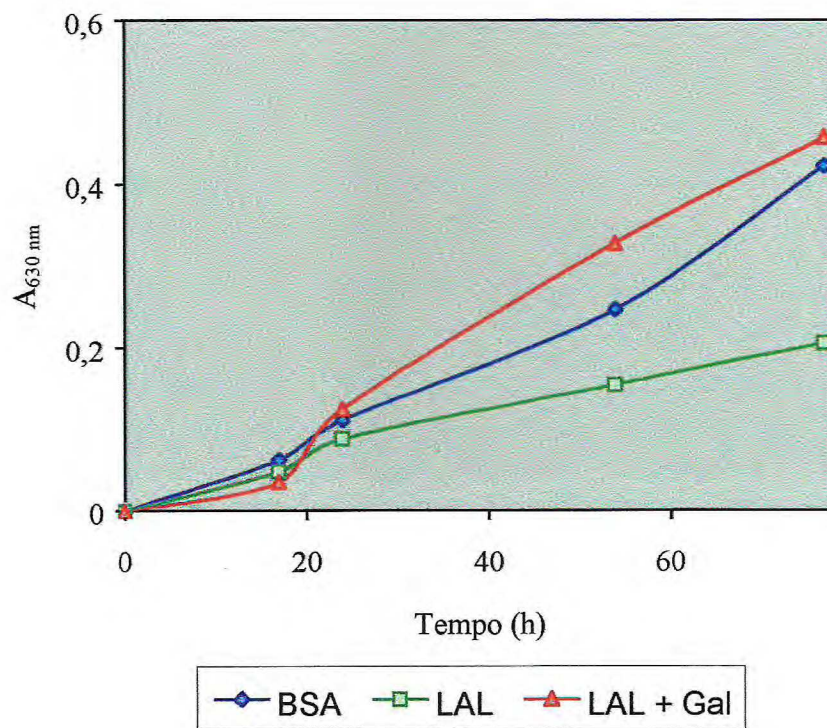


FIGURA 8 – Curva de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na presença da lectina de *L. auriculata* (LAL), LAL inibida por galactose 200 mM (LAL + Gal) e BSA, todas na concentração de 500  $\mu\text{g/ml}$ .

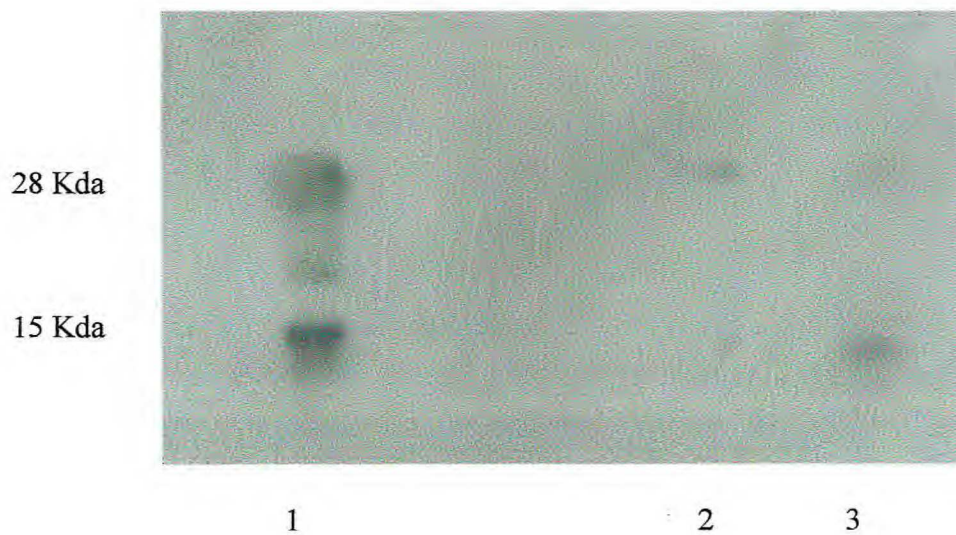


FIGURA 9 – *Western blot* mostrando a lectina extraída após interação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Raia 1 - LAL, Raia 2 – LAL extraída com galactose 500 mM e Raia 3 – LAL extraída com HCl 0,1 N. Reação revelada com anticorpo anti-LAL por quimioluminescência.

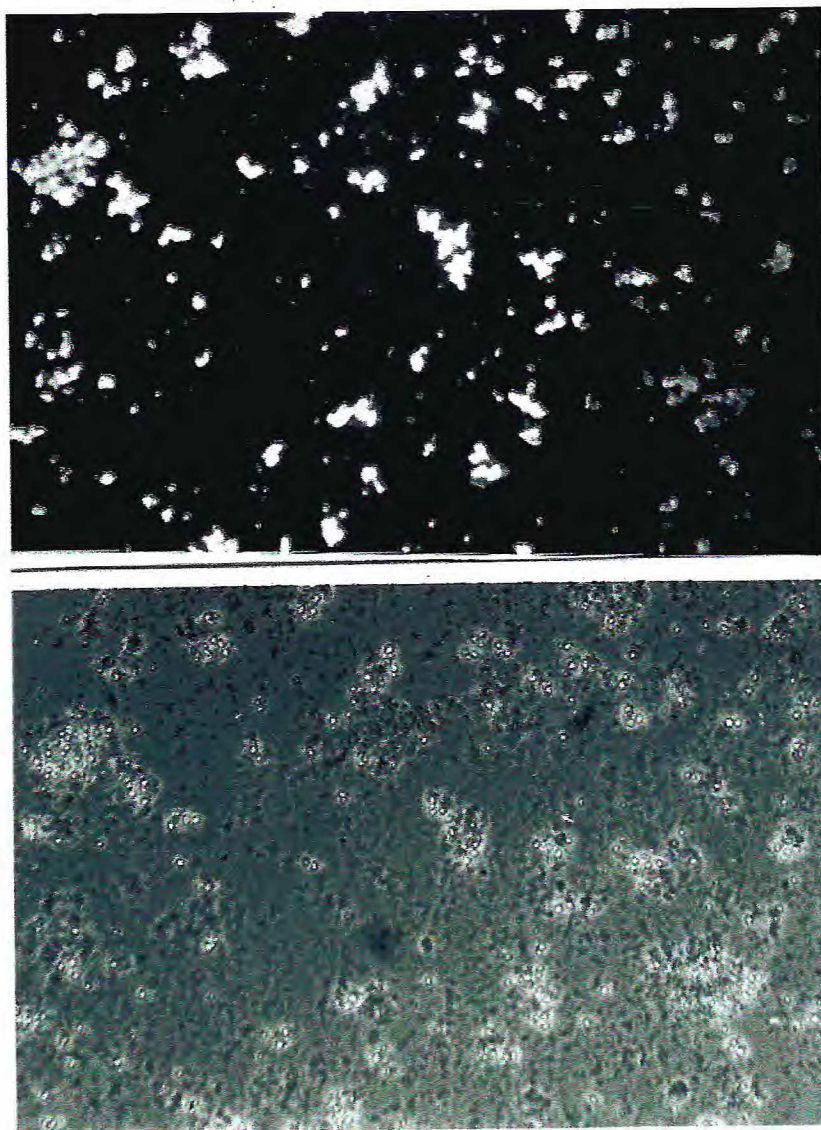


FIGURA 10 – Imunofluorescência em células de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em meio contendo a lectina de *L. auriculata* (foto superior). Lâmina observada em microscopia de campo claro (foto inferior). Aumento 100 x.



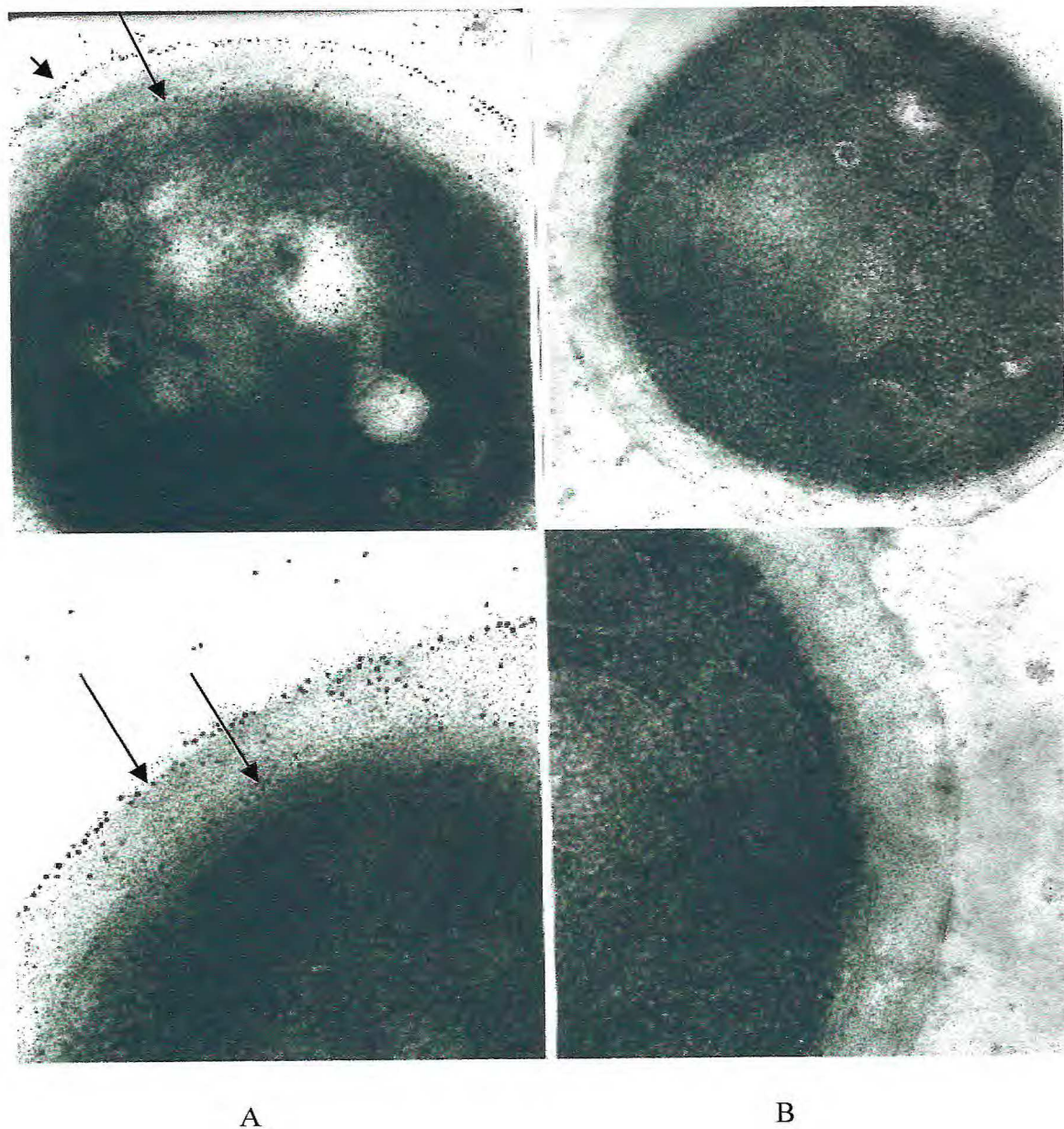


FIGURA 11 – Eletromicrografias de células de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em meio contendo a lectina de *L. auriculata* (A) e de células cultivadas em meio sem lectina (B). As setas indicam as regiões de interação da lectina com a superfície da levedura. Aumento 50.000 x.

As bombas de prótons são importantes componentes de membrana, estando envolvidas, principalmente, na regulação do pH intracelular e na manutenção de gradientes eletroquímicos de prótons necessários à captação de nutrientes. A bomba de próton encontrada na membrana plasmática de fungos faz parte da classe de enzimas transportadoras de íons que estão comumente presentes em todas as membranas celulares externas (MONK & PERLIN, 1994).

Estruturalmente, parece possível uma interação entre a lectina e componentes da membrana plasmática da levedura, haja vista a marcação por partículas de ouro detectada próximo a membrana (FIGURA 11).

É digno de nota que ensaios preliminares feitos com vesículas de membrana plasmática isoladas de hipocótilos de *L. auriculata* demonstraram que a lectina, na concentração de 120 µg/ml, promoveu 50% de inibição da H<sup>+</sup>ATPase (Dr. Arnaldo Façanha (UENF), comunicação pessoal). A confirmação desse resultado abrirá novas perspectivas para elucidação da função fisiológica da LAL.

Analisando o conjunto de resultados, é possível sugerir que a inibição *in vitro* da levedura, provocada pela lectina, provavelmente ocorra através da inibição da H<sup>+</sup>ATPase de membrana plasmática. Da mesma forma, é possível especular que mecanismo semelhante atue na inibição de fungos filamentosos, particularmente porque a lectina só atua sobre esses fungos em seus estágios iniciais do desenvolvimento, quando, provavelmente, teria condições de interagir com a ATPase de membrana. Com os fungos adultos, entretanto, isso não seria possível, como demonstrado pela incapacidade da lectina de inibir o crescimento micelial, provavelmente devido a impedimentos provocados pela presença de substâncias que recobrem a parede celular do micélio (GOODAY, 1994) e que, conseqüentemente, impediriam a interação da lectina com a enzima.

Caso se demonstre que as funções endógena e exógena da LAL atuam através do mesmo mecanismo, isto é, regulação do transporte de íons através da membrana plasmática, é possível argumentar que estamos diante de um exemplo de adaptação evolutiva convergente para a multifuncionalidade desta proteína. Isto reforçaria a idéia de que as lectinas desempenhariam diferentes funções, dependendo de sua ocorrência temporal e espacial no ciclo de vida planta. Experimentos deverão ser conduzidos para provar essa hipótese.

## 7 – CONCLUSÕES

A lectina de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* possivelmente atua inespecificamente na defesa da planta contra fungos fitopatogênicos. Os argumentos a favor dessa hipótese se baseiam na localização da lectina na epiderme da semente, na sua exsudação para o meio e na sua capacidade de retardar o crescimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos.

Os resultados não nos permitem afirmar se a função básica da lectina seria a de defesa, entretanto, considerando os seus efeitos sobre a ATPase de membrana plasmática é possível especular que, além de regular fisiologicamente o transporte de íons, ela poderia atuar, via esse mesmo mecanismo, na defesa da planta.

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREU, A., DALEO, G. R. Properties of potato lectin fractions isolated from different parts of the tuber and their effect on the growth of *Phytophthora infestans*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 32, p. 323-333, 1988.

BARKAI-GOLAN, R., MIRELMAN, D., SHARON, N. Studies on growth inhibition by lectins of penicillia and aspergilli. **Arch. Microbiol.**, v. 116, p. 119-124, 1978.

BARTNICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 22, p. 87-107, 1968.

BERGERS, L.R., REYNOLDS, D.M. The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 29, p. 522-534, 1958.

BOHLOOL, B. B., SCHMIDT, E. L., Lectins: a possible basis for specificity in *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. **Science**, v. 185, p. 269-271, 1974.

BORKOWSKA, M., KRZYMOWSKA, M., TALARCZYK, K., AWAN, M. F. M., YAKOVLEVA, L., KLECZKOWSKI, K., WIELGAT, B. Transgenic potato expressing soybean beta-1,3-endoglucanase gene exhibit an increased resistance to *Phytophthora infestans*. **J. Biosc.**, v. 53, p. 1012-1016, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, 248-254, 1976.

BROEKAERT, W. F., VAN PARIJS, J., LEYNS, F., OJOS, H., PEUMANS, W. J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, v. 245, p. 1100-1102, 1989.

BROEKAERT, W. F., CAMMUE, B. P. A., VANDERLEYDEN, J. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 69, p. 61-66, 1990.

CÂMARA, F. L. **Lectinas de *Luetzelburgia auriculata* Ducke. Purificação, Caracterização Parcial e Estudos de Mobilização Durante o Desenvolvimento da Plântula.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica. 1994, 119 p.

CAMMUE, B. P. A., BROEKAERT, W. F., PEUMANS, W. J. Wheat germ agglutinin in wheat seedling roots: induction by elicitors and fungi. **Plant Cell Rep.**, v. 9, p. 264-267, 1990.

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

CIOPRAGA, J., GOZIA, O., TUDOR, R., BREZUICA, L., DOYLE, R. *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1428, p. 424-432, 1999.

CZAPLA, T. H., LANG, B. A. Effect of plant lectin on the larval development of european corn borer (Lepidoptera:Pyralidae) and the Southern corn rootworm (Coleoptera:Chrysomelidae). **J. Econ. Entomol.**, 1991.

DE PATER, S., BOOIJ, P., DEMEL, R., KIJNE, J. Pea lectin associates with lipid monolayers. **J. Cell Biochem.**, v. 19A, p. 139. 1995.

DIAZ, C. L., S, PAINK, H. P., WIJFFELMAN, C. A., KIJNE, J. W. Genomic requirement of *Rhizobium* for nodulation of white clover hairy roots transformed with the pea lectin gene. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 8, p. 348-356, 1995.

DOES, M. P., HOUTERMAN, P. M., DEKKER, H. L., CORNELISSEN, J. C. Processing, targeting, and antifungal activity of stinging nettle agglutinin in transgenic tobacco. **Plant Physiol.**, v. 120, p. 421-431, 1999.

EINHOFF, W., RUDIGER, H. Isolation of the *Canavalia ensiformis* seed  $\alpha$ -mannosidase by chromatography on concanavalin A, the lectin from the same plant, without involving its sugar binding site. **Biol. Chem.**, v. 367, p. 313-320, 1986.

FERENC, M., MORAWIECKA, B. Lectin involved in fast mobilization of seeds reserves? Rye germ agglutinin (RGA) activates endogenous acid phosphatases. In: BOG-HANSE, T. C., BREBOROWICZ, J. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1985, v. 4, p. 515-522.

GARAS, N. A., KUC, J. Potato lectin lyses zoospores of *Phytophthora infestans* and precipitates elicitors of terpenoid accumulation produced by the fungus. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 18, p. 227-237, 1981.

GERS-BARLAG, H., SCHECHER, G., SIVA KUMAR, N., RUDIGER, H. Protein body membranes as binding partners of lectins. In: VAN DRIESSCHE, E., FRANZ, H., BEECKMANS, S., PFULLER, U., KALLIKORM, A., BOG-HASEN, T. C. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1993, v. 8, p. 97-100.

GOMES, V. M., OLIVEIRA, A. E. A., XAVIER-FILHO, J. A chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase isolated from the seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) inhibit the growth of fungi and insect pest of the seed. **J. Sci. Food Agricult.**, v. 72, p. 86-90, 1996.

GOODAY, G. W. Cells walls. In: GOW, N. A. R., GADD, G. M. **The Growing Fungus**. Londres, Chapman & Hall. 1994, p. 45-62.

GUO, B. Z., CHEN, Z. Y., BROWN, R. L., LAX, A. R., CLEVELAND, T. E., RUSSIN, J. S., MEHTA, A. D., SELITRENNIKOFF, C. P., WIDSTROM, N. W. Germination induces accumulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. **Phytopathol.**, v. 87, p. 1174-1178, 1997.

HEIDENREICH, M., RUDIGER, H. Interactions between the lectins from *Dolichos biflorus* and *Glycine max* and other components of the protein bodies from the same plant. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 74, suppl., 46, p. 13, 1997.

HINCHA, D. K., BRATT, P. J., WILLIAMS, W. P. A cryoprotective lectin reduces the solute permeability and lipid fluidity of thylakoid membranes. **Cryobiol.**, v. 34, p. 193-199, 1997.

HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Cur. Op. Plant Biol.**, v. 2, p. 320-326, 1999.

JAYARAMAN, V., DAS, H. R. Interaction of peanut root lectin (PRA II) with rhizobial lipopolysaccharides. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1381, p. 7-11, 1998.

JOHNSON, G. D. Immunofluorescence. In: CATTY, D. **Antibodies**. Oxford: IRL Press, 1989, v. 2, cap. 6, p. 179-200.

KOMAROVA, E. N., VOLNOVA, T. L., TRUNOVA, T. I., VYSKREBENTSVA, E. I. Effect of fusaric acid on the activity and carbohydrate specificity of lectins from crown cell walls and the frost resistance of winter-wheat plants. **Russ. J. Plant Physiol.**, v. 44, p. 454-457, 1997.

LEGRAND, M., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P., FRITIG, B. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. **Botany**, v. 84, p. 6750-6754, 1987.

LIS, H., SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 637-674, 1998.

MIRELMAN, D., GALUN, E., SHARON, N., LOTAN, R. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. **Nature**, v. 256, p. 414-416, 1975.

MONK, B. C., PERLIN, D.S. Fungal plasma membrane proton pumps as promising new antifungal targets. **Critical Rev. Microbiol.**, v. 20, n. 3, p. 209-223, 1994.

MOREIRA, R.A., CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.), isolation, characterization and behavior during germination. **Biol. Plantarum**, v. 26, n. 2, p. 113-120, 1984.

MOREIRA, R. A., PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol.**, v. 59, p. 783-787, 1977.

O'CONNELL, R. J., PAIN, N. A., HUTCHISON, K. A., JONES, G. L., GREEN, J. R. Ultrastructure and composition of the cells surfaces of infection structures formed by the



fungal plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **J. Microscopy**, v. 181, p. 204-212, 1996.

OLIVEIRA, J. T. A., MORAES, S. M. D., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., VASCONCELOS, I. M. Protein and lectin mobilization during *Erythrina velutina* f. *aurantiaca* seed germination and seedling growth in the dark. **Rev. Bra. Fisiol. Veg.**, v. 10, n. 1, p. 25-30, 1998.

OLIVEIRA, J. T. A., PUSZTAI, A., GRANT, G. Changes in organs and tissue induced by feeding of purified Kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) lectins. **Nutr. Res.**, v. 8, p. 943-947, 1988.

PARADEZ-LOPEZ, O., GUEVARA-LARA, F., BARBA DE LA ROSA, A. P. Biosynthesis of lectins in developing seeds of common bean. **Food Chem.**, v. 35, p. 237-242, 1990.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v. 109, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: Storage proteins with a defensive role. In: BASU, J., KUNDU, M., CHAKRABARTI, P. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. 1993, v. 9, p. 1993.

POWELL, K. S., GATEHOUSE, A. M. R., HILDER, V. A., GATEHOUSE, J. A. Antimetabolic effects of plant lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pests, *Nilaparva lugens* and *Nephotettix cincitepa*. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 66, p. 119-126, 1993.

RAIKHEL, N. V., LERNER, D. R. Expression and regulation of lectin genes in cereals and rice. **Dev. Genet.** v. 12, p. 255-260, 1991.

RECORBET, G., STEINBERG, C., ALABOUVETTE, C. Quantitative variability of sugar residues at the surface of *Fusarium oxysporum* conidia as detected by lectin typing. **Lett. App. Microbiol.**, v. 22, p. 233-236, 1996.

REISSIG, J. L., SROMENGER, J. L., LELOIR, L. F. A. A modified colorimetric method for estimation of N-acetylamino sugars. **Biol. Chem.**, v. 217, p. 959-966, 1955.

ROBERTS, W. K., SELITRENNIKOFF, C. P. Plant cell and bacterial chitinase differ in antifungal activity. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 169-176, 1988.

RUDIGER, H. Plant lectins- more than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anat.**, v. 161, p. 130-152, 1998.

RUDIGER, H., BARTZ, I. The phosphatase from *Canavalia ensiformis* seeds interacts with concanavalin A, the lectin from the same plant. In: VAN DRIESSCHE, E., FRANZ, E. H., BEECKMANS, S., PFULLER, U., KALLIKORM, A., BOG-HANSEN, T. C. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1993, v. 8, p. 92-96.

SCHLUMBAUM, A., MAUCH, F., VOGELI, U., BOLLER, T. Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, v. 324, p. 365-367, 1986.

SELA-BUURLAGE, M. B. **Apud DOES et al. (1999)**. In vitro sensitivity and tolerance of *Fusarium solani* towards chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. 1996. PhD thesis. Landbouwniversiteit Wageningen, Wageningen, The Netherlands.

SINGH, P., BHAGLAL, P., BHULLAR, S. S. Differential levels of wheat germ agglutinin (WGA) in germinating embryos of different wheat cultivars in response to osmotic stress. **Plant Physiol.**, v. 34, p. 547-552, 1996.

SIQUEIRA, J. O., FRANCO, A. A. **Biotechnologia do Solo: Fundamentos e Perspectivas**. Nagy Ltda., São Paulo, 1988, 236 p.

SMETS, G., VAN DRIESSCHE, E., BEECKMANS, S. Ultrastructural localization of pea lectin in the embryos and cotyledons during development by colloidal-gold method. In: BOGHANSE, T. C., BREBOROWICZ, J. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 1985. v. 4, p. 453-462.

SMEETS, K., VAN DAMME, E. J. M., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W. J. Isolation and characterization of lectins and lectin alliinase complexes from bulbs of garlic (*Allium sativum*) and ramsons (*Allium ursinum*). **Glycoconj. J.**, v. 14, p. 331-343, 1997.

TERRAS, F. R. G., EGGERMONT, K., KOVALEVA, V., RAIKHEL, N., OSBORN, R. W., KESTER, A., REES, S. B., TORREKENS, S., VAN LEUVEN, F., VANDERLEYDEN, J., CAMMUE, B. P. A., BROEKAERT, W. F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. **Plant Cell**, v. 7, p. 573-588, 1995.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed., Porto Alegre, Artes Gráficas, 2000, 827 p.

TOWBIN, H., STAEBLIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

URBANЕК, H., KUZNIAK-GEBAROWSKA, E., HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiol. Plant.**, v. 13, p. 43-50, 1991.

VAN DRIESSCHE, E., SMETS, G., DEJAEGERE, R., KANAREK, L. The immuno-histochemical localization of lectin in pea seeds (*Pisum sativum* L.). **Planta**, v. 153, p. 287-296, 1981.

VAN PARIJS, J., JOOSEN, H. M., PEUMANS, W. J., GEUNS, J. M., VAN LAERE, A. J. Effect of the *Urtica dioica* agglutinin on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. **Arch. Microbiol.**, v. 158, p. 19-25, 1992.

VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W. F., GOLDSTEIN, I. J., PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Plant**, v. 183, p. 258-262, 1991.

WENZEL, M., GERS-BALAG, H., SCHIMPL, A., RUDIGER, H. Time course of lectin and storage protein biosynthesis in developing pea (*Pisum sativum*) seeds. **Biol. Chem.**, v. 374, p. 887-894, 1993.

WENZEL, M., GERS-BALAG, H., RUDIGER, H. Cross-reactions with pea lectin of a protein from protein body membranes. **Phytochem.**, v. 38, p. 825-829, 1995.

XUE, L., CHAREST, P. M., JABAJI-HARE, S. H. Systematic induction of peroxidases,  $\beta$ -1,3-glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Phytopathol.**, v. 88, p. 359-365, 1998.

ZHU, K., HUESING, J. E., SHADE, R. E., BRESSAN, R. A., HASEGAWA, P. M., MURDOCK, L. An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae). **Plant Physiol.**, v. 110, p. 195-202, 1996.

# APÊNDICE

---

## APÊNDICE 1

### 1- Reagente A

- 10 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro
- 10 g de tartarato de sódio e potássio
- 8 g de  $\text{NaHCO}_3$
- 80 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro
- $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 400 ml

### 2- Reagente B

- 15 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 1 a 2 gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado
- $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 100 ml

### 3- Reagente C

Mistura dos reagentes C' e C''

#### 3.1- Reagente C'

- 25 g de molibdato de amônio
- 450 ml de  $\text{H}_2\text{O}$
- 21 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado

#### 3.2- Reagente C''

- 3 g de  $\text{Na}_2\text{HSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

C'' foi adicionado ao C' e a mistura agitada e incubada a 55 °C, por 30 minutos.

## **APÊNDICE 2**

### **Solução de DMAB**

- 10 g de DMAB
- 100 ml de ácido acético glacial contendo 12,5% de HCl 11,5 M

Diluir 1:2 com ácido acético glacial antes de usar.



# **CAPÍTULO III**

---

**ANÁLISE DO CONTEÚDO E PERFIL DA LECTINA DE  
TECIDOS DE *Luetzelburgia auriculata* OBTIDOS DE  
PLANTAS TRATADAS COM ÁCIDO SALICÍLICO E  
COM O FUNGO *Fusarium solani***

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 – Considerações Gerais

Ao longo da evolução, plantas, insetos e microrganismos estabeleceram uma complexa relação, com trocas de informações tanto a nível celular quanto molecular. Como resultado desta co-evolução, a maioria das plantas apresenta algum grau de resistência ao ataque de predadores e patógenos, ou seja, a suscetibilidade de plantas aos agressores é antes uma exceção, do que a regra (PASCHOLATI & LEITE, 1994). Assim mesmo, os fitopatógenos são responsáveis por 12-13% dos prejuízos causados na produção anual de alimentos (DEMPSEY *et al.*, 1998).

Considerando apenas os patógenos de sementes, já foram identificados cerca de 1300 microrganismos causadores de doenças. Em termos proporcionais, os fungos são os principais patógenos (72%), seguidos dos vírus (19%), bactérias (9%) e nematóides (1%) (RICHARDSON, 1996).

As doenças de plantas têm sido exacerbadas na agricultura moderna devido à prática de monoculturas intensivas que favorecem a evolução, relativamente rápida, de predadores e patógenos. A experiência tem mostrado a ineficácia do uso continuado de defensivos agrícolas para o controle dessas pragas, além dos sérios danos que causam ao ambiente (ORTEGA *et al.*, 1998). Assim, as modernas técnicas de controle estão lançando mão do arsenal natural de defesa das plantas. Cada vez mais os trabalhos estão se voltando para o isolamento e identificação de genes de resistências que possam ser transferidos para variedades comerciais, a fim de torná-las mais resistentes a predadores e patógenos (LAMB *et al.*, 1992; CORNELISSEN & MELCHERS, 1993; DEMPSEY *et al.*, 1998).

## 1.2 – Interação Planta-Patógeno

Cada interação hospedeiro-parasita pode ser encarada como uma luta entre dois organismos, pela sobrevivência. Nesta batalha, o patógeno lança mão de suas armas químicas para atacar o hospedeiro em potencial, enquanto o hospedeiro, através de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, procura se defender do patógeno. O hospedeiro mostra-se como vencedor quando a doença não ocorre (resistência), enquanto o aparecimento de sintomas da doença (suscetibilidade), indica o patógeno como vencedor (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

A forma mais comum de interação entre plantas e patógenos é a do tipo não-hospedeira ou incompatibilidade básica. Neste tipo de interação, o patógeno não consegue colonizar a planta, a despeito dela não exibir nenhuma resposta. O segundo tipo de interação é aquela em que a planta pode ativar uma resposta de defesa, em consequência do ataque do patógeno. Essa resistência induzida inclui o desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade no sítio de infecção, caracterizada por necrose, que impede a disseminação do patógeno. Frequentemente associada à resposta de hipersensibilidade, verifica-se um aumento da síntese de fitoalexinas, a deposição de compostos que fortalecem a parede celular e a expressão de proteínas de defesa. Além disso, observa-se que regiões da planta não agredidas desenvolvem uma resistência duradoura ao patógeno, fenômeno conhecido como resistência sistêmica adquirida. Finalmente, a suscetibilidade é o evento mais raro e caracteriza-se pelo aparecimento dos sintomas da doença (DEMPSEY *et al.*, 1998).

## 1.3 – Mecanismos de Defesa de Plantas

As plantas podem se defender dos agentes fitopatogênicos passivamente ou ativamente. Os fatores de resistência pré-formados (passivos, constitutivos), incluem aqueles já presentes na planta antes do contato com os patógenos. Os fatores pós-formados

(ativos, induzidos) mostram-se ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença dos patógenos. Em ambas as categorias, os fatores podem ser subdivididos em estruturais e bioquímicos (PASCHOLATI & LEITE, 1994).

Os fatores estruturais da planta atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto que as reações bioquímicas que ocorrem nas células do hospedeiro produzem substâncias que se mostram tóxicas ao patógeno, ou criam condições adversas ao crescimento deste no interior da planta (AGRIOS, 1988; XAVIER-FILHO, 1993).

Várias proteínas têm sido implicadas nos mecanismos de resistência de plantas contra patógenos e predadores. Elas podem ser agrupadas em três classes, de acordo com suas funções. Na primeira classe, estão as proteínas que reforçam, reparam ou alteram a parede celular da planta ou modificam sua matriz extracelular. A segunda classe de proteínas inclui aquelas que exibem atividade antimicrobiana e a terceira classe compreende as proteínas que estão envolvidas na resposta de defesa (BOWLES, 1990).

Algumas proteínas relacionadas à patogênese, coletivamente chamadas proteínas PR, constituem a principal classe de compostos induzidos após a reação de hipersensibilidade. Essas proteínas foram originalmente identificadas em plantas de fumo, infectadas com o vírus do mosaico do fumo (TMV) (GIANINAZZI *et al.*, 1970). Desde essa descoberta, outras proteínas com propriedades físico-químicas e funcionais semelhantes foram isoladas de várias espécies de plantas, incluindo mono e dicotiledôneas (VAN LOON, 1999).

As proteínas PR, identificadas em plantas de fumo infectadas com o TMV, foram divididas em 5 famílias, de acordo com a solubilidade, resistência às proteases, acúmulo em resposta a lesões e mobilidade eletroforética (BOWLES, 1990). Mais recentemente, novas famílias foram adotadas com o intuito de acomodar outras classes de proteínas com características semelhantes. Essa nomenclatura baseia-se na seqüência de aminoácido, relações sorológicas e/ou atividades enzimáticas ou biológicas. Com base nessa classificação são reconhecidas 11 famílias de proteínas PR: PR-1 – de propriedades desconhecidas; PR-2 – atividade  $\beta$ -1,3-glucanase; PR-3 – quitinases dos tipos I, II, IV, V, VI e VII; PR-4 – quitinases dos tipos I e II; PR-5 – tipo taumatina; PR-6 – inibidor de

proteínase; PR-7 – endoproteínases; PR-8 – quitinase do tipo III; PR-9 – peroxidases; PR-10 – tipo ribonucleases e PR-11 – quitinase tipo I (VAN LOON, 1999).

As proteínas PR são definidas como proteínas codificadas pela planta hospedeira, mas induzidas somente em situações patológicas ou relacionadas (ANTONIW *et al.*, 1980). Essa definição exclui as proteínas constitutivas que estão presentes em baixas concentrações, mas que aumentam substancialmente após a infecção. Exceção é feita as isoformas específicas de tais enzimas que não ocorrem normalmente, mas são induzidas como resultado da infecção. Portanto, o principal critério para uma proteína ser considerada uma proteína PR é sua expressão após a infecção (VAN LOON, 1999).

Embora existam algumas evidências do envolvimento de lectinas no mecanismo de defesa de plantas e já tenha sido demonstrado o aumento da síntese de algumas delas após tratamento com eliciadores bióticos e abióticos (CAMMUE *et al.*, 1989; 1990; GIBSON *et al.*, 1982), elas não são consideradas proteínas relacionadas à patogênese.

#### 1.4 – Elicidores de Resposta de Defesa de Plantas

Várias substâncias e estímulos físicos são capazes de desencadear uma resposta de defesa em plantas. Os principais eliciadores físicos são a radiação ultravioleta, a injúria mecânica e o choque térmico. Como exemplos de eliciadores químicos podem ser citados carboidratos, glicoproteínas, ácidos graxos, corantes, fungicidas, antibióticos, etanol, cloreto de mercúrio, bromo, ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno etc (TEMPLETON & LAMB, 1988; MAUCH *et al.*, 1992; NASSER *et al.*, 1990; WHITE, 1979; EBEL & COSIO, 1994; VERNOOIJ *et al.*, 1994; FERNANDES, 1998). Fragmentos derivados de paredes celulares de fungos e de plantas também podem atuar como agentes sinalizadores na ativação de genes envolvidos nas respostas de defesa (ROBY *et al.*, 1985).

Elicidores exógenos, originados do patógeno ou agressor, possuem mobilidade limitada dentro da planta. Eles geralmente evocam respostas nas células circunvizinhas ao patógeno. Nesta categoria de eliciadores estão incluídas proteínas, oligossacarídeos, glicoproteínas, ácidos graxos e derivados. Eles podem ser liberados espontaneamente

durante o crescimento do patógeno ou através da ação de enzimas produzidas pela planta. Esses eliciadores estão geralmente envolvidos em respostas de defesa inespecíficas. A resistência específica do cultivar depende do reconhecimento de um biótipo de patógeno pela planta. Isso significa a detecção de um componente específico do patógeno, que não é característico para a espécie, mas apenas para aquela forma especial ou raça. Portanto, membros da espécie que não possuem esse determinante podem passar despercebidos e colonizar a planta (EBEL & COSIO, 1994).

Os eliciadores endógenos são originados da planta e surgem como resultado da interação com o agressor. A função desses eliciadores é de modular a resposta ao redor do tecido. Essa modulação pode ser exercida independentemente da presença de eliciadores exógenos ou de maneira sinérgica. Os eliciadores endógenos variam em sua mobilidade, e dependendo do tipo, podem mediar respostas localizadas ou sistêmicas. Entre os mais bem caracterizados estão os galacturonídeos, derivados de componentes pécticos da parede celular. Eles são liberados após danos celulares ou morte provocada por ferimentos ou através da ação de pectinases derivadas do patógeno (EBEL & COSIO, 1994).

As respostas de defesa de plantas, portanto, podem ser induzidas por estímulos inespecíficos, como um simples ferimento, ou por estímulos altamente específicos, como patógenos especializados. A maneira como a planta é capaz de reconhecer a injúria ou agressão depende de sua capacidade de perceber sinais, que culminam com a eliciação de uma resposta no tecido afetado. A magnitude e extensão da resposta observada irão depender do tipo de molécula sinalizadora e de sua mobilidade ou habilidade para induzir sinais secundários dentro da planta. A rápida ativação da transcrição de vários genes de defesa, poucos minutos após o tratamento com o eliciador, representa a forma mais eficiente de estímulo de transcrição genética detectada em plantas (TEMPLETON & LAMB, 1988).

Em síntese, a resposta de defesa de plantas implica em uma série de alterações metabólicas, que envolve a expressão de vários genes (EBEL & COSIO, 1994).

Embora as lectinas não sejam consideradas proteínas PR, existem evidências de seu envolvimento na defesa de plantas. A lectina presente nas raízes de trigo (WGA), por exemplo, teve sua síntese aumentada após tratamento com eliciadores bióticos e abióticos (CAMMUE *et al.*, 1990). O pico de WGA ocorreu após 24 horas do desafio das plantas

com os fungos *Fusarium culmorum* e *Rhizoctonia solani* e após 48 horas, quando o tratamento foi feito com os fungos *Pythium ultimum* e *Neurospora crassa*. Embora as cinéticas tenham sido diferentes, o aumento da síntese de WGA ocorreu independentemente do fungo ser patogênico (*P. ultimum*) ou não (*N. crassa*), sugerindo que a indução de WGA, *in vivo*, depende apenas da detecção pela planta de eliciadores exógenos de fungos. O aumento da WGA também foi acompanhado do aumento de sua exsudação para o meio, particularmente, na presença de eliciadores. Após 96 horas, a quantidade de WGA liberada de raízes infectadas excedeu em várias vezes a quantidade de lectina ainda presente nas raízes.

Na tentativa de demonstrar o envolvimento da lectina de soja (SBA) na defesa contra fungos, GIBSON *et al.* (1982) realizaram um trabalho com vários cultivares de soja resistentes e suscetíveis ao fungo *Phytophthora megasperma* var. *sojae* (Raça 1). Eles encontraram que sementes de cultivares resistentes tinham em média uma maior concentração de lectina do que sementes de cultivares suscetíveis. Foi verificado, também, que a lectina exsudava mais cedo e, em maior concentração, durante a germinação das sementes resistentes do que das sementes suscetíveis. Além disso, o exsudado de sementes resistentes foi mais eficiente em retardar o crescimento do *P. megasperma* do que o exsudado de sementes suscetíveis, demonstrando uma diferença na especificidade da lectina presente nos exsudados. A atividade antifúngica foi subseqüentemente confirmada como sendo devido à SBA.

Embora o papel das lectinas como agentes protetores ainda não tenha sido conclusivamente demonstrado, os exemplos sugerem o envolvimento dessas proteínas nos mecanismos de defesa das plantas.

## 2 – OBJETIVOS

Analisar o conteúdo de lectina de tecidos de *Luetzelburgia auriculata* obtidos de plantas tratadas com ácido salicílico e com esporos do fungo *Fusarium solani* e comparar com o de plantas controles não tratadas, visando detectar alguma alteração que possa sinalizar sobre a participação de lectina na resposta de defesa da planta.



### 3 – MATERIAIS

#### 3.1 – Sementes

Sementes quiescentes de *L. auriculata* Ducke foram obtidas de plantas coletadas no Estado do Ceará.

#### 3.2 – Fungo

O fungo *Fusarium solani* foi proveniente da coleção do Departamento de Micologia da Universidade Rural de Pernambuco.

#### 3.3 – Hemácias

Foram utilizadas hemácias de coelhos albinos, da raça Nova Zelândia.

#### 3.4 – Reagentes

Ácido salicílico, reagentes para eletroforese, *Western blot*, ELISA e membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) foram adquiridos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.

Todos os demais reagentes foram de grau analítico e adquiridos comercialmente.

## 4 - MÉTODOS

### 4.1 – Germinação de Sementes

Sementes de *L. auriculata* foram desinfectadas com hipoclorito de sódio 2%, durante 5 minutos, e enxaguadas com água destilada estéril (5x). A seguir, foram postas para germinar entre folhas de papel de filtro estéreis (30 x 30 cm), umedecidas com água estéril (10 sementes/folha). Os rolos com as sementes foram arrumados em jarros plásticos, previamente desinfectados com hipoclorito de sódio. Foram preparados 4 jarros, cada um contendo cinco rolos, totalizando 200 sementes. Todo esse procedimento foi realizado sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. Os jarros foram arrumados em câmaras de germinação e incubados no escuro.

Após 17 dias de incubação, as plântulas estioladas foram cuidadosamente selecionadas, também sob condições assépticas, separadas em 3 grupos de 20 plantas e submetidas aos tratamentos descritos a seguir.

### 4.2 – Tratamento com Elicidores

O tratamento das plantas consistiu do pincelamento de suas folhas primárias com os seguintes reagentes: suspensão de esporos do fungo *Fusarium solani* ( $10^6$  cél/ml), preparada em NaCl 150 mM (Grupo 1); solução de ácido salicílico 5 mM, preparada em solução de NaCl 150 mM (Grupo 2) e NaCl 150 mM (Grupo 3, controle). Após o tratamento, as plantas foram envolvidas com folhas de papel de filtro umedecidas, arrumadas nos jarros e incubadas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente.

Após 96 horas de incubação, os tecidos (raízes, hipocótilos, cotilédones, epicótilos e folhas) de cada grupo de plantas foram congelados com nitrogênio líquido, moídos em

moinho elétrico, até obtenção de uma farinha de fina granulação. As farinhas foram acondicionadas em sacos plásticos e liofilizadas.

#### 4.3 – Determinação de Proteína Bruta

O teor de proteína bruta dos tecidos foi determinado através do método de Kjeldahl, adaptado para medida de N através do ensaio colorimétrico descrito por BAETHGEN & ALLEY (1989).

20 mg de farinha de cada tecido foram mineralizados (Digestor Infravermelho MA 4002; Marconi) na presença de 1,1 g de catalisador ( $K_2SO_4$ ;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; selênio, 100:10:1) e 1,5 ml de  $H_2SO_4$  concentrado, até o aparecimento de uma cor esverdeada.

Ao final, as amostras foram diluídas para 10 ml em água de grau milli-Q, após o que, alíquotas foram ensaiadas para determinação do teor de nitrogênio, através de reação colorimétrica e mensurada pela absorbância a 650 nm.

O nitrogênio total foi estimado em relação a uma curva padrão obtida com sulfato de amônio e o teor de proteína bruta determinado multiplicando-se o valor de % N pelo fator 6,25.

#### 4.4 – Preparação de Extrato Bruto

Proteínas das farinhas foram extraídas com tampão glicina-HCl 50 mM, pH 2,6, contendo NaCl 150 mM, na proporção de 1:10 (m/v), a 4 °C, durante 4 horas, sob agitação constante. Ao final, as suspensões foram filtradas e, em seguida, centrifugadas a 20.000 g, por 20 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes foram dialisados contra água destilada e liofilizados.

#### 4.5 – Determinação de Proteínas Solúveis

As determinações de proteínas solúveis dos extratos foram feitas pelo método descrito por BRADFORD (1976), usando-se albumina sérica bovina como padrão.

#### 4.6 – Atividade Hemaglutinante

Os ensaios de hemaglutinação foram feitos seguindo a metodologia descrita por MOREIRA & PERRONE (1977).

#### 4.7 – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Eletroforeses em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, foram feitas seguindo a metodologia descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para o uso de placas. Os géis de aplicação e separação encerravam 3,95% e 15% de acrilamida, respectivamente. Os extratos foram dissolvidos em Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8 contendo 1% de SDS, na presença de 1% de 2-mercaptoetanol, aquecidos a 100 °C, durante 10 min, e centrifugados a 10.000 g (centrífuga “Eppendorf” 541 7R), durante 5 min, a 10 °C. Os sobrenadantes, antes de serem aplicados nos poços, receberam alguns cristais de sacarose e azul de bromofenol, para aumentar a densidade das amostras e permitir a visualização da corrida, respectivamente. A corrida foi conduzida a corrente constante de 20 mA por placa, durante 1 hora. As bandas protéicas foram visualizadas corando-se os géis com uma solução a 0,25% de azul brilhante de Coomassie R-250 e descorando-os com uma mistura de ácido acético, metanol e água (1:3:7).

#### 4.8 – Western Blot

Após eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Immobilon P, Sigma), em uma unidade de transferência semi-seca (Multiphor II, Pharmacia), usando como tampão Tris-base 25 mM, glicina 198 mM, pH 9,4 contendo 20% de metanol. A eletrotransferência foi ajustada para uma corrente constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup>, durante 1,5 h. A eficiência da transferência foi checada corando-se as membranas com vermelho de Ponceau até o aparecimento das bandas protéicas. Em seguida, as membranas foram lavadas com água grau milli-Q, para remoção do corante, e procedeu-se o ensaio imunológico (TOWBIN *et al.*, 1979).

As membranas foram bloqueadas durante 1 h, à temperatura ambiente, com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e leite em pó desnatado 2% (m/v). Em seguida, elas foram incubadas com o anticorpo anti-lectina diluído (1:1000) no tampão bloqueador, por 16 h, a 4 °C. Após a incubação, as membranas foram lavadas quatro vezes, a intervalos de 10 minutos, com o mesmo tampão, isento de leite. As membranas foram, então, incubadas com o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada com fosfatase alcalina, da Sigma) diluído (1:2000) no tampão bloqueador, por 2 horas, à temperatura ambiente, após o que, foram lavadas como anteriormente. A reação foi visualizada após adição do substrato da enzima (BCIP/NBT), preparado de acordo com as instruções do fabricante (Sigma). Após o desenvolvimento da cor, as membranas foram lavadas com água grau milli-Q, secadas e guardadas ao abrigo da luz.

#### 4.9 – Quantificação de Lectina por ELISA

A determinação do conteúdo de lectina dos extratos de tecidos de *L. auriculata* foi feita de acordo com o método descrito por ROWHANI & FALK (1995). O conteúdo de

lectina foi estimado a partir de uma curva padrão obtida com a lectina isolada de cotilédones (LAL). A seguir, estão listadas as etapas realizadas no ensaio.

- 1- Impregnação da placa (Polysorp, NUNC) com 100 µl de cada extrato diluído em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM e galactose 100 mM.
- 2- Incubação da placa durante a noite, a 4 °C.
- 3- Remoção do antígeno e lavagem da placa (4x, 3 min cada) com uma solução de NaCl 150 mM e 0,05% de Tween 20 (NaCl-Tween).
- 4- Aplicação de 100 µl da solução de anticorpo primário (anti-lectina, 1:1000), preparado em NaCl-Tween, contendo galactose 100 mM.
- 5- Incubação da placa a 37 °C, durante 2 horas.
- 6- Lavagem da placa com NaCl-Tween (4x, 3 min, cada).
- 7- Adição de 100 µl do segundo anticorpo conjugado com peroxidase (1:2000), preparado em NaCl-Tween.
- 8- Incubação da placa a 37 °C, durante 3 horas.
- 9- Lavagem da placa (4x, 3 min cada).
- 10- Revelação com o substrato para peroxidase (1 pastilha de O-fenileno diamina (OPD), Sigma), diluído em 25 ml de tampão citrato de sódio 100 mM, pH 4,5, contendo 30 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%.
- 11- Incubação da placa à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 20-30 minutos.
- 12- Adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 N, para parar a reação.
- 13- Leitura da absorbância a 450 nm no leitor de ELISA (BIO-TEK ELX 800).
- 14- O controle consistiu da substituição do anticorpo anti-lectina pelo soro pré-imune, preparado nas mesmas condições.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução de proteínas relacionadas à patogênese, após o tratamento de plantas com ácido salicílico, tem sido demonstrada em vários trabalhos (VERNOOIJ *et al.*, 1994; FERNANDES, 1998; MORRIS *et al.*, 1998). Da mesma forma, vários fungos ou eliciadores isolados a partir deles, também têm sido utilizados com essa mesma finalidade (YOHKAWA *et al.*, 1993; EBEL & COSIO, 1994; XUE *et al.*, 1998).

Embora as lectinas não sejam consideradas proteínas relacionadas à patogênese, CAMMUE *et al.* (1990) demonstraram o aumento da WGA após o tratamento com fungos e eliciadores abióticos, demonstrando a participação desta lectina na defesa da planta.

O interesse deste trabalho esteve voltado para detectar alguma relação entre o conteúdo de lectina de tecidos de *L. auriculata* e o desafio com eliciadores biótico e abiótico. Para tanto, foram comparados o perfil e os teores de proteína e lectina de tecidos de *L. auriculata* obtidos de plantas previamente tratadas com ácido salicílico 5 mM e com esporos do fungo *Fusarium solani*, com os de plantas controles não tratadas.

A estratégia inicial foi procurar detectar alterações no conteúdo de proteína total de tecidos de *L. auriculata*, que pudessem ser associadas ao tratamento com os eliciadores.

Como mostrado na FIGURA 1, não houve diferença significativa entre os teores de proteína total de raízes, hipocótilos, cotilédones e epicótilos obtidos de plantas tratadas e plantas controles. Analisando-se o grupo de folhas, observa-se que houve um aumento significativo no teor de proteína bruta de folhas provenientes de plantas tratadas com ácido salicílico 5 mM, quando comparado aos outros grupos, sugerindo uma reação da planta a este tratamento.

Contudo, embora a análise do conteúdo de proteína total forneça alguma pista sobre a resposta bioquímica da planta, ela não dá informação sobre a qualidade dessa resposta. Assim, por exemplo, dizer que o teor de proteína de raízes dos grupos de plantas tratadas não foi diferente do grupo controle, não significa dizer que o perfil de proteína seja quantitativamente e qualitativamente idêntico. A resposta pode ser de tal forma, que o balanço entre a indução e supressão de proteínas seja o mesmo.

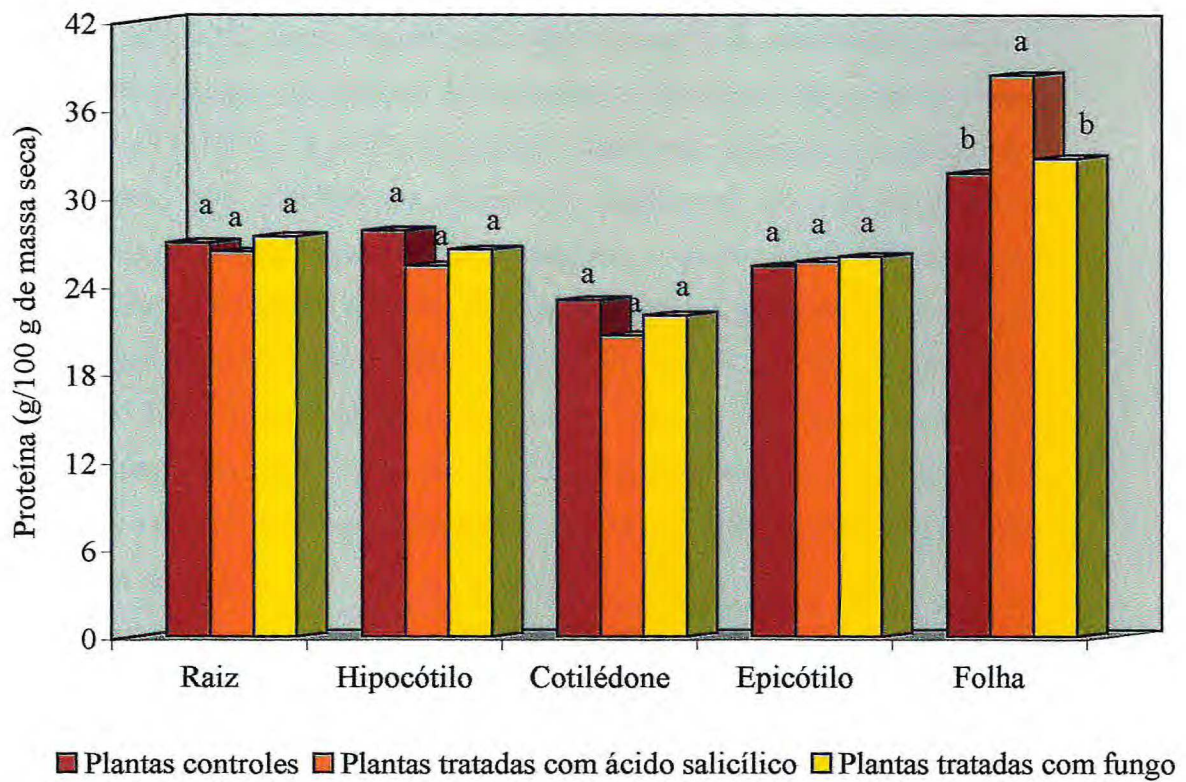


FIGURA 1 – Proteína total (% N x 6,25) de tecidos de *Luetzelburgia auriculata* provenientes de plantas após 96 h de tratamento com ácido salicílico 5 mM e com esporos do fungo *Fusarium solani* ( $10^6$ /ml), expressa em grama por 100 g de farinha do tecido. Letras iguais indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ), pelo teste de Tuckey, programa MSTATC.



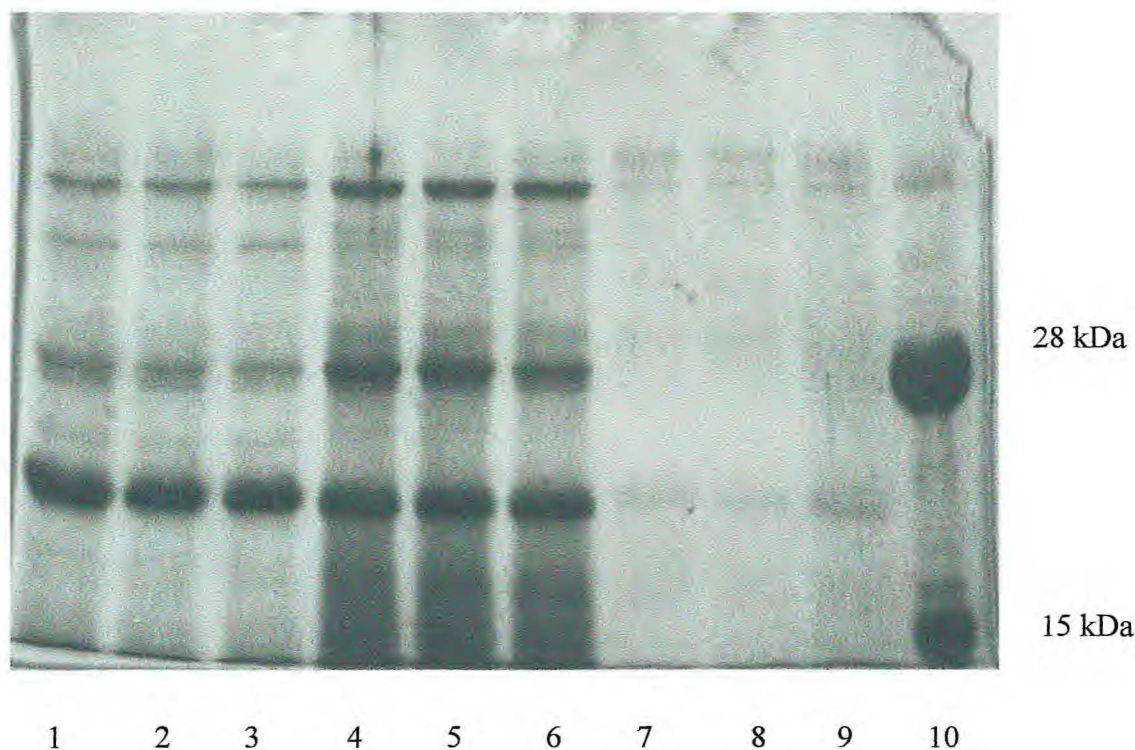
O próximo passo, foi analisar o perfil eletroforético de cada tecido. Assim, os tecidos foram extraídos com tampão glicina-HCl 50 mM, pH 2,6, contendo NaCl 150 mM, e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol. Para efeito de comparação, os extratos de um mesmo grupo de tecido foram ajustados para a mesma concentração com tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, contendo 1% SDS), antes de serem aplicados nos poços do gel de eletroforese.

Os perfis de proteínas dos extratos de hipocótilos, cotilédones germinantes e raízes estão mostrados na FIGURA 2 e os de epicótilos e folhas estão mostrados na FIGURA 3. Analisando os géis, não se observam diferenças qualitativas nas bandas protéicas, independentemente da natureza do tecido e do tratamento. Usando a lectina de cotilédones (LAL) como referencial, é possível perceber em todos os extratos, a presença de uma banda de massa molecular aparente correspondente a banda de 28 kDa da lectina e uma outra, bem proeminente, de mobilidade eletroforética situada entre as duas bandas da LAL (28 kDa e 15 kDa). Como discutido no Capítulo 1, LAL é formada de uma cadeia principal de 28 kDa (cadeia  $\alpha$ ) e de seus fragmentos (cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ ), de mobilidades eletroforéticas bem próximas, ao redor de 15 kDa.

A presença de lectinas nos extratos foi confirmada através de ensaios de hemaglutinação. Qualitativamente, todos os extratos promoveram aglutinação de eritrócitos de coelho 2%, confirmando os resultados previamente descritos por CÂMARA (1994).

Visando detectar alguma homologia entre a lectina de cotilédones (LAL) e a lectina presente nos tecidos vegetativos da planta, os extratos foram submetidos à análise por *Western blot*, usando o anticorpo anti-LAL (FIGURAS 4 e 5).

Os *blots* revelaram a existência de homologia entre LAL e a lectina presente nos demais tecidos, com exceção das raízes, cujo resultado não pôde ser analisado devido à quantidade de proteína aplicada ( $2\mu$ /poço) que, provavelmente, foi insuficiente para a eletrotransferência e detecção pelo o anticorpo.



GURA 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol de extratos de tecidos de *Luetzelburgia auriculata* provenientes de plantas controles e de plantas tratadas com ácido salicílico 5 mM e com esporos do fungo *Fusarium solani* ( $10^6$ /ml). Poços 1, 4 e 7 representam, respectivamente, os extratos de hipocótilos (7  $\mu$ g/poço), cotilédones (13  $\mu$ g/poço) e raízes (2  $\mu$ g/poço) de plantas controles. Poços 2, 5 e 8 representam, respectivamente, os extratos de hipocótilos, cotilédones e raízes de plantas tratadas com ácido salicílico; poços 3, 6 e 9 representam, respectivamente, os extratos de hipocótilos, cotilédones e raízes de plantas tratadas com o fungo. Poço 10 - lectina de *L. auriculata* (20  $\mu$ g/poço).

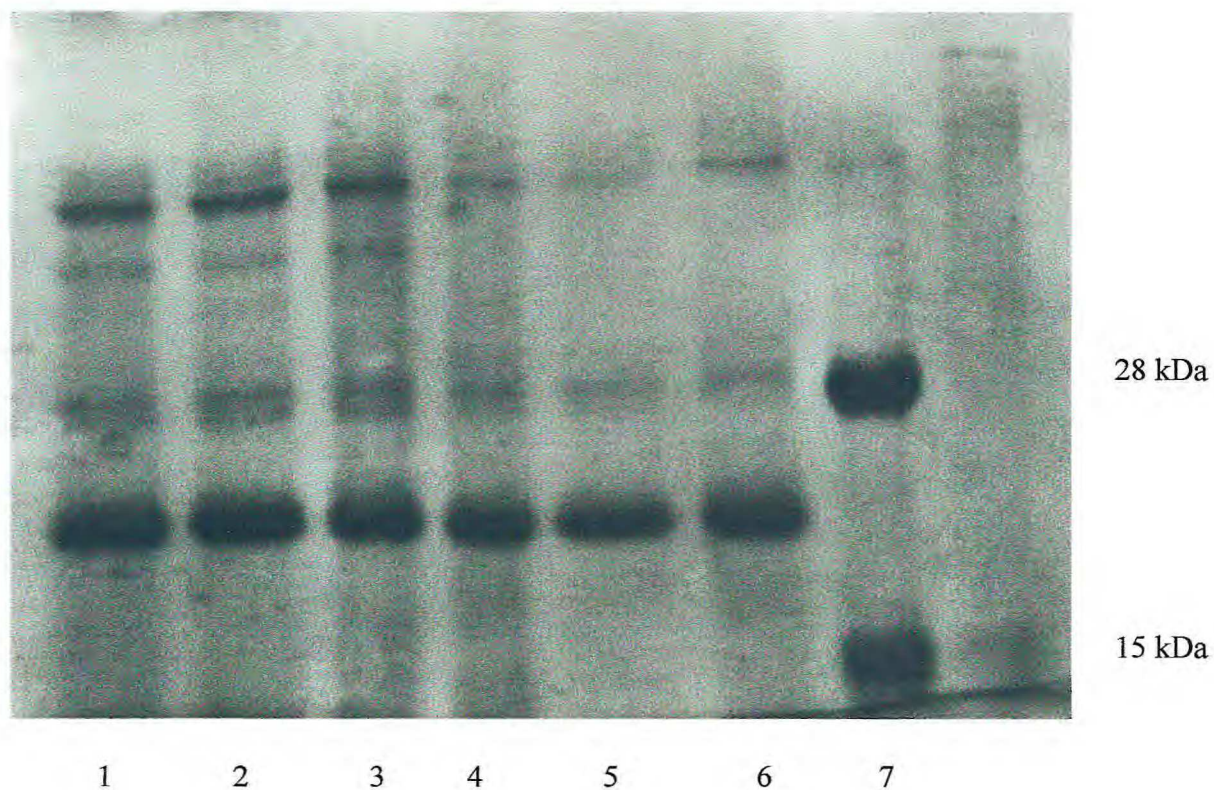


FIGURA 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol de extratos de tecidos de *Luetzelburgia auriculata* provenientes de plantas controles e de plantas tratadas com ácido salicílico 5 mM e com esporos do fungo *Fusarium solani* ( $10^6$ /ml). Poços 1 e 4 representam, respectivamente, os extratos de epicótilos (7,5  $\mu$ g/poço) e folhas (5  $\mu$ g/poço) de plantas controles. Poços 2 e 5 representam, respectivamente, os extratos de epicótilos e folhas de plantas tratadas com ácido salicílico; poços 3 e 6 representam, respectivamente, os extratos de epicótilos e folha de plantas tratadas com o fungo. Poço 7 - lectina de *L. auriculata* (20  $\mu$ g/poço).

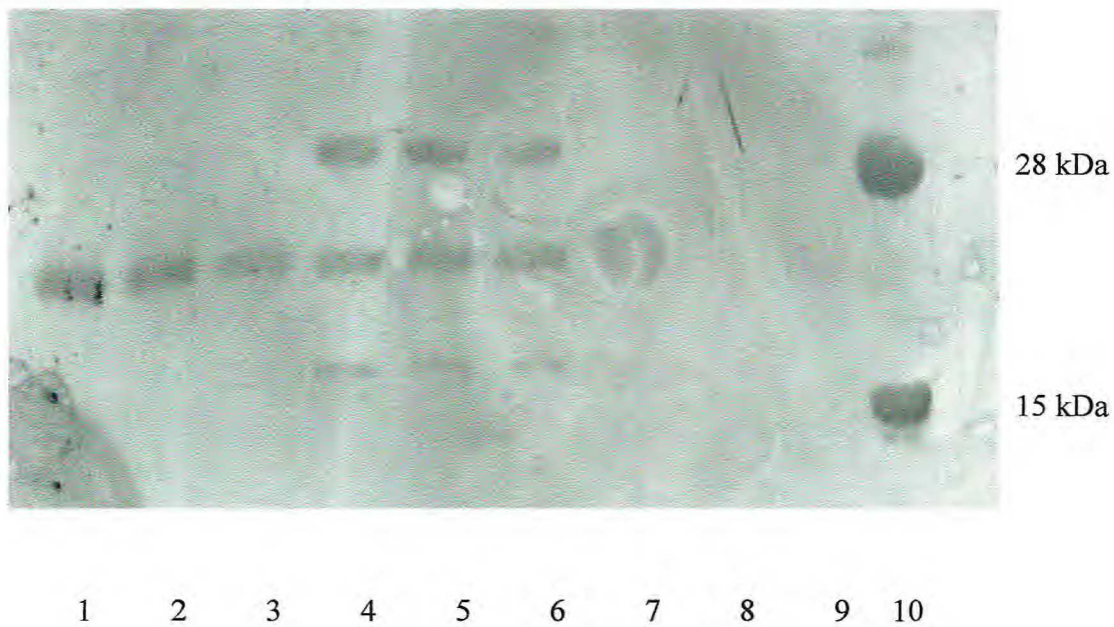


FIGURA 4 – Western blot de extratos de hipocótilos, cotilédones e raízes de *Luetzelburgia auriculata* obtidos de plantas controles e de plantas tratadas com ácido salicílico 5 mM ou com esporos do fungo *Fusarium solani* ( $10^6$ /ml). Poços 1, 4 e 7 representam, respectivamente, os extratos de hipocótilos, cotilédones e raízes de plantas controles. Poços 2, 4 e 8 representam, respectivamente, os extratos de hipocótilos, cotilédones e raízes de plantas tratadas com ácido salicílico. Poços 3, 6 e 9 representam, respectivamente, os extratos de hipocótilos, cotilédones e raízes de plantas tratadas com o fungo. Poço 10 – LAL.

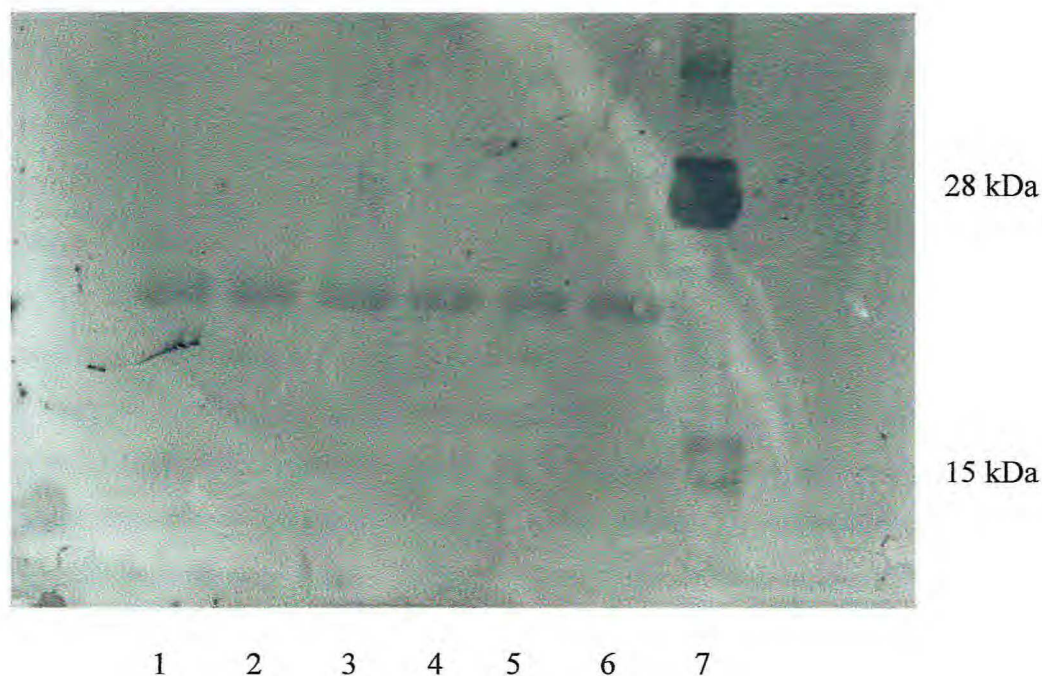


FIGURA 5 – Western blot de extratos de epicótilos e folhas de *Luetzelburgia auriculata* obtidos de plantas controles e de plantas tratadas com ácido salicílico 5 mM ou com esporos do fungo *Fusarium solani* ( $10^6$ /ml). Poços 1 e 4 representam, respectivamente, os extratos de epicótilos e folhas de plantas controles. Poços 2 e 5 representam, respectivamente, os extratos de epicótilos e folhas de plantas tratadas com ácido salicílico. Poços 3 e 6 representam, respectivamente, os extratos de epicótilos e folhas de plantas tratadas com o fungo. Poço 7 – LAL.

Na FIGURA 4, observa-se que o anticorpo anti-LAL reconheceu uma banda de proteína presente no extrato de hipocótilos, exatamente a de mobilidade eletroforética intermediária entre as duas bandas da LAL. Por outro lado, o anticorpo reagiu com três bandas protéicas presentes no extrato de cotilédones germinantes.

Merece destaque o padrão revelado para os cotilédones germinantes, isto é, três bandas bem definidas, que correspondem, respectivamente, as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\lambda$  da LAL. Embora esse seja o perfil proposto para a lectina isolada de cotilédones quiescentes (LAL), ele não foi visualizado nas eletroforeses realizadas neste trabalho. Na realidade, a confirmação de que a banda correspondente a 15 kDa compreendia os fragmentos N e C-terminais da lectina foi obtida a partir da determinação da seqüência N-terminal desta banda. Provavelmente, nos cotilédones germinantes, a lectina nativa é completamente processada por enzima (s) metabolicamente ativa (s), o que não acontece em cotilédones quiescentes. É interessante ressaltar que tal padrão de três bandas já havia sido revelado para a lectina exsudada de sementes germinadas em água, como demonstrado por *Western blot* (FIGURA 2, Capítulo II), confirmando que o processamento da lectina parece depender do estado fisiológico da semente.

A ocorrência de lectinas a uma ou a duas cadeias em sementes de espécies do gênero *Lathyrus*, por exemplo, parece depender mais de processamentos realizados por proteases ativas do que propriamente da seqüência de aminoácidos (ROUGÉ *et al.*, 1989).

Nos extratos de epicótilos e folhas, como nos hipocótilos, o anticorpo anti-LAL reconheceu apenas a banda de mobilidade eletroforética intermediária entre as duas bandas da LAL (FIGURA 5).

Os resultados dos *blots* confirmaram a ocorrência de lectina em hipocótilos, cotilédones germinantes, epicótilos e folhas de *L. auriculata*. A lectina de cotilédones germinantes, provavelmente, corresponde à forma nativa da LAL. Com relação aos outros tecidos, não é possível afirmar que a lectina detectada seja idêntica a LAL, mas pode-se dizer que são, no mínimo, lectinas homólogas.

O conteúdo de lectina dos extratos foi dosado por ELISA, usando-se o anticorpo anti-LAL e, para aprofundar a análise, foi determinado também o conteúdo de proteína solúvel total.

A FIGURA 6 mostra os teores de proteína solúvel total e de lectina de raízes obtidas de plantas controles e tratadas com os eliciadores. Observa-se que não houve diferença no conteúdo de proteína solúvel nos três grupos de raízes. Os teores de lectina de raízes obtidas de plantas controles e de plantas tratadas com ácido salicílico também não diferiram estatisticamente entre si. Entretanto, o conteúdo de lectina de raízes obtidas de plantas tratadas com *F. solani* foi significativamente mais baixo do que o controle. A primeira vista, parece que o tratamento com o fungo acelerou a degradação da lectina presente nas raízes, todavia, não se pode descartar a possibilidade de ter havido exsudação de lectina para o meio, durante o período de incubação das plantas. Fenômeno semelhante já foi demonstrado para WGA, que exsuda das raízes na presença de eliciadores. Como relatado, o aumento da síntese de WGA verificado após 24 ou 48 horas do tratamento de plantas com diferentes fungos é acompanhado de sua exsudação para o meio, sendo verificado um pico de exsudação após 96 horas (CAMMUE *et al.*, 1990).

Como neste trabalho a determinação do conteúdo de lectina dos extratos foi pontual, isto é, medida após 96 horas, é possível que tenhamos deixado de detectar algum aumento da lectina ocorrido nas primeiras horas após a eliciação. Assim, o teor de lectina encontrado nas raízes provenientes de plantas tratadas com o fungo, provavelmente, expressa a lectina residual deste tecido.

Para os hipocótilos, os tratamentos não afetaram os níveis de proteína solúvel total. Quando se analisou o conteúdo de lectina, observou-se que os grupos de plantas controles e tratadas com ácido salicílico também não diferiram estatisticamente entre si. Entretanto, observou-se um aumento significativo no teor de lectina do grupo tratado com *F. solani*, sugerindo uma reação da planta ao tratamento (FIGURA 7). Esse aumento no conteúdo de lectina pode significar a indução de sua síntese *in situ* ou a sua mobilização a partir de outros tecidos.

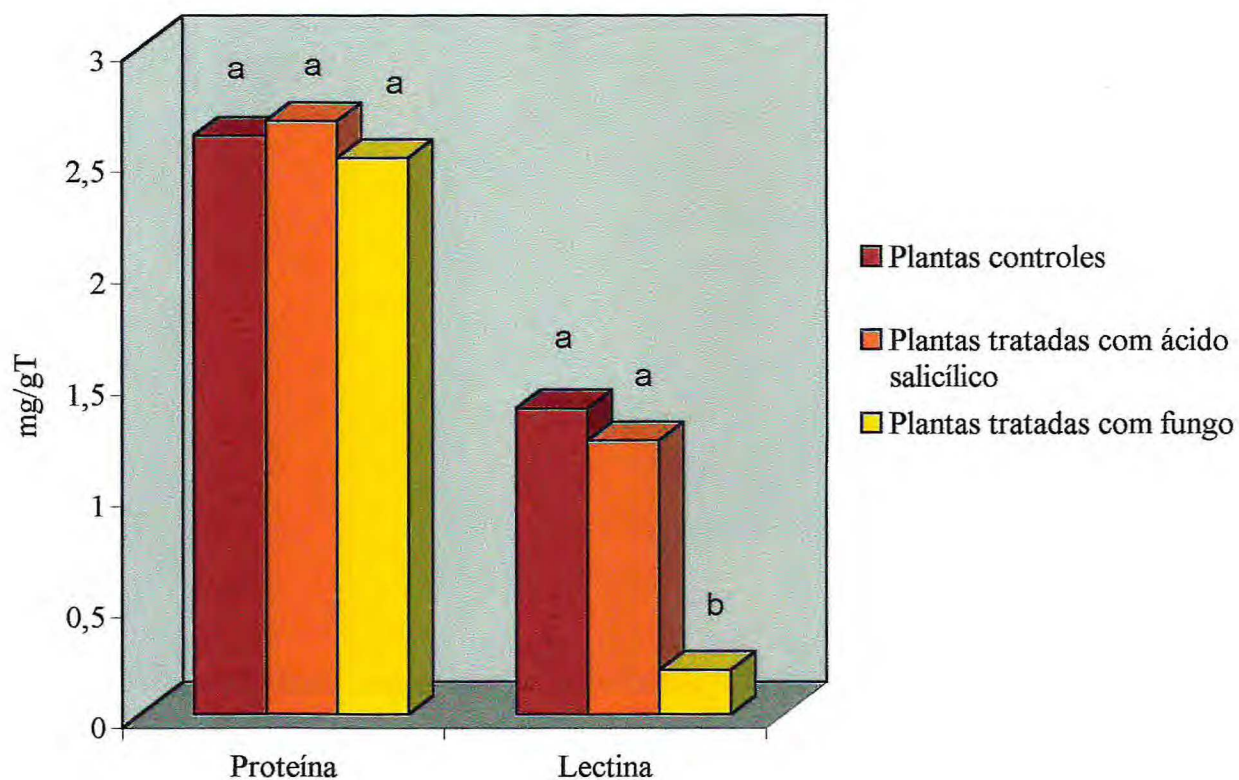


FIGURA 6 – Teores de proteína solúvel e de lectina de raízes obtidas a partir de plantas de *L. auriculata* tratadas com salina (controle), ácido salicílico 5 mM e com *Fusarium solani* ( $10^6$  esporos/ml), expressos em mg por grama de tecido seco (mg/gT). Letras iguais indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ), pelo teste estatístico de Tuckey, programa MSTATC.



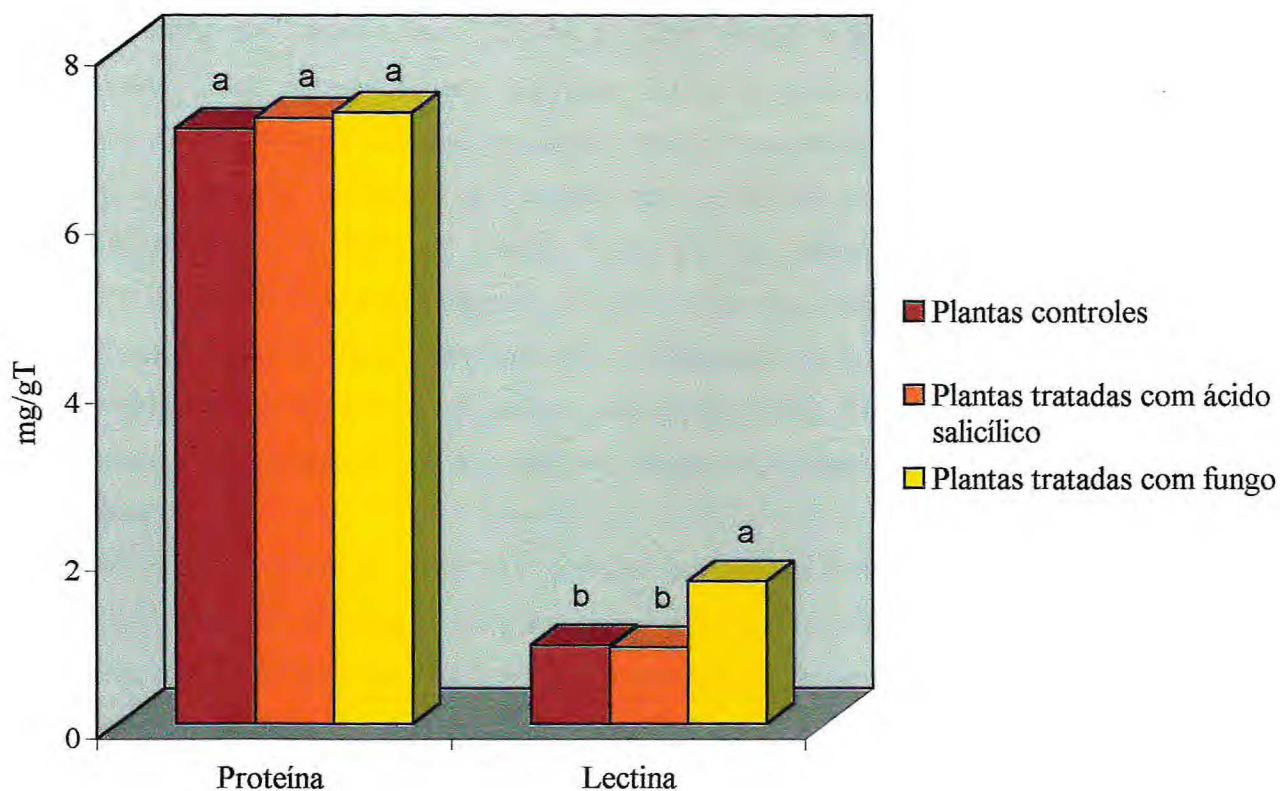


FIGURA 7 – Teores de proteína solúvel e de lectina de hipocótilos obtidos a partir de plantas de *L. auriculata* tratadas com salina (controle), ácido salicílico 5 mM e com *Fusarium solani* ( $10^6$  esporos/ml), expressos em mg por grama de tecido seco (mg/gT). Letras iguais indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ), pelo teste estatístico de Tuckey, programa MSTATC.

Não se observou nenhuma diferença no conteúdo de proteína solúvel total dos extratos de cotilédones germinantes (FIGURA 8). Com relação à lectina, os grupos de plantas tratadas com os eliciadores diferiram significativamente do controle. A concentração de lectina dos cotilédones de plantas tratadas com ácido salicílico aumentou enquanto a concentração de lectina dos cotilédones de plantas tratadas com o fungo diminuiu. É possível que aqui, da mesma forma que nas raízes, a diminuição da concentração de lectina, seja, provavelmente, devido à exsudação estimulada pelo fungo. De outra forma, é possível que o tratamento tenha acelerado a degradação da lectina ou, ainda, que tenha havido translocação da lectina para outros tecidos. Todavia, a planta não foi sensível ao tratamento com ácido salicílico como respondeu com o aumento da síntese de lectina.

A FIGURA 9 mostra os resultados obtidos para os epicótilos. Observa-se um aumento significativo do conteúdo de proteína solúvel dos epicótilos do grupo tratado com *F. solani*. Por outro lado, não houve diferença na concentração de proteína dos grupos de plantas controle e tratadas com ácido salicílico. A concentração de lectina dos epicótilos de plantas tratadas com os eliciadores foi significativamente maior do que o controle. Assim, é possível afirmar que os tratamentos promoveram o aumento da síntese e/ou mobilização de lectina.

Finalmente, os resultados para as folhas estão mostrados na FIGURA 10. Os grupos de plantas tratadas com eliciadores diferiram significativamente do grupo controle em relação à concentração de proteína. A maior concentração de proteína foi registrada para o grupo tratado com ácido salicílico enquanto a mais baixa concentração foi detectada no grupo tratado com o fungo. Observou-se ainda, uma redução acentuada no teor de lectina dos grupos tratados com os eliciadores quando se compara com o controle. Para o que foi observado, é possível especular que a degradação da lectina tenha sido acelerada na presença dos eliciadores ou que tenha havido mobilização da lectina da folha para outros tecidos.

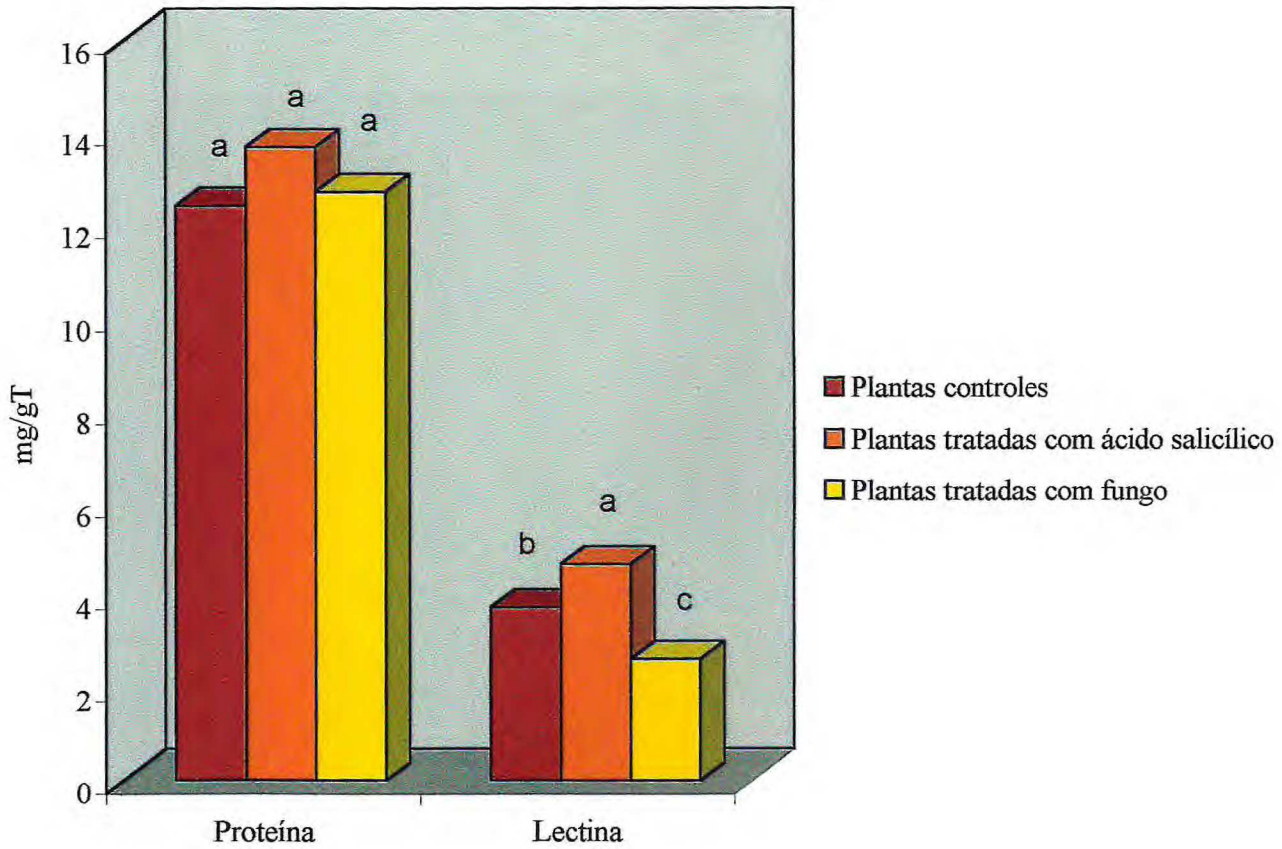


FIGURA 8 – Teores de proteína solúvel e de lectina de cotilédones germinantes obtidos a partir de plantas de *L. auriculata* tratadas com salina (controle), ácido salicílico 5 mM e com *Fusarium solani* ( $10^6$  esporos/ml), expressos em mg por grama de tecido seco (mg/gT). Letras iguais indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ), pelo teste estatístico de Tuckey, programa MSTAC

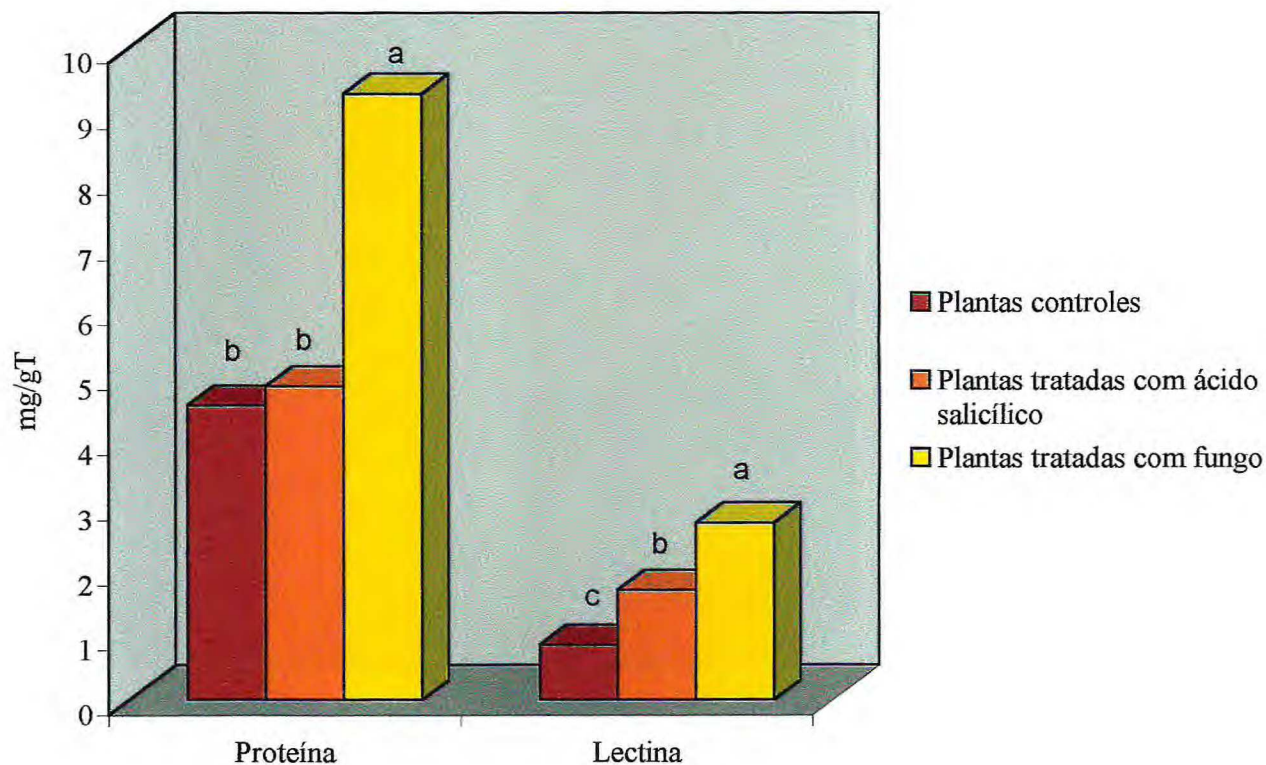


FIGURA 9 – Teores de proteína solúvel e de lectina de epicótilos obtidos a partir de plantas de *L. auriculata* tratadas com salina (controle), ácido salicílico 5 mM e com *Fusarium solani* ( $10^6$  esporos/ml), expressos em mg por grama de tecido seco (mg/gT). Letras iguais indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ), pelo teste estatístico de Tuckey, programa MSTAC

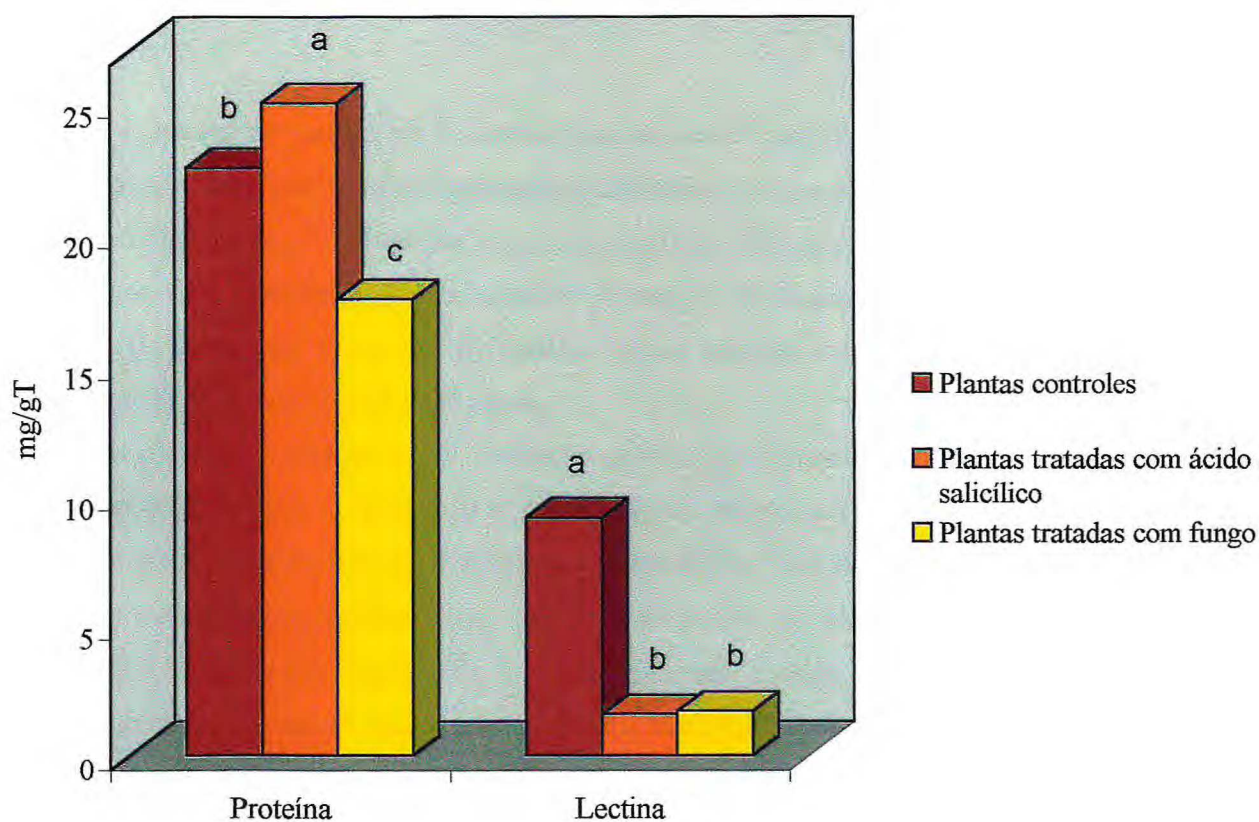


FIGURA 10 – Teores de proteína solúvel e de lectina de folhas obtidas a partir de plantas de *L. auriculata* tratadas com salina (controle), ácido salicílico 5 mM e com *Fusarium solani* ( $10^6$  esporos/ml), expressos em mg por grama de tecido seco (mg/gT). Letras iguais indicam que não há diferença significativa ( $p > 0,05$ ), pelo teste estatístico de Tuckey, programa MSTATC

## 6 – CONCLUSÕES

O tratamento de plantas de *L. auriculata* com ácido salicílico e com esporos do fungo *Fusarium solani* não promoveu alterações dramáticas no conteúdo de proteína total, nem no perfil de proteínas solúveis de raízes, hipocótilos, cotilédones, epicótilos e folhas, que pudessem ser associadas a uma resposta contra os eliciadores. Entretanto, foram detectadas alterações no conteúdo de lectina desses tecidos, sugerindo um possível envolvimento na resposta de defesa da planta.

O tratamento de plantas com *F. solani* promoveu um aumento significativo no teor de lectina dos hipocótilos e epicótilos enquanto que o tratamento com ácido salicílico promoveu o aumento de lectina dos cotilédones e epicótilos. Todavia, nas raízes e folhas, observou-se uma redução significativa no conteúdo de lectina em resposta aos eliciadores, sugerindo que tenha havido degradação ou exsudação para o meio, no caso das raízes, e degradação ou translocamento da lectina no caso das folhas. De qualquer forma, a resposta diferenciada da planta sugere mecanismos distintos de percepção dos agentes desafiadores.

A lectina presente nas raízes, nos hipocótilos, nos epicótilos e nas folhas apresenta homologia com a LAL, embora não seja possível afirmar que se trata da mesma lectina.

A lectina presente nos cotilédones germinantes, aparentemente, corresponde a LAL processada, sugerindo que o processamento final da lectina nativa é feito, provavelmente, por enzimas ativas durante a germinação da semente.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. How plants defend themselves against pathogens. In: **Plant Pathology**. Academic Press Inc., London, p. 97-115, 1988.

ANTONIW, J. F., RITTER, C. E., PIERPOINT, W. S., VAN LOON, L. C. Comparasion of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. **J. Gen. Virol.** v. 47, p. 79, 1980.

BAETHGEN, W. E., ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant kjeldalh digest. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v. 20, n. 9, p. 961-969, 1989.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 59, p. 873-907, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye inding. **Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CÂMARA, F. L. **Lectinas de *Luetzelburgia auriculata* Ducke. Purificação, caracterização parcial e estudos de mobilização durante o desenvolvimento da plântula.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica. 1994, 119 p.

CAMMUE, B. P. A., BROEKAERT, W. F., PEUMANS, W. J. Wheat germ agglutinin in seedling roots: induction by elicitors and fungi. **Plant Cell Rep.**, v. 9, p. 264-267, 1990.

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

CORNELISSEN, B. J. C., MELCHERS, L. S. Strategies for control of fungal disease with transgenic plants. **Plant Physiol.**, v. 101, p. 709-712, 1993.

DEMPSEY, M. A., SILVA, H., KLESSIG, D. F. Engineering disease and pest resistance in plants. **Trends in Microbiol.**, v. 6, n. 2, p. 54-61, 1998.

EBEL, J., COSIO, E. G. Elicitors of plant defense responses. **Intern. Rev. Citol.**, v. 148, p. 1-36, 1994.

FERNANDES, C. F. **Estudo da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão de corda (*Vigna unguiculata* (L) Walp) CV. Vita 3.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica. 1998, 64 p.

GIANINAZZI, S., MARTIN, C., VALLÉE, J. C. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. **CR Acad. Sci. Paris**, v. 270, p. 2383-2386, 1970.

GIBSON, D. M., STACK, S., KRELL, K., HOUSE, J. A comparison of soybean agglutinin in cultivars resistant and susceptible to *Phytophthora megasperma* var. sojae (Race 1). **Plant Physiol.**, v. 70, p. 560-566, 1982.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMB, C. J., RYALS, J. A., WARD, E. R., DIXON, R. A. Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. **Biotechnol.**, v. 10, p. 1436-1445, 1992.

MAUCH, F., MEEHL, J. B., STAEHELIN, L. A. Ethylene-induced chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase accumulate specifically in the lower epidermis and along vascular strands of bean leaves. **Planta**, v. 186, p. 367-375, 1992.



MOREIRA, R. A., PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol.**, v. 59, p. 783-787, 1977.

MORRIS, S. W., VERNOOIJ, B., TITATARN, S., STARRETT, M., THOMAS, S., WILTSE, C. C., FREDERIKSEN, R. A., BHANDHUFALCK, A., HULBERT, S., UKNES, S. Induced resistance in maize. **MPMI**, v. 11, n. 7, p. 643-658, 1998.

NASSER, W., DE TAPIA, M., BURKARD, G. Maize pathogenesis-related proteins: characterization and cellular distribution of  $\beta$ -1,3-glucanases and chitinases induced by brome mosaic virus infection or mercuric chloride treatment. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 36, p. 1-14, 1990.

ORTEGA, F., STEINER, U., DEHNE, H. W. Induced resistance: a tool for fungicide resistance management. **Pestic. Sci.**, v. 53, p. 193-196, 1998.

PASCHOLATI, S. F., LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **RAPP**, v. 2, p. 1-51, 1994.

RICHARDSON, M. J. Seed mycology. **Mycol. Res.**, v. 100, p. 385-392, 1996.

ROBY, D., TOPPAN, A., ESQUERRRE-TUGAYA, M. T. Cell surfaces in plant-microorganism interactions. V. Elicitors of fungal and of plant origin trigger the synthesis of ethylene and of cell wall hydroxiprolin-rich glycoproteins in plant. **Plant Physiol.**, v. 77, p. 700-704, 1985.

ROUGÉ, P., PÈRE, D., BOURNE, Y., CABBILLAU, C., RICHARDSON, M. Single and two chain lectins: A revisited question. In: KOCOUREK, J., FREED, D. I. J. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. 1990, v. 7, p. 105-112.

ROWHANI, A., FALK, B. W. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Methods to certify pathogen (Virus)- free plants. In: GAMBORG, O. L., PHILLIPS, G. C. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 1995, p. 266-280.

TEMPLETON, M. D., LAMB, C. I. Elicitors and defense gene activation. **Plant Cell Environ.**, v. 11, p. 395-401, 1988.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrilamide gel to nitrocellulose sheet: produces and some application. **Pro. Nat. Acad. Sci.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VAN LOON, L. C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: DATTA, S. K., MUTHUKRISHNAN, S. **Pathogenesis Related Proteins in Plants**, Boca Raton: CRC Press, 1999, p. 1-19.

VERNOOIJ, B., UKNES, S., WARD, E., RYALS, J. Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions. **Curr. Op.Cell Biol.**, v. 6, p. 275-279, 1994.

WHITE, R. F. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. **Virology**, v. 99, p. 410-412, 1979.

XAVIER-FILHO, J. **Sementes e suas Defesas contra Insetos**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Imprensa Universitária. 1993, 31 p.

XUE, L., CHAREST, P. M., JABAJI-HARE, S.H. Systemic induction of peroxidases, 1,3-glucanases, chitinases, and resistence in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Phytophatol.**, v. 88, p. 359-365, 1998.

YOSHIKAMA, M., YAMAOKA, N., TAKEUCHI, Y. Elicitors: Their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. **Plant Cell Physiol.**, v. 34, n. 8, p. 1163-1173, 1993.