

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LECTINAS DA FRAÇÃO
GLOBULÍNICA DE SEMENTES DE JACA (*Artocarpus integrifolia* L.)
var. mole.

FRANCISCO DAS CHAGAS REBOUÇAS DA COSTA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1982

E R R A T A

<u>Pág.</u>	<u>Parágrafo</u>	<u>linha</u>	<u>em vez de</u>	<u>leia-se</u>
1	1	11	imobilizada	imobilizados
1	2	2	assume	assumem
10	2	14	lipopolissacarídeo	lipopolissacarídio
10	3	6	e estruturas	de estruturas
11	1	8	lectinas	β -lectinas
11	1	11	β -lectinas	lectinas
12	2	9	canconavalina A	concanavalina A
35	2	7	observa-se	observava-se

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição do material contido nesta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Francisco das Chagas Rebouças da Costa

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/02/82

Renato de Azevedo Moreira
Orientador da Dissertação

Iracema Lima Ainouz

José Xavier Filho

À minha esposa Ivani

a meus pais

e à memória de

ISABEL REBOUÇAS DE LIMA

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Coordenação do Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de bolsa de Pós-Graduação (PICD) concedida ao autor e através de auxílios ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (Projeto de Pesquisas em Sementes).

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta dissertação foi preparada.

AGRADECIMENTOS

A todos os colegas, funcionários e professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, pela cooperação e incentivo e em particular aos professores RENATO DE AZEVEDO MOREIRA, pela orientação desta pesquisa, e JOSÉ XAVIER FILHO e IRACEMA LIMA AINOZ, pelas sugestões e discussões apresentadas.

Ao JOAQUIM MARQUES, pela determinação da análise elementar da semente em estudo.

A Srta. WALKÍRIA GONÇALVES DE LIMA, por ter fornecido do grande parte das sementes utilizadas neste trabalho.

Aos professores ARI PINHEIRO AMORIM e PEDRO ALMEIDA DUARTE, respectivamente ex-diretor e atual diretor da Escola Superior de Agricultura de Mossoró, por licenças para afastamento concedidas ao autor em diferentes etapas deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Química e Tecnologia da Escola Superior de Agricultura de Mossoró, pelo apoio e incentivo.

De modo muito especial a CASIMIRO LIMA FILHO e LUIS REBOUÇAS DE LIMA, pela inestimável colaboração prestada ao autor durante toda a sua formação profissional.

3.3 - <u>Cromatografia das Globulinas em Coluna de CM-Celulose</u>	28
3.4 - <u>Cromatografia das Globulinas em Coluna de Sephadex G-100</u>	28
3.5 - <u>Cromatografia das Globulinas em Coluna de Afinidade</u>	31
3.6 - <u>Cromatografia da Fração GII em Coluna de Sephadex G-100</u>	35
3.7 - <u>Cromatografia da Fração GII em Coluna de SP-Sephadex C-50</u>	37
3.8 - <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e Beta-mercaptoetanol</u>	37
3.9 - <u>Estudos de Especificidade</u>	40
3.9.1 - <u>Ensaio de Hemaglutinação Contra Hemácias Humanas</u>	40
3.9.2 - <u>Ensaio de Hemaglutinação Contra Hemácias de Diferentes Animais</u>	44
3.10 - <u>Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante</u>	44
3.11 - <u>Imunoeletroforese</u>	47
3.12 - <u>Espectros de Absorção</u>	47
4 - <u>CONCLUSÕES</u>	52
5 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	54
6 - <u>COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS</u>	62

LISTA DE TABELAS

TABELA	página
1 - Especificidade de algumas lectinas contra grupos sanguíneos humanos	7
2 - Composição mínima de sementes de <i>Artocarpus integrifolia</i> L. var. mole	25
3 - Teor de proteínas e atividade hemaglutinante contra hemácias AB(+) de extrato total, albumina e globulina de <i>Artocarpus integrifolia</i> L. var. mole	27
4 - Atividades específicas de extrato total, globulina e frações GI, GII e GIII contra hemácias humanas do sistema ABO	43
5 - Atividades específicas de extrato total, globulina e frações GI, GII e GIII contra hemácias de diferentes animais	45
6 - Açúcares usados na tentativa de inibição da atividade hemaglutinante das frações GII e GIII	46

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	página
1 - Esquema geral de obtenção das globulinas de jaca mole a partir da farinha delipidada	26
2 - Cromatografia em coluna de CM-Celulose das globulinas de jaca mole	29
3 - Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 das globulinas de jaca mole	30
4 - Cromatografia analítica em coluna de afinidade preparada com estromas de hemácias humanas AB(+) das globulinas de jaca mole .	32
5 - Cromatografia preparativa em coluna de afinidade preparada com estromas de hemácias humanas AB(+) das globulinas de jaca mole .	34
6 - Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 da fração GII	36
7 - Cromatografia em coluna de SP-Sephadex C-50 da fração GII	38
8 - Esquema geral das etapas de fracionamento das lectinas da fração globulínica de sementes de <i>Artocarpus integrifolia</i> L. var. mole	39
9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das globulinas e das frações GI, GII e GIII na presença de beta-mercaptoetanol	41
10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das globulinas e frações GII e 2SPSGII na presença de SDS e beta-mercaptoetanol	42

FIGURA

página

11	- Imunoeletroforese em gel de agarose das globulinas e frações GII e 2SPSGII com anti-soro preparado contra extrato total de jaca mole	48
12	- Imunoeletroforese em gel de agarose das globulinas e das frações GI, GII e GIII com anti-soro preparado contra extrato total de jaca mole	49
13	- Espectros de absorção das globulinas de jaca mole e das frações GII e GIII	51

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

CM-Celulose	Carboximetil-celulose.
SP-Sephadex	Sulfopropil-Sephadex.
PBS	Tampão fosfato de sódio e potássio 0,025M, pH 7,4 contendo NaCl 0,15M.
PHA	Lectina isolada de <i>Phaseolus vulgaris</i> .
SDS	Dodecil sulfato de sódio.
U.H.	Unidade de hemaglutinação, definida como o inverso da maior diluição de uma dada solução, ainda capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2% em PBS.
U.H./mg	Valor em unidades de hemaglutinação de uma solução contendo 1mg/ml de proteína, através do qual se expressa a <u>atividade específica</u> de hemaglutinação.
$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	Coefficiente de extinção de uma solução a 1% em uma célula de 1cm de caminho ótico.
FI	Primeira fração ativa (PM 97.000 daltons) da cromatografia em Sephadex G-100 das globulinas de jaca mole.
FII	Segunda fração ativa (PM 59.700 daltons) da cromatografia em Sephadex G-100 das globulinas de jaca mole.
GI	Fração protéica obtida por eluição com PBS das globulinas de jaca mole em cromatografia de afinidade em coluna de estromas de hemácias humanas AB(+).
GII	Fração protéica obtida por eluição com água destilada das globulinas de jaca mole em cro

matografia de afinidade em coluna de estromas de hemácias humanas AB(+).

GIII Fração protéica obtida por eluição com tampão glicina-HCl 0,2M pH 2,6, das globulinas de jaca mole em cromatografia de afinidade em coluna de estromas de hemácias humanas AB(+).

ISPSGII Fração obtida por cromatografia da fração GII em coluna de SP-Sephadex C-50 com o tampão de equilíbrio.

2SPSGII Fração obtida da cromatografia em coluna de SP-Sephadex C-50 da fração GII, com o auxílio de um gradiente salino.

RESUMO

Estudos de isolamento das lectinas presentes na fração globulínica de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. var. mole foram conduzidos através de cromatografia de afinidade em estromas de hemácias humanas, tendo as lectinas isoladas sido parcialmente caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, imunoeletroforese em gel de agarose, determinação do espectro de absorção e ensaios de atividade hemaglutinante contra diversos tipos de hemácias, e de inibição por açúcares simples.

As frações ativas isoladas (GII e GIII) revelaram pequenas diferenças em ensaios de atividade hemaglutinante, com hemácias humanas do sistema ABO. Em ensaios de atividade contra hemácias de diferentes animais, essas frações aglutinaram sangue de rato, camundongo, pato e coelho, tendo no entanto, sido incapazes de aglutinar sangue de galinha. Os valores de $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ da globulina e das frações GII e GIII a 280 nm, foram de 17,9, 33,5 e 15,0, respectivamente.

A presença de contaminantes de natureza protéica na fração GII foi detectada por cromatografia de exclusão molecular. A existência de mais de uma lectina nessa fração foi verificada por cromatografia de troca iônica, tendo uma dessas lectinas (2SPSGII) sido obtida na forma pura.

A semelhança observada entre os arcos de precipitação de frações ativas em experimentos de imunoeletroforese, associada ao fato de que as duas subunidades (pesos moleculares 11.000 daltons e 16.000 daltons), características da lectina 2SPSGII, foram encontradas nas frações GII e GIII, indicam a ocorrência na fração globulínica de uma família de isolectinas.

ABSTRACT

Lectins from the globulin fraction of *Artocarpus integrifolia* L. var. mole seeds were isolated by affinity chromatography on column of erythrocyte stroma from human group AB(+). The two active fractions obtained, GII and GIII, presented slight differences when they were tested with human erythrocytes of the ABO system. They also agglutinated red blood cells from mice, rat, rabbit and duck, but were not able to agglutinate erythrocytes from chicken. The $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ values at 280 nm of globulin, GII and GIII fractions were 17.9, 33.5 and 15.0, respectively. The GII fraction when chromatographed on SP-Sephadex C-50 gave two active fractions (1SPSGII and 2SPSGII). One of these fractions, 2SPS GII, was obtained in pure form as showed by SDS electrophoresis in the presence of β -mercaptoethanol and immunoelectrophoresis in agarose gel. All the lectins studied, when subjected to SDS electrophoresis in the presence of β -mercaptoethanol, presented two bands with molecular mass of 11.000 and 16.000, suggesting the occurrence of a family of isolectins in the globulin fraction.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais

Lectinas são proteínas que se caracterizam por apresentarem a capacidade de se ligar a carboidratos presentes nas superfícies de estruturas celulares de diferentes organismos vivos (LIS & SHARON, 1973). A consequência mais importante da interação das lectinas com açúcares é, sem dúvida, a habilidade que têm essas proteínas de interagirem com diferentes tipos de células, produzindo efeitos variados como a aglutinação de eritrócitos, a indução de mitose em linfócitos e outros tipos de células, a inibição de crescimento de tecidos cancerosos, a interação com polissacarídeos e glicoproteínas em solução ou imobilizada em estruturas rígidas e a interação com glicolipídios associados à membrana de lipossomos, entre outros (DOWNING *et al.*, 1968; BOLDT *et al.*, 1977, DWYER *et al.*, 1974; HOWARD *et al.*, 1977; IOACHIM, 1966; KAUSS, 1977; LIS *et al.*, 1974; LIS & SHARON, 1973; SHARON, 1977; SHARON & LIS, 1972; SARKANY & CARON, 1966; SOUTHWORTH, 1975; WATSON *et al.*, 1974).

A importância prática que as propriedades biológicas das lectinas assume em vários campos da atividade científica justifica o crescente interesse que elas despertam em pesquisadores de diferentes áreas como imunologia, bioquímica, fisiologia vegetal e biologia molecular.

1.2 - Revisão Histórica

As lectinas são conhecidas desde o século passado, quando Stillmarck em 1889, estudando os efeitos tóxicos de

sementes de *Ricinus communis*, descobriu que a ricina, extraído protéico dessas sementes, produzia a aglutinação de eritrócitos humanos (BOYD, 1963). Posteriormente, Ehrlich em 1891, trabalhando com a ricina e com o extrato protéico de *Abrus precatorius*, abrina, demonstrou que uma dose subcutânea de ricina correspondendo a uma concentração 200 vezes maior do que a dose letal podia ser tolerada por camundongos aos quais fossem administradas doses do extrato tóxico cujas concentrações aumentassem gradualmente ao longo de um determinado período de tempo. Além disso, mostrou que o soro de animais imunizados contra a ricina era capaz de neutralizar a ricina, porém não neutralizava a abrina e vice-versa (SHARON & LIS, 1972; TOMS & WESTERN, 1971).

Até 1947, essas aglutininas vegetais ou fitohemaglutininas, como são ainda conhecidas as lectinas de origem vegetal, eram apenas ocasionalmente citadas, por se presumir que eram inespecíficas. Atribui-se a Boyd a descoberta, em 1945, da existência de lectinas específicas para grupos sanguíneos humanos, mas apenas alguns anos mais tarde, em 1949, Boyd e Reguera mostraram a existência de uma lectina anti-A em sementes de *Phaseolus lunatus* (ALLEN & BRILLIANTINE, 1969), fato que ocorreu um ano após a descoberta por Renkonen de que *Lotus tetragonolobus* tinha uma lectina específica para o grupo O (SHARON, 1977). A partir de então essas proteínas passaram a ser objeto de estudos sistemáticos com o objetivo de se descobrir hemaglutininas que pudessem ser utilizadas na tipagem de grupos sanguíneos e no estudo da estrutura química de substâncias dos grupos sanguíneos (SHARON et al., 1974).

1.3 - Distribuição e Localização das Lectinas

A maioria das lectinas até hoje conhecidas foi extraída de vegetais, desde bactérias, algas e fungos até mono e dicotiledôneas, destacando-se entre estas as famílias

Leguminosae e *Euphorbiaceae* (GOLD & BALDING, 1975). As lectinas, no entanto, são também encontradas no reino animal desde protozoários, equinodermos, crustáceos e moluscos (GOLD & BALDING, 1975) até os vertebrados, incluindo mamíferos (SIMPSON et al., 1978; STOCKERT et al., 1974).

A localização das lectinas nos organismos em que ocorrem é bastante diversificada. Nas plantas superiores as concentrações mais elevadas são observadas nas sementes, mas elas são encontradas também nas raízes, látex, tubérculos, caules e folhas (GOLD & BALDING, 1975); em animais elas já foram encontradas em diferentes tecidos e órgãos como músculo, cérebro, fígado e coração (SIMPSON et al., 1978).

A maioria das lectinas já estudadas são proteínas citoplasmáticas (CLARKE et al., 1975). Bowles e Kauss detectaram atividade hemaglutinante em frações protéicas extraídas de membrana plasmática, mitocôndria, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático (KAUSS, 1977). No entanto, CLARKE et al. (1975) apresentaram evidências de que as β -lectinas, que interagem especificamente com β -glicosídeos, têm localização extra-citoplasmática na membrana celular, paredes celulares e espaços intercelulares.

1.4 - Composição Química e Características Fisicoquímicas das Lectinas

De todas as lectinas obtidas em estado puro e que têm a sua composição química conhecida, apenas a concanavalina A, a lectina de germe de trigo e a lectina de mucunã não contêm carboidratos em suas estruturas (LIS & SHARON, 1973; MOREIRA, 1982); todas as demais são glicoproteínas nas quais a composição de açúcar é muito variada, sendo frequente a presença de manose, glicosamina e galactose (SHARON & LIS, 1972).

No que diz respeito à composição de aminoácidos, as lectinas de um modo geral, apresentam grande heterogeneida-

de. As presentes em representantes das leguminosas, por exemplo, cuja composição revela teores relativamente elevados de aminoácidos básicos e hidroxilados, possuem teores muito reduzidos ou são completamente destituídas de aminoácidos sulfurados (MOREIRA, 1975). Em contraste, as lectinas encontradas no germe de trigo (SHARON et al., 1974) e em ovas de alguns peixes (OLIVEIRA, 1980) possuem alto teor de aminoácidos sulfurados.

Os pesos moleculares variam de aproximadamente 25.000 daltons até cerca de 400.000 daltons (SHARON & LIS, 1972), sendo as lectinas de um modo geral proteínas oligoméricas que resultam da associação de subunidades ou protômeros, idênticos ou não, em número de dois, quatro ou oito (LIS & SHARON, 1981). Uma decorrência importante desta constituição oligomérica é a existência de formas moleculares múltiplas de lectinas, as isolectinas, que são proteínas muito similares resultantes de combinações diferentes das mesmas subunidades ou de subunidades estreitamente relacionadas (LIS & SHARON, 1973; SHARON & LIS, 1972). A ocorrência de lectinas apresentando semelhanças estruturais foi observada em sementes de uma mesma planta (PUEPPKE, 1979; PUSZTAI & WATT, 1974), em variedades diferentes de uma mesma espécie, e mesmo em espécies diferentes de um mesmo gênero (OLIVEIRA, 1980).

As isolectinas diferem em suas mobilidades eletroforéticas, sendo a focalização isoelétrica uma técnica que tem se mostrado muito eficiente no seu fracionamento. (PUSZTAI & WATT, 1974).

Algumas lectinas necessitam de íons divalentes como Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2} para exercerem as suas atividades, apresentando as mesmas, na sua estrutura tridimensional, sítios específicos para a ligação desses íons (KAUSS, 1977).

1.5 - Propriedades Biológicas das Lectinas

As lectinas exercem as suas diferentes propriedades através de mecanismos ainda não completamente elucidados, mas que se sabe envolver a participação de resíduos de carboidratos presentes nas estruturas com as quais elas interagem. Segundo LIS & SHARON (1973) a manifestação de efeitos biológicos como a aglutinação de hemácias e de células cancerosas por lectinas é determinada pela localização de carboidratos na superfície externa da membrana plasmática, e que a interação das lectinas com esses carboidratos resulta em modificações da arquitetura molecular da membrana celular, geralmente associada com alterações metabólicas. Nowell observou que a PHA (a lectina isolada de *Phaseolus vulgaris*) pode produzir alterações na membrana celular de linfócitos de modo que substâncias do meio de cultura entram na célula, iniciando o processo de mitose (KOLODNY & HIRSCHHORN, 1964). A importância da presença de carboidratos nas superfícies de estruturas celulares, como mediadores das interações envolvendo lectinas em diferentes organismos, tem sido destacada por diversos autores (BIDDLE et al., 1970; DWYER, 1974; NORDBRING-HERTZ & MATTIASSON, 1979; WATSON et al., 1974).

Esse fato é conhecido desde 1936 quando Sumner e Howell, depois de constatarem que a aglutinação de eritrócitos pela concanavalina A era inibida por açúcar de cana, sugeriram que a hemaglutinação podia ser uma reação da proteína com carboidratos da superfície da célula. Em 1952, Watkins e Morgan descobriram que a aglutinação de eritrócitos provocada por lectinas podia ser inibida pela adição de certos açúcares simples. Dois anos mais tarde, estes pesquisadores observaram que a aglutinação de hemácias humanas pela lectina de *Phaseolus lunatus* era melhor inibida por N-acetil-galactosamina, sugerindo ser esse açúcar um determinante da especificidade do grupo A. O trabalho de Watkins e Morgan evidenciando a presença de carboidratos nas super-

fícies das células abriu um novo horizonte nas pesquisas dos constituintes estruturais da membrana celular e contribuiu para uma melhor compreensão das propriedades das lectinas (SHARON, 1977).

O fenômeno da aglutinação, quer de hemácias humanas, quer de hemácias de outros animais, por constituir a atividade mais característica das lectinas, é de um modo geral, sem dúvida, a mais explorada, sendo geralmente utilizada como instrumento de identificação da presença de lectinas em extratos proteicos de diversas origens (BOYD, 1963; JAFFÉ, 1969).

As lectinas apresentam, no entanto, diferenças marcantes quanto à interação com as hemácias. Por esta razão, BOYD (1963) classificou essas proteínas em três grupos distintos:

- aglutininas diretas ou completas, lectinas capazes de aglutinar eritrócitos quando suspensos em solução salina isotônica;

- aglutininas indiretas ou lectinas incompletas, lectinas incapazes de aglutinar eritrócitos em solução salina, mas capazes de promover a aglutinação quando misturados com plasma ou determinados meios coloidais. Neste grupo se incluem também as lectinas que aglutinam hemácias previamente tratadas com certas enzimas proteolíticas;

- lectinas não aglutinantes, lectinas que se combinam firmemente com vários tipos de eritrócitos mas não são capazes de aglutiná-los.

As aglutininas, independente do grupo a que pertençam, podem ser inespecíficas, sendo capazes de aglutinar diferentes tipos de hemácias, ou específicas, aglutinando preferencialmente determinado grupo sanguíneo. Na tabela 1 são relacionadas algumas lectinas específicas para grupos sanguíneos humanos.

Além de hemácias, as lectinas são capazes de interagir com outros tipos de células como leucócitos (DOWNING et al., 1968), protoplastos vegetais (CHIN & SCOTT, 1979;

TABELA 1 - Especificidade de algumas lectinas contra grupos sanguíneos humanos.

Origem	Grupo sanguíneo	Referências
<i>Dolichos biflorus</i>	A	1,2,4,5
<i>Phaseolus lunatus</i>	A	1,2,4,5
<i>Lathyrus silvestris</i>	A	1,5
<i>Crotalaria aegyptia</i>	A	1,4,5
<i>Vicia cracca</i>	A	1,2,3,4,5
<i>Vicia peregrina</i>	A	1,5
<i>Vicia villosa</i>	A	1,5
<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	B	2,3
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	B	6
<i>Crotalaria striata</i>	AB	1,2,5
<i>Sophora japonica</i>	AB	1,2,4,5
<i>Ulex europeus</i>	H(O)	1,2,3,4,5
<i>Lotus tetragonolobus</i>	H(O)	1,2,3,4
<i>Iberis amara</i>	M	1,2
<i>Vicia graminea</i>	N	1,2,4,5
<i>Bauhinia purpurea</i>	N	1,2,4

1 - BOYD (1963)

2 - GOLD & BALDING (1975)

3 - LIENER (1976b)

4 - SHARON & LIS (1972)

5 - TOMS & WESTERN (1971)

6 - VOSS et al. (1978)

LARKIN, 1978) e células cancerosas (BIDDLE et al., 1970; SHARON, 1977), sendo neste caso muito úteis na distinção entre essas células e células normais, permitindo assim estudos das alterações morfológicas e metabólicas que ocorrem em decorrência da transformação maligna.

A indução de mitose por lectinas, que atuam como agentes estimuladores da divisão de diferentes tipos de células (HOWARD et al., 1977; IOACHIM, 1966; SARKANY & CARON, 1966), é uma propriedade de grande utilidade na investigação de eventos bioquímicos envolvidos na divisão celular, bem como em estudos de estruturas de cromossomos e de fenômenos imunológicos (SHARON, 1977). O efeito mitogênico das lectinas tem sido observado tanto através de experimentos in vitro (HOWARD et al., 1977; IOACHIM, 1966) como in vivo (SARKANY & CARON, 1966).

1.6 - Significado Nutricional das Lectinas

A presença de lectinas em sementes comestíveis de muitas plantas, notadamente legumes (LIENER, 1976a), despertou o interesse de vários pesquisadores no sentido de investigarem o significado nutricional dessas proteínas.

Embora um grande número de lectinas seja destituído de qualquer efeito deletério comprovado, muitas lectinas exibem atividade tóxica (JAFFE, 1969).

Em ratos, nos quais foram injetadas lectinas tóxicas, foram observados efeitos como lesões patológicas de diversos tipos, edemas em diferentes tecidos, destruição de células epiteliais, hemorragias e distensão de capilares do rim, entre outros (JAFFE, 1969).

As lectinas são apontadas como um dos principais fatores responsáveis pelo empobrecimento de dietas preparadas à base de proteínas vegetais, notadamente quando tais preparações são administradas sem qualquer tratamento que condu-

za à inativação das toxinas presentes como, por exemplo, exposição ao calor úmido por tempo suficiente para desnaturar as proteínas ativas, sem no entanto alterar o valor nutritivo dos constituintes protéicos de um modo geral (LIENER, 1974). Como resultado da ingestão de dietas contendo lectinas tóxicas observa-se uma diminuição da absorção de nutrientes, tendo como conseqüência a inibição do crescimento e, às vezes, a morte (LIENER, 1975). De acordo com um mecanismo proposto por JAFFÉ (1969), a redução na absorção de nutrientes é devida a interações das lectinas com substâncias da membrana de células da superfície da parede intestinal. PUSZTAI et al. (1981), entretanto, investigando a toxicidade de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. cv Processor em ratos, observou que a maior parte do nitrogênio perdido pelos animais em função da ingestão da toxina dessas sementes, era constituída de nitrogênio corporal cuja perda era atribuída a alterações fisiológicas de células intestinais danificadas e a possíveis respostas imunes às lectinas absorvidas.

1.7 - Papel Fisiológico das Lectinas nos Organismos Onde Ocorrem

Existe muita controvérsia quanto ao papel que as lectinas desempenham nos organismos vegetais, sendo inclusive encontradas na literatura referências que admitem serem as lectinas presentes em cotilédones proteínas de reserva, não desempenhando nenhum papel vital para a planta (BOLLINI & CHRISPEEL, 1978; ROUGE, 1974).

Pelo fato de as interações das lectinas com carboidratos serem análogas à reação antígeno-anticorpo em muitos aspectos, sugeriu-se que as fitohemaglutininas poderiam ser anticorpos vegetais, mas essa hipótese tem sido desprezada em virtude das diferenças notáveis que existem entre essas duas classes de proteínas (SHARON, 1977). Entretanto, tem

sido defendido por alguns pesquisadores o papel não imunológico de defesa por lectinas de plantas em determinados estágios de seu desenvolvimento, contra o ataque de patógenos (LIENER, 1976b; SHARON, 1977).

A descoberta do paralelismo entre a nodulação de raízes de muitas plantas que estabelecem simbiose com bactérias do solo e a presença de lectinas em algumas leguminosas, levou alguns autores a sugerirem que estas proteínas podem desempenhar um importante papel na fixação de nitrogênio em plantas, através da ligação de bactérias às suas raízes. HAMBLIN & KENT (1973), mostraram que a lectina de *Phaseolus vulgaris*, PHA, é capaz de prender *Rhizobium phaseoli* em sítios adequados da raiz, para a infecção da planta por essa bactéria. WOLPERT & ALBERSHEIM (1976), trabalhando com espécies de *Rhizobia* e de legumes, demonstraram uma interação específica entre lipopolissacarídeos contendo antígeno-O de *Rhizobia* e a lectina do legume hospedeiro. Foi assim evidenciado um componente de *Rhizobia* (lipopolissacarídeo) envolvido no processo de seleção simbiote-hospedeiro, em apoio à observação de BOHLOOL & SCHMIDT (1974) de que a lectina de soja se liga seletivamente apenas a linhagens de *R. japonicum* capazes de promover nodulação. A especificidade da interação simbiote-hospedeiro foi observada também por DAZZO & BRILL (1978) entre a lectina de *Trifolium repens* e o seu simbiote *R. trifolium*. A interação de lectinas de diferentes espécies de leguminosas com bactérias fixadoras de nitrogênio foi descrita também por BHUVANESWARI *et al.* (1977) e WONG (1980), entre outros autores. Por outro lado, esse papel das lectinas foi negado por PUEPPKE *et al.* (1978), pelo fato de não terem detectado lectina em plantas jovens com duas ou três semanas de idade.

Outras funções fisiológicas têm sido atribuídas às lectinas. Alguns autores sugeriram que as lectinas dotadas de atividade mitogênica desempenham importante papel no desenvolvimento e diferenciação das células (LIENER, 1976b). As lectinas são apontadas também como fatores de reconhecimento e estruturas moleculares, sendo capazes de detectar

diferenças sutis na estrutura química da superfície celular como um meio de influenciar e regular uma variedade de funções fisiológicas normais. Deve-se considerar a possibilidade de que essas proteínas desempenham algum papel relevante na troca de informações post-ribossomais essenciais ao crescimento e desenvolvimento ordenados de estruturas celulares (ASHWELL, 1977). CLARKE et al. (1975) sugeriram que as β -lectinas funcionam como fatores de auto-reconhecimento em células vegetais, determinando as relações entre células vegetativas em tecidos e órgãos. A importância do papel de reconhecimento celular por β -lectinas em diferentes processos biológicos tem sido enfatizada também por vários outros autores (LARKIN, 1977; SIMPSON et al., 1978).

1.8 - Metodologia Empregada no Isolamento e na Purificação de Lectinas

Uma das maiores dificuldades responsáveis pelas imprecisões e dúvidas a respeito das propriedades das lectinas, reside no fato de muitos estudos realizados com essas proteínas terem sido feitos com extratos impuros, em que os contaminantes interferiam com as atividades das lectinas ou apresentavam propriedades erroneamente atribuídas às lectinas. Por esta razão, por exemplo, admitiu-se durante muito tempo que as atividades tóxica e hemaglutinante do extrato protéico da mamona eram produzidas pela mesma substância (LIENER, 1976a). Do mesmo modo, conhecem-se hoje lectinas diferentes presentes no mesmo organismo dotadas de atividades biológicas distintas, como atividade hemaglutinante e atividade mitogênica, por exemplo, que antes se acreditava serem exercidas por uma única proteína (PUSZTAI & WATT, 1974).

Durante muito tempo, a metodologia empregada na extração e no isolamento das lectinas baseou-se unicamente nas propriedades fisicoquímicas das proteínas. Entre as técnicas

cas mais utilizadas para esse fim, podemos mencionar a precipitação fracionada, a cristalização, e os diferentes tipos de cromatografia e troca iônica e de filtração em gel (BESSLER & GOLDSTEIN, 1973; JAFFÉ et al., 1974; MOREIRA & PERRONE, 1977; STOREY & BEEVERS, 1978). Recentemente, entre tanto, técnicas de isolamento por cromatografia de afinidade explorando a habilidade das lectinas de reagirem reversivelmente com açúcares, estão sendo largamente empregadas em estudos de isolamento e purificação dessas proteínas (LIS et al., 1974). A cromatografia de afinidade, isoladamente ou em combinação com métodos convencionais de fracionamento (ERSSON, 1977; ROUGE & LASCOMBES, 1973), apresenta vantagens consideráveis sobre as técnicas tradicionais tais como rendimento mais elevado e maior grau de pureza (BETAIL et al., 1971; FELSTED et al., 1975; FROST et al., 1975).

Vários procedimentos são empregados em cromatografia de afinidade de lectinas, os quais diferem em função da especificidade da lectina em estudo. Alguns géis usados em cromatografia de exclusão molecular, como Sephadex, Sepharose e Biogel, têm se mostrado muito úteis como matrizes para cromatografia de afinidade de algumas lectinas (AGRAWAL & GOLDSTEIN, 1967; LIS et al., 1974; VOSS et al., 1978). Em muitos casos, no entanto, o acoplamento de substâncias ligantes, incluindo lectinas, como cancanavalina A, por exemplo, a matrizes inertes se faz necessário para a ligação de certas lectinas (MANEN e MIEGE, 1977; VRETBLAD, 1976). HOREJSI & KOCOUREK (1974) descreveram o isolamento de lectinas usando géis de poli(acrilamida) copolimerizados com vários glicosídeos. Esses géis foram também empregados na separação eletroforética de misturas complexas de lectinas, proporcionando dessa maneira a detecção de lectinas de uma dada especificidade e permitindo a identificação do tipo de açúcar ligante adequado para cromatografia de afinidade em escala preparativa. O uso de hemácias íntegras submetidas a diferentes tratamentos (REITHERMAN et al., 1974) e de estromas de porco e de homem glutarizados e imobilizados em matrizes inertes constitui também procedimento de grande uti-

lidade no isolamento e na purificação de lectinas por cromatografia de afinidade (BÉTAIL et al., 1971).

A eluição das lectinas das colunas de cromatografia de afinidade é feita através da adição de açúcares inibidores, e de modificações estruturais das lectinas produzidas por variações de pH e força iônica, e pela adição de agentes químicos desnaturantes.

1.9 - Propósitos deste Trabalho

No presente trabalho foram feitos estudos de isolamento e de caracterização parcial de lectinas da fração globulínica de sementes quiescentes de *Artocarpus integrifolia* L. var. mole, com o objetivo de contribuir para um melhor conhecimento das características fisicoquímicas e biológicas dessa classe de proteínas. Foi feita também uma abordagem de características estruturais das lectinas isoladas, através de experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida e de imunoeletroforese.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Materiais

2.1.1 - Sementes

Neste trabalho foram utilizadas sementes quiescentes de *Artocarpus integrifolia* L. variedade mole, representante da família Moraceae, obtidas de frutos maduros coletados no município de Maranguape-Ce.

2.1.2 - Sangue

Amostras de sangue humano do sistema ABO foram obtidas de doadores sadios em bancos de sangue da cidade de Fortaleza.

As amostras de sangue dos diferentes animais usadas no presente trabalho foram obtidas de espécimes sadios dos biotérios da UFC (ratos, camundongos e coelhos) e de criação doméstica (patos e galinhas).

2.1.3 - Outros Materiais

Albumina sérica bovina - Fração V 96-99%, lote 126c - 0199 de Sigma Chemical Co., St Louis, EUA.

Acrilamida e N-N'-metileno bisacrilamida - Eastman Organic Chemicals, Rochester, N.Y., EUA.

Sephadex G-100 média (lote nº 5967) e Sephadex G-25 super fina (lote nº 8662) de Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Carboximetil Celulose - Nutritional Biochemistry, Co. EUA.

Sulfopropil - Sephadex C-50 de Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Agarose - Sigma Chemical Co., St Louis, EUA.

Beta-mercaptoetanol - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Ácido dietil barbitúrico - Atlântida Representações e Importações Ltda., RJ, Brasil.

5-5-Dietil barbiturato de sódio - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Preparação da Farinha

Sementes quiescentes livres de tegumento foram cortadas em pequenos pedaços e desidratadas com acetona (na proporção de 1:10 peso/volume) por pelo menos três vezes no período de um dia. Após remoção da umidade por este tratamento, as sementes foram secas ao ar e finalmente trituradas em moinho Wiley adaptado com uma tela de 60 malhas por polegada linear (60 mesh). A farinha assim obtida foi estocada em recipientes hermeticamente fechados, a temperatura ambiente.

2.2.2 - Extração de Proteínas

A farinha preparada pelo procedimento descrito acima, foi submetida a extração exaustiva (1:20 p/v) com tampão fosfato de sódio e potássio 0,025M pH 7,4 contendo NaCl 0,15M (PBS). A extração foi feita inicialmente na relação 1:10 (p/v) por três horas a temperatura ambiente com agitação ocasional, seguida de filtração em papel de filtro qualitativo. O resíduo foi reextraído mais duas vezes por 30 minutos empregando-se a relação 1:5 (p/v), mantendo-se constantes as demais condições, e os filtrados reunidos.

O extrato total assim obtido, após diálise contra água e liofilização, foi utilizado para determinações posteriores.

2.2.3 - Fracionamento das Proteínas em Albuminas e Globulinas

O extrato total foi dialisado contra água destilada durante um período mínimo de 48 horas a 7°C, utilizando-se um volume de água destilada que correspondia a 20 vezes o volume do extrato total a ser dialisado, sendo a água trocada 4 vezes ao longo do período acima mencionado, O dialisado era então submetido a centrifugação a 16.000 x G por 20 min a 4°C em uma centrífuga Sorval RC-5, obtendo-se duas frações protéicas distintas: as albuminas, correspondendo ao sobrenadante e as globulinas, que correspondiam ao precipitado. Após liofilização, essas frações eram armazenadas em congelador (-17°C), em frascos herméticos.

2.2.4 - Dosagem de Proteínas

O conteúdo de proteína nas amostras liofilizadas,

depois de dissolvidas em PBS, foi determinado pelo método do micro-biureto (BAILEY, 1967) usando-se albumina sérica bovina como padrão. Nos efluentes das colunas de cromatografia, a concentração de proteína foi medida pela absorvância a 280 nm em um espectro fotômetro Beckman DU.

2.2.5 - Ensaio de Hemaglutinação

A atividade hemaglutinante foi determinada empregando-se o método descrito por MOREIRA (1975) adaptado para o uso de placas contendo 8 fileiras de 12 poços e de microdiluidores capazes de reter por capilaridade um volume constante (25 μ l) de amostra (Cooke Engineering, EUA), como detalhado a seguir.

Com uma pipeta apropriada foi colocada em cada poço uma gota (25 μ l) de PBS. O microdiluidor que continha a amostra a ser titulada foi então mergulhado no primeiro poço de uma fileira e agitado de modo a se obter uma primeira diluição, e, ao mesmo tempo, a retenção dessa amostra já diluída por esse microdiluidor que, operado seqüencialmente até o último poço, levava a uma diluição da amostra em estudo. Após diluição de todas as amostras (uma em cada fileira), adicionou-se a cada poço 25 μ l de uma suspensão das hemácias a serem testadas (2% em PBS). As placas foram então incubadas em estufa a 37°C por 30 min, e, depois de deixadas em repouso por mais 30 min a temperatura ambiente (25°C), tiveram os títulos determinados visualmente, observando-se a maior diluição que ainda apresentava aglutinação.

2.2.6 - Cromatografia em Coluna de Troca Iônica

2.2.6.1 - Cromatografia em coluna de CM-Celulose

Uma coluna de CM-Celulose medindo 12 x 1,3cm foi montada segundo PETERSON & SOBER (1962). O adsorvente foi inicialmente lavado com água, seguida de HCl 0,1 N, água, NaOH 0,1 N e água, com o objetivo de se eliminar as partículas finas. Em seguida, o adsorvente foi deixado sedimentar por gravidade em coluna de vidro, sendo submetido novamente a lavagens com HCl 0,1 N, água, NaOH 0,1 N e água e, finalmente, equilibrado com tampão fosfato de sódio e potássio 5mM pH 6,8, contendo Uréia 2M.

Amostras de globulinas liofilizadas foram dissolvidas no tampão de equilíbrio e dialisadas contra esse mesmo tampão por um período de aproximadamente 20 horas a 7°C. O dialisado foi então centrifugado a 1500 x G durante 5 minutos em centrífuga Janetzki T32c e o sobrenadante aplicado à coluna. A eluição das amostras foi feita com o tampão de equilíbrio, seguido de um gradiente linear de NaCl de 0 a 0,5M, preparado a partir do eluente inicial. Frações de 3,6 ml foram recolhidas a um fluxo de 30 ml/hora utilizando-se um coletor automático LKB.

2.2.6.2 - Cromatografia em coluna de SP-Sephadex C-50

Uma coluna de SP-Sephadex C-50 medindo 23,4 x 1,1cm foi montada segundo especificação pelo fabricante e equilibrada com tampão acetato 5 mM, pH 5,0, contendo Uréia 2M.

Amostras liofilizadas, depois de dissolvidas no tampão de equilíbrio foram aplicadas na coluna e eluídas com o mesmo tampão a um fluxo de 20 ml por hora. Após eluição das proteínas que não ficavam retidas na coluna, aplicou-se

um gradiente linear de NaCl de 0 a 1,0 M, preparado a partir do tampão de equilíbrio. Frações de 3,6 ml foram recolhidas utilizando-se um coletor automático LKB a um fluxo de 20ml/hora.

2.2.7 - Cromatografia em Coluna de Exclusão Molecular

Uma coluna de Sephadex G-100 foi montada de acordo com as instruções do fabricante. O gel foi embebido em água por 72 horas a temperatura ambiente com agitações ocasionais e, depois de desprezadas as partículas finas, deixado sedimentar livremente em uma coluna de vidro de 2,5cm de diâmetro até alcançar uma altura de 40cm, sendo em seguida equilibrado com tampão borato de sódio 0,01M, pH 10, contendo NaCl 1%. A determinação do volume de exclusão (V_0) foi feita usando-se azul de dextrana (20mg por 3ml) no mesmo tampão, contendo 10% de sacarose.

As amostras dissolvidas no tampão de equilíbrio, foram centrifugadas a 1500 x G e os sobrenadantes aplicados na coluna e eluídos com o mesmo tampão. Frações de 3,6ml foram recolhidas em um coletor automático LKB a um fluxo de 20ml/hora.

Os pesos moleculares das frações obtidas foram estimados recorrendo-se à fórmula de DETERMANN e MICHEL (1966):

$$\log M = 5,941 - 0,847 (V_e/V_0)$$

onde M: peso molecular

V_e : vol. de eluição

V_0 : vol. de exclusão

2.2.8 - Cromatografia de Afinidade

Uma coluna de 24,4 x 1,7cm foi montada de acordo com o procedimento de OCHOA & KRISTIANSEN (1978), modificado para o uso de hemácias humanas. Os estromas de hemácias do grupo AB(+), empregados como suporte da coluna, foram obtidos baseando-se na técnica de AVRAMEAS et al. (1977) e descrita a seguir.

Os eritrócitos foram inicialmente lavados 3 vezes com PBS e lisados com água destilada obedecendo a relação eritrócito : água 1:10 (v/v). Essa suspensão foi então centrifugada (16.000 x G por 20 min a 4°C, em centrífuga Sorval RC-5) e o precipitado lavado exaustivamente com uma solução hipotônica de NaCl 0,2%. Ao precipitado da última lavagem, o qual se apresentou pastoso, adicionou-se quantidade correspondente a 1:10 do seu volume, de tampão acetato 2M pH 5 e a seguir, glutaraldeído 2,5% na proporção 4:1 (precipitado + tampão acetato : glutaraldeído) e deixado em repouso por 3 horas a temperatura ambiente. O derivado insolúvel assim obtido foi então lavado exaustivamente por centrifugações sucessivas com PBS, incubado por toda a noite em congelador (-17°C) com tampão glicina-HCl 0,2M, pH 2,6, para neutralizar os grupos aldeídicos livres, e depois, lavado novamente por 3 vezes com PBS, e guardado no congelador.

O suporte da coluna foi preparado homogeneizando-se em "potter" a preparação obtida acima. O homogenato foi então misturado com Sephadex G-25 superfino na proporção 1:10 (proteína de estroma : Sephadex) e a mistura deixada sedimentar em coluna de vidro. Alcançando o volume desejado, a coluna foi lavada com PBS, seguida de água destilada e tampão glicina-HCl 0,2M pH 2,6, com pelo menos 4 vezes o volume da coluna para cada solução, e, no final, equilibrada com PBS. Esse ciclo de lavagem era repetido antes da aplicação das amostras, que foram dissolvidas no mesmo tampão de equilíbrio e eluídas seqüencialmente com PBS, água destilada e tampão glicina-HCl 0,2M

pH 2,6. Frações de 3,6 ml foram coletadas automaticamente a um fluxo de 24ml/hora. Após determinações de proteína e da atividade hemaglutinante, as diversas frações foram dialisadas, liofilizadas e armazenadas em congelador (-17°C) até uso posterior.

2.2.9 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e Beta-mercaptoetanol

Experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS foram realizados de acordo com o método desenvolvido por WEBER & OSBORN (1969).

Amostras liofilizadas de extrato total, globulinas e frações obtidas a partir de diferentes tratamentos cromatográficos foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,0, contendo 2% de SDS e 1% de beta-mercaptoetanol e incubadas a 100°C por 10 min. A seguir, foram adicionados a cada amostra azul de bromofenol 0,05% e sacarose para uma concentração final de 20% (p/v). Alíquotas de 20 a 50 µl das amostras encerrando cerca de 0,2 a 1mg foram aplicadas às colunas de gel e submetidas a uma corrente de 7 mA/coluna durante 4 horas. A localização das bandas de proteínas foi feita usando-se Coomassie Brilliant Blue a 0,005% em metanol: ácido acético: água (5:1:5) por cerca de 16 horas e o excesso de corante retirado com uma solução de ácido acético 7%.

As determinações de peso molecular foram feitas segundo XAVIER FILHO e MOREIRA (1978).

2.2.10 - Imunoeletroforese em Gel de Agarose

Os experimentos de imunoeletroforese foram feitos seguindo-se a técnica descrita por CLAUSEN (1969), utilizando

do-se agarose a 1% com azida sódica a 0,02% em tampão Veronal 0,075M pH 8,6, contendo lactato de cálcio 0,08%. Nestes experimentos foram usados placas do gel de agarose montadas em lâminas de microscópio, contendo dois poços, aos quais foram adicionados 7 μ l do antígeno, separados por uma canaleta central, que era preenchida por anti-soro depois da corrida eletroforética.

A eletroforese foi desenvolvida durante 3 horas com tensão constante de 7 volts/cm. Após a corrida o anti-soro foi posto na canaleta e deixado difundir. Estabelecidos os arcos de precipitação, o material solúvel foi removido por imersão das placas em solução salina 0,9% durante pelo menos 48 horas, seguida de lavagem com água destilada por 1 hora, após o que as placas foram postas para secar em estufa a 37°C. A revelação foi feita por coloração em Ponceau S 10% em ácido acético 2%, e o excesso de corante retirado com uma solução de ácido acético 7%, seguida de coloração com Verde Brilhante (0,1% em ácido acético 1M : acetato de sódio 0,1M : glicerol na proporção 4,5:4,5:1).

O anti-soro preparado segundo método descrito por OLIVEIRA (1980), foi usado na concentração de 50mg/ml em NaCl 0,15M.

2.2.11 - Espectro de Absorção

Os espectros de absorção das globulinas e das frações ativas da cromatografia de afinidade foram determinados em um espectrofotômetro Varian de duplo-feixe, usando-se cubetas de quartzo de 1cm de caminho ótico. As soluções foram preparadas dissolvendo-se as amostras liofilizadas em NaCl 0,15M. As determinações de proteínas das amostras foram feitas pelo método do micro biureto (BAILEY, 1967).

2.2.12 - Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante com Açúcares

Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples foram feitos adaptando-se o uso dos microdiluidores referidos anteriormente, como descrito a seguir.

As amostras foram diluídas da mesma maneira que no ensaio normal de atividade hemaglutinante em placas, descrito anteriormente. Em seguida, procedeu-se às diluições das soluções de açúcares nas placas contendo as amostras de proteínas, com orientação ortogonal à direção da seqüência das diluições dessas amostras, de modo que um grande número de combinações de valores discretos de diluições de proteínas e açúcares, variando de duas vezes a concentração inicial de cada um deles até diluições da ordem de 4.096 e 256 vezes para proteínas e açúcares, respectivamente, foram obtidas (CAVADA, 1980).

Depois de feitas as diluições das proteínas e das soluções de açúcares, as placas foram deixadas em repouso por uma hora, a temperatura de 25°C, para permitir a interação entre as lectinas e os açúcares. Em seguida, foram adicionados a cada poço 25 µl de uma suspensão a 2% de hemácias AB(+), e as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos, deixadas em repouso por mais 30 minutos a temperatura ambiente, e os títulos determinados visualmente.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Descrição da semente

As sementes de jaca mole apresentam um peso médio de 5,2g, sendo 97,1% de amêndoa, com um teor de umidade de até 85% da sua massa, e os restantes 2,9% compreendendo dois tegumentos, um externo, branco, preso frouxamente a um outro, de cor castanha, intimamente ligado à amêndoa.

Os dados referentes à composição mínima dessa semente são apresentados na tabela 2.

3.2 - Extração e Fracionamento por Diálise das Proteínas

O estudo das proteínas e das atividades hemaglutinantes da semente de jaca mole obedeceu ao esquema mostrado na figura 1, usando-se PBS como solução extratora. Dados relativos ao teor de proteína e a atividade hemaglutinante do extrato total e das frações albumina e globulina são apresentados na tabela 3.

A partir dos resultados obtidos, foi verificado que a fração globulínica representa apenas 10% do total de proteínas extraídas e detém uma percentagem muito pequena, 2,2%, de atividade hemaglutinante exibida pelo extrato total.

TABELA 2 - Composição mínima de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. var. mole determinada com base no peso seco e expressa em percentagem.

Constituintes	(%)
Umidade	até 85
Proteína bruta*	7,15
Lipídios	3,8
Glicídios**	87,75
Cinzas	3,3

* Nitrogênio total x 6,25

** Obtido por diferença

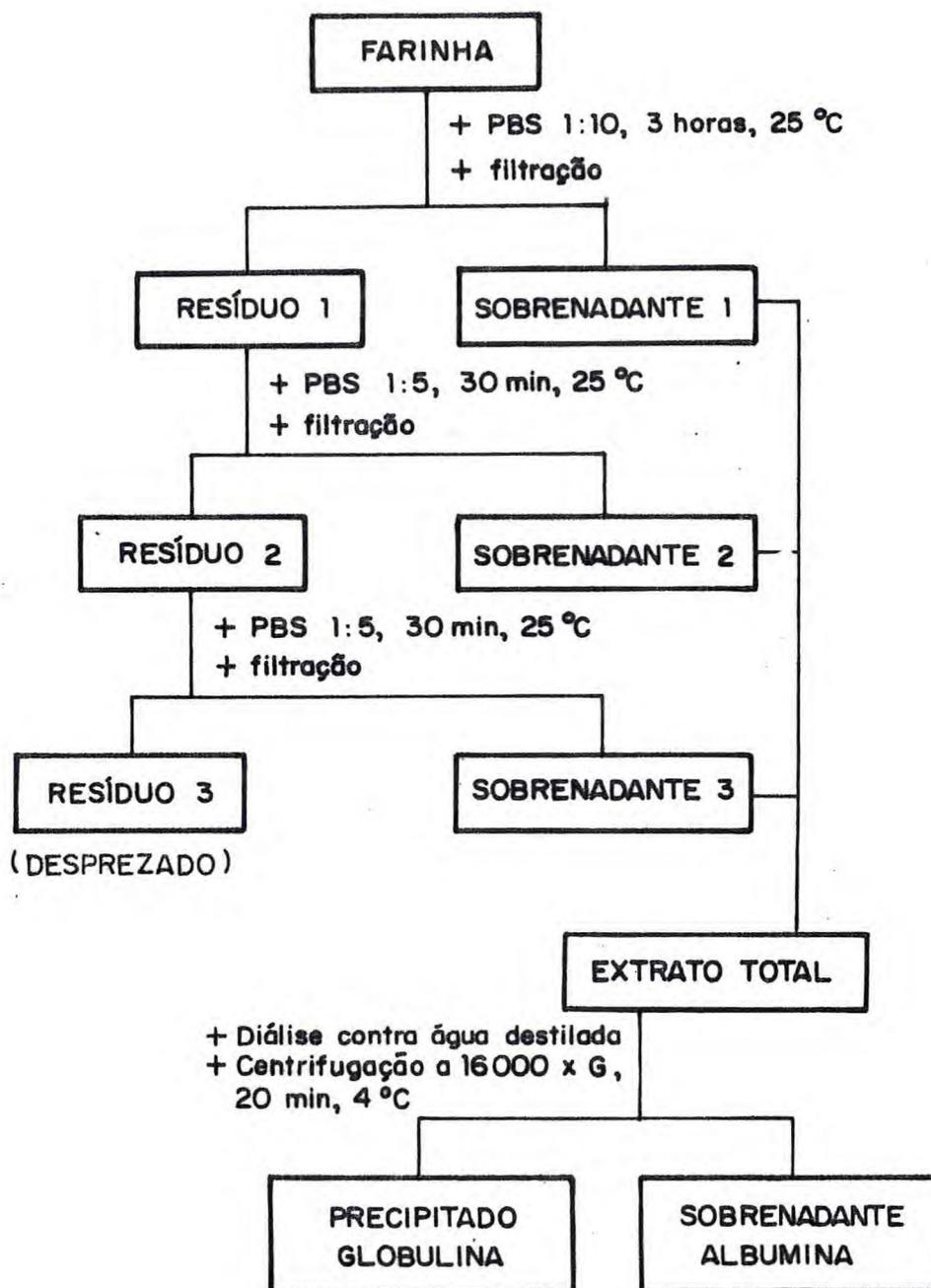


FIGURA 1 - Esquema geral de obtenção das globulinas de jaca mole a partir da farinha delipidada.

TABELA 3 - Teor de proteína e atividade hemaglutinante contra hemácias AB(+) de extrato total, albumina e globulinas de *Antocarpus integrifolia* L. var. mole, expressos em mg de proteína/g de farinha e unidade de de hemaglutinação/g de farinha.

	Proteína (mg/g) ($\bar{X} \pm \delta$)	Atividade Hemaglutinante (U.H./g) (10^3) ($\bar{X} \pm \delta$)
Extrato total	70,39 \pm 8,57	207,13 \pm 45,0
Albumina	36,77 \pm 7,90	90,74 \pm 9,57
Globulina	7,38 \pm 0,21	4,59 \pm 2,02

3.3 - Cromatografia das Globulinas em Coluna de CM-Celulose

A cromatografia das globulinas de jaca mole em CM-Celulose a pH 6,8 apresentou dois picos de proteínas, ambos dotados de atividade hemaglutinante (figura 2). O primeiro pico, correspondendo às proteínas eluídas com o tampão de partida, continha a maior parte da proteína aplicada e a sua atividade específica, quando medida do ponto que apresentou maior título de hemaglutinação, foi muito baixa (910 U.H./mg) quando comparada à do segundo pico (8982 U.H./mg). Este segundo pico, continha apenas 13,7% do total de proteína aplicada e foi eluído com uma concentração muito baixa de NaCl (0,05M).

Apesar de tornar possível a obtenção de um pico com atividade específica elevada, a cromatografia em CM-Celulose não se mostrou um método conveniente para o isolamento das lectinas da fração globulínica de jaca mole, uma vez que não foi capaz de separar satisfatoriamente as proteínas dotadas de atividade hemaglutinante. A presença de atividade no primeiro pico, associada ao baixo rendimento do segundo pico, foram as razões que tornaram o método pouco eficiente, principalmente para fins preparativos.

3.4 - Cromatografia das Globulinas em Coluna de Sephadex G-100

Os resultados obtidos quando globulinas de jaca mole foram submetidas a cromatografia em coluna de Sephadex G-100 (tampão borato pH 10, 0,01M/NaCl 1%) são mostrados na figura 3. Dos quatro picos obtidos, o de menor peso molecular (4.500 daltons), constituído provavelmente por pigmentos e/ou peptídios pequenos, foi o único que se apresentou completamente separado dos demais, que consistiam em três picos de proteínas de pesos moleculares de 97.300, 59.700 e 21.200 daltons.

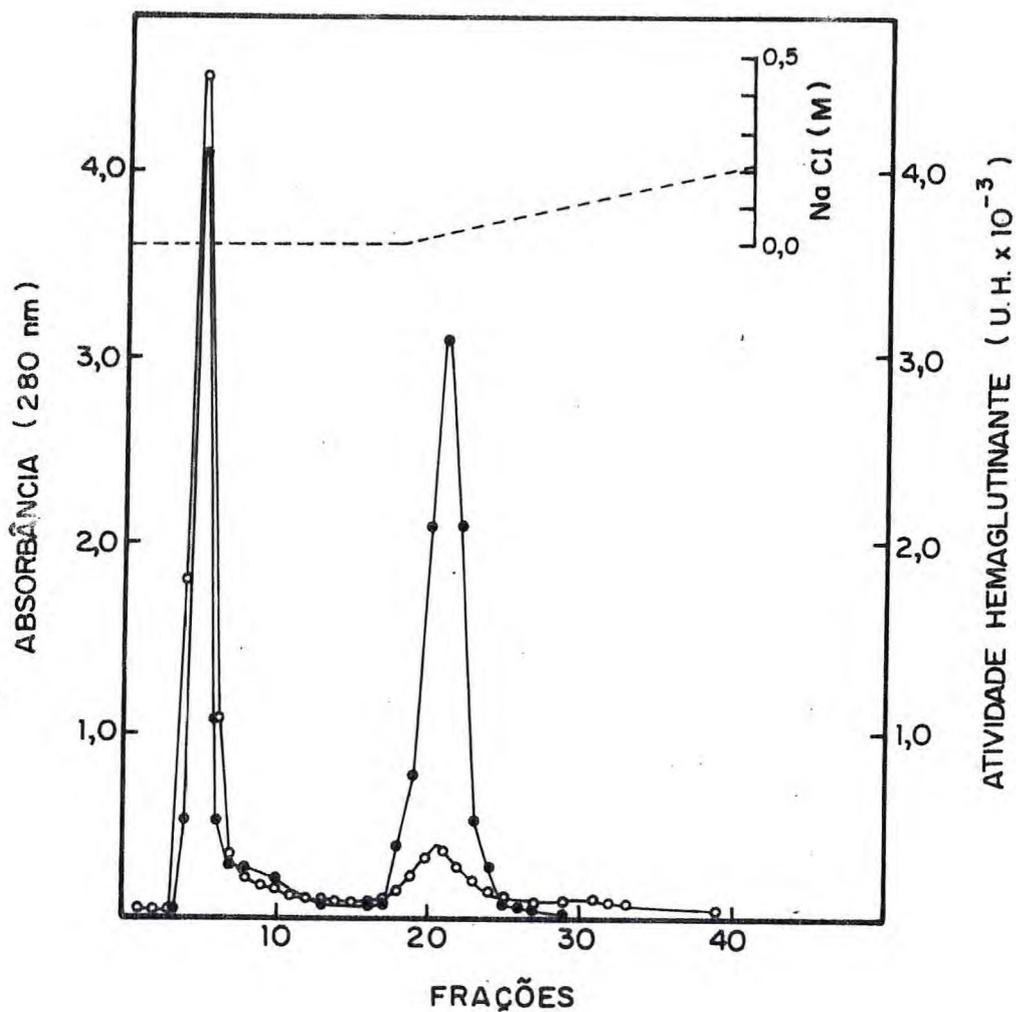


FIGURA 2 - Cromatografia em coluna de CM-Celulose das globulinas de jaca mole, Dimensões da coluna: 12cm x 1,3cm. Tampão de partida: tampão fosfato de sódio 5mM, pH 6,8, contendo Uréia 2M, seguido por gradiente de concentração de NaCl. Amostra: 40mg/4,0ml do tampão de partida. Fluxo: 30ml/hora. Frações: 3,6ml (○—○) A₂₈₀. (●—●) U.H.

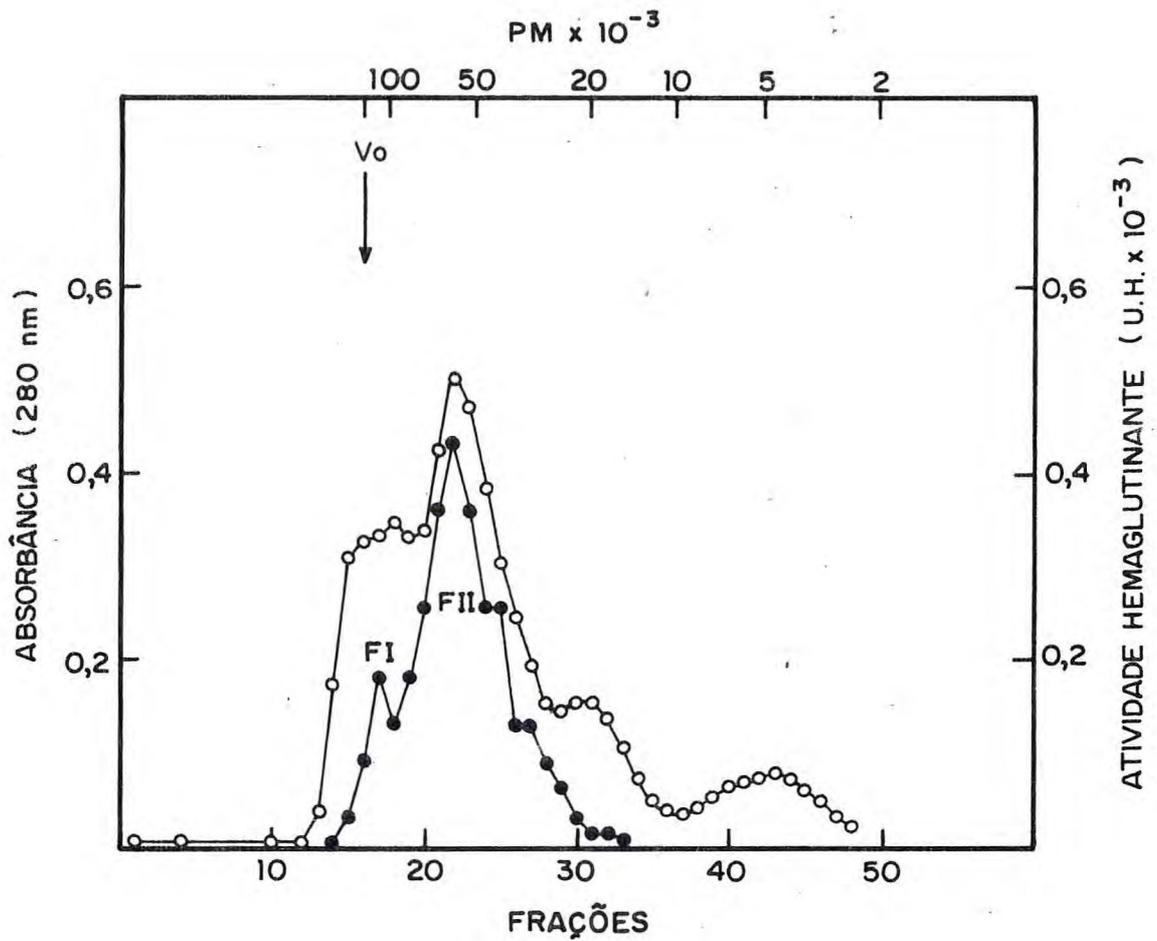


FIGURA 3 - Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 das globulinas de jaca mole. Dimensões da coluna: 40cm x 2,5cm. Tampão de equilíbrio: tampão borato de sódio 0,01M, pH 10, contendo NaCl 1%. Amostra: 41,5mg/2,5ml de tampão. Fluxo: 20ml/hora. Frações: 3,6ml. (o—o) A₂₈₀. (●—●) U.H.

A atividade hemaglutinante ficou concentrada nos dois picos de proteínas de pesos moleculares mais elevados, tendo se caracterizado pela formação de dois picos de atividade: o primeiro (FI), apresentando atividade relativamente baixa, situando-se na região correspondente ao pico de proteína de 97.000 daltons, e o segundo (FII), coincidindo com o pico de proteína de 59.700 daltons, que apresentou maiores valores tanto de atividade total como de atividade específica.

A cromatografia em Sephadex G-100 se revelou um método inadequado para o fracionamento das lectinas da fração globulínica de jaca mole, uma vez que a atividade hemaglutinante foi distribuída ao longo dos dois picos principais de proteínas, entre os quais não se observou uma separação eficiente.

3.5 - Cromatografia das Globulinas em Coluna de Afinidade

Diante dos resultados não satisfatórios obtidos com cromatografias em CM-Celulose e Sephadex G-100, como tentativas de se isolar as lectinas da fração globulínica de jaca mole, recorreu-se ao emprego de cromatografia de afinidade em coluna de estromas de hemácias humanas glutarizadas. Esta técnica tem sido usada com eficiência no isolamento de lectinas, pois se baseia na propriedade mais característica dessas proteínas: a sua capacidade de se ligarem a carboidratos presentes na membrana plasmática (OCHOA & KRISTIANSEN, 1978; OLIVEIRA, 1980).

A cromatografia de globulina de jaca mole nessa coluna, cuja eluição foi feita em três etapas, PBS, H₂O e tampão glicina-HCl 0,2M, pH 2,6, apresentava invariavelmente três frações protéicas (figuras 4 e 5). A primeira, eluída com PBS e chamada fração GI, era constituída por proteínas destituídas de atividade hemaglutinante. As duas outras frações, eluídas com água destilada e com o tampão glicina-HCl

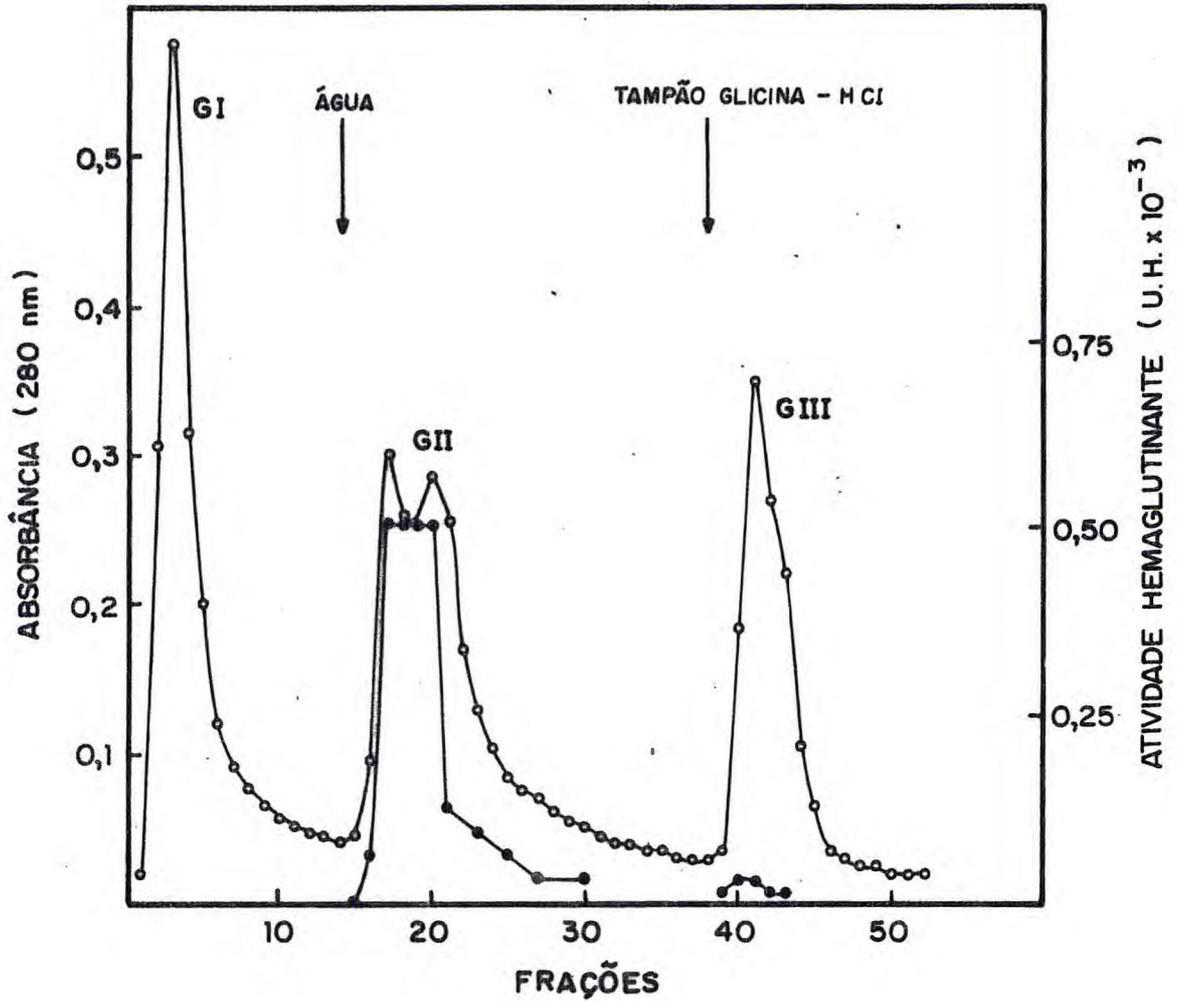
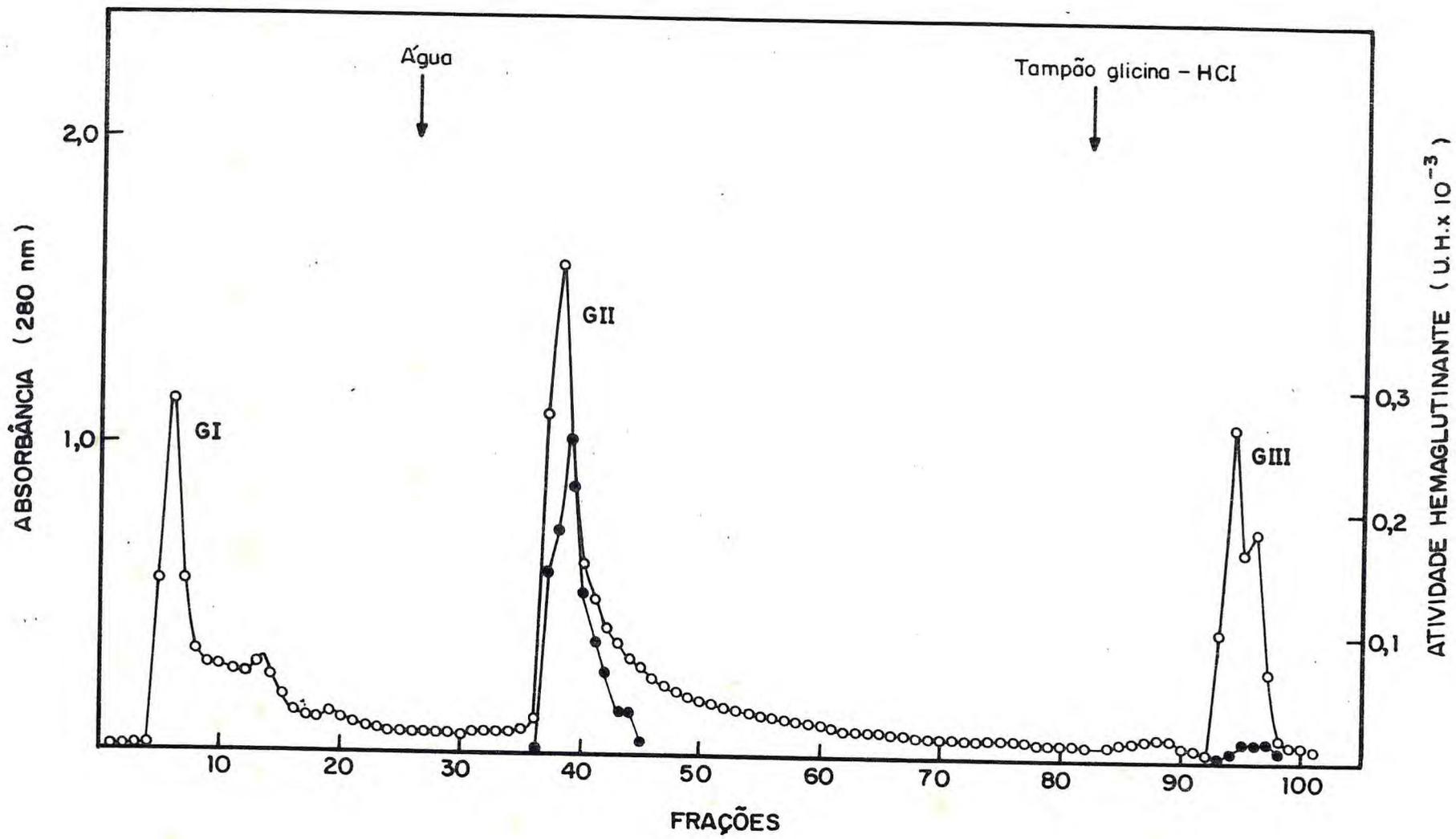


FIGURA 4 - Cromatografia analítica em coluna de afinidade preparada com estromas de hemácias humanas AB(+) das globulinas de jacá mole. Dimensões da coluna: 4,5cm x 1,9cm. Tampão de equilíbrio: PBS. Eluentes: PBS, água destilada e tampão glicina-HCl 0,2M, pH 2,6. Fluxo: 24ml/hora. Frações: 3,6ml. (o—o) A₂₈₀. (●—●) U.H.

FIGURA 5 - Cromatografia preparativa em coluna de afinidade preparada com estromas de hemácias humanas AB(+) das globulinas de jaca mole. Dimensões da coluna: 24,4cm x 1,7cm. Tampão de equilíbrio: PBS. Eluentes: PBS, água destilada e tampão glicina-HCl 0,2M, pH 2,6. Amostra: 130mg/4,3ml do tampão de equilíbrio. Fluxo: 24ml/hora. Frações: 3,6ml. (o—o) A_{280} . (●—●) U.H.



0,2M pH 2,6, constituíam proteínas que exibiam atividade hemaglutinante, observando-se uma recuperação de 98,3% da atividade aplicada. Estas frações eram presas na coluna por mecanismos provavelmente diferentes entre si e ainda não esclarecidos (OCHOA & KRISTIANSEN, 1978).

A fração eluída com água destilada, que foi denominada fração GII, em experimentos analíticos (figura 4), apresentava-se formada por dois picos de proteínas parcialmente superpostos. A atividade dessa fração era caracterizada por um platô abrangendo os dois picos de proteína. Por outro lado, quando quantidades maiores de globulinas eram aplicadas (cromatografias preparativas), figura 5, observa-se apenas um pico, assimétrico, tendo sua porção posterior deformada, apresentando-se como um declive pouco acentuado até atingir a linha de base. A atividade, neste caso, acompanhava o teor de proteína em toda a extensão do pico. A quantidade de proteína obtida desta maneira, bem como a atividade hemaglutinante, eram mais elevadas que as obtidas por eluição com tampão glicina-HCl 0,2M, pH 2,6.

A fração eluída com tampão glicina-HCl 0,2M, pH 2,6, denominada fração GIII, apresentava um pico assimétrico, com atividade hemaglutinante muito baixa, tanto em experimentos analíticos como preparativos.

3.6 - Cromatografia da Fração GII em Coluna de Sephadex G-100

Quando a fração GII foi submetida a cromatografia em Sephadex G-100 foram obtidos três picos de pesos moleculares de 67.500, 39.000 e 3.200 daltons (figura 6). A atividade hemaglutinante ficou concentrada no pico de 39.000 daltons, que contém 69,2% da área total.

O pico de 3.200 daltons, que não apresentou atividade de hemaglutinante, era provavelmente devido a presença na fração GII de peptídios ou glicopeptídios contaminantes, que foram eluídos juntamente com as lectinas dessa fração, com

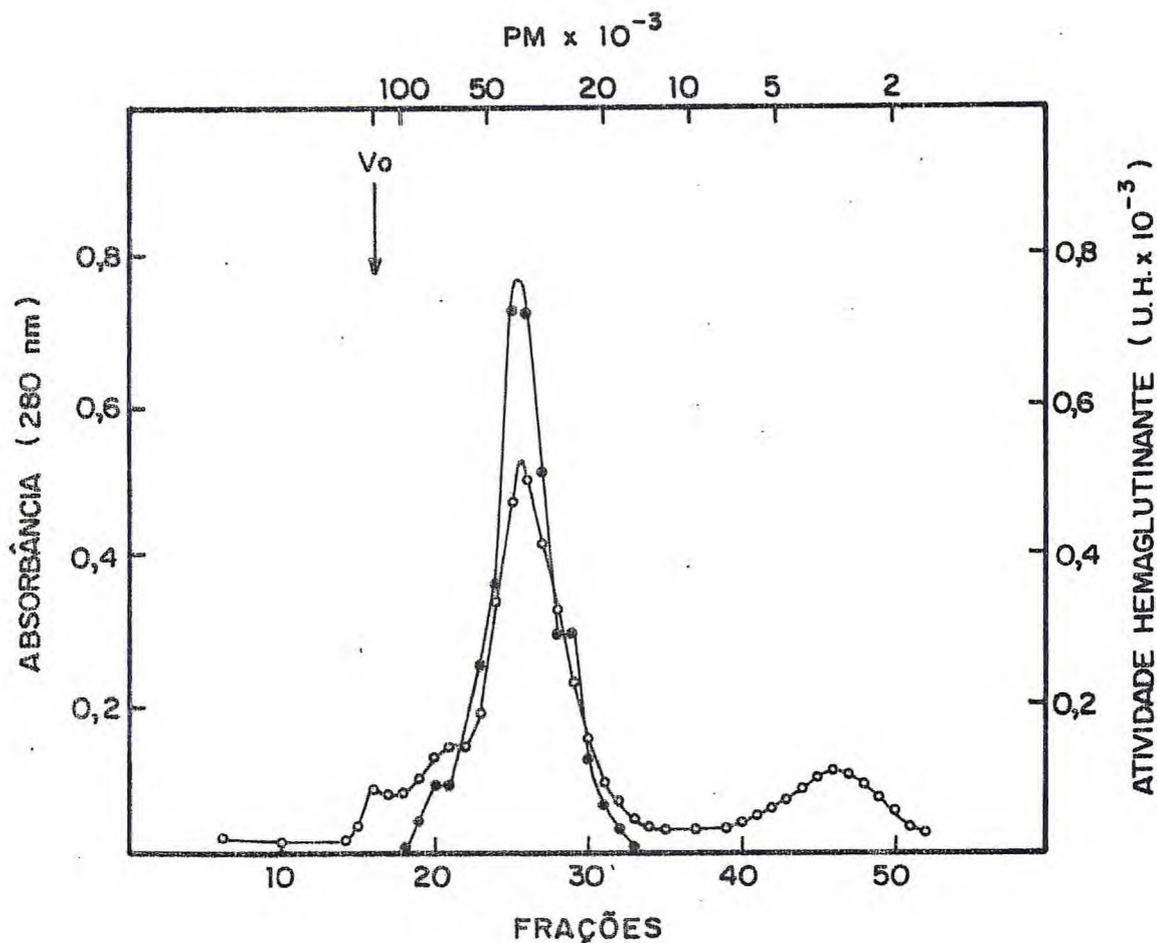


FIGURA 6 - Cromatografia em coluna de Sephadex G-100 da fração GII. Dimensões da coluna: 40cm x 2,5cm. Tampão de equilíbrio: tampão borato de sódio 0,01M, pH 10, contendo NaCl 1%. Amostra: 19,1mg/2,2ml de tampão. Fluxo: 20ml/hora. Frações: 3,6ml. (o—o) A₂₈₀. (●—●) U.H.

as quais interagem.

A partir destes resultados, podemos concluir que a cromatografia de globulinas de jaca mole em coluna de estromas de hemácias AB(+), apesar de isolar as proteínas dotadas de atividade hemaglutinante em frações que são retidas na coluna, não é suficiente para uma purificação completa dessas proteínas.

3.7 - Cromatografia da Fração GII em Coluna de SP-Sephadex C-50

A fração GII apresentou dois picos quando submetida a cromatografia em SP-Sephadex C-50, pH 5,0 (figura 7). Ambos os picos mostraram atividade hemaglutinante, tendo, no entanto, a fração 2SPSGII exibido atividade específica muito mais elevada do que a fração 1SPSGII.

A baixa atividade específica da fração 1SPSGII é provavelmente devida à presença de glicopeptídeos contaminantes na fração GII que, a julgar pela simetria do pico, se encontravam complexadas com as lectinas.

Os resultados mostrados aqui evidenciam a existência de duas lectinas na fração GII.

Tendo em vista os resultados obtidos por cromatografia e já descritos, sugere-se o esquema apresentado na figura 8, para a purificação das lectinas da fração globulínica de jaca mole.

3.8 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e Beta-mercaptoetanol

Um estudo comparativo dos padrões eletroforéticos de amostras de globulina e das frações GI, GII, GIII e 2SPSGII, tratados com beta-mercaptoetanol, em gel de poliacrilamida

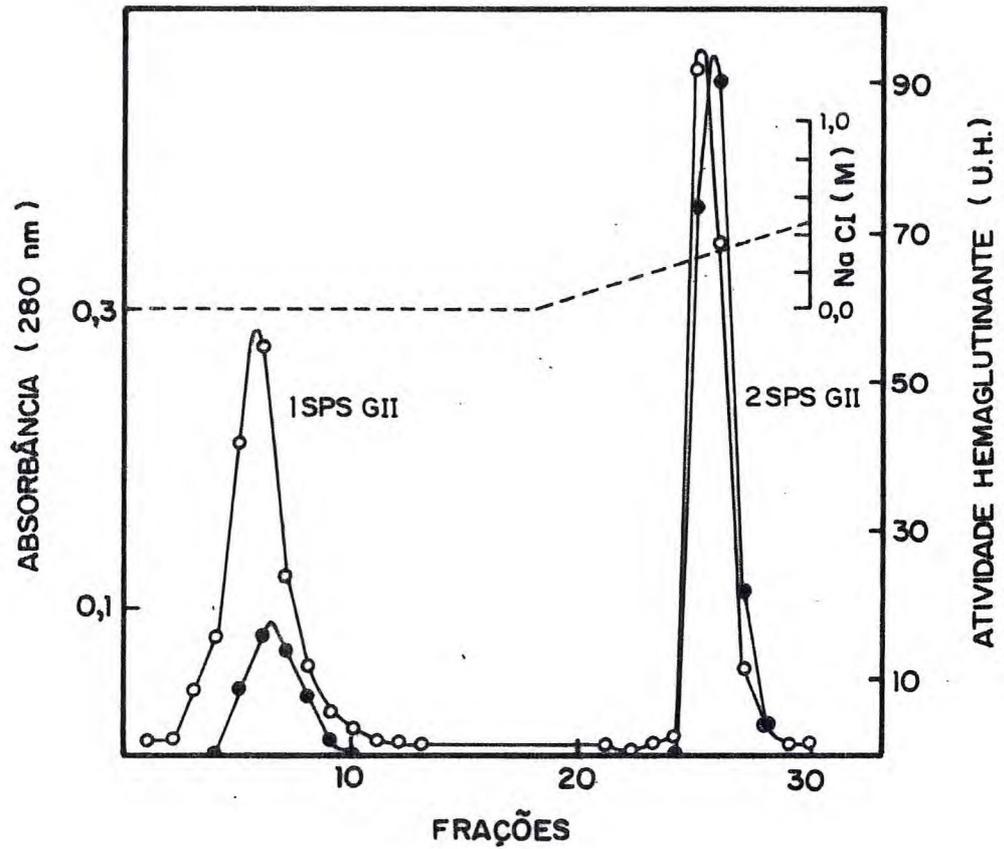


FIGURA 7 - Cromatografia em coluna de SP-Sephadex C-50 da fração GII. Dimensões da coluna: 23,4 x 1,1cm. Tampão de partida: tampão acetato 5mM, pH 5,0, contendo uréia 2M, seguido por gradiente de concentração de NaCl. Amostra: 9,8mg/0,5ml do tampão de partida. Fluxo: 20ml/hora. Frações: 3,6ml. (o—o) A_{280} . (●—●) U.H.

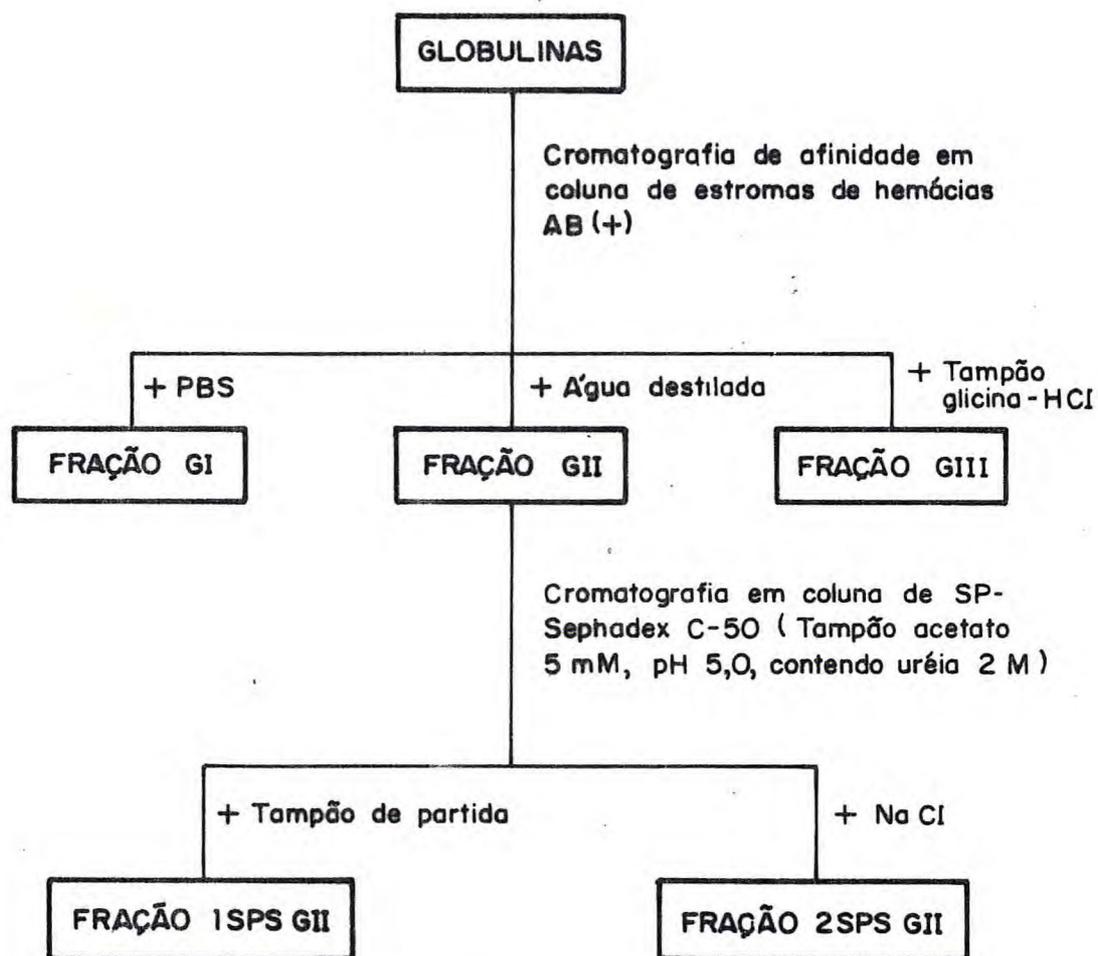


FIGURA 8 - Esquema geral das etapas de fracionamento das lectinas da fração globulínica de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. var. mole.

com SDS, permitiu a identificação de duas bandas de proteínas, de pesos moleculares de 11.000 e 16.000 daltons, comuns a todas as amostras dotadas de atividade hemaglutinante (figuras 9 e 10). Essas bandas se apresentavam nas diferentes frações em proporções ligeiramente diferentes, sendo os únicos componentes observados nas frações GII e 2SPSGII.

A identificação observada entre os padrões eletroforéticos de GII e 2SPSGII é uma indicação de que os contaminantes presentes na fração GII, como foi demonstrado através de cromatografia de exclusão molecular (item 3.6) e sugerido por cromatografia de troca iônica (item 3.7), além de apresentarem peso molecular baixo, existem em concentrações reduzidas, não sendo possível detectá-los em experimentos de eletroforese.

Os resultados apresentados aqui concordam com a observação de OLIVEIRA (1980) de que as diferentes lectinas presentes na fração globulínica de sementes de jaca mole são formadas por duas subunidades de baixo peso molecular e confirmam a hipótese de que essas proteínas constituem uma família de isolectinas. A ocorrência de isolectinas foi também demonstrada por MOREIRA e AINOUIZ (1981) na fração albumínica de jaca mole.

3.9 - Estudos de Especificidade

3.9.1 - Ensaio de Hemaglutinação contra Hemácias Humanas

Os resultados obtidos quando a atividade hemaglutinante de extrato total, globulina e frações GI, GII e GIII, a partir de amostras liofilizadas, foi determinada contra hemácias humanas do sistema ABO, com os fatores Rh positivo e negativo, são mostrados na tabela 4.

Comparando os dados de atividade específica obtidos com as diferentes frações protéicas observamos que todas

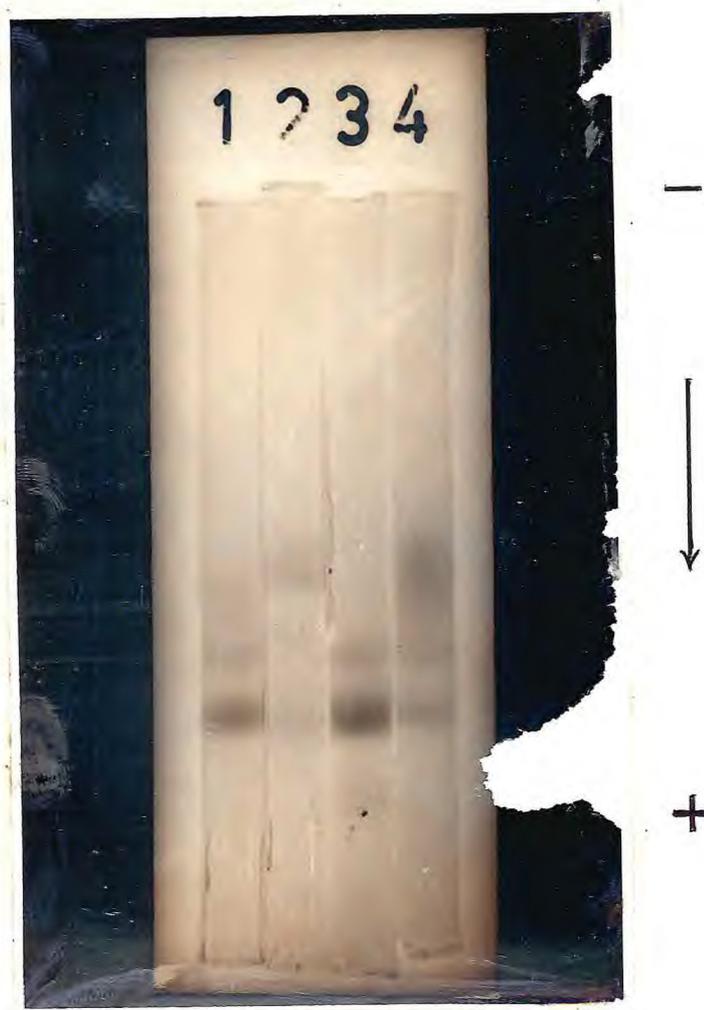


FIGURA 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das globulinas (1) e das frações GI(2), GII(3) e GIII(4), na presença de SDS e beta-mercaptoetanol.

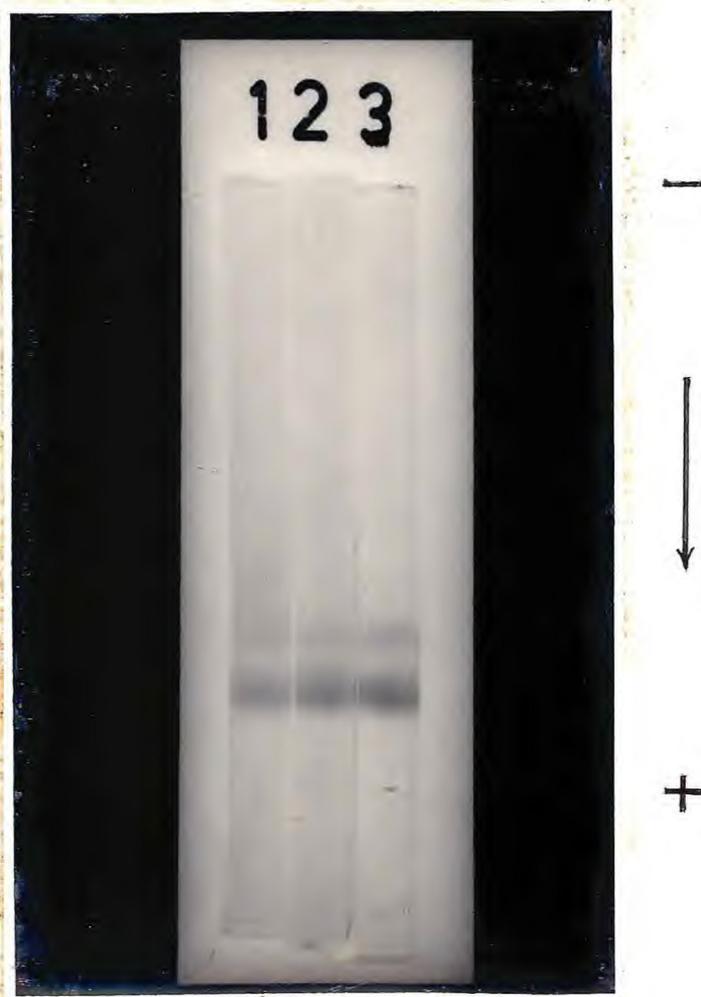


FIGURA 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das globulinas (1) e das frações GII (2) e 2SPSGII (3), na presença de SDS e beta-mercaptoetanol.

TABELA 4 - Atividades específicas (Unidades de Hemaglutinação/mg de proteína) de extrato total, globulina e frações GI, GII e GIII, contra hemácias humanas do sistema ABO

	Grupos Sanguíneos				
	A(+)	B(+)	AB(+)	O(+)	O(-)
Extrato total	90	326	64	85	107
Globulina	132	426	106	115	261
Fração GI	-	-	-	-	-
Fração GII	230	256	64	90	160
Fração GIII	128	181	85	90	399

mostraram títulos mais elevados contra o grupo B(+). Com relação aos demais grupos, todas as frações exibiram títulos de modo geral semelhantes, sendo as diferenças apresentadas, abaixo da sensibilidade do método. A fração GII, no entanto, apresentou uma atividade específica ligeiramente mais elevada que as demais frações, contra hemácias do grupo A(+), o mesmo ocorrendo com relação à fração GIII contra hemácias do grupo O(-).

3.9.2 - Ensaio de Hemaglutinação Contra Hemácias de Diferentes Animais

Os resultados dos ensaios de hemaglutinação de extrato total, globulina e frações GI, GII e GIII contra hemácias de rato, camundongo, pato, galinha e coelho são mostrados na tabela 5. O sangue de galinha foi o único contra o qual não se observou atividade em nenhuma das frações testadas. Dos tipos de sangue que exibiram atividade, o de coelho foi o que apresentou maiores títulos para todas as frações protéicas.

3.10 - Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante

O tratamento das frações GII e GIII contra 13 diferentes açúcares simples revelou serem as lectinas presentes nessas frações protéicas insensíveis à inibição por tais açúcares, mesmo quando a concentração de açúcar atinge valores da ordem de 500 a 1.000 vezes a de lectina.

A tabela 6 apresenta a relação dos açúcares empregados neste experimento, indicando a concentração máxima em que foram usados. As concentrações das frações GII e GIII foram de 0,44mg/ml e 0,76mg/ml, respectivamente.

TABELA 5 - Atividades específicas (Unidades de Hemaglutinação/mg de proteína) de extrato total, globulina e frações GI, GII e GIII, contra hemácias de diferentes animais

	Animais				
	Rato	Camundongo	Coelho	Pato	Galinha
Extrato total	144	34	232	21	-
Globulina	127	63,6	254	48	-
Fração GI	-	-	-	-	-
Fração GII	8	11	51	28	-
Fração GIII	32	32	247	18	-

TABELA 6 - Açúcares usados na tentativa de inibição das frações GII e GIII, nas concentrações máximas utilizadas.

Açúcares	Concentração (mg/ml)
Arabinose	300
Frutose	360
Fucose	328
Galactose	360
Glicosamina	358
Glicose	360
Maltose	684
Manose	360
Ramnose	328
Ribose	300
Sacarose	684
Xilose	300
N-Acetil-D-Glicosamina	442

3.11 - Imunoeletroforese

Os resultados dos experimentos de imunoeletroforese (contra anti-extrato total de *Artocarpus integrifolia* L. var. mole) das globulinas e frações GI, GII, GIII e 2SPSGII são apresentados nas figuras 11 e 12.

Comparando os padrões obtidos para as diferentes amostras ativas, verificamos uma semelhança entre o arco de precipitação formado com a fração 2SPSGII, presumivelmente pura, e o da própria fração GII (figura 11). Uma observação decorrente dessa comparação é o fato da fração GII não exibir outros arcos de precipitação que pudessem ser atribuídos à lectina presente na fração 1SPSGII nem aos contaminantes não ativos que foram encontrados por cromatografia de exclusão molecular (item 3.6). Uma provável explicação para esse fenômeno é, além do baixo peso molecular, a baixa concentração dos contaminantes não ativos e o fato de a lectina de 1SPSGII ser uma isolectina de 2SPSGII, com propriedades antigênicas semelhantes.

Com relação à fração GIII (figura 11), notamos pelo menos dois arcos de precipitação concêntricos. Se considerarmos a interpretação acima de que a atividade hemaglutinante é identificada através de um único arco de precipitação, admitindo que a atividade desta fração é devida a uma ou mais lectinas formadas pelas mesmas subunidades que as da fração GII, como foi demonstrado em experimentos de eletroforese, então o segundo arco de precipitação, provavelmente o que difundiu menos, é devido às glicoproteínas contaminantes sugeridas por OLIVEIRA (1980).

3.12 - Espectros de Absorção

Os resultados dos espectros de absorção na região do ultra-violeta das globulinas e das frações GII e GIII



FIGURA 11 - Imunoeletroforese em gel de agarose das globulinas (1) e frações GII (2) e 2SPSGII (3), com antisoro preparado contra extrato total de jacaranda mole.

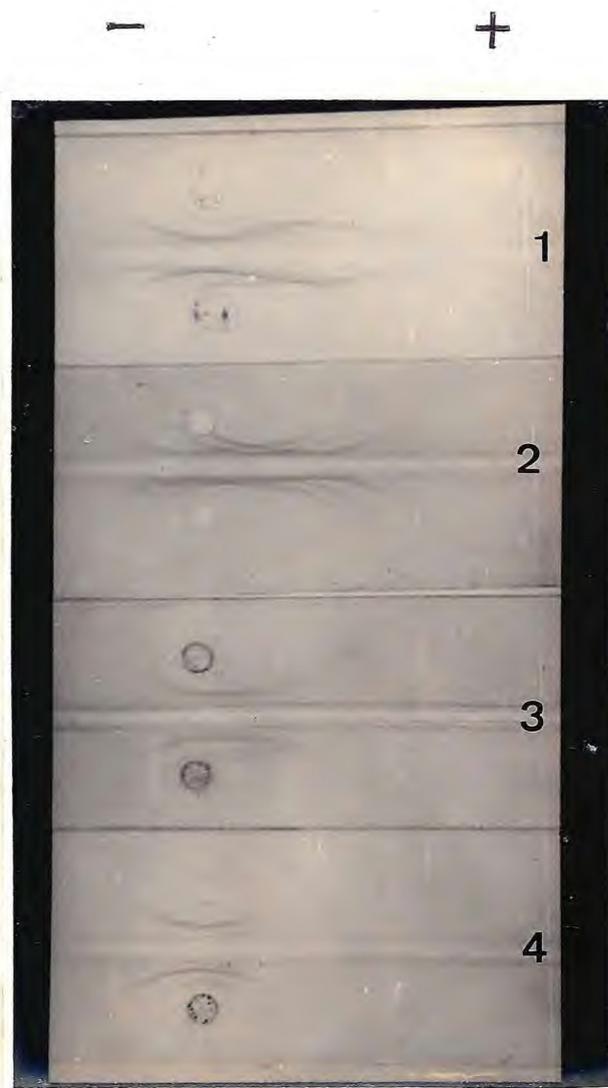


FIGURA 12 - Imunoeletroforese em gel de agarose das globulinas (1) e frações GI(2), GII(3) e GIII(4), com anti-soro preparado contra extrato total de jaca mole.

são mostrados na figura 13. Como se pode observar, as três frações exibiram maior intensidade de absorbância na faixa de comprimento de onda compreendida entre 276 e 278 nm.

Os valores de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ encontrados para as globulinas, fração GII e fração GIII foram de 17,9, 33,5 e 15,0, respectivamente.

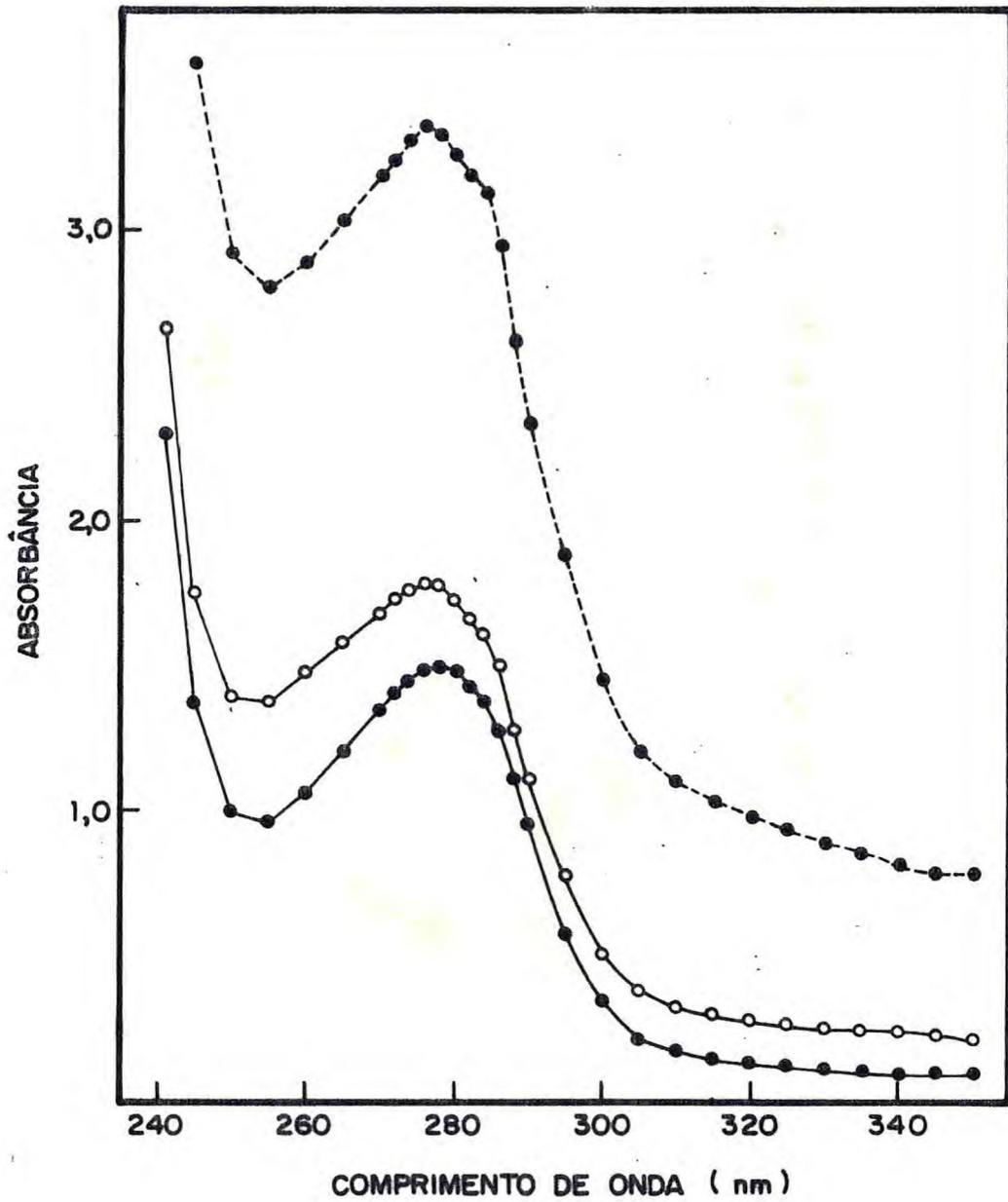


FIGURA 13 - Espectros de absorção da globulina de jaca mole (○—○) e das frações GII (●--●) e GIII (●—●), dissolvidas em NaCl 0,15M.

4 - CONCLUSÕES

- 1 - A cromatografia de afinidade em coluna de estromas de hemácias humanas AB(+) se revelou um método muito eficiente no isolamento das lectinas presentes na fração globulínica de jaca mole, pois além de separar as proteínas ativas das não ativas, foi capaz de promover o fracionamento das lectinas em duas frações (GII e GIII) que exibiram diferenças com relação à atividade hemaglutinante.
- 2 - As frações GII e GIII aglutinaram hemácias de todos os grupos sanguíneos humanos do sistema ABO, tendo as atividades específicas de GII contra o grupo A(+), e de GIII contra o grupo O(-), apresentando valores ligeiramente mais elevados do que com os demais grupos. Essas frações aglutinaram também hemácias de rato, camundongo, pato e coelho, mas foram incapazes de aglutinar hemácias de galinha.
- 3 - As frações GII e GIII não se mostraram sensíveis à inibição por 13 dos diferentes mono e dissacarídeos capazes de inibir outras lectinas.
- 4 - Foi detectada através de cromatografia de exclusão molecular, a presença na fração GII de peptídios ou glicopeptídios de baixo peso molecular, destituídos de atividade hemaglutinante.
- 5 - A fração GII contém pelo menos duas lectinas (1SPSGII e 2SPSGII) que podem ser separadas por cromatografia em SP-Sephadex C-50.
- 6 - A fração 2SPSGII se mostrou homogênea quando submetida

a imunoeletroforese em gel de agarose e eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e beta-mercaptoetanol.

- 7 - A identificação através de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e beta-mercaptoetanol, de duas subunidades comuns a todas as frações protéicas ativas, indica que as lectinas da fração globulínica de jaca mole constituem uma família de isolectinas.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, B.B.L. & GOLDSTEIN, J.J. (1967). Protein-carbohydrate interaction. VI. Isolation of concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels. Biochim. Biophys. Acta, 147:262-271.
- ALLEN, N.K. & BRILLIANTINE, L. (1969). A survey of hemagglutinins in various seeds. J. Immunol., 102:1295-99.
- ASHWILL, G. (1977). A functional role for lectins. Trends in Biochem. Sciences, 2(8):186.
- AVRAMEAS, S., GONATAS, N. & GUILBERT, B. (1977). Isolement, detection et mesure des glycanes extra et endo-cellulaires a l'aide de phytoagglutinines, in Methodologie de la structure et du metabolisme des glycoconjugues. Colloques Internationaux du CNRS, volume 1, n° 221, 20-27 juin, 1973. Edition du CNRS, 1974.
- BAILEY, J.L. (1967). Techniques in Protein Chemistry 2nd. Ed. New York, revised and expanded edition, Elsevier Publishing Co., 406pp.
- BESSLER, W. & GOLDSTEIN, I.J. (1973). Phytohemagglutinin purification: a general method involving affinity and gel chromatography. FEBS Letters, 34(1):58-61.
- BÉTAIL, G., COULET, M., GUILLOT, J. & SCANDARIATO, M. (1971). Emploi de colonnes d'hématies pour la purification de quelques agglutinines végétales. C. R. Soc. Biol., 169: 561-566.
- BHUVANESWARI, T.V., PUEPPKE, S.G. & BAUER, W.D. (1977). Role of lectins in plant - microorganism interactions. I. Binding of soybean lectin to Rhizobia. Plant Physiol., 60:486-491.

- BIDDLE, F., CRONIN, A.P. & SANDERS, F.K. (1970). The interaction between wheat germ agglutinin and receptors on normal and transformed cells and on erythrocytes. Cytobios, 5:9-17.
- BOLDT, D.H., SPECKART, S.F., RICHARDS, R.L. & ALVING, C.R. (1977). Interactions of plant lectins with glycolipids in liposomes. Biochem. Biophys. Res. Comm., 74(1):208-214.
- BOHLOOL, B.B. & SCHMIDT, E.L. (1974). Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. Science, 185(4147):269-271.
- BOLLINI, R. & CHIRSPEEL, M. (1978). Characterization and subcellular localization of vicilin and phytohemagglutinin, the two major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L. Planta, 142:291-298.
- BOYD, W. (1963). The lectins: their present status. Vox Sang, 8(1):1-32.
- CAVADA, B.S. (1980). Lectinas de *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolamento, caracterização parcial e comportamento durante a germinação. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. 87pp.
- CHIN, J.C. & SCOTT, K.J. (1979). Effect of phytolectins on isolated protoplasts from plants. Ann. Bot., 43:33-34.
- CLARKE, A.E. & KNOX, R.B. (1975). Localization of lectins in legume cotyledons. J. Cell Sci., 19(1):157.
- CLAUSEN, J. (1969). Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules, in T.S. WORK and E. WORK - Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. North-Holland Publishing Company - Amsterdam - London.
- DAZZO, F.B. & BRILL, W.J. (1978). Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium* clover symbiosis. Plant Physiol., 62:18-21.

- DETERMANN, H. & MICHEL, W. (1966). The correlation between molecular weight and elution behaviour in the gel chromatography of proteins. J. Chromatog., 25:303-313.
- DOWNING, H.J., KEMP, G.C.M. & DENBOROUGH, N.A. (1968). Plant agglutinins and mitosis. Nature, 217:654-655.
- DWYER, D.M. (1974). Lectin binding saccharides on a parasitic protozoan. Science, 184:471-473.
- ERSSON, B. (1977). A phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotalaria juncea*). II Purification by a high capacity biospecific affinity adsorbent and its physicochemical properties. Biochim. Biophys. Acta, 494:51-60.
- FELSTED, R.L., LEAVITT, R.D. & BACHUR, N.R. (1975). Purification of the phytohemagglutinin family of proteins from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) by affinity chromatography. Biochim. Biophys. Acta, 405:72-81.
- FROST, R.G., REITHERMAN, R.W., MILLER, A.L. & O'BRIEN, J.S. (1975). Purification of *Ulex europaeus* hemagglutinin I by affinity chromatography. Analytical Biochem., 69:170-179.
- GOLD, E.R. & BALDING, P. (1975). Receptor - specific proteins, plant and animal lectins. Excerpta Medica, Amsterdam, 440pp.
- HAMBLIN, J. & KENT, S.P. (1973). Possible role of phytohemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. Nature, 245(149):28-30.
- HOREJSI, V. & KOCOUREK, J. (1974). Studies on phytohemagglutinins. XVIII. Affinity eletrophoresis of phytohemagglutinins. Biochim. Biophys. Acta, 336:338-343.
- HOWARD, J., SHANNON L., OKI, L. & MURASHIGE, T. (1977). Soybean agglutinin. A mitogenic for soybean callus cells. Exp. cell Res. 107:448-450.
- IOACHIM, H.L. (1966). Effects of phytohemagglutinin *in vitro* on cells other than lymphocytes. Nature, 210:919-921.

- JAFFÉ, W.G. (1969). Hemagglutinins, in LIENER, I.E. ed. Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press, New York, 500pp.
- JAFFÉ, W.G., LEVY, A. & GONZÁLEZ, D.I. (1974). Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. Phytochemistry, 13:2685-2693.
- KAUSS, H. (1977). Plant lectins (phytohemagglutinins). Progress. in Botany, 38:58-70. ✕
- KOLODNY, R.L. & HIRSCHHORN, K. (1964). Properties of phytohemagglutinins. Nature, 201:715-716.
- LARKIN, P.J. (1977). Plant protoplast agglutination and membrane-bound β -lectins, J. Cell Science, 21:31.
- LARKIN, P.J. (1978). Plant protoplast agglutination by lectins. Plant Physiol., 61:626-629.
- LIENER, I.E. (1974). Phytohemagglutinins: Their nutritional significance. J. Agr. Food Chem., 22(1):17-22.
- LIENER, I.E. (1975). Antitryptic and other antinutritional factors in legumes. Offprints from Nutricional Improvement of Food Legumes by breeding. Edited by Dr. Max Milner - Published by John Wiley and Sons, 1976.
- LIENER, I.E. (1976a). Legume toxins in relation to protein digestibility - A review. J. Food Sci., 41:1076-1081.
- LIENER, I.E. (1976b). Phytohemagglutinins (phytolectins). Ann. Rev. Plant Physiol., 27:291-319.
- LIS, H., LOTAN, R. & SHARON, N. (1974). Synthesis and use of affinity chromatography columns for the purification of plant lectins., Ann. N.Y. Acad. Sci., 234:232-238.
- LIS, H. & SHARON, N. (1973). The biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinins). Ann. Rev. Biochem., 42: 541-574.
- LIS. H. & SHARON, N. (1981). Lectins in higher plants, in MARCUS, A. ed. The Biochemistry of Plants. A. Comprehensive Treatise. Academic Press, New York.

- MANEN, J.F. & MIEGE, M.N. (1977). Purification et caractérisation des lectines isolées des albumines et des globulines de *Phaseolus vulgaris*. Physiol. Veg., 15(1): 163-173.
- ✓ MOREIRA, R.A. (1975). Isolamento e caracterização de uma lectina de *Phaseolus vulgaris*. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 111pp.
- MOREIRA, R.A. (1982) - Comunicação pessoal.
- MOREIRA, R.A. & AINOZ, I.L. (1981). Lectins from seeds of Jack fruit (*Artocarpus integrifolia* L.): Isolation and purification of two isolectins from the albumin fraction. Biologia Plantarum, 23(3):186-192.
- MOREIRA, R.A. & PERRONE, J.C. (1977). Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol., 59:783-787.
- NORDBRING-HERTZ, B. & MATTIASSON, B. (1979). Action of a nematode-trapping fungus shows lectin-mediated host-microorganism interaction. Nature, 281:447-449.
- OCHOA, J.L. & KRISTIANSEN, T. (1978). Stroma: as an affinity adsorbent for non-inhibitable lectins. Febs Letters, 50(1):145-148.
- ✓ OLIVEIRA, J.T.A. (1980). Estudo comparativo das lectinas presentes em sementes de três representantes do gênero *Artocarpus*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. 106pp.
- PETERSON, E.A. & SOBER, H.S. (1962). Column chromatography of proteins: substituted celluloses, in COLLOWICK, S.P. ed., Methods in Enzymology. Academic Press, New York.
- PUEPPKE, S.G., BAUER, W.D., KEEGSTRA, K. & FERGUSON, A.L. (1978). Role of lectins in plant-microorganism interactions II. Distribution of soybean lectin in tissues of *Glicine max* (L.) Merr. Plant Physiol., 61: 779-784.

PUEPPKE, S.G. (1979). Distribution of lectins in the jumbo virginia and spanish varieties of the peanut, *Arachis hypogaea* L. Plant Physiol., 64:575-580.

PUSZTAI, A., CLARKE, E.M.W., GRANT, G. & KING, T.P. (1981). The toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. Nitrogen balance and immunochemical studies. J. Sci. Food Agric., 32:1037-1046.

PUSZTAI, A. & WATT, W.B. (1974). Isolectins of *Phaseolus vulgaris*. A comprehensive study of fractionation. Biochem. Biophys. Acta, 356:57-71.

REITHERMAN, R.W., ROSEN, R.D. & BARONDES, S.H. (1974). Lectin purification using formalinised erythrocytes as a general affinity adsorbant. Nature, 248:599-600.

ROUGE, M.P. (1974). Etude de la phytohémagglutinine des graines de lentille au cours de la germination et des premiers stages du développement de la plante. Evolution dans des cotylédons. C.R. Acad. Sc. Paris, 278:449-452.

ROUGE, M.P. & LASCOMBES, S. (1973). Isolemente et purification de la phytohémagglutinine des graines de fève (*Vicia faba* L.) par chromatographie d'affinité sur gel de dextran. Séance, 17:71-75.

SARKANY, I. & CARON, G.A. (1966). Effect of phytohemagglutinin on guinea-pig skin *in vivo*. Nature, 210(5031).105-106.

SHARON, N. (1977). Lectins. Scientific American, 236(6): 108-119.

SHARON, N. & LIS, H. (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins. Science, 117:949-959.

SHARON, N., LIS, H. & LOTAN, R. (1974). On the structural diversity of lectins, in Methodologie de la structure et de metabolisme des glicoconjugués. Colloques Internationaux du CNRS, N° 221, volume 1, 20-27 juin, 1973, Edition du CNRS.

SIMPSON, D.L.; THORNE, D.R. & LOH, H.H. (1978). Lectins: endogenous carbohydrate-binding proteins from vertebrate tissues: functional role in recognition processes? Life Science, 22:727-748.

SOUTHWORTH, D. (1975). Lectins stimulate pollen germination. Nature, 258(5536):600-602.

STOCKERT, R.J., MORELL, A.G. & SCHEINBERG, I.H. (1974). Mammalian hepatic lectin. Science, 186:365-366.

STOREY, R.D. & BEEVERS, L. (1978). A simple procedure for rapid separation of enzymes and lectin from other cellular metabolites. Plant Science Letters, 11:251-259.

TOMS, G.C. & WESTERN, A. (1971). Phytohaemagglutinins in Chemotaxonomy of the Leguminosae edited by J. B. Harborne, D. Boulter and B.L. Turner. Academic Press. London and New York. 367-462.

VOSS, E.W., Jr. FRYER, J.L. & BANOWETZ, G.M. (1978). Isolation, purification, and partial characterization of a lectin from Chinook salmon ova. Arch. Biochim. Biophys., 186(1):25-34.

VRETBLAD, P. (1976). Purification of lectins by biospecific affinity chromatography, Biochim. Biophys. Acta, 434:169-176.

WATSON, L. (1974). Con A differentiates among grass pollens by binding specifically to wall glycoproteins and carbohydrates. Nature, 249(5457):574-576.

WEBER, K. & OSBORN, M. (1969). The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244(16):4406-4412.

WOLPERT, J.S. & ALBERSHEIM, P. (1976). Host-Symbiont interactions. I. The lectins of legumes interact with the O-antigen-containing lipopolysacharides of their symbiont *Rhizobia*. Biochim. Biophys. Res. Comm., 70(3): 729-737.

WONG, P.O. (1980). Interactions between *Rhizobia* and lectins of lentil, pea, broad bean, and jackbean. Plant Physiol., 65:1049-1052.

XAVIER FILHO, J. & MOREIRA, R.A. (1978). Visualization of proteinase inhibitors in SDS-polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 84:296-303.

6 - COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS

LECTINAS PRESENTES EM SEMENTES DO GÊNERO ARTOCARPUS

R. Azevedo Moreira

J.T. Abreu de Oliveira

F.C.R. Costa e

I. Lima Ainouz

Universidade Federal do Ceará
Deptº de Bioquímica e Biologia
Molecular

Fortaleza - Ceará

Resumo:

O estudo das lectinas tem despertado grande interesse desde que estas proteínas parecem desempenhar importantes papéis na fisiologia da planta, desde a fixação de nitrogênio até a proteção da planta contra o ataque de fungos e insetos. Com a finalidade de se conhecer as semelhanças entre as lectinas de sementes do gênero Artocarpus, foi iniciado um estudo de extração, fracionamento e purificação de proteínas de sementes de Artocarpus integrifolia L. (jaca mole e jaca dura) e Artocarpus communis Forst (fruta pão).

Foram feitas extrações das proteínas das três sementes com tampão fosfato 0,025 M pH 7,4 contendo NaCl 0,88%, encontrando-se valores semelhantes para a concentração de proteínas, enquanto a atividade hemaglutinante se apresentou cerca de 3 vezes mais forte no extrato de jaca mole do que no das outras duas sementes. Os diversos extratos foram fracionados em albuminas e globulinas, notando-se que o teor de proteínas variava entre 40 e 50% nas albuminas e nas globulinas correspondiam de 7 a 10% das proteínas totais, enquanto a quase totalidade da atividade hemaglutinante se encontrava na fração albumínica. As albuminas foram ainda fracionadas por precipitação com sulfato de amônio, encontrando-se que o grosso das proteínas e da atividade precipitavam entre 20 e 60% de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Publicado no Livro de Resumos
2ª Reunião Nordestina de Botânica, 1978.

Supplement to:

PLANT PHYSIOLOGY

Wednesday Morning, August 1 Session 16 •

Abstract Only 323

HEMAGGLUTININATING ACTIVITY IN SEEDS OF *Artocarpus incisa* L.
J.T.A. Oliveira, F.C.R. Costa and R.A. Moreira
Dept. de Bioquímica e Biologia Molecular, Univ. Fed. do Ceará
Caixa Postal 1065, 60000 Fortaleza, Ceará, Brasil

Lectins are one of the most interesting group of proteins present in seeds. They seem to play important roles in plants, that span from carbohydrate accumulation up to helping in nitrogen fixation. In order to study the lectin structure conservation during evolution, as a way to measure the importance of these proteins to the plant, the lectins of *Artocarpus incisa* are being studied and compared with the lectins already isolated from *A. integrifolia* (Moreira, R.A. Plant Physiology, (1977) 59: 68).

Hemagglutinating activity was found in both albumin (562 UH/mg) and globulin (1646 UH/mg) fractions of *A. incisa*. When the albumins were fractionated with ammonium sulfate, almost all the activity was found in the fractions precipitated between 20 and 60% of saturation (1611 UH/mg).

Sephadex G-100 chromatography of the crude extract showed at least two peaks with hemagglutinating activity, which was unespecific when tested with human blood of the ABO system.

In polyacrylamide gel electrophoresis in presence of SDS it was found that all the active fractions presented bands with molecular weight of 11,250 and 15,000 daltons.

*Program and abstracts
of papers*

*for the Annual Meeting
of the*

American Society of

Plant Physiologists at

Ohio State University

Columbus, Ohio

July 30--Aug. 4, 1979

The American Society of Plant Physiologists will meet with the American Society for Horticultural Science at Ohio State University, Columbus, Ohio, July 30 to August 4, 1979.



ISOLAMENTO DE LECTINAS PRESENTES NA FRAÇÃO GLOBULÍNICA DE SEMENTES DE Artocarpus
integrifolia (JACA MOLE)

Francisco das Chagas Redouças da Costa

Renato de Azevêdo Moreira

Universidade Federal do Ceará - Dept^o de Bioquímica e Biologia Molecular

Cx. Postal 1065 - 60.000 - Fortaleza - CE.

RESUMO:

Lectinas são proteínas amplamente distribuídas no reino vegetal capazes de se ligar a carboidratos, desta característica decorrendo inúmeras propriedades biológicas de grande interesse prático para os diversos campos científicos como imunologia, fisiologia vegetal, Biologia molecular, etc. Apesar de existirem modelos que tentam explicar a interação das lectinas com carboidratos, este mecanismo, bem como o papel fisiológico desempenhado por essas proteínas nos organismos onde elas ocorrem, ainda não foi completamente elucidado devido ao fato de apenas um pequeno número de lectinas já ter sido obtido na forma pura, pois as propriedades químicas, físico-químicas e biológicas só são possíveis de ser determinadas se a proteína for isolada do meio onde ela se encontra.

Extratos totais obtidos quando farinha de sementes de jaca mole foi extraída com tampão fosfato 0.025 M pH 7.4 contendo NaCl 0.88% (PBS) foram fracionados por diálise e as globulinas obtidas submetidas a cromatografia de afinidade em coluna de estromas de hemácias humanas (AB+) glutarizados e misturados com Sephadex G-25 superfina, equilibrada com PBS. Por eluição com PBS, H₂O e tampão Glicina-HCl 0.2 M, pH 2.6, nesta ordem, foram obtidas três frações, duas das quais contendo atividade hemaglutinante, que foram então caracterizadas, juntamente com outras frações ativas, por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, na presença e ausência de Beta-mercaptoetanol. Das frações ativas foram determinadas ainda as atividades específicas contra hemácias do sangue humano e de diversos animais.

IV REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA

Mossoró (RN) setembro de 1980

Publicado no Livro de Resumos

ISOLECTINAS DE *Artocarpus integrifolia*. ESTUDOS FÍSICOQUÍMICOS E IMUNOQUÍMICOS

R.A.MOREIRA, J.T.A.OLIVEIRA e F.C.R.COSTA

Depto de Bioquímica e Biologia Molecular, UFCe, Cx.Postal 1065, Fortaleza, Ceará.

Algumas propriedades físicoquímicas e imunoquímicas das lectinas de origem albumínica e globulínica, extraídas de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. var. mole, foram investigadas, já que se acredita que embora diferentes em alguns aspectos, como proteínas integras, essas lectinas são formadas pelas mesmas subunidades que se associam em proporções diferentes dando assim origem a isolectinas.

Quando foi feito o isolamento em coluna de afinidade (estromas humanos) foi encontrado apenas um pico com atividade hemaglutinante (AII) para as albuminas, enquanto para as globulinas foram encontrados dois picos ativos (GII e GIII) eluídos com diferentes soluções de eluição.

Eletroforese em gel de poliácridamida com SDS, em presença e ausência de betamercaptoetanol, das diversas frações ativas indicaram a presença dos mesmos grupos de subunidades apresentando os mesmos pesos moleculares, independente da origem das lectinas, embora em GIII se apresente um grupo a mais, bastante difuso, sobrepondo-se àquelas bandas bem definidas, também encontradas em AII e GII.

Ensaio imunoquímico em gel de agarose (imuno-eletroforese simples e rocket imuno-eletroforese) revelaram também semelhanças entre essas frações ativas onde foram encontradas bandas com identidade antigênica e mesma mobilidade eletroforética, indicando a presença dos mesmos determinantes em todas essas frações.

Foram ainda determinados os espectros de absorção das frações estudadas, bem como das albuminas e globulinas que lhe deram origem, tendo sido encontradas semelhanças pronunciadas entre as mesmas.

Dos dados apresentados pode-se concluir pela existência em *A. integrifolia* de diferentes lectinas compostas pelas mesmas subunidades, confirmando assim a existência de uma família de isolectinas nessas sementes.

Auxílios financeiros: UFC, FINEP, CNPq

Apresentado à III Reunião Regional da PAABs - Cone Sul e
X Reunião Anual da SBBq.