

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA
LECTINA DE SEMENTES DE *Canavalia aff. boliviana*
E CLONAGEM DE SEU GENE**

Hélio Cabral Lima

FORTALEZA-2000

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA
LECTINA DE SEMENTE DE *Canavalia aff. boliviana*
E CLONAGEM DE SEU GENE**

Hélio Cabral Lima

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM AGRONOMIA/FITOTECNIA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM AGRONOMIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA

2000

L698p **Lima, Hélio Cabral**

Purificação e Caracterização Parcial de uma Lectina de Sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* e Clonagem de seu Gene/Hélio Cabral Lima – Fortaleza, 2000

111p.: il

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará – Departamento de Fitotecnia.

1. Lectinas; 2. *Canavalia*; 3. Sequência Primária; 4. Clonagem

CDD 632

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA
LECTINA DE SEMENTES DE *Canavalia aff. boliviana* E
CLONAGEM DE SEU GENE**

Hélio Cabral Lima

TESE APROVADA EM 03/11/2000.

Prof. Dr. Abdllatif Kameledine Benbadis
Departamento de Fitotecnia – UFC
Orientador da Tese

Prof. Dr. Bênildo Sousa Cavada
Departamento de Bioquímica e
Biologia Molecular - UFC

Prof. Dra. Cláudia Ferreira Santos
Departamento de Ciências
Fisiológicas – UECE

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Departamento de Biologia - UFC

Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior
Departamento de Genética - UFPE

A Deus,

À minha Vó Maria Diro (*in memorium*)

Aos meus pais José e Josefa,

Ao meu filho Lucas,

Aos meus irmãos, Clara Edna, Gustavo e Eliane,

e de forma especial ao Prof. Dr. Benildo S. Cavada meu eterno
Orientador,

dedico.

AGRADECIMENTOS

De maneira especial a Professor Dr. Abdelatif Benbadis por aceitar trabalhar comigo, pela sua amizade e pela sua incansável maneira de se dedicar a ciência como uma verdadeira profissão, fato que me causou tremenda impressão.

De modo especial ao Professor Dr. Benildo Sousa Cavada do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC pelo interesse constante e dedicação com que me orientou, desde o dia em que nos conhecemos, bem como, pela amizade e oportunidade que me proporcionou para crescer profissionalmente.

Ao Professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro do Departamento de Biologia da UFC pela co-orientação, seu empenho à pesquisa e amizade demonstrados durante o período que trabalhamos juntos.

Ao Dr. Juan Calvete, do Instituto de Biomedicina de Valência (Espanha) pela determinação da sequência total da proteína purificada, bem como pelo convívio científico e nos churrasquitos com seu bom humor.

De modo muito especial à Professora Ms. Maria Aparecida Alves do Departamento de Biologia da UFC pelo acolhimento em seu laboratório, amizade e sua dedicação à pesquisa e a Ana Maria Bitencourt amiga de todas as horas.

Aos Professores Edson de Paula Nunes e Dr. Afrânio Gomes Fernandes do Departamento de Biologia da UFC pela determinação taxonômica da espécie aqui estudada.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular José Tadeu Abreu de Oliveira, Ana Lúcia Ponte Freitas, Joaquim Albenísio Gomes da Silveira e ao Dr. Márcio Viana Ramos pelas ajudas constantes e seus empenhos à pesquisa.

Aos Professores do Departamento de Agronomia/Fitocnia Raimundo Pontes, Fanuel, Berilo, Willian, Joaquim Enéas e Romildo por tudo que aprendi e pelas experiências passadas.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Genética Molecular, Delano, Alex, João Paulo, Rodrigo, Péricles, Juliana, Vânia, Fabiano (importantíssimo), Víví, Mário.

Aos colegas do BiolMol-Lab Kátia, Lia, Mazé, Vanesca, Flávia, Fernanda, Creuza, Bia, Marcelo, Carlinhos, Yusef, e Iza.

Aos colegas de curso Luiz Antônio, Silveira, Zenáide, Kátia, Eleonora, Timbó, Oscar, Jair, Geraldo e Sérgio Horta.

À colega Joseana Saraiva pelo incentivo e amizade dedicados.

Ao meu filho Lucas e a minha namorada Ana Wylma Saraiva pelo apoio, estímulo e paciência dedicados durante todo o período em que estive ausente.

A todos os meus amigos e parentes, que sempre estiveram presentes.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Pós-graduação concedida a autora através de convênio com o curso de Pós-graduação em Bioquímica, e por auxílios de pesquisa aos grupos de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Biologia, ao BioMol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências e ao Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de convênio com o curso de Pós-graduação em Bioquímica e por auxílios de aos grupos de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Biologia, ao BioMol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências e ao Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Ceará (FUNCAP), através de convênios aos grupos de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Biologia, ao BioMol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências e ao Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), através de convênio com aos grupos de Citogenética e Biologia Molecular do Departamento de Biologia, ao BioMol-Lab do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Departamentos de Biologia, de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências e de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foi executado esse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de lectinas. Merolectinas, hhololectinas, quimerolectinas e superlectinas segundo Peumans & Van Damme (1995).....	21
Figura 2 – Esquema de processamento da ConA proposto para as demais lectinas de Diocleinae com características similares (Van Damme & Peumans, 1996).....	36
Figura 3 – Cromatografia de afinidade em Sephadex G-50 de <i>Canavalia aff. boliviana</i>	71
Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% em condições desnaturantes da amostra da lectina de <i>Canavalia aff. boliviana</i> purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50.....	73
Figura 5 – Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony utilizando-se IgG de coelho anti-lectina de ConBr.....	77
Figura 6 – Representação esquemática da cadeia α e dos fragmentos β e γ da lectina de <i>Canavalia aff. boliviana</i>	79
Figura 7 – Alinhamento da sequencia primária da lectina de sementes de <i>Canavalia aff. boliviana</i> com a lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr) e com outras lectinas de outras espécies da sub-tribo Diocleinae.....	81
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% de DNA genômico de <i>Ca-</i>	

<i>navalia aff. boliviana</i>	82
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% do gene de <i>Canavalia aff. boliviana</i>	83
Figura 10 – Amplificação do gene <i>conbol</i> por PCR a partir de preparações analíticas de plasmídeos de colônias recombinantes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α -pUC18- <i>conbol</i>	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Procedimento para preparação do gel de poliacrilamida.....	54
Quadro 2 – Protocolo de PCR utilizada na amplificação do fragmento correspondente ao gene <i>conbol</i>	60
Quadro 3 – Esquema dos ciclos de amplificação do fragmento correspondente ao gene <i>conbol</i>	61
Quadro 4 – Reação de Ligação.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lectinas isoladas de espécies da subtribo Diocleinae.....	30
Tabela 2 – Propriedades Química e Físico-Químicas de algumas lectinas da subtribo Diocleinae.....	33
Tabela 3 – Exemplos de lectinas de sementes de espécies da sub-família Papilionodeae (Leguminosae) já sequenciaadas.....	43
Tabela 4 – Especificidade eritrocitária de extratos de sementes maduras de <i>Canavalia</i> aff. <i>boliviana</i> Piper.....	68
Tabela 5 – Especificidade da lectina de <i>Canavalia</i> aff. <i>boliviana</i> por açúcares simples.....	69
Tabela 6 – Composição de aminoácidos da lectina de <i>Canavalia</i> aff. <i>boliviana</i> e de outras lectinas de espécies a subtribo Diocleinae.....	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

$\Delta G'$	- Variação de energia livre padrão
Ala	- Alanina
Arg	- Arginina
Asn	- Asparagina
Asp	- Ácido aspártico
Asx	- Ácido aspártico + Asparagina
BSA	- Albumina Sérica Bovina
<i>C.e.</i>	- Lectina de sementes de <i>Canavalia ensiformis</i>
<i>C.f.</i>	- (= CFL) Lectina de sementes de <i>Cratylia floribunda</i>
<i>C.bol.</i>	- Lectina de sementes de <i>Canavalia aff. boliviana</i>
<i>C.m.</i>	- Lectina de sementes de <i>Canavalia maritima</i>
Con A	- Concanavalina A, lectina de sementes de <i>Canavalia ensiformis</i>
<i>C.r. Lac</i>	- Lectina lactose-específica de sementes de <i>Cymbosema roseum</i>
<i>C.r. Man</i>	- Lectina manose-específica de sementes de <i>Cymbosema roseum</i>
Con Br	- Lectina de sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i>
<i>D.l. I</i>	- Lectina I de sementes de <i>Dioclea lehmanni</i>
<i>D.l. II</i>	- Lectina II de sementes de <i>Dioclea lehmanni</i>
Dgui	- Lectina I de sementes de <i>Dioclea guianensis</i>
Dvir	- Lectina I de sementes de <i>Dioclea virgata</i>
$E_{(1\%, 1\text{cm})}$	- Coeficiente de extinção molar
ESI	- Electro Spray Ionization
Glu	- Ácido glutâmico
Glx	- Ácido glutâmico + Glutamina
Gly	- Glicina
His	- Histidina
i.p.	- intraperitoneal
IgA	- Imunoglobulina A

IgG	- Imunoglobulina G
Ile	- Isoleucina
kDa	- quilodalton
Leu	- Leucina
Met	- Metionina
N.I.	- Não inibiu
PAGE-SDS	- Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
PHA	- Fitohemaglutinina, lectina de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
Phe	- Fenilalanina
Pro	- Prolina
PSA	- lectina de ervilha (<i>Pisum sativum</i>)
q.s.p.	- Quantidade suficiente para
RL	- Rice lectin, lectina do arroz (<i>Oryza sativa</i>)
S.A.	- Sem atividade hemaglutinante
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
Ser	- Serina
Thr	- Treonina
Tris	- Tris(hidroximetil) - aminometano
Tyr	- Tirosina
UDA	- Lectina de <i>Urtica dioica</i>
UH	- Unidade de Hemaglutinação. Definida como o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2 %.
Val	- Valina
WGA	- Wheat germ agglutinin, lectina do gérmen de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
1.1. Considerações Gerais.....	20
1.2 Detecção e Purificação.....	23
1.3. Caracterização Bioquímica.....	25
1.4. Estudos Moleculares.....	26
1.5. Lectinas da subtribo Diocleinae.....	28
1.6. Características Químicas, Físico-Químicas e Bioquímicas das Lectinas de Diocleinae.....	31
1.6.1. Propriedades Gerais.....	31
1.6.2. Aglutinação de células eritrocitárias.....	37
1.6.3. A Especificidade por Carboidratos.....	38
1.6.4. Estudos Estruturais.....	41
1.6.5. Relações Evolucionárias entre Lectinas de Diocleinae e outras Lectinas.....	42
2 – OBJETIVOS	46
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1. Preparação de Farinhas.....	47
3.2. Extração de proteínas a diferentes valores de pH.....	47
3.3. Dosagem de proteínas solúveis.....	47

3.4. Determinação da atividade hemaglutinante.....	48
3.5. Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante da lectina de semente de <i>Canavalia aff boliviana</i> por açúcares.....	49
3.6. Preparação de IgG de coelho contra lectina de semente de <i>Canavalia aff boliviana</i>	50
3.7. Isolamento de IgG de antissoro de coelho imunizado com lectina de <i>Canavalia aff boliviana</i>	51
3.8. Imunodifusão.....	51
3.9. Isolamento das lectinas de semente de <i>Canavalia aff boliviana</i>	52
3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol.....	53
3.11. Determinação da Massa Molecular por Espectroscopia de Massa.....	55
3.12. Degradações proteolíticas.....	55
3.13. Isolamento dos Peptídeos.....	56
3.14. Análise de Aminoácidos.....	56
3.15. Sequenciamento de Aminoácidos.....	56
3.16. Isolamento de DNA.....	57
3.17. Eletroforese de DNA em gel de agarose a pH neutro.....	58
3.18. Amplificação do gene da <i>Canavalia aff. boliviana</i> por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR).....	59
3.19. Clonagem do gene da lectina de <i>Canavalia aff. boliviana</i>	62
3.19.1. Ligação do produto da PCR ao vetor.....	62

3.19.2. Preparo de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	64
3.19.3. Transformação de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	64
3.19.4. Seleção de clones recombinantes.....	65
4 – RESULTADOS	67
4.1. Levantamento da atividade hemaglutinante em diferentes extratos protéicos de farinha de semente de <i>Canavalia aff. boliviana</i>	67
4.2. Inibição da atividade hemaglutinante de extrato de farinha de sementes de <i>Canavalia aff. boliviana</i>	67
4.3. Isolamento da lectina de farinha de sementes de <i>Canavalia aff. boliviana</i> por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50.....	70
4.4. Perfil eletroforético (eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e de 2-mercaptoetanol) da lectina de farinha de sementes de <i>Canavalia aff. boliviana</i>	72
4.5. Características da lectina de farinha de <i>Canavalia aff. boliviana</i>	74
4.5.1. Análises de aminoácidos.....	74
4.5.2. Peso molecular por espectrometria de massa.....	74
4.5.3. Estudos imunoquímicos.....	76
4.5.4. Sequência primária da lectina de farinha de sementes de <i>Canavalia aff. boliviana</i>	76
4.6. Homologia da sequencia da lectina de farinha de sementes de <i>Canavalia aff. boliviana</i> com a sequencia de outras lectinas da sub-tribo Diocleinae.....	80

4.7. Clonagem do gene da lectina de farinha de semente de <i>Canavalia aff. boliviana</i>	80
5 – DISCUSSÃO.....	86
6 – RESUMO DOS RESULTADOS.....	91
7- CONCLUSÃO.....	93
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

RESUMO

Canavalia aff. *boliviana* é uma leguminosa (Leguminosae, sub-família Papilionideae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae) endêmica da Amazônia, no médio Rio Negro, que tem mostrado todas as características de se constituir uma nova espécie. Os experimentos demonstraram que suas sementes contém uma lectina glicose/manose específica que pode ser facilmente purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. Apresentou um padrão eletroforético típico de lectinas de sementes de espécies da subtribo Diocleinae, caracterizado por três bandas protéicas em SDS-PAGE em presença de 2-mercaptoetanol: uma banda principal de 30 kDa, caracterizando a subunidade íntacta α , e duas bandas minoritárias de de 16-18 kDa (fragmento β) e de 10-12 kDa (fragmento γ). Por imunquímica, a lectina purificada de suas sementes mostrou ser semelhante a outras lectinas glicose-manose purificadas de outras espécies da subtribo Diocleinae, tanto do gênero *Canavalia*, como de outros gêneros como *Cratylia* e *Dioclea*. A sua seqüência primária é altamente homóloga com as seqüências de outras lectinas da subtribo Diocleinae, porém, com diferenças pontuais, como por exemplo, difere da Conbr em apenas três resíduos de aminácidos. Um fragmento de DNA codificando o gene da ConBol foi amplificado por PCR, clonado em *E. coli* DH5 α - plasmídeo pUC-18.

ABSTRACT

Canavalia aff. boliviana is a legum (Leguminosae, sub-family Papilionideae, tribe Phaseoleae, subtribe Diocleinae) endemic of the Amazonian, in medium Rio Negro, that has been showing all the characteristics of constituting a new species. The experiments demonstrated that your seeds contain a lectin specific glucose/manose that can be easily purified by likeness cromatografic in column of Sephadex G-50. It is showed a pattern typical eletroforetic of lectins if seeds of species of the subtribe Diocleinae, characterized by three bands proteins in SDS-PAGE in presence of 2-mercaptoethanol: a main band of 30 kDa, characterizing the intact subunidade α , and two minority bands of of 16-18 kDa (fragment β) and of 10-12 kDa (fragment γ). For imunochemistry, the purified lectin of your seeds showed to be similar the other lectins glucose-manose purified of another species of the subtribe Diocleinae, so much of good *Canavalia*, as of another goods as *Cratylia* and *Dioclea*. Your primary sequence presented a high homology degree with the sequences of other lectins of the subtribe Diocleinae, however, with punctual differences, as for instance, it differs of the Conbr in only three aminacids residues. A fragment of DNA codifying the gene of ConBol was amplified by PCR, it was cloned in *E. coli* DH5 α - pUC 18 plasmid.

1 - INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A capacidade de interagir específica e reversivelmente com carboidratos é uma propriedade das lectinas. Classicamente elas são definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que possuem como propriedade comum a capacidade de reconhecimento específico e de se ligar reversivelmente a resíduos de carboidratos ou glicoconjugados, bem como de aglutinar células, sem contudo alterar a estrutura química dos ligantes (GOLDSTEIN *et al.*, 1980; LIENER *et al.*, 1986).

Recentemente, Peumans & Van Damme (1995) redefiniram as lectinas como proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico de ligação a carboidratos e que são capazes de se ligar especificamente a mono ou oligossacarídeos. Estes autores classificaram ainda estas proteínas, de acordo com a sua estrutura, em três categorias: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas (FIGURA 1). Merolectinas são aquelas proteínas que possuem apenas um único domínio de ligação a carboidratos. São proteínas pequenas constituídas de uma única cadeia polipeptídica. Assim, devido à sua natureza monovalente não são capazes de aglutinar células ou glicoconjugados. A

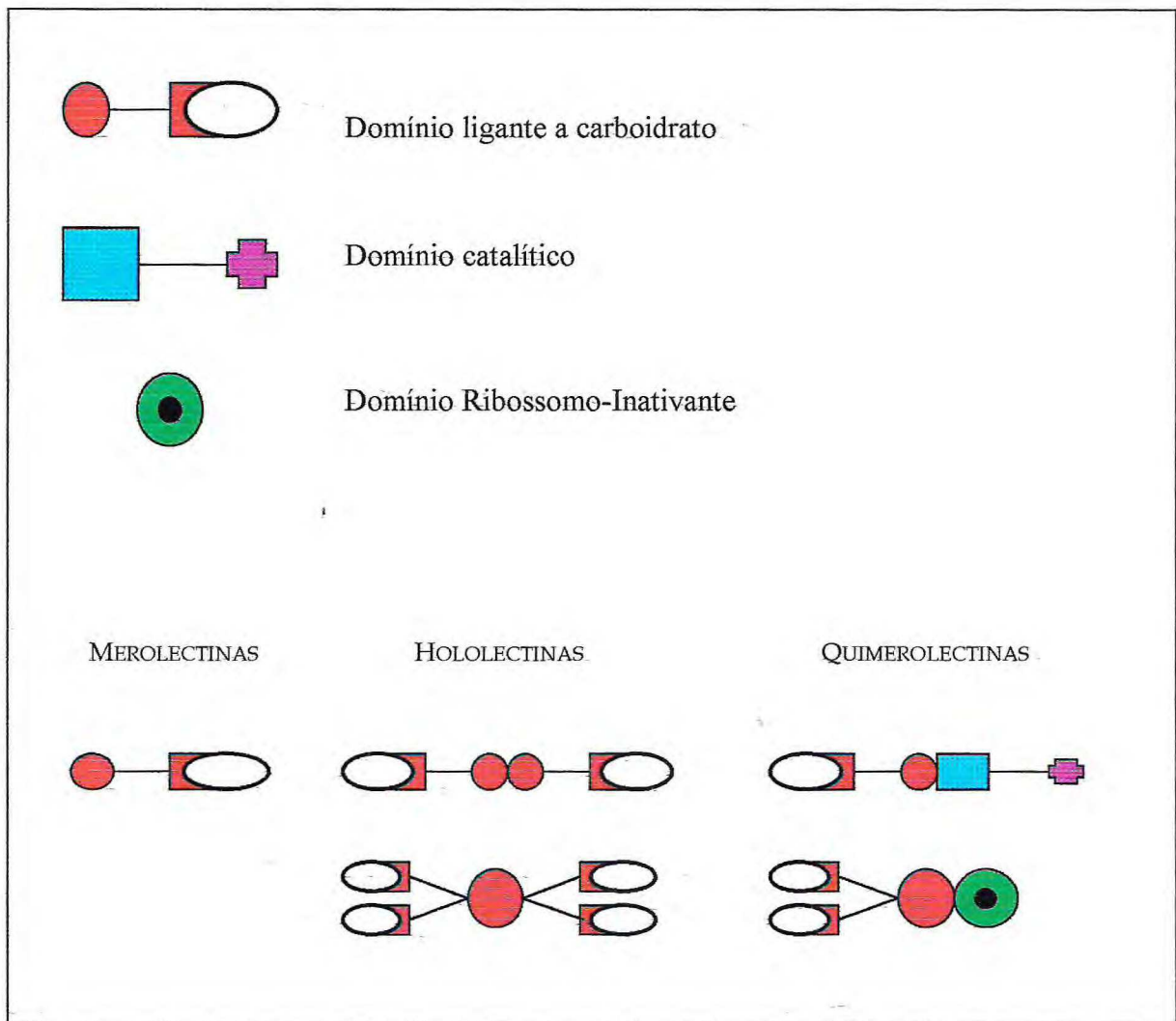


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE LECTINAS. MEROLECTINAS, HOLOLECTINAS E QUIMEROLECTINAS SEGUNDO PEUMANS & VAN DAMME, 1995.

heveína do látex da seringueira (VAN PARRIJS *et al.*, 1991) e as proteínas monoméricas encontradas nas orquídeas (VAN DAMME *et al.*, 1994) são exemplos desta categoria.

As hololectinas são, também, somente constituídas de domínios de ligação a carboidratos, possuindo dois ou mais sítios que são idênticos ou muito homólogos. Este grupo é representado pela maioria das lectinas, também conhecidas como hemaglutininas, capazes de aglutinar células ou glicoconjugados. Estas lectinas são características de espécies da família Leguminosae.

Por outro lado, as quimerolectinas são proteínas que além de possuírem domínio de ligação a carboidratos, também apresentam outros sítios não relacionados com atividade catalítica ou biológica bem definida. Como exemplos desta categoria encontram-se as RIPs (Proteínas Inativadoras de Ribossomos) e Quitinases Classe I.

Além destas classes de lectinas, mais recentemente Peumans & Van Damme (1998) introduziram mais um tipo de lectinas, as superlectinas, lectinas que apresentam mais de um sítio de ligação a carboidratos, porém diferentes entre si.

As lectinas são encontradas em todas as classes e famílias de seres vivos e também em vírus (SHARON & LIS, 1989). No Reino Vegetal, a classe das Dicotiledôneas detém o maior número de lectinas já isoladas e caracterizadas,

principalmente na família Leguminosae, enquanto que na classe das Monocotiledôneas destaca-se a família Gramineae (SILVA, 1993).

1.2. DETECÇÃO E PURIFICAÇÃO

A maneira mais simples de se detectar a presença de lectina em um extrato biológico é através do ensaio de hemaglutinação. Algumas lectinas só são capazes de aglutinar eritrócitos previamente tratados com enzimas proteolíticas como tripsina, papaína, subtilisina e bromelaína (AINOUZ *et al.*, 1992). Este tratamento, às vezes, torna as células mais sensíveis à aglutinação por expor carboidratos receptores na superfície da membrana do eritrócito.

Após a detecção de uma lectina em um dado extrato, através da técnica de hemaglutinação, o passo seguinte é verificar se a aglutinação pode ser revertida pela adição de açúcares simples ou complexos, ou mesmo por glicoconjugados. A inibição da atividade hemaglutinante da lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) foi obtida pela primeira vez com açúcar de cana (SUMNER & HOWELL, 1936). Assim, para testar a especificidade de uma lectina por carboidratos é necessário que o monossacarídeo ou oligossacarídeo (ou ainda o glicoconjugado) tenha a capacidade de inibir uma determinada reação (ou atividade biológica) causada pela lectina (GRANGEIRO, 1996).

As lectinas podem ser isoladas por métodos tradicionais de química de proteínas como: precipitação salina, precipitação isoelétrica, cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de troca iônica, entre outras. No entanto,

devido ao fato das lectinas se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos, um novo método de isolamento tem sido empregado: a cromatografia de afinidade (CAVADA, 1980). Neste processo, ocorre a interação da lectina com uma matriz insolúvel derivada ou ligada covalentemente a um açúcar inibidor específico. Após eluição de todo material não retido (proteínas sem atividade hemaglutinante), a desorção da lectina é feita por diminuição do pH do eluente ou por eluição com o açúcar inibidor. A lectina obtida desta maneira é geralmente homogênea quando examinada por uma variedade de critérios, e via de regra, não requer purificação adicional (SHARON & LIS, 1989).

Outros métodos de detecção como precipitação de polissacarídeos e glicoconjugados (SHARON & LIS, 1989), métodos imunológicos como ELISA (VAN DAMME & PEUMANS, 1990), radioimunoensaio (MISHKIND *et al.*, 1980), também são usados.

Por outro lado, quando há presença de isolectinas em uma mesma espécie é necessário o uso de técnicas de separação mais sensíveis como por exemplo cromatografia de troca iônica acoplada a sistema de FPLC (Cromatografia Líquida de Rápida Performance) (VAN DAMME & PEUMANS, 1990), técnicas de cromatofocalização (CAVADA & ROUGÉ, 1985) e cromatografia de interações hidrofóbicas (ZENTENO *et al.*, 1991).

Na família Leguminosae, algumas centenas de lectinas de espécies distribuídas em diferentes subfamílias, tribos e subtribos já foram purificadas

(SHARON & LIS, 1990). Cerca de 20 lectinas dos gêneros *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* (todas da subtribo *Diocleinae*) foram isoladas nos últimos 15 anos (GRANGEIRO, 1996).

1.3. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

As lectinas compreendem uma classe de proteínas com propriedades moleculares distintas formando, portanto, um grupo bastante heterogêneo. Elas podem diferir em várias características como composição de aminoácidos, massa molecular aparente, número de subunidades, conteúdo de íons metálicos, estruturas primária, secundária, terciária e quaternária, etc. (SILVA, 1993).

De uma maneira geral, as lectinas vegetais são pobres em aminoácidos sulfurados e ricas em ácido aspártico, serina e treonina (LIS & SHARON, 1981). Exceções são verificadas em algumas lectinas, como as de germe de trigo e de batata, que apresentam razoáveis conteúdos de cisteína (ALLEN, 1983; ALLEN *et al.*, 1973).

As lectinas apresentam uma variação muito grande em termos de massa molecular aparente, sendo encontrados valores que variam de 3,5 kDa a 480 kDa. Com relação à estrutura quaternária, as lectinas podem ser monoméricas (PEUMANS *et al.*, 1984) ou até mesmo apresentar 20 subunidades (SHARON & LIS, 1989). Contudo, as lectinas geralmente consistem de duas a quatro subunidades que podem ser idênticas ou não. Assim, a lectina de *Phaseolus vulgaris* é um tetrâmero composto de subunidades diferentes (PUSZTAI &

STEWART, 1978), enquanto que a lectina de *Dioclea grandiflora* consiste de quatro subunidades idênticas (MOREIRA *et al.*, 1983).

Várias lectinas necessitam da presença de cátions divalentes para exercerem suas atividades biológicas (LIS & SHARON, 1981). A lectina da *C. ensiformes* (ConA), por exemplo, possui dois sítios de ligação a íons metálicos em cada subunidade. Sendo um sítio ocupado pelo Mn^{++} , denominado S1, e um segundo sítio S2 pelo Ca^{++} (HARDMAN & AINSWORTH, 1972). A ocupação destes sítios pelos respectivos metais é fundamental para que a molécula se arranje espacialmente de forma adequada e os sítios de interação a carboidratos se formem.

1.4. ESTUDOS MOLECULARES

A sequência de aminoácidos de muitas lectinas tem sido determinada por técnicas convencionais baseadas na degradação de EDMAN (1950). Contudo, o uso da tecnologia do DNA recombinante em estudos de estrutura, biossíntese e função de proteínas, tem se tornado cada vez mais usual e eficaz. Deste modo, o sequenciamento completo de uma série de lectinas vegetais tem sido deduzido das sequências de nucleotídeos de cDNAs sintetizados pela transcriptase reversa a partir dos seus respectivos mRNAs (GRANGEIRO, 1996).

Duas estratégias têm sido utilizadas na clonagem do gene de uma proteína: a construção de bibliotecas de DNA genômico e de cDNA. A biblioteca de DNA genômico possibilita, em potencial, o isolamento de todos os genes do

genoma, enquanto que uma biblioteca de cDNA permite a clonagem do(s) gene(s) transcrito(s) no tecido vegetal utilizado na construção da biblioteca do cDNA. A escolha de uma delas depende de alguns fatores: que tipo de utilização terá o clone; a disponibilidade do material biológico; e os tipos de sondas disponíveis para avaliação da biblioteca. Deste modo, os clones genômicos se destinam em princípio a estudos sobre a estrutura e regulação do gene da proteína. Todavia, a possibilidade da presença de “introns” no gene clonado pode representar dificuldades caso as seqüências destes clones sejam utilizadas para se deduzir a seqüência de aminoácidos proteína.

As bibliotecas de cDNAs refletem, de fato, uma abundância relativa dos vários produtos primários de transcrição no tecido sob investigação. A freqüência do cDNA nestas condições é bem maior que uma biblioteca genômica. Deste modo, são bastante úteis para os casos onde mRNA da lectina prevaleça naquele tecido ou órgão. Como muitas plantas leguminosas acumulam em suas sementes uma grande quantidade de lectina durante o desenvolvimento do fruto, bibliotecas de cDNAs foram construídas a partir de seus respectivos mRNAs. Assim, bibliotecas de cDNAs de sementes pertencentes a diferentes taxones têm sido construídas e vários genes de lectinas têm sido clonados: *Pisum sativum* (HIGGINS *et al.*, 1983), *Glycine max* (VODKIN *et al.*, 1983), *Canavalia ensiformes* (CARRINGTON *et al.*, 1985), *Canavalia gladiata* (YAMAUCHI *et al.*, 1989), *Arachis hypogea* (ARANGO *et al.*, 1992), *Canavalia brasilienses* (ConBr) (GRANGEIRO, 1996), etc.

Por outro lado, a comparação das sequências de aminoácidos codificadas pelos produtos primários de tradução com as respectivas sequências das proteínas maduras, acrescido de estudos radioativos tanto *in vitro* como *in vivo*, tem fornecido informações importantes sobre a biossíntese de lectinas. Deste modo, tem sido sugerido que as lectinas de leguminosas são sintetizadas sob a forma de pré-pro-lectinas. A ConA, por exemplo, é sintetizada na forma de um precursor de 34 kDa que é glicosilado co-traducionalmente pela ligação covalente de um oligossacarídeo rico em manose ao resíduo ASN 153 localizado na posição mediana da pro-ConA (CHRISPEELS *et al.*, 1986; HERMAN *et al.*, 1985).

1.5. LECTINAS DA SUBTRIBO DIOCLEINAE

A subtribo Diocleinae Benth. (1837) é constituída por 13 gêneros largamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais, notadamente no Novo Mundo: *Dioclea*, *Cymbosema*, *Cleobulia*, *Canavalia*, *Pachyrhizus*, *Macropsychanthus*, *Luzonia*, *Camptosema*, *Cratyliia*, *Collaea*, *Galactia*, *Calopogonium* e *Herpyza*. Segundo Polhill & Raven (1981), a subtribo Diocleinae possui algumas características supostamente primitivas: o hábito é freqüentemente lenhoso, as flores são normalmente grandes e possuem discos proeminentes em volta do ovário, o hilo é via de regra longo e a inflorescência geralmente paniculada.

Do ponto de vista químico, o aminoácido não protéico canavanina está presente em todas as espécies já investigadas, com exceção de uma espécie de

Dioclea e de uma espécie de *Cleobulia*. Entretanto, a maioria dos caracteres não fornece uma indicação clara e precisa de estrutura interna ou alguns limites genéricos, e somente mostra uma tendência geral a partir de *Dioclea* e gêneros afins, seguida de uma série de plantas intermediárias terminando com *Galactia*. Esta apresenta uma mudança de hábito, que passa de lenhoso para uma forma mais delicada, com sementes menores dotadas de hilo curto e também uma alteração no número cromossômico, que muda de 22 para 20. Apesar de ser um grupo basicamente nativo, a subtribo Diocleinae é difícil de ser definida. Contudo, a canavanina pode ser usada como um marcador do táxon Diocleinae.

Diversos estudos têm demonstrado, por outro lado, que as lectinas isoladas de espécies de diferentes gêneros da subtribo Diocleinae apresentam uma altíssima homologia de sequência primária (CAVADA *et al.*, 1993), indicando que estas proteínas foram extremamente conservadas durante o processo de especiação. Estes resultados indicam que as lectinas de espécies desta subtribo podem perfeitamente ser usadas como marcadores quimiotaxonômicos deste grupo (MOREIRA *et al.*, 1993; MOREIRA *et al.*, 1995), a exemplo do que ocorre com a tribo Vicieae (Leguminosae, Papilionoideae), onde as lectinas constituem excelentes marcadores filogenéticos (BARRE *et al.*, 1994; ROUGÉ & CAVADA, 1984; CAVADA & ROUGÉ, 1985). A TABELA 1 apresenta uma lista de espécies da subtribo Diocleinae onde lectinas foram detectadas e isoladas.

O alto grau homologia de sequência primária e estrutural entre as lectinas de espécies da subtribo Diocleinae dificulta a explicação das diferenças

TABELA 1 - LECTINAS ISOLADAS DE ESPÉCIES DA SUB-TRIBO DIOCLEINAE

Espécie	Designação da lectina	Referência
<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA	SUMNER & HOWELL, 1936
<i>Canavalia brasiliensis</i>	ConBr	MOREIRA & CAVADA, 1984
<i>Canavalia maritima</i>	ConM	PEREZ <i>et al.</i> , 1991
<i>Canavalia bonariensis</i>	CABO	CAVADA <i>et al.</i> , 1996
<i>Canavalia gladiata</i>	ConGl	YAMAUCHI <i>et al.</i> , 1989
<i>Canavalia virosa</i>	ConVr	FUJIMURA <i>et al.</i> , 1993
<i>Cleobulia multiflora</i>	CML	GUITMARÃES, 1998
<i>Cymbosema roseum</i> I	CRL-I	SILVEIRA, 1999
<i>Cymbosema roseum</i> , II	CRL-II	ROCHA, 1998
<i>Cratylia floribunda</i>	CFL	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1991
<i>Dioclea grandiflora</i>	DGL	MOREIRA <i>et al.</i> , 1983
<i>Dioclea rostrata</i>	DRL	CAVADA <i>et al.</i> , 1996
<i>Dioclea guianensis</i>	Dgui	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 1991
<i>Dioclea virgata</i>	Dvir	CAVADA <i>et al.</i> , 1996
<i>Dioclea violacea</i>	Dvio	MOREIRA <i>et al.</i> , 1996
<i>Dioclea altissima</i>	DAL	MOREIRA <i>et al.</i> , 1997
<i>Dioclea lehmani</i> I	DLL I	PEREZ <i>et al.</i> , 1991
<i>Dioclea lehmani</i> II	DLL II	PEREZ <i>et al.</i> , 1996

marcantes encontradas entre estas proteínas quanto à várias atividades biológicas, como potência de hemaglutinação, mitogenicidade, indução da síntese de interferon (*in vivo* e *in vitro*), indução da liberação de histamina, efeito edematogênico, etc. O entendimento e a elucidação destas diferenças necessariamente passam pelo estabelecimento da estrutura tridimensional destas proteínas.

1.6. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS DAS LECTINAS DE DIOCLEINAE

1.6.1. PROPRIEDADES GERAIS

As lectinas da subtribo Diocleinae estudadas até o momento, via de regra, apresentam especificidade por resíduos de glicose/manose, são oriundas de várias espécies dos gêneros *Canavalia*, *Dioclea* e *Cratyhia* e apresentam o mesmo padrão, quando analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Este padrão, é caracterizado por três grupos de bandas protéicas, com massas moleculares aparentes próximas de 29-30 kDa (cadeia α), 16-18 kDa (fragmento β) e 12-13 kDa (fragmento γ). A interrelação entre os polipeptídeos que compõem a subunidade das lectinas Diocleinae foi inicialmente estabelecida para a ConA, a lectina de *Canavalia ensiformis* (ABE *et al.*, 1971). Através do sequenciamento N-terminal da cadeia α e dos fragmentos β e γ isolados desta lectina, demonstrou-se que tais fragmentos correspondem as metades N- e C-terminais da cadeia intacta α . Posteriormente, a mesma relação foi demonstrada

para uma lectina isolada de uma espécie do gênero *Dioclea*, a *Dioclea grandiflora*, através da determinação da sequência completa de aminoácidos dos fragmentos isolados e da cadeia α (RICHARDSON *et al.*, 1984; AINOUZ *et al.*, 1984). Mais recentemente, para uma espécie de *Cratylia* (*Cratylia floribunda*), os polipeptídeos que constituem a lectina madura foram fracionados por PAGE-SDS, eletrotransferidos para membrana de PVDF e suas sequências N-terminais determinadas por degradação de Edman automatizada (GRANGEIRO *et al.*, 1997). A comparação das sequências entre si e com as estruturas primárias de outras lectinas de Diocleinae, também revelaram que os fragmentos β e γ da lectina de *Cratylia floribunda* constituem as porções N- e C-terminais da cadeia α . A TABELA 2 apresenta um sumário das características químicas e físico-químicas de várias lectinas de Diocleinae.

O estudo detalhado da biossíntese da ConA durante o desenvolvimento das sementes em plantas de *Canavalia ensiformis* revelou o mecanismo pelo qual tais fragmentos são originados, e considerando-se a proximidade filogenética entre as Diocleinae, o modelo pode ser empregado para as demais lectinas desse táxon, cujo padrão eletroforético é similar aquele da ConA.

De uma maneira geral, sabe-se que as lectinas de Leguminosas são sintetizadas na forma de pré-pró-proteínas no retículo endoplasmático. A pré-pró-lectina possui na sua extremidade N-terminal um peptídeo denominado de peptídeo sinal, com 20 a 30 resíduos de aminoácidos, que é removido co-

TABELA 2 - PROPRIEDADES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE ALGUMAS LECTINAS DA SUB-TRIBO DIOCLEINAE

Lectina	Isolamento	Especificidade Por açúcar	Especificidade por Eritrócitos ^a	Mr (kDa) ^b	PI	Dependência por metais	Estrutura primária
Con A	Sephadex	Glc/Man	C > H	25 / 50 / 100	> 8	Sim	Sim
Con Br	Sephadex	Glc/Man	C > H	25 / 50 / 100	> 8	Sim	Sim
Con M	Sephadex	Glc/Man	C > H	25 / 50 / 100	Nd	Sim	Sim
Con G	Sephadex	Glc/Man	C > H	25 / 50 / 100	Nd	Sim	Sim
CABO	Sephadex	Glc/Man	C > H	25 / 50 / 100	Nd	Sim	Não
DGL	Sephadex	Glc/Man	C > H	25 / 50 / 100	> 8	Sim	Sim
DVL	Sephadex	Glc/Man	C > H	25 / 50 / 100	Nd	Sim	Não
DRL	Sephadex	Glc/Man	C > H	25 / 50 / 100	Nd	Sim	Não
Dvir	Sephadex	Glc/Man	C > H	25 / 50 / 100	Nd	Sim	Não
Dgui	Sephadex	Glc/Man	C > H	25 / 50 / 100	Nd	Sim	Sim
CFL	Sephadex	Glc/Man	C > H	25 / 50 / 100	Nd	Sim	Não
CYBRL-1 ¹	Agarose- manose	Glc/Man	C > H	Nd	Nd	Nd	Nd

^a C: eritrócitos de coelho; H: eritrócitos humanos

^b Valores de Mr para as estruturas de monômeros, dímeros e tetrâmeros, respectivamente

traducionalmente durante o transporte da pré-pró-lectina para o lúmen do retículo endoplasmático, originando a pró-lectina. A pró-lectina, também chamada de precursor, pode então sofrer uma série de modificações pós-traducionais, como glicosilação e clivagens proteolíticas, originando a lectina madura (SHARON & LIS, 1990). A ConA é sintetizada na forma de uma pré-pró-proteína com 290 resíduos de aminoácidos e a comparação entre as sequências de aminoácidos da pré-pró-ConA, deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do cDNA (CARRINGTON *et al.*, 1985) com a sequência de aminoácidos obtida da proteína madura revelou inicialmente que as duas metades da ConA madura, ou seja, o fragmento β que corresponde a metade N-terminal (resíduos 1-118) e o fragmento γ que corresponde a metade C-terminal (resíduos 119-237), estão dispostos na pré-pró-ConA numa ordem inversa a encontrada na cadeia α , sendo separados por um peptídeo central de 15 aminoácidos e flanqueados pelo peptídeo sinal de 30 resíduos na extremidade N-terminal e por uma extensão C-terminal de 9 aminoácidos.

Experimentos de marcação radioativa e de sequenciamento de aminoácidos das formas intermediárias detectadas em sementes em desenvolvimento de *C. ensiformis* permitiram desvendar o mecanismo do processamento proteolítico pós-traducional da forma precursora, na qual as metades N- e C-terminais estão numa ordem inversa, e conseqüentemente, explicar a existência de algumas dessas metades livres na semente madura. Assim, durante o trânsito da cadeia polipeptídica nascente para o lúmen do retículo

endoplasmático, o peptídeo sinal de 30 resíduos de aminoácidos é removido. A cadeia polipeptídica resultante, denominada de precursor (34 kDa) é então glicosilada co-traducionalmente pela ligação covalente de um oligossacarídeo rico em manose ao resíduo ASN 153 localizado na porção mediana da pró-ConA (CHRISPEELS *et al.*, 1986; HERMAN *et al.*, 1985). Durante o transporte para os corpos protéicos, via complexo de Golgi, o glicopeptídeo central é removido e os polipetídeos resultantes (metades N- e C-terminais da proteína madura) sofrem uma transposição e são religados, originando a lectina madura não glicosilada com 30 kDa. A nova ligação peptídica formada envolve os resíduos 118 e 119 da ConA madura. Entretanto, a formação da nova ligação peptídica não ocorre com uma eficiência completa, e como consequência, algumas metades não são religadas. Assim, os fragmentos β e γ observados na lectina madura por PAGE-SDS são na realidade as metades N- e C-terminais que não foram religadas durante o processamento da forma precursora. Apesar de não estarem ligados covalentemente, os dois fragmentos são mantidos juntos por ligações não covalentes e formam um protômero cuja estrutura tridimensional é essencialmente a mesma da subunidade formada pela cadeia polipeptídica íntegra, sem descontinuidade na sua estrutura primária (BECKER *et al.*, 1975). A FIGURA 2, representa a sequência de eventos que constituem o processamento da ConA para formar a lectina isolada de sementes maduras.

A determinação da sequência de aminoácidos dos precursores das lectinas de *Canavalia gladiata* (YAMAUCHI *et al.*, 1989) e *C. brasiliensis* (GRANGEIRO *et al.*, 1997), por dedução a partir da sequência de nucleotídeos

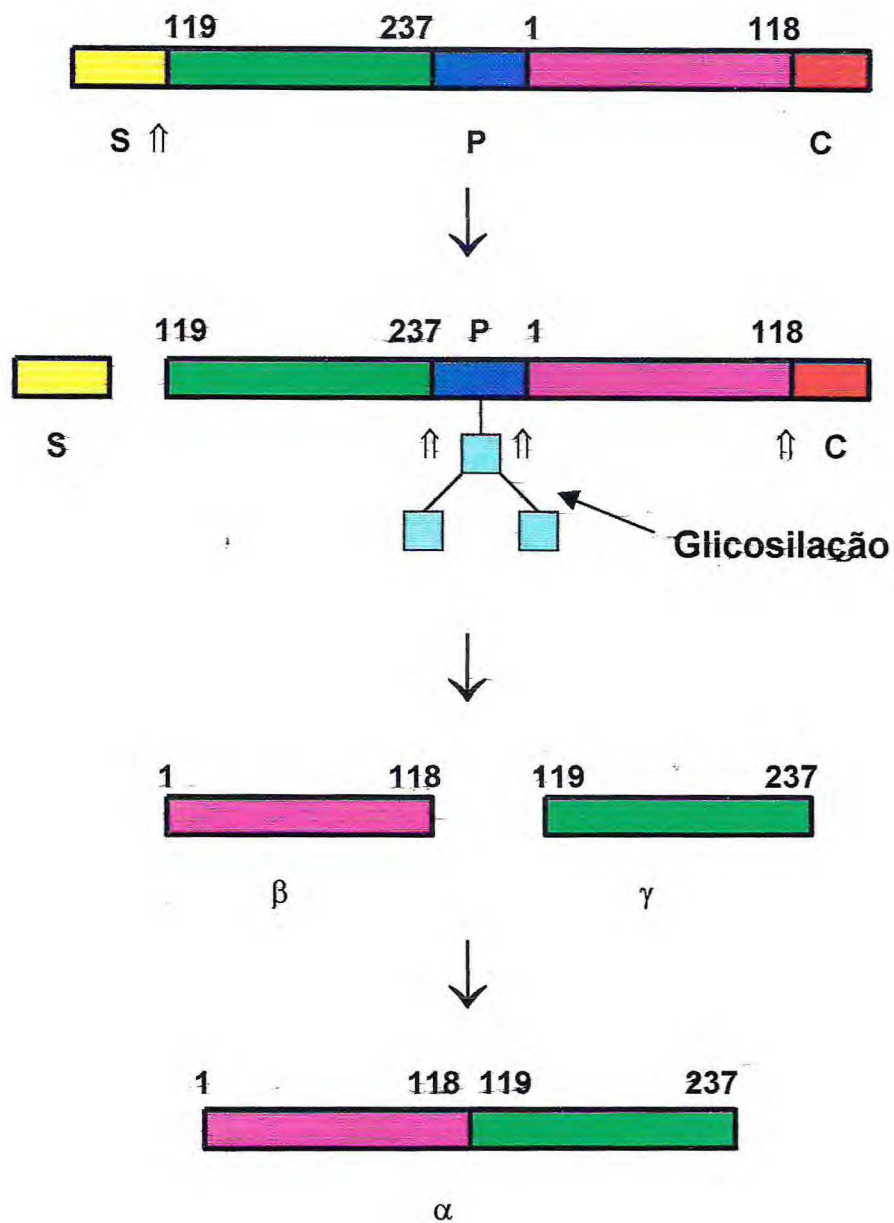


FIGURA 2 - ESQUEMA DO PROCESSAMENTO DA CONA PROPOSTO PARA AS DEMAIS LECTINAS DE DIOCLEINAE COM CARACTERÍSTICAS SIMILARES (VAN DAMME & PEUMANS, 1996).

dos respectivos cDNAs e sua comparação com as sequências de aminoácidos das lectinas maduras, também revela que as metades N- e C-terminais estão ligadas numa ordem inversa no precursor, sugerindo que o mesmo processamento pós-traducional da ConA também ocorre nessas espécies.

1.6.2. AGLUTINAÇÃO DE CÉLULAS ERITROCITÁRIAS

As lectinas de Diocleinae aglutinam fortemente hemácias nativas de coelho, e o tratamento dessas hemácias com enzimas proteolíticas tais como tripsina, papaína e bromelaína, resultam num aumento do título de hemaglutinação. A capacidade de aglutinar células (não somente células eritrocitárias) advém da capacidade da lectina reconhecer, na superfície celular, estruturas glicanas que podem ocupar o referido sítio de interação a carboidratos destas proteínas. Usualmente, uma molécula lectínica possui apenas um sítio de interação a carboidratos por unidade estrutural, entretanto, igualmente comum é a presença de associações diméricas, tetraméricas ou oligoméricas o que promove, desta forma, a presença de mais de um sítio ativo por molécula. Esta propriedade é que torna possível a lectina interagir com duas superfícies celulares distintas, aproximando as células e induzindo o fenômeno de aglutinação.

Por muito tempo esta propriedade foi considerada essencial para classificar uma lectina e o poder de aglutinar células foi inclusive descrito na definição destas proteínas (KOUCOREK & HOREJSI, 1983). Atualmente, esta definição tem sido abandonada progressivamente desde que o número de

trabalhos descrevendo o isolamento de novas lectinas que não aglutinam células cresce constantemente. Embora durante décadas a propriedade de aglutinar células tenha sido relevante no estudo de lectinas, a comunidade científica concorda que esta propriedade foi superestimada e não deve, no atual momento do estudo com lectinas, ser fortemente considerada.

1.6.3. A ESPECIFICIDADE POR CARBOIDRATOS

A determinação da especificidade por carboidratos das lectinas é comumente realizada através de um ensaio de inibição por haptenos. Nestes experimentos, diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos e/ou glicopeptídeos são avaliados com relação à sua habilidade em inibir a atividade hemaglutinante ou a precipitação de polissacarídeos (ou glicoconjugados) pela lectina (DEBRAY, *et al.*, 1981). A ligação das lectinas a carboidratos pode ser também examinada por métodos físico-químicos, como microcalorimetria, equilíbrio de diálise, espectrofotometria, fluorimetria e ressonância nuclear magnética. Por estes métodos, a constante de associação e outros parâmetros termodinâmicos e cinéticos da reação podem ser medidos. As constantes de associação entre lectinas e monossacarídeos variam de 10^3 a $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, enquanto que entre lectinas e oligossacarídeos estão na faixa de 10^4 a 10^7 M^{-1} (DEBRAY, *et al.*, 1981). A reação entre lectinas e carboidratos é essencialmente exergônica e o valor de -6,18 kcal/mol foi determinado para a variação de energia livre padrão da reação de associação entre ConA e o 4-metilumbeliferil alfa-D-manopiranosídeo.

MAKELA (1957) agrupou os monossacarídeos inibidores das lectinas em 4 grupos, usando como critério a configuração estereoquímica relativa dos carbonos 3 e 4 do anel piranosídico ou furanosídico: L-fucose (Grupo I), Galactose/N-acetil-galactosamina (Grupo II), Glicose/manose (Grupo III) e Idose/gulose/L-glicose/L-xilose (Grupo IV). Não existem relatos de lectinas que interagem com açúcares do Grupo IV de Mäkela (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986). Posteriormente, N-acetil-glicosamina e ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico) foram reconhecidos como dois novos grupos, complementando a classificação de Mäkela (MOREIRA *et al.*, 1991).

As sementes de espécies do táxon Diocleinae possuem grandes quantidades de lectinas que interagem especificamente com D-glicose, D-manose e estruturas derivadas. Esta interação específica com glicose/manose é explorada na purificação dessas proteínas através de cromatografia de afinidade numa matriz inerte que contenha tais resíduos de carboidratos. Assim, a maioria das lectinas de Diocleinae tem sido purificadas usando-se como matriz de afinidade o Sephadex, um polímero de D-glicose (MOREIRA & CAVADA, 1984; OLIVEIRA *et al.*, 1991; VASCONCELOS *et al.*, 1991; CAVADA *et al.*, 1996a; CAVADA *et al.*, 1996b; CAVADA *et al.*, 1996c). Entretanto, outras matrizes também tem sido utilizadas. Por exemplo, a lectina de sementes de *Dioclea lehmani* foi purificada por interação com Sephacril (PEREZ *et al.*, 1991), enquanto que a lectina de sementes de *Canavalia gladiata* foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de maltamil-Sepharose (KOJIMA *et al.*, 1991).

Muitas lectinas toleram variações no carbono C2 do monossacarídeo ao qual elas se ligam. Por exemplo, as lectinas específicas para manose usualmente também reagem com glicose e, em menor extensão, com N-acetilglicosamina, como é o caso das lectinas de Diocleinae e algumas lectinas do Grupo III (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986; SHARON & LIS, 1990). Variações no carbono 3 são também toleradas. Entretanto, a configuração do carbono C4 é crucial para interação com as lectinas de Diocleinae, desde que as mesmas não reagem com D-galactose (RAMOS *et al.*, 1996b). Algumas lectinas exibem especificidade anomérica, reagindo preferencialmente com o anômero alfa ou beta do respectivo monossacarídeo. A ConA, e as lectinas de *Griffonia simplicifolia* (I-B4) e *Lotus tetragonolobus*, exibem uma pronunciada especificidade para os anômeros alfa de manose (ou glicose), de galactose e de L-fucose, respectivamente, enquanto que muitas lectinas solúveis de tecidos animais são específicas por beta-galactosídeos. Por outro lado, as lectinas de *Glycine max* e de *Ricinus communis* são completamente destituídas de especificidade anomérica (SHARON & LIS, 1989).

Muitas lectinas possuem uma maior afinidade por oligossacarídeos, reagindo frequentemente com o monossacarídeo da extremidade não-redutora, apesar de algumas lectinas também reconhecerem monossacarídeos que ocupam posições internas (SHARON & LIS, 1989).

1.6.4. ESTUDOS ESTRUTURAIIS

O estabelecimento da estrutura das lectinas vegetais, não apenas de representantes de Diocleinae, explodiu nos últimos cinco anos. O número crescente de estruturas estudadas por difração de raios-x ou modelamento molecular tem sido incentivado por as proteínas apresentarem peculiaridades estruturais que não refletem a homologia das proteínas. No caso das lectinas da sub-tribo Diocleinae o estudo da estrutura é ainda mais complexo devido a presença dos fragmentos (β e γ).

Foi investigada a hipótese que as estruturas quaternárias das lectinas de Diocleinae, compostas de subunidades nativas (α) e fragmentadas (β e γ), poderia explicar, pelo menos em parte, as discrepâncias observadas para a potência de interação com receptores. Embora o procedimento utilizado para a purificação da subunidade α das lectinas não tenha sido completamente eficaz, a maioria das lectinas (ConM, DGL, DVL e CFL) tratadas com acetato de sódio pH 2,3, seguido de diálise contra bicarbonato de amônio pH 7,9 como descrito por SENEAR & TELLER (1981), mostram uma melhor reatividade com as glicoproteínas testadas, quando comparadas com as lectinas nativas não tratadas. Surpreendentemente, a lectina ConBr é a única que apresenta uma menor reatividade, enquanto que a ConA, cuja subunidade α foi totalmente isolada, não apresenta nenhuma alteração em seus resultados. Estas diferenças observadas podem resultar da precipitação parcial das subunidades fragmentadas (β e γ), o

que poderia modificar suas estruturas quaternárias, e por extensão, suas afinidades por glicoproteínas (ou mesmo por seus receptores de natureza de glicoconjugado).

Embora não seja possível quantificar o percentual de subunidade α fragmentada presente em cada lectina, a análise destas proteínas por eletrofocalização, mostra que cada lectina apresenta, naturalmente, uma mistura complexa de isoformas. Estes padrões se devem, provavelmente, às múltiplas associações entre as subunidades α , β e γ , fazendo assim com que cada lectina apresente um padrão de associações distinto dos demais. Foi mostrado, por exemplo, que a lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* apresenta múltiplas associações estruturais (SANS-APARICIO *et al.*, 1997), o que concorda totalmente com estes resultados. A presença de várias isoformas foi também evidenciada quando as lectinas DGL e CFL foram cromatofocalizadas em coluna PBE-94, onde uma complexidade de picos são obtidos no gradiente de pH analisado.

1.6.5. *RELAÇÕES EVOLUCIONÁRIAS ENTRE LECTINAS DE DIOCLEINAE E OUTRAS LECTINAS*

O uso de informações estruturais de lectinas para propósitos filogenéticos é largamente sugerido (BARRE *et al.*, 1994, ROUGÉ & CAVADA, 1984; MOREIRA *et al.*, 1995). Embora informações derivadas de estudos com lectinas sejam cada vez mais disponíveis (TABELA 3) e possam suportar a classificação botânica clássica, não é possível, no momento, estender informações estruturais de lectinas para estudar as relações filogenéticas de todos

TABELA 3 - EXEMPLOS DE LECTINAS DE SEMENTES DE ESPÉCIES DA SUB-FAMÍLIA PAPILIONODEAE (LEGUMINOSAE) JÁ SEQUENCIADAS.

<i>Tribo</i>	<i>Sub-tribo</i>	<i>Espécie c/lectina sequenciada</i>	<i>Referência</i>	
<i>Sophoreae</i>		<i>Bowringia mildbraedi</i>	CHAWLA <i>et al.</i> , 1993	
		<i>Maackia amurensis</i>	YAMAMOTO <i>et al.</i> , 1994	
		<i>Cladrastis lutea</i>	VAN DAMME <i>et al.</i> , 1995	
		<i>Sophora japonica</i>	VAN DAMME <i>et al.</i> , 1997	
<i>Abreae</i>		<i>Abrus precatorius</i>	ROY <i>et al.</i> , 1976	
<i>Robineae</i>		<i>Robinia pseudoacacia</i>	VAN DAMME <i>et al.</i> , 1995	
<i>Dalbergieae</i>		<i>Vatairea macrocarpa</i>	SANTOS, 1998; CALVETE <i>et al.</i> , 1998.	
<i>Phaseoleae</i>	<i>Erythrinae</i>	<i>Erythrina corallodendron</i>	ADAR <i>et al.</i> , 1989	
	<i>Diocleinae</i>	<i>Canavalia brasiliensis</i>	GRANGEIRO <i>et al.</i> , 1996	
		<i>Dioclea grandiflora</i>	RICHARDSON <i>et al.</i> , 1984b	
		<i>Cratylia floribunda</i>	CAVADA <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Glicininae</i>	<i>Glycine max</i>	VODKIN <i>et al.</i> , 1983	
		<i>Phaseolinae</i>	<i>Pseudocarpus</i>	PURI & SUROLIA, 1994
			<i>Tetragonolobus</i>	
			<i>Dolichos biflorus</i>	SCHNELL <i>et al.</i> , 1987
<i>Phaseolus vulgaris</i>			HOFFMAN & DONALDSON, 1985	
<i>Aeschynomeneae</i>	<i>Stylosanthinae</i>	<i>Arachis hypogea</i>	RODRIGUES-ARANGO <i>et al.</i> , 1992	
<i>Hedysareae</i>		<i>Onobrychis viciifolia</i>	KOUCHALAKOS <i>et al.</i> , 1984	
<i>Loteae</i>		<i>Lotus tetragonolobus</i>	KONAMI <i>et al.</i> , 1990	
		<i>Vicia faba</i>	HOPP <i>et al.</i> , 1982	
		<i>Lathyrus ochrus</i>	RICHARDSON <i>et al.</i> , 1984	
	<i>Vicieae</i>	<i>Lens culinares</i>	FORIERS <i>et al.</i> , 1981	
		<i>Pisum sativum</i>	HIGGINS <i>et al.</i> , 1983	
	<i>Pisum arvense</i>	MOREIRA-SILVA, 1997		
<i>Trifolieae</i>		<i>Medicago truncatula</i>	BAUCHROWITZ <i>et al.</i> , 1992	
<i>Genisteeae</i>		<i>Laburnum alpinum</i>	KONAMI <i>et al.</i> , 1991	
		<i>Cytisus scoparius</i>	KONAMI <i>et al.</i> , 1992	
		<i>Ulex europaeus</i>	KONAMI <i>et al.</i> , 1991 ^a	

os taxa de plantas contendo lectinas. Como um exemplo, as plantas da sub-tribo *Diocleinae* pertencem a tribo *Phaseoleae*. Assim, deveria esperar-se que a lectina isolada de *Phaseolus vulgaris* (PHA) apresentasse fortes semelhanças com aquelas de *Diocleinae*. Entretanto, PHA não exhibe consideráveis semelhanças com as lectinas de *Diocleinae*. A PHA é composta de uma complexa mistura de isoformas de duas cadeias polipeptídicas distintas que formam uma família de proteínas exibindo diferentes atividade biológicas entre elas mesmas (RAMOS, 1997a). A PHA mostra baixa homologia de sequência quando comparada com lectinas de *Diocleinae* e *Vicieae* e não interage com glicose ou manose. Aparte a classificação botânica, as lectinas de espécies de *Diocleinae* e *Vicieae* são proteínas estreitamente relacionadas, que poderiam eventualmente desempenhar papéis biológicos similares, como sugere a comparação estrutural das mesmas.

Estes resultados mostram que existe um considerável número de características relacionadas à biossíntese, processamento e estrutura de lectinas que podem ser entendidos e transformados em caracteres filogenéticos individuais. Conclusões mais definitivas, entretanto, ainda dependem de uma cuidadosa comparação de um número adicional de taxa dentro e fora das Leguminosas. Na realidade, o estudo da evolução das lectinas dentro da filogenia das angiospermas deveria ser particularmente útil para levar a um melhor entendimento das lectinas dentro de grupos como as leguminosas. Assim, a variação encontrada dentro de cada grupo deveria ser mais propriamente interpretada em termos de transformações de série (isto é: pleiomorfias e

apomorfias). Se os resultados deste tipo de estudo tornarem-se disponíveis, as informações obtidas utilizando-se dados de lectinas, mais do que mostrar apenas relações de similaridades rudes, poderão gerar diretamente dados filogenéticos aos quais poderão ser adicionadas informações de outras fontes para gerar cladogramas e conclusões sobre a evolução de diferentes grupos. Um melhor entendimento das relações entre as lectinas de *Diocleinae*, *Vicieae*, *Phaseolinae*, *Erythrinae* e outros grupos de leguminosas, desta forma, seria possível, mesmo que ainda depende de uma compreensão mais completa das diferenças sobre uma abordagem filogenética.

2 - OBJETIVOS

- 1 - Isolar e purificar uma lectina de sementes de *Canavalia aff. boliviana*;
- 2 - Caracterizar química, físico-química e biologicamente a lectina purificada;
- 3 - Estabelecer a seqüência primária dessa lectina de *Canavalia aff. boliviana* e compará-la com as seqüências de outras lectinas da subtribo Diocleinae já determinadas;
- 4 - Clonar o gene que codifica essa lectina de sementes de *Canavalia aff. boliviana*.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PREPARAÇÃO DE FARINHA

Sementes quiescentes de *Canavalia* aff. *boliviana*, oriundas da Amazônia, foram destegumentadas e trituradas em moinho elétrico do tipo Wiley, acoplado com peneira de 60 mesh e o material obtido foi repassado em moinho de café (krups tipo 200) para se obter farinha fina, a qual foi estocada em frascos hermeticamente fechados e mantidos em câmara fria (12°C).

3.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS A DIFERENTES VALORES DE PH

A farinha das sementes foi submetida a extrações protéicas (1:10, m/v) com diferentes soluções tampões (tampão Glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6; tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6 e tampão Glicina-NaOH 0,1 M, pH 9,0) por 12 horas sob agitação constante à temperatura ambiente. Sendo então centrifugadas a 10.870 x g durante 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados em papel de filtro qualitativo e os extratos (extratos totais) obtidos utilizados em ensaios de hemaglutinação e de dosagem de proteínas solúveis.

3.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

As determinações de proteínas nos diferentes extratos foram realizadas segundo o método de BRADFORD (1976). A cada 100 µl de diferentes diluições do extrato foram adicionados 2,5 ml do reagente de Bradford. Após 10

minutos de repouso foi determinada a absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro Pharmacia LKB - Novaspec II. A concentração de proteínas foi estimada a partir de uma curva padrão usando-se Albumina Sérica Bovina (BSA).

3.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Para a determinação da atividade hemaglutinante nos diferentes extratos protéicos, foi utilizado o método descrito por MOREIRA & PERRONE (1977). As amostras foram submetidas a diluições duplas seriadas (1:2, 1:4, 1:8, ...) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6 contendo Ca^{++} e Mn^{++} a 5,0 mM ; e a cada 200 μl de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias (de coelhos albinos adultos, mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC e hemácias humanas tipos A, B e O, adquiridas no Hemoce, a 2 % em NaCl 0,15 M. Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos e deixados em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos, após o que foram centrifugados a 1000 x g por 30 segundos em centrífuga de bancada Excelsa Baby I modelo 206. Foi feita uma primeira leitura e após 12 horas, à temperatura ambiente, uma nova leitura foi realizada. Os títulos de hemaglutinação foram determinados como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação visível a olho nu. Hemácias humanas e de coelho foram utilizadas no estado normal e tratadas com enzimas proteolíticas (Bromelaína, Papaína, e Tripsina). Todas as amostras de sangue foram coletadas em recipientes contendo heparina, lavadas cinco vezes com NaCl 0,15 M, centrifugadas (3.000 x g) e determinado o número de células vermelhas em

relação ao volume total (hematócrito), de acordo com a metodologia descrita por KABATT & MAYER (1967). No caso de tratamento enzimático, as hemácias foram suspensas em solução de NaCl 0,15 M contendo cada enzima proteolítica (0,1 mg de enzima para cada 10 ml de hemácias a 2%). As suspensões foram incubadas a 20 ° C por 1 hora com agitações ocasionais e, a seguir, lavadas sete vezes com solução de NaCl 0,15 M gelada. Após centrifugação (3.000 x g), as células foram suspensas em NaCl 0,15 M para uma concentração final de 2 %.

3.5. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DA LECTINA DE SEMENTE DE *CANAVALIA AFF. BOLIVIANA*. POR AÇÚCARES

Foram preparadas soluções 1,0 M (em NaCl 0,15 M) dos açúcares α -metil, xilose, glicose, manose, GlicNac., lactose e galactose, que foram diluídas em séries ($\frac{1}{2}$) em NaCl 0,15 M, contendo CaCl₂ 5,0 mM e MnCl₂ 5,0 mM. Inicialmente foram adicionados, a cada tubo, 200 μ l da salina. Igual volume de solução inicial (1,0 M) de açúcares foi adicionado ao primeiro tubo de cada série de diluição. Após as diluições, foram adicionados, a cada tubo, 200 μ l de uma solução do extrato total com concentração equivalente ao último título de hemaglutinação. Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos e depois deixados em repouso por mais 30 minutos. Após este período, foram adicionados 400 μ l das suspensões de hemácias (a 2%) de coelho e humanas. Foi feita uma nova incubação, em igual temperatura e período. Após 30 minutos de repouso à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 2.000 x g, por 30 segundos, e os títulos de hemaglutinação determinados como descrito no item 3.4.

3.6. PREPARAÇÃO DE IGG DE COELHO CONTRA LECTINA DE *CANAVALLIA* *AFF. BOLIVIANA*

O antissoro contra lectina de *Canavalia aff. boliviana* utilizado nos experimentos imunoquímicos foi obtido conforme protocolo descrito por CAVADA (1980) e MOREIRA & CAVADA (1984).

Um coelho albino adulto foi sensibilizado com a lectina de *Canavalia aff. boliviana*. Inicialmente foram injetados por via intramuscular 10 mg de lectina liofilizada dissolvidos em 0,5 ml de NaCl 0,15 M e 0,5 ml de adjuvante completo de Freund.

A primeira dose de reforço (1 mg de lectina dissolvido em 1 ml de NaCl 0,15 M) foi aplicada por via subcutânea após 7 dias. Decorridos 15 dias após o primeiro reforço foi feita a primeira sangria na orelha e um reforço igual ao anterior, repetindo-se este protocolo em intervalos de 7 dias, até a obtenção de quantidade suficiente de antissoro.

O sangue obtido em cada sangria foi incubado a 37°C por uma hora e o soro obtido centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos. Os soros obtidos foram mantidos congelados até o isolamento de IgG.

3.7. ISOLAMENTO DE IGG DE ANTISORO DE COELHO IMUNIZADO COM LECTINA DE *CANAVALIA AFF. BOLIVIANA*

Os soros obtidos nas sangrias (item 3.6) foram reunidos e precipitados com sulfato de amônio a 33% de saturação. Após repouso de 24 horas sob refrigeração, foram centrifugados a 15.000 x g por 20 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi ressuspenso em água e dialisado extensiva e alternadamente contra ácido acético 0,05 M pH 5,0 e água destilada. Após uma última diálise contra tampão acetato, foi realizada uma centrifugação a 15.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado em coluna de DEAE - Sepharose equilibrada com tampão acetato. O pico não retido, eluído com o mesmo tampão foi coletado, dialisado contra água, liofilizado e acondicionado em frasco hermeticamente fechado, para ser utilizado em experimentos de imun química.

3.8. IMUNODIFUSÃO

Foi usado o método de imunodifusão dupla de Ouchterlony descrito por CLAUSEN (1969). Uma preparação de agarose a 1% (em NaCl 0,15 M) contendo 0,02% de azida sódica foi fundida e montada em lâminas de microscópio sobre superfície nivelada. Após a solidificação, foi feito um orifício central e orifícios radiais equidistantes com auxílio de um furador de 2,5 mm de diâmetro.

No orifício central foram aplicados 5,0 µl de uma solução das lectinas de *Canavalia aff. boliviana* e de *C. brasiliensis* (1 mg/ml) em NaCl 0,15 M, e nos

orifícios radiais diluições de uma solução 60 mg/ml de anticorpo contra lectina de *Canavalia* aff. *boliviana*. Outras lâminas foram montadas inversamente, isto é, no orifício central o anticorpo e nos orifícios radiais diluições das lectinas. Após incubação em câmara úmida por 48 horas, as lâminas foram lavadas em NaCl 0,15 M contendo azida sódica a 0,02% por 48 horas, com diversas trocas. O NaCl 0,15 M foi eliminado pela imersão das lâminas em água destilada, trocada várias vezes durante 24 horas. O gel de agarose foi colocado em estufa a 37°C e corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,005% por alguns minutos. O excesso de corante foi removido com a mesma solução descorante utilizada para geis de SDS-PAGE (item 4.2).

3.9. ISOLAMENTO DAS LECTINAS DE SEMENTES DE *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA*.

O isolamento da lectina de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* foi realizado de acordo com procedimento experimental descrito por MOREIRA & CAVADA (1984).

A farinha fina das sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* foi submetida a extração com solução de Tris-HCl pH 7,6 NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ e MnCl₂ 5,0 mM (1:10, m/v), por 12 horas à temperatura ambiente sob agitação constante. A mistura foi centrifugada a 16.000 x g por 20 minutos a 4°C, descartado o resíduo, e o sobrenadante, denominado extrato total, aplicado em coluna de Sephadex G-50 (50 x 3 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão de

extração. Após lavagem da coluna com a solução de equilíbrio, até liberação de todo o material não retido ($A_{280} < 0,05$), a lectina foi eluída com solução de glicose 0,1 M, dialisada contra ácido acético 1,0 M por 1 hora e depois contra água destilada por 24 horas com várias trocas, liofilizada e estocada em recipiente hermeticamente fechado, à temperatura ambiente, para usos posteriores.

3.10. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS E 2-MERCAPTOETANOL.

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol foram conduzidos de acordo com o protocolo descrito por LAEMMLI (1970), adaptado para géis montados entre placas de vidro.

Os géis de separação e de aplicação com concentrações finais de poliacrilamida de 15% e 3,5%, respectivamente, foram montados de acordo com o protocolo descrito no QUADRO 1 (para volumes finais de 10 e 5 ml, respectivamente).

As proteínas submetidas à SDS-PAGE (2 mg/ml) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8 contendo SDS 2% (m/v) e 2-mercaptoetanol 5% (v/v) (tampão de amostra), e tratadas a 100° C por 10 minutos. Após resfriadas, foram acrescentados alguns microlitros de azul de bromofenol 0,1% (m/v) e de alguns cristais de sacarose.

QUADRO 1 – PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA

<i>Reagentes</i>	<i>Gel de Separação</i>	<i>Gel de Aplicação</i>
Acrilamida:bisacrilamida (30:0,8%)	5 ml	625 µl
Tris-HCl 3 M pH 8,8	1,25 ml	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	125 ml
SDS 10% (m/v)	100 µl	50 µl
Persulfato de amônio 1,5% (m/v)	500 µl	250 µl
H₂O destilada	3,15 ml	2,82 ml
TEMED	5 µl	5 µl
Volume final	10 ml	5 ml

A corrida eletroforética foi conduzida a uma voltagem constante de 50V usando-se como tampão de corrida Tris 0,025 M pH 8,3 contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v).

Após terminada a corrida, as bandas protéicas foram visualizadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue 0,2% (m/v) em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v). O gel foi descorado com solução de metanol 50% e ácido acético 10% (v/v).

3.11. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Para a determinação da massa molecular da lectina (ConBol pura) foi utilizado o método de MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) em um aparelho Bruker REFLEXTM TOF (tempo de voo). Schimadzu MALDI-I, usando-se ácido α -cano-cinâmico saturado como matriz. A amostra (1,0 μ l) foi misturada com igual volume de ácido 2,5-diidroxibenzóico numa concentração de 10 mg/ml em etanol 10 %, seca à temperatura ambiente e submetida ao espectro de massa sob uma voltagem de aceleração de 20 KV.

3.12. DEGRADAÇÕES PROTEOLÍTICAS

A lectina de *Canavalia aff. boliviana*, na concentração de 2 mg/ml dissolvida em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,6, foi degradada durante 18 horas com as enzimas Asp-C, Elastase, Glu-C, , Quimiotripsina e Tripsina na

relação enzima/substrato de 1:100 (m/m). Após a degradação, os sobrenadantes foram secos em Speed-Vac e em seguida os peptídeos isolados por HPLC.

3.13. ISOLAMENTO DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos, obtidos das degradações enzimáticas, foram separados por HPLC de fase reversa utilizando-se uma coluna Lichrospher RP100 (Merk) 4,6 x 250 mm C18 (partículas de 5 μ m). As amostras foram eluídas a um fluxo de 1 ml/min, com gradientes formados por uma mistura de 0,1 % de ácido trifluoroacético em água (solução A) e acetonitrila (solução B).

3.14. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

Os peptídeos da lectina de *Canavalia* aff. *boliviana* isolados por HPLC foram submetidos a hidrólise em ampolas seladas a vácuo com HCl 6 N, a 110 ° C, por aproximadamente 15 horas. A composição das amostras foi determinada em analisador de aminoácidos Pharmacia Alpha Plus.

3.15. SEQÜENCIAMENTO DE AMINOÁCIDOS

A seqüência de aminoácidos dos peptídeos obtidos das diferentes degradações enzimáticas e dos fragmentos foi realizada pelo método automático de Edman em um aparelho Applied Biosystem Procise, seguindo as especificações do fabricante. Após sobreposição dos peptídeos seqüenciados, obteve-se a seqüência completa da subunidade intacta α e dos fragmentos β e γ . A seqüência

completa da lectina de sementes de *Canavalia aff. boliviana* foi alinhada com seqüências já determinadas de outras lectinas de sementes de espécies da sub-tribo Diocleinae, a fim de se determinar o grau de homologia existente entre estas lectinas.

3.16. ISOLAMENTO DE DNA

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens de *Canavalia aff. boliviana*, utilizando-se o reagente CTAB 2X (Brometo de CetilTrietilAmônio) de acordo com a metodologia descrita em SAMBROOK *et al* (1989).

Cerca 0,5 g de folhas jovens foram colocados em um gral contendo nitrogênio líquido e macerados com auxílio de um pistilo. Após evaporação do nitrogênio, o pó obtido foi transferido para um tubo Falcon contendo 6,0 ml do reagente CTAB 2X em NaCl 1,4 M (contendo 2-mercaptoetanol 2% v/v), previamente aquecido a 60° C. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada durante 1,0 h. Após esse período, foi adicionado 1,0 volume de clorofórmio : álcool isoamil (25:1 v/v). Após inversão (10 a 20 vezes), as duas fases (aquosa e orgânica) foram separadas por centrifugação a 3.500 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente (centrífuga-Beckman GS-6R).

O DNA presente na fase aquosa (superior) foi transferido para um tubo limpo e precipitado pela adição de 2/3 do volume com isopropanol 100%. O precipitado foi coletado por centrifugação (3.500 rpm, 5 min.), lavado com etanol a 70 % e ressuspensão em tampão TE pH 8,0.

A quantificação do DNA foi realizada pela medida de A_{260} em um espectrofotômetro Incibrás MF 00 UV/VIS. Uma solução de DNA, numa concentração de $50\mu\text{g/ml}$ possui uma A_{260} de 1,0. A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

3.17. ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE A PH NEUTRO

As eletroforeses de DNA em gel de agarose foram realizadas de acordo com o protocolo descrito em SAMBROOK *et al* (1989). A agarose foi misturada ao tampão TBE 0,5 X a 1,0 % (m/v). A mistura foi levada a uma fonte de aquecimento até completa fusão. Quando a temperatura atingiu aproximadamente 60°C , foi adicionado brometo de etídio numa concentração final de $0,5\mu\text{g/ml}$ e, logo após, aplicada numa cuba para solidificação à temperatura ambiente.

Nas amostras submetidas às corridas eletroforéticas foram adicionados, previamente, 1/5 de seu volume uma solução de azul de bromofenol 0,25% (m/v) em glicerol 30% (v/v) e tampão TE (Tris-HCl/EDTA) a pH 8,0. As eletroforeses foram realizadas com o gel submerso em TBE 0,5 X contendo brometo de etídio a $0,5\mu\text{g/ml}$, a uma voltagem constante de 150 Volts, até o azul atingir 2/3 do comprimento total do gel. Após a corrida, as bandas foram visualizadas com luz UV (302nm) em transiluminador. Marcadores de pesos moleculares foram utilizados de acordo com tamanho da mostra analisada.

3.18. AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA* POR REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR)

O fragmento de DNA correspondente ao gene da lectina da *Canavalia* aff. *boliviana* foi amplificado por PCR usando-se como substrato o DNA genômico isolado de folhas jovens. Os oligonucleotídeos utilizados como “primers” correspondentes às extremidades 5’ e 3’ foram construídos de acordo com a sequência primária da ConBr:

Oligonucleotídeo complementar à extremidade 5’(fita senso): CCG
GAA TTC ATG GCC ATC TCA AAG AAA TC

Oligonucleotídeo complementar à extremidade 3’: TGC TCT AGA
TCA AAC CAC GGT AGC AAT

Deste modo, em um tubo estéril foram misturados os componentes descritos no QUADRO 2.

Após a adição de todos os componentes, os tubos foram colocados em um aparelho PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc., programado para 35 ciclos de acordo com o esquema representado no QUADRO 3.

QUADRO 2 – PROTOCOLO DA PCR UTILIZADA NA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO CORRESPONDENTE AO GENE CONBOL

Tampão de reação 10 X*	5,0 µl
Mistura de dNTPs 1,25mM cada	10,0 µl
Primer 5'	1,0 µl
Primer 3'	1,0 µl
DNA genômico	5,0 µl
H2O	27,5 µl
Taq DNA polimerase	0,5 µl (2,5 unidades)
Volume Final	50,0 µl

*Tris-HCl 100mM pH 9,0, MgCl₂ 15mM e KCl 500mM.

QUADRO 3 - ESQUEMA DOS CICLOS DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO
CORRESPONDENTE AO GENE DA CONBOL

	Temperatura (oC)	Tempo (min.)
1º Ciclo		
Desnaturação	94	3,0
Anelamento	45	2,0
Extensão	72	3,0
2º ao 34º Ciclos		
Desnaturação	94	1,0
Anelamento	45	2,0
Extensão	72	3,0
35º Ciclo		
Desnaturação	94	1,0
Anelamento	45	2,0
Extensão	72	7,0

Após o último ciclo, as amostras foram estocadas a 4° C, quando não utilizadas imediatamente. Para a análise do produto da reação, foram retiradas alíquotas de 20 µl que foram submetidas a eletroforese em gel de agarose, como descrito em 3.13.

3.19. CLONAGEM DO GENE DA LECTINA DE *CANAVALIA AFF. BOLIVIANA*.

3.19.1. LIGAÇÃO DO PRODUTO DA *PCR* AO VETOR.

Para se obter a clonagem, um pedaço do gel contendo o fragmento de DNA amplificado, como descrito no item anterior, foi cortado utilizando-se um bisturi estéril e o DNA foi purificado da agarose utilizando-se o kit "Nucleotrap" (de acordo com as recomendações do fabricante) sendo, posteriormente, recuperado em 50 µl de TE pH 8,0 e estocado a 4° C até ser utilizado. Como vetor de clonagem foi utilizado o plasmídeo pUC18. As reações de ligações foram preparadas com proporções vetor x DNA purificado, que variaram de 2,5 µl a 12,5 µl levando os componentes descritos no QUADRO 4.

Após a mistura, as amostras foram incubadas num termociclador (15° C) durante a noite, sendo depois estocada a 4° C até uso posterior. Como controle foram incluídos: uma reação sem produto de PCR e uma outra reação sem o vetor.

QUADRO 4 - REAÇÃO DE LIGAÇÃO

Reagentes	Volume
Tampão 10X*	2,0 µl
pUC 18	X
Produto da PCR (purificado)	Y
T4 DNA ligase	1,0 µl
H2O	1,0 µl
Volume Total	20,0 µl

* Tris-HCl 60 mM, pH 7,5, MgCl₂ 60 mM, NaCl 50 mM, BSA 1,0 mg/mL, 2-mercaptoetanol 70 mM, ATP 1,0 mM, DTT 20 mM e espermidina 10 mM.

3.19.2. PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES DE *ESCHERICHIA COLI*

A preparação de células competentes de *E.coli* DH 5 α foi realizada pelo tratamento com cálcio como descrito em SAMBROOK *et al.* (1989).

Uma colônia de DH 5 α foi inoculada em 5,0 ml de meio líquido LB (Luria-Bertani), esterilizado por autoclavagem (127°C por 20 minutos a 15 lb/pol²), sob agitação constante (180 rpm) a temperatura ambiente, durante a noite. No dia seguinte, uma alíquota de 1,5 ml da cultura “overnight” foi expandida num erlhenmyer contendo 100 ml de meio LB líquido até uma OD₆₀₀ entre 02-03. Após a leitura, as células foram coletadas por centrifugação (3.500 rpm, 15 minutos, a temperatura ambiente) e ressuspensas em 20 ml de CaCl₂ 50 mM, gelado. A suspensão foi incubada no gelo por 30 minutos. Após esse período, as células foram, novamente, coletadas por centrifugação nas mesmas condições anteriores, sendo então ressuspensas em 2,0 ml de CaCl₂ 50 mM, gelado.

3.19.3. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. COLI DH5 α*

Alíquotas de 200 μ l das suspensões de células competentes recém preparadas foram dispensadas em tubos, aos quais foram adicionados 10 μ l de cada mistura de reação de ligação, além do controle (10 μ l de água destilada). Após homogeneização, os tubos foram incubados no gelo por 30 minutos e, imediatamente, transferidos para um banho-maria (regulado a 42° C) durante 3,0

minutos. Logo após esse período, as amostras foram incubadas no gelo. A seguir, foram adicionados, em cada tubo, 800 µl de meio LB sem antibiótico. Os tubos foram incubados em banho-maria regulado a 37° C por 01:30h. Após a transformação, foram plaqueados 200 µl de cada cultura em placas de meio LB ágar contendo ampicilina (100 µg/ml) e, previamente, tratada com 50 µl de uma solução estoque de X-Gal 20 mg/ml em N,N-dimetilformamida. As placas foram deixadas em posição normal durante 20 minutos para que a cultura pudesse se difundir uniformemente no meio. Em seguida, foram incubadas, em posição invertida, numa estufa regulada a 37° C por aproximadamente 18h, quando as colônias atingiram entre 1-2mm de diâmetro. Assim, as colônias que têm o plasmídeo contendo o inserto são brancas (recombinantes) enquanto que aquelas com plasmídeo sem o inserto são azuis.

3.19.4. SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES

Para se testar a validade da transformação, foram escolhidas 10 colônias brancas (recombinantes) da placa L4 (vetor 2:1 DNA genômico.) ao acaso, das quais, foram feitas preparações analíticas de plasmídeos. Aliquotas destas soluções contendo o vetor-gene ConBol foram submetidas a PCR usando-se os mesmos “primers” da amplificação do gene da ConBol. Da solução de plasmídeo que apresentou a banda eletroforética (produto da PCR) mais forte foi feita a confirmação da presença do inserto (gene ConBol) pela digestão do DNA do plasmídeo com as enzimas de restrição EcoRI e XbaI com subsequente análise por eletroforese em gel de agarose. Ao final foram selecionados 5 clones cujas

cepas foram estocadas numa geladeira em meio LB e glicerol. Sequenciamento do gene da lectina de *Canavalia aff. bolivina*

4 - RESULTADOS

4.1. LEVANTAMENTO DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE EM DIFERENTES EXTRATOS PROTÉICOS DE FARINHA DE SEMENTES DE *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA*

A TABELA 4 mostra um resumo dos resultados de atividade hemaglutinante específica em extratos de farinha de sementes de *Canavalia* aff. *Boliviana*, onde se constata que os extratos, independentemente do pH de extração, aglutinam melhor hemácias de coelho e que, entre as hemácias humanas do sistema ABO, somente aquelas tratadas com bromelaína foram aglutinadas. Estes resultados, per si, reforçam a possibilidade de que as sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* possam possuir mais de uma lectina.

4.2. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DE EXTRATO DE FARINHA DE SEMENTES DE *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA*

Baseando-se nos resultados de levantamento da atividade hemaglutinante apresentados na TABELA 4, realizou-se ensaios de inibição da atividade hemaglutinante (tanto contra hemácias de coelho como contra hemácias humanas do sistema ABO) do Extrato Protéico a pH 7,6 com o intuito de se determinar a especificidade por carboidratos da(s) lectina(s) presente(s) na farinha de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana*. Os resultados, apresentados na TABELA 5, indicam claramente que a atividade hemaglutinante contra hemácias de coelho e a atividade hemaglutinante contra hemácias humanas do tipo O foram

TABELA 4 - ESPECIFICIDADE ERITROCITÁRIA DE EXTRATOS DE SEMENTES MADURAS DE *CANAVALLIA* AFF. *BOLIVIANA* PIPER.

Hemácias (2%)	Tratamento	UH/mgP*		
		PH 2,6	PH 7,6	PH 9,0
Coelho	Normal	692,33	349,49	343,41
	Bromelaína	86,74	43,69	42,93
	Papaína	1.384,65	698,98	686,81
	Tripsina	692,33	174,75	171,70
Humanas				
Tipo A	Normal	S.A.**	S.A.	S.A.
	Bromelaína	648,96	1.133,80	1.902,66
	Papaína	S.A.	S.A.	S.A.
	Tripsina	S.A.	S.A.	S.A.
Tipo B	Normal	S.A.	S.A.	S.A.
	Bromelaína	33,97	32,63	46,48
	Papaína	S.A.	S.A.	S.A.
	Tripsina	S.A.	S.A.	S.A.
Tipo O	Normal	S.A.	S.A.	S.A.
	Bromelaína	5.823,23	2.305,94	1.736,97
	Papaína	S.A.	S.A.	S.A.
	Tripsina	S.A.	S.A.	S.A.

* Atividade hemaglutinante específica

** S.A.: nenhuma aglutinação foi observada

TABELA 5 - ESPECIFICIDADE DA LECTINA DE SEMENTE DE CANAVALLIA AFF. BOLIVIANA POR AÇÚCARES SIMPLES. CONCENTRAÇÃO MÍNIMA (mM) REQUERIDA PARA INIBIR UMA UNIDADE DE HEMAGLUTINAÇÃO).

Açúcar	Tipo de Hemácia			
	A ¹	B ¹	O ¹	Coelho ²
Glicose	15,62	15,62	31,25	62,50
GlicNac	31,25	31,25	31,25	62,25
Manose	3,9	3,9	250	125
Galactose	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.
Lactose	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.
Xilose	S.I.	S.I.	S.I.	S.I.

¹ - Hemácias previamente tratadas com bromelaína

² - Hemácias nativas

melhor inibidas por glicose (Gli) e N-acetil-glicosamina (GlicNac), enquanto que a atividade hemaglutinante contra hemácias humanas do tipo A e B, foram melhor inibidas por manose (Man) e Glicose (Gli). Estes resultados reafirmam, definitivamente que as sementes de *Canavalia aff boliviana* contém pelo menos duas lectinas com especificidades diferentes por carboidratos.

4.3. ISOLAMENTO DA LECTINA DE FARINHA DE SEMENTES DE *CANAVALLIA AFF. BOLIVIANA* POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE SEPHADEX G-50

O Extrato Protéico a pH 7,6, quando aplicado em uma coluna de Sephadex G-50, equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5mM, apresentou o cromatograma representado na FIGURA 3, onde se observa dois picos. O Pico I, não retido na coluna e eluído com a solução de equilíbrio e sem atividade hemaglutinante contra hemácias humanas do sistema ABO e ativo contra hemácias de coelho e Pico II, retido na coluna, ativo tanto contra hemácias de coelho como contra hemácias humanas do sistema ABO e só eluído com a solução de equilíbrio contendo Glicose 0,1 M ou com tampão Glicina-HCl 0,1 m, pH 2,6 , contendo NaCl 0,15 M. Estes resultados confirmam definitivamente a presença de mais de uma lectina na farinha de sementes de *Canavalia aff boliviana*. O presente trabalho, entretanto, passou a enfocar, a partir de então, somente a lectina que interagiu com a Sephadex G-50, sendo que a segunda lectina deverá ser objeto de outro estudo.

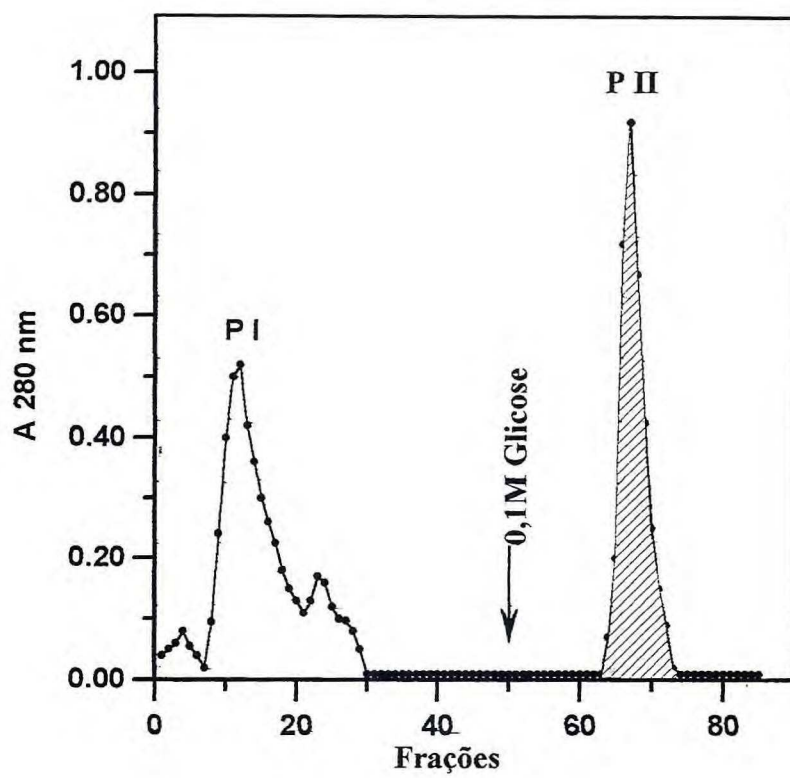


FIGURA 3 - CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM SEPHADEX G-50 DE *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA*. P I - PICO NÃO RETIDO. P II - PICO RETIDO.

4.4. PERFIL ELETROFORÉTICO (ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS E DE 2-MERCAPTOETANOL) DA LECTINA DE FARINHA DE SEMENTES DE *CANAVALLIA* AFF. *BOLIVIANA*

O Pico 2, retido em Sephadex G-50, após diálise exaustiva contra água e liofilização, e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol, apresentou o perfil eletroforético mostrado na FIGURA 4, onde se observa a presença de 3 bandas protéicas: a banda principal com massa molecular aparente de 29-30 kDa (chamada de subunidade α); uma Segunda banda protéica com massa molecular aparente de 16-18 kDa (denominada de subunidade β); e uma terceira banda protéica de massa molecular aparente de 10-12 kDa (denominada de γ). Este perfil eletroforético é característico das lectinas glicose/manose de outras espécies da sub-tribo Diocleinae e já foi observado para outras lectinas do mesmo grupo como as lectinas ConA, de sementes de *Canavalia ensiformis* (CARRINGTON, *et al.*, 1985), ConBr de sementes de *Canavalia brasiliensis* (CAVADA, 1980), DGL de sementes de *Dioclea grandiflora* (AINOUZ *et al.*, 1987), Dgui de sementes de *Dioclea guianensis* (VASCONCELOS *et al.*, 1991), CFL de sementes de *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991), Dros de sementes de *Dioclea rostrata* (CAVADA *et al.*, 1996a), Dvir de sementes de *Dioclea virgata* (CAVADA *et al.*, 1996b), CABO de sementes de *Canavalia bonariensis* (CAVADA *et al.*, 1996). Na verdade, para várias destas lectinas, as cadeias β e γ são, de fato, as duas metades da cadeia α intacta da respectiva lectina, como já demonstrado por

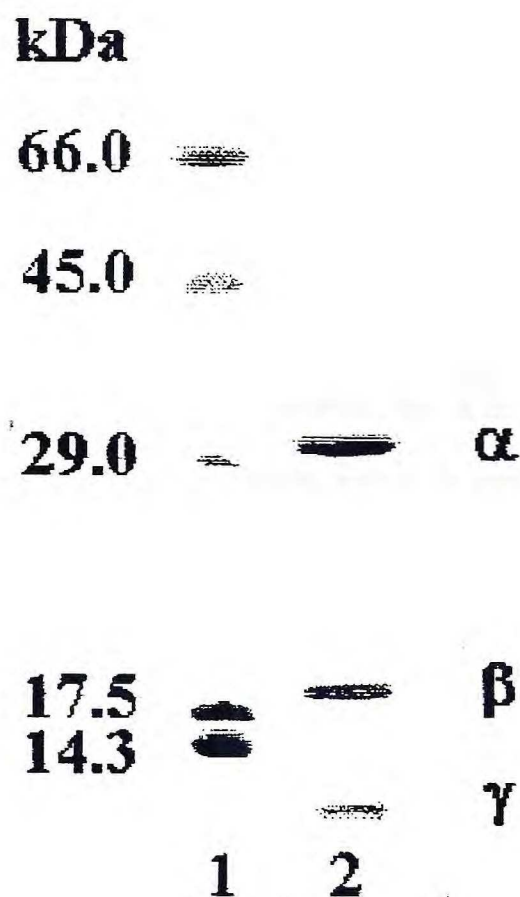


FIGURA 1 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 12,5% EM CONDIÇÕES DESNATURANTES DA AMOSTRA DA LECTINA DE *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA* PURIFICADA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE SEPHADEX G-50. POÇO 1 - MARCADORES MOLECULARES. POÇO 2 - AMOSTRA DA LECTINA DE *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA* (CORRESPONDENTE AO PICO II).

sequenciamento de todas as cadeias das lectinas ConA (CARRINGTON *et al.*, 1985), DGL (AINOUZ *et al.*, 1987), CFL (GRANGEIRO *et al.*, 1997), ConBr (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997), Dgui e Dvir (CALVETE *et al.*, 1998).

4.5. CARACTERIZAÇÃO DA LECTINA DE FARINHA DE SEMENTES DE *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA*

4.5.1. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

A análise da composição de aminoácidos da lectina de *Canavalia* aff. *boliviana* (TABELA 6) revela que a lectina é rica em aminoácidos hidroxilados (SER e THR) e em aminoácidos ácidos (GLU e ASP), pobre em aminoácidos sulfurados e destituída de Cisteína. Estes resultados estão compatíveis com aqueles obtidos para outras lectinas de espécies da sub-tribo Diocleinae.

4.5.2. PESO MOLECULAR POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

As massas moleculares dos fragmentos β e γ e da subunidade intacta α , determinadas por espectrometria de massa tipo ESI (electrospray ionization), foi de 12876 ± 2 Da (fragmento β), 12707 ± 4 Da (fragmento γ) e de 25565 ± 4 Da para a subunidade intacta α . Estes resultados estão de acordo com aqueles determinados para outras lectinas de espécies da mesma sub-tribo Diocleinae como ConBr (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997), Dgui e Dvir (CALVETE *et al.*, 1998).

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA LECTINA DE SEMENTES DE *CANAVALLIA* AFF. *BOLIVIANA* (C.spL) E DE OUTRAS LECTINAS DE ESPÉCIES DA SUB-TRIBO *DIOCLENAE*.

Amino ácidos	C.spL Nmol%	Resíduos/ mol	Lectinas				
			ConA (a)	ConM (b)	DGL (c)	DLL (d)	CFL (e)
ASX (ASP)	15.4	36.5	32	31	31	33	25
GLX (GLU)	5.9	14.0	12	10	13	9	13
CYS	-	-	-	-	-	1	-
SER	11.1	26.3	31	29	33	30	28
GLY	10.0	23.7	16	17	17	17	30
HIS	1.6	3.8	6	6	4	4	3
THR	8.0	19.0	19	21	18	22	16
ALA	7.8	18.5	19	18	18	18	22
PRO	4.8	11.4	11	11	11	12	7
ARG	3.0	7.1	6	6	7	9	8
TYR	3.0	7.1	7	7	7	7	16
VAL	5.7	13.5	16	17	16	17	17
MET	0.1	0.2	2	2	1	1	-
ILE	6.2	14.7	15	10	14	15	13
LEU	7.3	17.3	18	17	18	17	16
PHE	4.7	11.1	11	10	11	11	8
LYS	5.3	12.6	12	9	12	9	10
TRP	n.d.	n.d.	4	4	5	3	5

n.d. : não determinado

(-) Não detectado

(a). Adaptado de CARRINGTON *et al.*

(b). Adaptado de PEREZ *et al.*

(c). Adaptado de RICHARDSON *et al.*

(e). Adaptado de OLIVEIRA *et al.*

4.5.3. ESTUDOS IMUNOQUÍMICOS

Os experimentos imunoquímicos demonstraram que a lectina de *Canavalia aff. boliviana* parece apresentar uma homologia completa com a lectina glicose-específica de sementes de *Canavalia brasiliensis* bem como com a lectina de sementes de *Dioclea* uma vez que os arcos de precipitação se mostraram uniformes (FIGURA 5).

4.5.4. SEQÜÊNCIA PRIMÁRIA DA LECTINA DE FARINHA DE SEMENTES DE CANAVALLIA AFF. BOLIVIANA

A FIGURA 6 representa a seqüência completa da subunidade intacta α e dos fragmentos endógenos β e γ , juntamente com as seqüências dos diferentes peptídeos utilizados para a obtenção das mesmas. A cadeia intacta α é composta de 237 resíduos de aminoácidos, enquanto que o fragmento β é composto de 118 resíduos de aminoácidos e o fragmento γ , de 119 resíduos de aminoácidos e os fragmentos correspondem, respectivamente a primeira e a segunda metade da cadeia intacta, respectivamente.

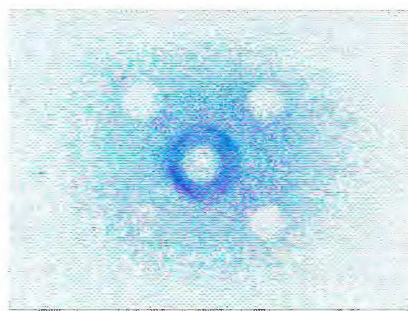
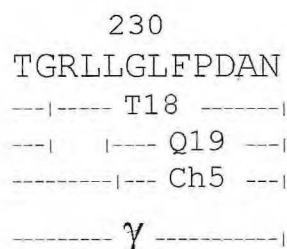
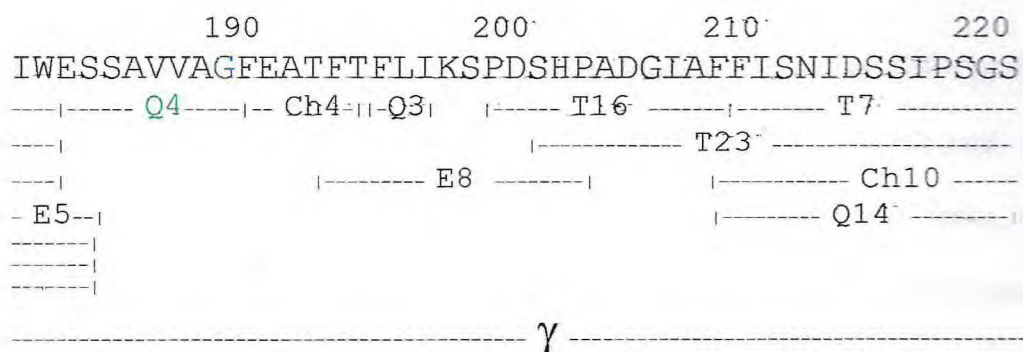
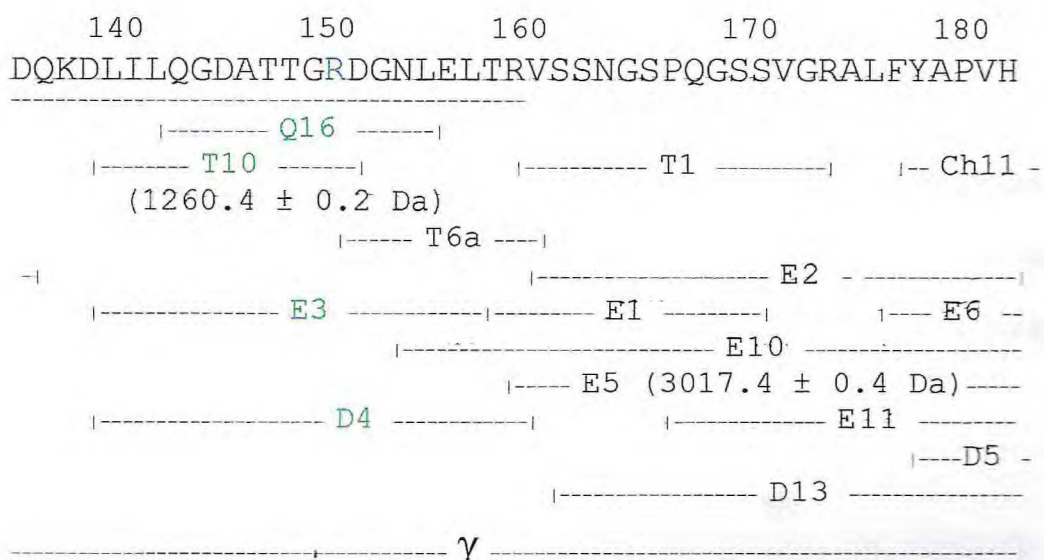


FIGURA 5 – IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA DE OUCHTERLONY UTILZANDO-SE IGG DE COELHO ANTI-LECTINA DE CONBR. NO POÇO CENTRAL FORAM APLICADOS 7 μ L DE IGG DE COELHO ANTI-LECTINA DE CONBR (30 MG/ML). NOS POÇOS RADIAIS FORAM APLICADOS 7 μ L DE SOLUÇÕES DE LECTINAS NAS SEGUINTE CONCENTRAÇÕES: POÇOS 1 E 3 – LECTINA DE *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA* (1 MG/ML); POÇO 2 – LECTINA DE *CANAVALIA* *BRASILIENSIS* (1 MG/ML); POÇO 4 – LECTINA DE *DIOCLEA* *GRANDIFLORA* (1 MG/ML).

1 10 20 30 40
 ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNG
 |----- N-terminal sequencing -----| Q5---
 |----- T22 -----| |--- T4 ---
 |----- Q17---|
 |----- Ch13 -----|----- Ch1 -----|
 |--- D2---|--- D1 ---|--- D6-----|
 |----- β (12876 \pm 2 Da) -----|

50 60 70 80 90
 KVGTAHIIYNSVGKRLSAVVSYPNGDSATVSYDVDLDNVLPWVR
----- T9-----	----- T24-----	
-----		----- Ch14-----
-----		----- Ch12 -----
-----		--- D8 -
----- β -----		

100 110 120 130
 VGLSATTGLYKETNTILSWSFETSKLKSNSHETNALHFEMFNQFSK
 |---Q12 ---| |--- Q1---| | N-terminal sequencing-
 |----- Q13 -----|
 |----- T12 -----|----- T15 -----| |--- T6b ---|----- T20 -----|
 (1108.5 \pm 0.5 Da)
 |---Q4---|
 |----- Ch2 -----| |----- T19 -----| |----- T21 -----|
 |----- T13 -----|
 |----- E4 -----| |----- E9 -----|
 |----- D8 -----|
 |----- γ (12707 \pm 4 Da) -----|



$$\alpha (25565 \pm 4 \text{ Da}) = [\beta (12876 \pm 2 \text{ Da}) + \gamma (12707 \pm 4 \text{ Da}) - 18 \text{ Da}]$$

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CADEIA α , E DOS FRAGMENTOS β E γ DA LECTINA DE *CANAVALLIA* AFF. *BOLIVIANA*. **T**: OS PEPTÍDEOS FORAM OBTIDOS POR HIDRÓLISE DA LECTINA COM TRIPSINA; **Ch**: COM QUIMIOTRIPSINA; **Q**: COM GLU.C; **D**: COM ASP.C E **E**: COM ELASTASE.

4.6. HOMOLOGIA DA SEQÜÊNCIA DA LECTINA DE FARINHA DE SEMENTES DE *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA* COM AS SEQÜÊNCIAS DE OUTRAS LECTINAS DA SUB-TRIBO *DIOCLEINAE*

A seqüência primária completa da ConBol comparada com as seqüências primárias de espécies do gênero *Canavalia*, *Dioclea* e com a *Cratylia floribunda* apresentou um alto grau de homologia e diferenças pontuais, FIGURA 7.

4.7. CLONAGEM DO GENE DA LECTINA DE FARINHA DE SEMENTES DE *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA*

A utilização do reagente CTAB 2X para obtenção de DNA genômico a partir de folhas jovens de *Canavalia* aff. *boliviana* mostrou-se eficiente. O seu perfil eletroforético em gel de agarose a 1% apresentou uma única banda (FIGURA 8) com peso molecular em torno de 23 Kb, o que representa uma boa integridade do DNA.

Este DNA genômico foi utilizado como substrato para a amplificação do gene da lectina da ConBol por PCR, com descrito no item 3.18. Após o último ciclo de amplificação, os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% onde foi constatado um único fragmento de DNA com peso molecular em torno de 873 pb (FIGURA 9), poços 3, 4 e 5. Dois controles foram adicionados para se verificar a especificidade da reação: um

CONBR ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHI IYNSVGKR
 CBOL ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHI IYNSVGKR
 CANGI ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHI IYNSVGKR
 CONA ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHI IYNSVDR
 CANVI ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHI IYNSVGKR
 CANLI ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHI IYNSVGKR
 CANMA ADTIVAVELDTYPNTDVGDPSYPHXXXXXSVRXXX TAKWNMQNGKVGTAHI SYNSVGKR
 CFL ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNYQHIGINIKSIRSKATRWNVQDGKVGTAHI SYNSVAKR
 DLEHM ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKDIRSKATARWNMQNGKVGTAHI SYNSVAKR
 DGRAN ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTKVGTVHI SYNSVAKR
 DGUI ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKKTAKWNMQTKVGTAHI SYNSVAKR
 DVIR ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHI IYNSVGKR
 ***** .***** .*** * * * * * * * . * * .*** * ***** ** ***** **

CONBR LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 CBOL LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 CANGI LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 CONA LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 CANVI LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 CANLI LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 CANMA LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 CFL LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 DLEHM LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 DGRAN LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 DGUI LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 DVIR LSAVVSYPNGDSATVS YDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFSTKLSNST
 *** .*** . * .***** * .***** .***** .*** . *** ** .**

CONBR HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGTDGNLELTRVSSNGSPQGS SVGRALFYAPVH
 CBOL HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGRDGNLELTRVSSNGSPQGS SVGRALFYAPVH
 CANGI HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGTDGNLELTRVSSNGSPQGS SVGRALFYAPVH
 CONA HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGTDGNLELTRVSSNGSPQGS SVGRALFYAPVH
 CANVI HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGTDGNLELTRVSSNGSPQGS SVGRALFYAPVH
 CANLI HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGTDGNLELTRVSSNGSPQGS SVGRALFYAPVH
 CANMA HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGTDGNLXXTRVSSNGSPQGS SVGRALFYAPVH
 CFL ADAQLHFTFNQFSQNPKDLILQGDASTDSDGNLQLTRVS -NGSPQNSVGRALFYAPVH
 DLEHM ADANDLHFSFSQFSQNPKDLILQGDATTDSDGNLSLTRVSSDGS PQGS SVGRALFYAPVH
 DGRAN ADANSLHFSFNQFSQNPKDLILQGDATTDSDGNLELTRVSSSDGDPQNSVGRALFYAPVH
 DGUI ADANSLHFSFNQFSQNPKDLILQGDATTDSDGNLELTRVSSSDGDPQNSVGRALFYAPVH
 DVIR HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGRDGNLELTRVSSNGSPQGS SVGRALFYAPVH
 ... *** * ** . ***** ** * **** * .** * . ***** .*****

CONBR IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
 CBOL IWESSAVVAGFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
 CANGI IWESSAVVASFDATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
 CONA IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
 CANVI IWESSAVVASFDATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
 CANLI IWESSAVVASFDATFTFLIKSSDHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
 CANMA IWESSATVAGFDATFXFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
 CFL VWDKSAVVASFDATFTFLIKSTDSDIADGIAWFIANTDSSIPSGSGRLLGLFPDAN
 DLEHM IWEKSAVVSSFDATFTFLIKSPDRDPADGITFFIANTDSSIPSGSGRLLGLFPDAN
 DGRAN IWESSAVVASFDATFTFLIKSPDHPADGITFFIANTDSSIPSGSGRLLGLFPDAN
 DGUI IWEKSAVVAGFDATFTFLIKSPDRDPADGITFFIANTDSSIPSGSGRLLGLFPDAN
 DVIR IWESSAVVAGFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
 . * . ** * . * .*** ***** * * ** . ** * * .*** ** *****

FIGURA 7 - ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DA LECTINA DE SEMENTES DE *CANAVALLA* AFF. *BOLIVIANA* COM A LECTINA DE *CANAVALLA BRASILIENSIS* (CONBR) E COM OUTRAS LECTINAS DE OUTRAS ESPÉCIES DA SUB-TRIBO *DIOCLEINAE*. (* - AMINOÁCIDOS INVARIÁVEIS; AMINOÁCIDOS EM VERMELHO - DIFEREM DA CONBR).

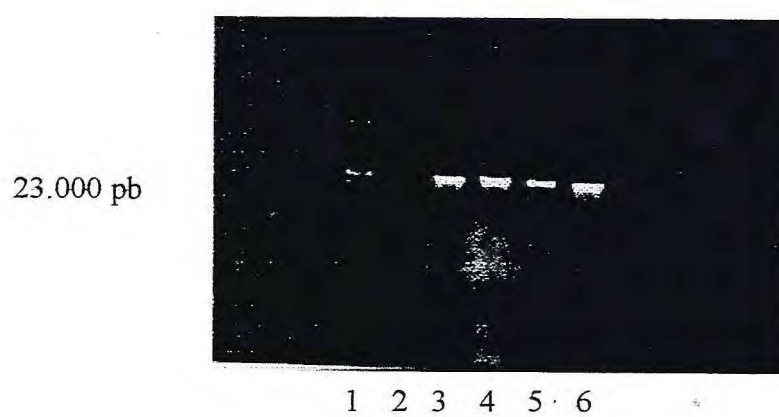


FIGURA 8 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DE DNA GENÔMICO DE *CANAVALLIA* AFF. *BOLIVIANA*. POÇO 1 – MARCADOR MOLECULAR; POÇOS 3, 4, 5 E 6 – DNA GENÔMICO.

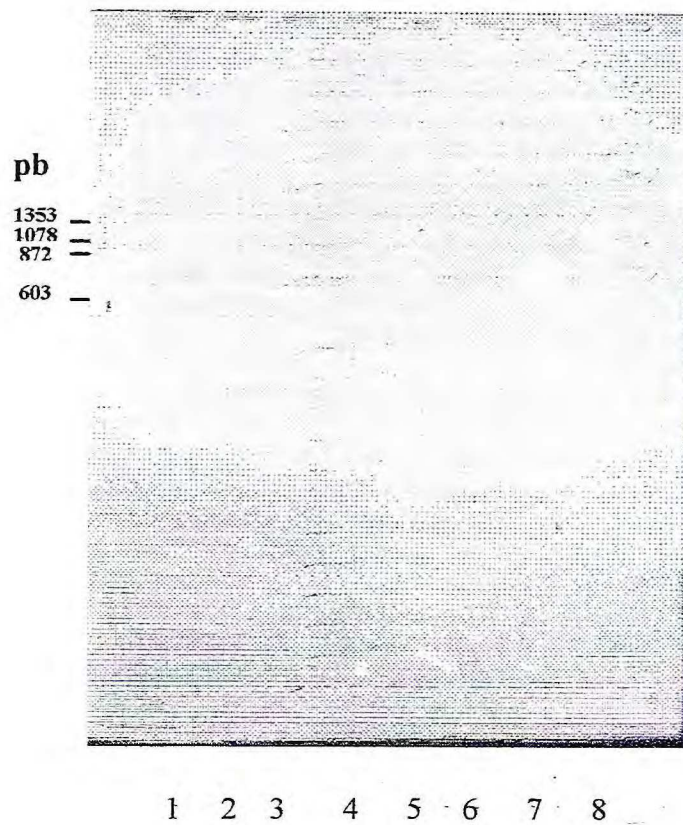


FIGURA 9 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1% DO GENE DA *CANAVALIA* AFF. *BOLIVIANA* APLICADO POR PCR. POÇOS 1 E 8 – MARCADORES MOLECULARES; POÇO 2 – CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA ESTÉRIL); POÇOS 3, 4 E 5 – FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DE CONBOL E POÇO 7 – CONTROLE POSITIVO (FRAGMENTO DO GENE DA CONBR RECOMBINANTE). PB – PARES DE BASES.

controle negativo sem DNA (água estéril), poço 2, que não apresentou nenhuma banda como produto amplificação e um controle positivo, poço 7, tendo como substrato um plasmídeo recombinante contendo o gene da ConBr o qual também apresentou uma única banda de DNA com peso molecular semelhante, com cerca de 870 pb.

O fragmento de DNA genômico amplificado por PCR foi clonado no vetor pUC 18 e a presença do inserto foi confirmada em 5 clones diferentes selecionados ao acaso (FIGURA 10).

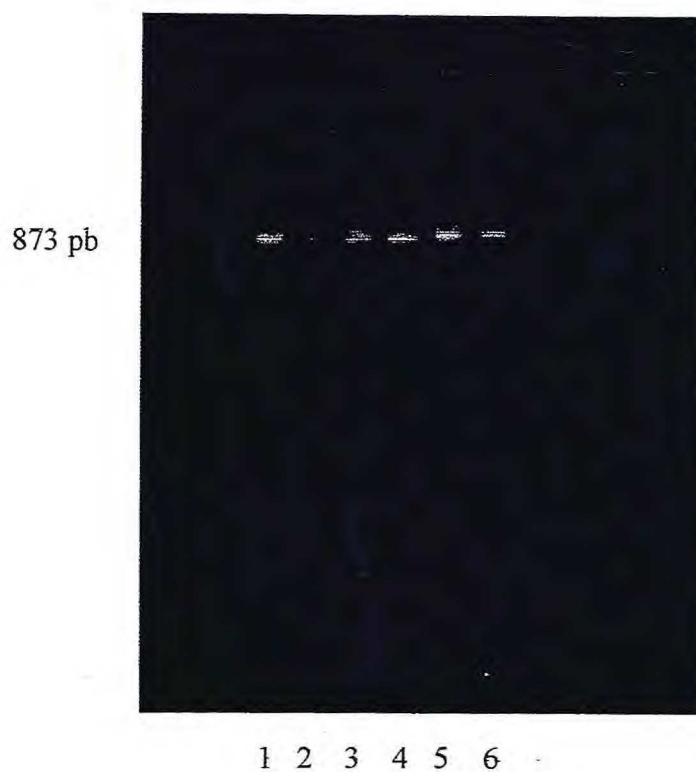


FIGURA 10 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA CONBOL POR PCR A PARTIR DE PREPARAÇÕES ANALÍTICAS DE PLASMÍDEOS DE COLÔNIAS RECOMBINANTES DE *ESCHERICHIA COLI* DH 5 α -PUC 18 – CONBOL. POÇO 1 – MARCADOR MOLECULAR; POÇOS 2, 3, 4, 5 E 6 FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.

5 - DISCUSSÃO

Canavalia aff. *boliviana* é uma leguminosa (família Leguminosae; sub-família Papilionoideae; tribo Phaseoleae; sub-tribo Diocleinae) endêmica da Amazônia, no médio Rio Negro, que tem mostrado todas as características de se constituir em uma nova espécie. O levantamento da presença de atividade hemaglutinante em diferentes extratos protéicos da farinha de sementes revelou a presença de pelo menos 2 lectinas diferentes. Assim, o presente estudo demonstra que estas sementes contém uma lectina glicose/manose específica que pode ser facilmente ser purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 seguindo de perto a metodologia utilizada por CAVADA (1980) para o isolamento da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis*. Estas lectinas, que são chamadas de ConA-like, por serem extremamentes homólogas à Concanavalina A, lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*, merecem ser estudadas por apresentarem atividades e aplicações biológicas bastantes variadas daquelas da ConA (BARRAL-NETTO, 1992; BARRAL-NETTO, 1996; ASSREUY et al., 1997; ASSREUY et al., 1999; ALENCAR et al., 1999; ANDRADE et al., 1999; BARBOSA et al., 2000).

A lectina de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* apresenta um padrão eletroforético típico de lectinas de sementes de espécies da sub-tribo Diocleinae, caracterizado por três bandas protéicas em eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol: uma banda principal de

30 kDa, caracterizando a subunidade intacta α , e duas bandas minoritárias de 16-18 kDa (fragmento β) e de 10-12 kDa (fragmento γ). Este mesmo padrão eletroforético já foi mostrado para as lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis* (CARRINGTON *et al.*, 1985), *Canavalia brasiliensis* (CAVADA & MOREIRA, 1984), *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991), *Dioclea guianensis* (VASCONCELOS *et al.*, 1991), *Canavalia bonariensis* (CAVADA *et al.*, 1996), *Dioclea rostrata* (CAVADA *et al.*, 1996), *Dioclea virgata* (CAVADA *et al.*, 1996) e *Dioclea violacea* (MOREIRA *et al.*, 1996). Como já mostrado para a ConA e para as lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* (SANS-APARICIO *et al.*, 1997), *Cratylia floribunda* (CAVADA *et al.*, 1999) e de *Dioclea guianensis* e *Dioclea virgata* (CALVETE *et al.*, 1999), os fragmentos β e γ constituem, também no caso da lectina de sementes de *Canavalia aff. boliviana* as duas metades da subunidade intacta α . Estes fragmentos, por sua vez, também integram moléculas de lectina ativas.

A lectina de sementes de *Canavalia aff. boliviana* mostrou não ser glicoproteína, uma vez que não foram detectadas porções glicídicas covalentemente ligadas à molécula. Estes resultados estão em conformidade com aqueles obtidos para as lectinas de *Canavalia brasiliensis* (CAVADA & MOREIRA, 1984), *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991), *Dioclea guianensis* (VASCONCELOS *et al.*, 1991), *Canavalia bonariensis* (CAVADA *et al.*, 1996), *Dioclea rostrata* (CAVADA *et al.*, 1996), *Dioclea virgata* (CAVADA *et al.*, 1996) e *Dioclea violacea* (MOREIRA *et al.*, 1996).

A lectina de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana*, quando comparada por imunoquímica com outras lectinas de outras espécies da mesma sub-tribo Diocleinae (*Canavalia*, *Dioclea*, *Cratylia*), apresentou identidade imunoquímica total com as mesmas, indicando que estas lectinas glicose/manose desta sub-tribo apresentam os mesmos epitopos. Tais resultados já foram também evidenciados para outras lectinas do mesmo grupo como ConBr (CAVADA, 1980), Dvir (CAVADA *et al.*, 1996); CABO (CAVADA *et al.*, 1996) e Dros (CAVADA *et al.*, 1996).

O peso molecular da subunidade intacta α e dos fragmentos β e γ estão em concordância com aqueles deduzidos a partir da seqüência primária da lectina de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* (FIGURA 4).

A seqüência primária total da lectina de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* (FIGURA 6) indica que esta proteína se diferencia em 3 resíduos de aminoácidos em relação a estrutura primária da ConBr (posição 96: Thr na lectina de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* e Ser na ConBr; posição 150: Arg na lectina de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* e Thr na ConBr; e posição 191: Gly na lectina de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* e Ser na ConBr). Na posição 96, que é um resíduo de Thr na lectina de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* e em todas as lectinas de sementes de espécies de *Dioclea* já sequenciadas, nas demais lectinas de sementes de espécies de *Canavalia* já sequenciadas e na lectina de *Cratylia floribunda* o resíduo é Ser. Por outro lado, na posição 150, nas demais lectinas de sementes de espécies de *Canavalia* já

sequenciadas o resíduo é Thr e nas lectinas de sementes de espécies de *Dioclea* o resíduo é Ser, com exceção da lectina de sementes de *Dioclea virgata* que, como a lectina de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana*, o resíduo é Arg. Finalmente, na posição 191, enquanto nas lectinas de sementes de *Canavalia* sp. aff. *C.boliviana*, *Canavalia maritima*, *Dioclea guianensis* e *Dioclea virgata* o resíduo é Gly, nas demais lectinas de sementes de espécies de *Canavalia* e de *Dioclea* já sequenciadas e na lectina de *Cratylia floribunda*, o resíduo é Ser. Quando se compara a seqüência primária da lectina ConBr com a da ConA, percebe-se que apenas uma diferença não conservativa na posição 58 (Gly na ConBr e Asp na ConA), faz com que a estabilização da estrutura quaternária da ConBr seja estabilizada por menos uma ponte de hidrogênio em relação a ConA (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997) e isto, provavelmente, explique as diferenças de potência exibidas por estas lectinas em várias atividades biológicas já estudadas (BENTO *et al.*, 1993; RODRIGUEZ *et al.*, 1992; BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; GOMES *et al.*, 1994). Além disto, estudos de ultracentrifugação a diferentes valores de pH (CALVETE *et al.*, 1998) de especificidade fina por ressonância plasmônica de superfície (RAMOS *et al.*, 2000) e de especificidade fina por microcalorimetria (DAM *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2000) tem demonstrado definitivamente que estas lectinas de sementes de espécies de *Diocleinae*, a despeito da alta homologia de seqüência primária que apresentam, são diferentes quando se compara suas especificidades finas em relações a açúcares com diferentes complexidades estruturais.

É importante salientar que, apesar da seqüência primária da lectina de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana* apresentar uma alta homologia de seqüência com a estruturas primárias de outras lectinas de espécies da sub-tribo *Diocleinae*, o que já era esperado, este fato, *per si*, é extremamente elucidatório, já que até hoje persiste a controvérsia de que *Canavalia* aff. *boliviana* ser ou não uma nova espécie de *Canavalia*. De fato, os nossos resultados, invalidam a possibilidade, levantada por alguns sistematas, de que este material é, na realidade, *Canavalia brasiliensis*. Além disto, mesmo a descrição botânica apresentada para *Canavalia boliviana* não se enquadra perfeitamente com a descrição botânica do material coletado na Amazônia. Portanto, nossos resultados reforçam fortemente a hipótese de que tal material se constitua de fato em uma nova espécie de gênero *Canavalia*.

A clonagem do gene de *Canavalia* aff. *boliviana* por PCR a partir do seu DNA genômico extraído de folhas jovens teve como produto um fragmento de comprimento com cerca 873 pb, semelhante aos fragmentos de 870 pb correspondentes aos cDNAs da ConA (CARRINGTON *et al.*, 1985) e ao da ConG (YAMAUCHI *et al.*, 1990), indicando ausência de íntrons no gene da ConBol.

6 - RESUMO DOS RESULTADOS

- 1 - As sementes de *Canavalia aff boliviana* contém uma lectina glicose/manose específica que foi isolada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. Além disto, o levantamento de atividade hemaglutinante contra hemácias (tratadas e não tratadas com enzimas proteolíticas) humanas e de coelho, demonstrou que, provavelmente, as sementes contenham mais de uma lectina;
- 2 - Por imunoquímica, a lectina purificada de sementes de *Canavalia aff boliviana* mostrou ser semelhante a outras lectinas glicose/manose purificadas de outras espécies da sub-tribo Diocleinae, tanto do mesmo gênero *Canavalia* como de outros gêneros como *Dioclea* e *Cratylin*;
- 3 - A lectina glicose/manose purificada de sementes de *Canavalia aff boliviana* mostrou, por estudos de espectrometria de massa, ser composta de uma subunidade intacta α (com 25.565 ± 4 Da) e de dois fragmentos, β (12.876 ± 2 Da) e γ (12.707 ± 4 Da), a exemplo de outras lectinas glicose/manose já estudadas em outras espécies da mesma sub-tribo;
- 4 - A seqüência primária da lectina de sementes de *Canavalia aff boliviana* mostrou alta homologia com as seqüências de outras lectinas de espécies da mesma sub-tribo já sequenciadas, apresentando sempre diferenças pontuais em relação as mesmas; por exemplo em relação a ConBr a lectina de sementes de *Canavalia aff boliviana* se diferencia em 3 resíduos;

- 5 - O fragmento do gene que codifica a lectina de *Canavalia* aff. *boliviana* amplificado por PCR a partir do DNA genômico apresentou o mesmo número de pares de base daquele que codifica a ConBr obtido por cDNA. Isto sugere a ausência de introns nesses genes.

- 6- Finalmente, os dados de estrutura primária da lectina de sementes de *Canavalia* aff *boliviana* são consistentes e suficientes para descartarmos, definitivamente, a possibilidade de que este material, nativo da Amazônia, classifique-se como *Canavalia brasiliensis*.

7 - CONCLUSÃO

O presente trabalho isolou, caracterizou química, físico-química, biológica e estruturalmente e clonou o gene de uma nova lectina glicose/manose de sementes de *Canavalia* aff. *boliviana*. Os resultados indicam contundentemente que, a despeito da controvérsia existente entre diferentes sistemas, o material estudado não é definitivamente *Canavalia brasiliensis*.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINOUZ, I.L., SAMPAIO, A. H., BENEVIDES, N.M.B., FREITAS, A .L.P., COSTA, F.H.P., CARVALHO, M.R. & PINHEIRO-JUVENTINO. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by brazilian marine algal extracts. **Botânica Marina**, v.35, p.475-479, 1992.
- AINOUZ, I.L., MOREIRA, R.A., CAMPOS, F.D.A.P., RICHARDSON, M., BEGBIE, R. STEWART, J.C., WATT, W.P. & PUSZTAI, A. The isolation and amino acid sequence of the β - and γ -subunits of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*, **Phytochemistry**, v.26, n.5, p.1435-1440, 1987.
- ABE, Y., IWABUCHI, M. & ISHIL, S. Multiple forms in the subunit structure of concanavalin A. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.45, n.5, p.1271-1278, 1971.
- ADAR, R., RICHARDSON, M., LIS, H. & SHARON, N. The amino acid sequence of Erytrina corallodendro lectin and its homology with other legume lectins. **FEBS Letter**, v.257, n.1, p.81-85, 1989.
- ALLEN, A.K.. Potato lectin – A glycoprotein with two domains. In: Chemical taxonomy, Molecular biology and Funtion of Plants Lectins. p.71-75, Goldstein, I.J. and Etzler, M.E. eds., Alan R. Liss, Inc., New York, 1983.
- ALLEN, A.K. & NEUBERGER, A.. The purification and properties of the lectin from potato ubers, a hydroxyproline-containing glycoprotein. **Biochem. J.**, v.135, p.307-314, 1973.

- ALENCAR, N. M. N., TEIXEIRA, E. H., ASSREUY, A. M. S., CAVADA, B. S., FLORES, C. A. & RIBEIRO, R. A.. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v.8, p.107-113, 1999.
- ANDRADE, J. L., ARRUDA, S., BARBOSA, T., PAIM, L., RAMOS, M. V., CAVADA, B. S. & BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced NO production. **Celular Immunology**, v.194, n.1, p.98-102, 1999.
- ARANGO, R., ADAR, R., ROZENBLANTT, S. & SHARON, N.. Expression of *Erythrina corallo dendron* lectin in *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.**, v.205, p.575-585, 1992.
- ASSREUY, A. M. S., SHIBUYA, M. S., MARTINS, G. J., SOUZA, M. L. P., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., RIBEIRO, R.A & FLORES, C. A.. Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v.6, p.1-10, 1997.
- ASSREUY, M. S. A., MARTINS, G.J., MOREIRA, M. E. F., BRITO, G. A. C., CAVADA, B. S., RIBEIRO, R. A. & FLORES, C. A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **The Journal of Urology**, v.161, n.6, p.1988-93, 1999.
- BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.M., SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. and CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunological Investigations**, v.21(4):297-303 (1992).

- BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R.L.; TEIXERA, M.; CONRADO DOS SANTOS, W.L.; POMPEU, M.L.; MOREIRA, R.A.; OLIVIERA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; FALCOFF, E. and BARRAL, A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, v.60: 237-250 (1996).
- BARBOSA, T. A., CAVADA, B. S., RODRIGUES, L. A., GRANGEIRO, T. B. & BARRAL NETO, M. Lymphocyte activation and apoptosis induction in BALB/c mice treated with plant lectins. **Celular Immunology**, 2000.
- BARRE, A., LAUGA, J. & ROUGÉ, P. The three-dimensional structure of lectins: a phenetic and phylogenetic tool for the **Leguminosae**. **Biochem System. and Ecology**, v.22, n.4, p.401-407, 1994.
- BAUCHROWITZ, M. A., BARKER, D. G., NADAUD, L., ROUGÉ, P. & LESCURE, B. Lectins genes from the legume *Medicago truncatula*. **Plant Mol. Biol.**, v.19, p.1011-1017, 1992.
- BECKER, J.W., REEKE, G.N.JR., WANG, J.L. CUNNINGHAM, B.A. & EDELMAN, G.M. The covalent and three-dimensional structure of Concanavali A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **The Journal of Biol. Chem.**, v.250, n.4, p.1513-1524, 1975.
- BENTO, C.A.M., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. and BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leucocyte immigration induced by plant lectins. **Agents and Actions**, v.38, p.48-54, 1993.

- 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.
- CALVETE, J. J., SANTOS, C. F., MANN, K., GRANGEIRO, T. B., M., URBANKE, C. AND CAVADA, B. S.. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. **FEBS Letters**, v.425, n.2, p.286-292, 1998.
- CALVETE, J. J., THOLE, H. H., RAIDA, M., URBANKE, C., ROMERO, A., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., DA ROCHA, I. M. A., GUIMARAES, F. N. & CAVADA, B. S. (1999). Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, n.2, p.367-375, 1999.
- CARRINGTON, D. M. , AUFFRET, A. & HANKE, D.E.. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalina A. **Nature**, v.313, p.64-67, 1985.
- CAVADA, B.S.. **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, Fortaleza, 1980, 87p.
- CAVADA, B.S. & ROUGÉ, P.. Partial characterization of the two isolectins isolated from *Lathyrus cicera* L. seeds. **Arq. Biol. Tecnol.**, v.28, p.421-430, 1985.

- CAVADA, B.S. **Isolement, Structure et Proprietés des Isolectines des Graines de *Lathyrus cicera* et *Lathyrus ochrus***. These de Doutorado, Universidade Paul Sabatier, Toulouse-França, 109p., 1985.
- CAVADA, B.S. MOREIRA, R.A. OLIVEIRA, R.A. & GRANGEIRO, T.B. Primary structures and functions of plant lectins. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.5, n.2, p.193-201, 1993.
- CAVADA, B.S., GRANGEIRO, T.B., RAMOS, M.V., CORDEIRO, E.F., OLIVEIRA, J.T.A. & MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from the *Dioclea rostrata* Benth seeds. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.8, n.1, p 31-36, 1996b.
- CAVADA, B.S., RAMOS, M.V., CORDEIRO, E.F., GRANGEIRO, T.B., OLIVEIRA, J.T.A., CARVALHO, A.F.F.U. & MOREIRA, R.A. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.8, n.1, p.37-42, 1996c.
- CAVADA, B.S., MOREIRA-SOLVA, L.I.M., GRANGEIRO, T.B., SANTOS, C.F., PINTO, V.P.T., BARRAL-NETTO, M., ROQUE-BARREIRA, M.C., GOMES, J.C., MARTINS, J.L., OLIVEIRA, J.T.A. & MOREIRA, R. A. Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. Seeds. Em: In: **LECTINS, BIOLOGY, BIOCHEMISTRY, CLINICAL BIOCHEMISTRY** Vol. 11, p.74-80, 1996a.
- CAVADA B.S., NOGUEIRA, N.A.P., FARIAS C.M.S.A., GRANGEIRO T.B., RAMOS M.V., THOLE, H.H., RAIDÁ, M., ROUGÉ, P., CALVETE, J. J..

Primary structure and kinetic interaction with glycoproteins of the lectin from seeds of *Cratylia floribunda*. **Protein and Peptide Letters**, v.6, n.1, p.27-34, 1999.

CHAWLA, D., ANIMASHAUN, T., HOUGHES, R. C., HARRIS, A. & AITKEN, A. Bowringia midbraedii agglutin polypeptide composition, primary structure and homologies with other legume lectins. **Biochim Biophys Acta**, v.1202, n.1, p.38-46, 1993.

CLAUSEN, J. Immunochemical techniques for the identification of macromolecules. In: WORK, T. S. & WORK, E. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol 1**, North-Holland. Publishing Company, Amsterdam-London, 1969, 572 p.

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

DAM, T. K., CAVADA, B. S., GRANGEIRO, T. B., SANTOS, C. F., CECCATTO, V. M., SANTOS, F. A. M., OSCARSON, S. and C. FRED BREWER, C. F. Thermodynamic Binding Studies of Lectins from the Diocleinae Subtribe to Deoxy Analogs of the Core Trimannoside of Asparagine-Lined Oligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.21, p.16119-16126, 2000.

- DEBRAY, H., DECOUT, D., STRECKER, G., SPIK, G. & MONTREUIL, J.
Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycoproteins related to N-glycosylproteins. **Eur. J. Biochem.** v.117, p.41-55, 1981.
- EDMAN, P. Preparation of phenyl thiohydantions from some natural amino acids. **Acta Chem. Scand.**, v.4, p.277-282, 1950.
- FORIERS, A., LEBRUN, E., VAN RAPEMBUSCH, R., DE NEVER, R. & STROSBERG, A. D. The structure of the lentil (*Lens culinaris*) lectin. Amino acid sequence determination and prediction of the secondary structure. **J. Biol. Chem.**, v.256, n.11, p.5550-5560, 1981.
- FUJIMOURA, S., TERADA, S., JAYAVARDHANAN, K. K., PANIKKAR, K. R., & KIMOTO, E. Primary structures of Concanavalin A – like lectins from seeds of two species of *Canavalia*. **Phytochemistry**, v.33, n.5, p.985-987, 1993.
- GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T. & SHARON, N.. What should be called a lectin?. **Nature**, v.285, p.66-70, 1980.
- GOLDSTEIN, I.J. & PORETZ, R.D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I.E., SHARON, N. & GLODSTEIN, I.J.(eds.) **THE LECTINS: PROPERTIES, FUNCTIONS AND APPLICATIONS IN BIOLOGY AND MEDICINE**, New York:Academic Press, 1986, 600p.
- GOMES, J.C., FERREIRA, R.R., CAVADA, B.S., MoREIRA, R.A. and oLIVEIRA, J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific

lectins isolated from brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents and Actions**, v.41, p.132-135, 1994.

GRANGEIRO, T.B.. **Clonagem, sequenciamento e expressão do gen da lectina (Con Br) de sementes de *Canavalia brasiliensis***. Tese de Doutorado apresentada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996, 134p.

GRANGEIRO, T. B., GATEHOUSE, J. A., PEREIRA, M. N. & CAVADA, B. S. Investigation on the origin of the naturally occurring fragments of the *Cratylia floribunda* lectin. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.9, n.1, p.9-13, 1997a.

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

GUIMARÃES, F.N. **Isolamento e caracterização parcial de uma lectina de sementes de *Cleobulia multiflora***. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1980, 100 p. 1998.

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

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

- HIGGINS, T.J.V., CHANDLER, P.M., ZURAWSKI, G., BUTTON, S.C. & SPENCER, D. The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin. **J. Biol. Chem.**, v.258, n.15: 9544-9549, 1983.
- HOFFMAN, L. M. & DONALDSON, D. D. Characterization of two *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin genes closely linked on the chromosome. **The EMBO Journal**, v.4, n.4, p.883-889, 1985.
- HOPP, T. P., HEMPERLY, J. J. & CUNNINGHAM, B. A. Amino acid sequence and variant forms of favin, a lectin from *Vicia faba*. **J. Biol. Chem.**, v.257, n.8, p.4473-4483, 1982.
- KABATT, E.A., MAYER, M.N. In: **Experimental Immunochemistry**, 2a. Edn. p.150, 1967.
- KOCOUREK, J. & HOREJSI, V. A note on the recent discussion on definition of the term *lectin*. In: **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** v.3, p.3-8, 1983.
- KOJIMA, K., OGAWA, H., SENO, N., MATSUMOTO. Purification and characterization of *Canavalia gladiata* agglutinin. **Carbohydrate Research**, v.213, p. 275-282, 1991.
- KONAMI, Y., YAMAMOTO, K., OSAWA, T. The primary structure of the *Lotus tetragonolobus* seed lectin. **FEBS Letter**, v.268, n.1, p.281-286, 1990.
- KONAMI, Y., YAMAMOTO, K. & OSAWA, T. The primary structures of two types of the *Ulex europaeus* seed lectin. **J. Biochem.**, v.109, p.650-658, 1991b.

- KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K., TOYOSHIMA, S. & OSAWA, T. The primary structures of the *Laburnum alpinum* seed lectin. **FEBS Letter**, v.286, n.1, p.33-38, 1991a.
- KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K., OSAWA, T. & IRIMIURA, T. The primary structures of the *Cytisus scoparius* seed lectin and a carbohydrate-binding peptide. **J. Biochem.**, v.112, p.366-375, 1992.
- KOUCHALAKOS, R., BATES., O. J., BRADSHAN, R. A. & HAPNER, K. D. Lectin from sainfoin (*Onobrychis vicifolia*). Complete amino acid sequence. **Biochemistry** v.23, n 1824-1830, 1984.
- LAEMMLI, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly for the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LEE, H. C., GORONCY, A. K., PEISACH, J., CAVADA, B. S., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., SAMPAIO, A. H., DAM, T. K. and BREWER, C. F. Demonstration of a Conserved Histine and Two Water Ligands at the Mn²⁺ Site in Diocleinae Lectins by Pulsed EPR Spectroscopy. **Biochemistry**, v. 39, n.9, p.2340-2346, 2000.
- LIENER, I. L., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. **The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**, New York, Academic Press, 1986, 600p.
- LIS, H. & SHARON, N. Lectins in higer plants.. In: ABRAHAM, M. (ed.). **The bochemistry of plants; a comprehensive treatise**. London: Academic Press, p.371-433, 1981.

- MAKELA, O.. Studies in hemagglutinins of *Leguminosae* seeds. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, v.35, (Suppl. 11), p.1-156, 1957.
- MISHKIND, M., KEEGSTRA, K. & PALEVITZ, B.A.. Distribution of wheat germ agglutinin in young wheat plants. **Plant Physiol.**, v.66, p.950-955, 1980.
- 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. & CAVADA, B.S. Lectins from *Canavalia brasiliensis* (Mart). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v.26, n.2, p.113-120, 1984.
- 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, Supp. II: p.211-218, 1991.
- MOREIRA, R.A., CORDEIRO, E.F., CAVADA, B.S., NUNES, E.P., FERNANDES, A.F. & OLIVEIRA, J.T.A. Plant seed lectins. A possible marker for chemotaxonomy of the genus *Canavalia*. **R. Bras. Fisiol. Veg.** v.5, n.2, p.127-132, 1993.
- MOREIRA, R.A.; CORDEIRO, E.F.; CAVADA, B.S.; NUNES, E.P.; FERNANDES, A.G. & OLIVEIRA, J.T.A. Lectins and the chemotaxonomy

- of the sub-tribe *Diocleinae* (LEGUMINOSAE-PHASEOLEAE). **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.7, n.1, p.7-14, 1995.
- MOREIRA, R.A.; CORDEIRO, E.F.; RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; MARTINS, J.L.; OLIVEIRA, J.T.A. & CAVADA, B.S. Isolation and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea violacea* Mattius (Ex Benth). **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.8, n.1, p.23-30, 1996.
- MOREIRA, R. A., CORDEIRO, A. C. O., HORTA, A. C. G., OLIVEIRA, J.T.A. & CAVADA, B. S. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea altissima* seeds. **Phytochemistry**, v.46, n.1, p.139-144, 1997.
- MOREIRA-SILVA, L.I.M. **Caracterização bioquímica e estrutura primária da lectina de sementes de *Pisum arvense***. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997, 128p..
- OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S. & MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. **Revista Brasileira de Botânica.**, v.14, p.63-68, 1991.
- PEREZ, G.; PEREZ, C.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; & RICHARDSON, M. Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*. **Phytochemistry**, v.30, n.8, p.1619-2621, 1991.
- PEREZ G. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.30, n.7, p.843-853, 1998.

- PEUMANS, W.J., DE LEY, M. & BROEKAERT, W.F. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. **FEBS Letters**, v.177, p.99-103, 1984.
- PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v.109, p.347-352, 1995b.
- PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnol Genet. Eng.**, v. 15, p.199-228, 1998.
- POLHILL, R. M., & RAVEN, P. H. **Advances in legume systematics**. Parte 1, 425p., 1981.
- PURI, K. D. & SUROLIA, A. Amino acid sequence of the winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) basic lectin. Adenine binding and identification of active-site tryptophan residue. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n.49, p.30917-30926, 1994.
- PUSZTAI, A. & STEWART, J.C.. Isolectins of *Phaseolus vulgaris*. Physicochemical studies. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.536, p.38-49, 1978.
- RAMOS, M.V.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. & ROUGÉ, P. The carbohydrate-binding specificity and molecular modelling of *Canavalia maritima* and *Dioclea grandiflora* lectins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n.6, p.761-766, 1996b.
- RAMOS, M. V., MOREIRA, R. A. OLIVEIRA, J. T. A. CAVADA, B. S. & ROUGÉ, P.. Structural similarities among *Diocleae* lectins. In: Van

- Driessche, E., Fisher, J., Beeckmans, S. & Bog-Hansen, T.C. eds.:
**LECTINS, BIOLOGY, BIOCHEMISTRY, CLINICAL
BIOCHEMISTRY**, v.11, p.44-49, 1996a, Textop, Denmark.
- RICHARDSON, M., ROUGÉ, P., CAVADA, B.S. & YARWOOD, A. The amino acid sequences of the alfa and beta subunits of the isolectins from the seeds of *Lathyrus ochrus* (L) DC. **FEBS Letters**, v.175, p.76-81, 1984a.
- RICHARDSON, M.; CAMPOS, F.D.A.P.; MOREIRA, R.A.; AINOUZ, I.L.; BEGBIE, R.; WATT, W.B. & PUSZTAI, A. The complete amino acid sequence of the major α subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Eur. J. Biochem.**, v.144, p.101-111, 1984a.
- ROCHA, I.M.A. Caracterização de uma lectina isolada de sementes de *Cymbosema roseum* Benth. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1980, 89p.1998
- RODRIGUEZ, D., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. and RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 25, p.823-826, 1992.
- RODRIGUES-ARANGO, E., ARANGO, R., ADAR, R., GALILI, G. & SHARON, N. Clonig, sequence analysis and expression in *Escherichia coli*

of the cDNA encoding a precursor of peanut agglutinin. **FEBS Letters**, v.307, p.185-189, 1992.

ROUGÉ, P., RICHARDSON, M., RANFAING, P., YARWOOD, A. & CAVADA, B.S.. Single and two chain legume lectins as phylogenetic markers of epeciacion. **Biochemical Systmatics and Ecology**, v.15, n.3, p.341-348, 1987.

ROUGÉ, P. & CAVADA, B.S. Isolation and partial characterization of the two isolectins from *Lathyrus ochrus* (L) DC seeds. **Plant Science Letters**, v.37, p.21-27, 1984.

ROY, J., SOM, S. & SEM, A. Isolation, purification, and some properties of a lectin and abrin from *Abrus precatorius* Linn. **Arch Biochem Biophys**, v.174, n.1, p.359-361, 1976

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL**. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p.5463-5467, 1978.

SANTOS, C.F. **Caracterização bioquímica e sequência primária de uma lectina galactose-específica (VML) de sementes de *Votairea macrocarpa* (Leguminosae, Dalbergieae)**. Tese de Doutorado apresentada ao

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998. 118p.

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 from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v.405, p.114-118, 1997.

SCHNELL, D. J. & ETZLER, M. E. Primary structure of the Dolichos biflorus seed lectin. **J. Biol. Chem.**, v.262, n.15, p.7220-7225, 1987.

SENEAR, D.F. and TELLER, D.C. Thermodynamics of Concanavalin A dimer-tetramer self-association: Sedimentation equilibrium studies. **Biochemistry**, v.20, p.3076-3083, 1981.

SHARON, N. & LIS, H.. **LECTINS**. Chapman and Hall, London, 1989, 126p.

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

SILVA, L. I. M. M. **Purificação e caracterização parcial da lectina de sementes de *Canavalia bonariensis* Lind.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1993, 111p.

SILVEIRA, S. B. **Purificação e caracterização parcial de uma lectina manose-específica de sementes de *Cymbosema roseum*.** UFC, Fortaleza, 1999, 92p.

- SUMNER, J. B., & HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack beans with concanavalin A. **J. Bacteriol.**, **32**: 227-237, 1936.
- VAN DAMME, E.J.M. & PEUMANS, W.J.. Developmental changes and tissue distribution of lectin in *Galanthus nivalis* L. and *Narcissus cv. Carlton*. **Planta**, **v.182**, p.605-609, 1990.
- VAN DAMME, E. J. M., BALZARINI, J., SMEETS, K., VAN LEUVEN, F. & PEUMANS, W. J. **Glycoconjugate J.**, **v.11**, p.321-332, 1994.
- VAN DAMME, E.J.M.; SMEETS, K. and PEUMANS, W.J. **The mannose-binding monocot lectins and their genes.** p 59-80. Em: PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S. eds. **LECTINS: BIOMEDICAL PERSPECTIVES**, 331p, Taylor & Francis, London, 1995.
- VAN DAMME EJM, BARRE A, ROUGE P & PEUMANS WJ. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **Plant Mol. Biol.**, **v. 33**, n.3, p.523-536, **FEB**, 1997.
- VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W. F., GOLDESTEIN, J.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., MOREIRA, R.A. & DE OLIVEIRA, J.T.A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **Journal of Food Biochemistry**, **v.15**, p.137-154, 1991.
- VODKIN, L.O., RHODES, P. & GOLBERG, R.B. A lectin gene insertion has the structural features of transposable element. **Cell.**, **v.34**, p.1023-1031, 1983.

- YAMAMOTO, K., ISHIDA, C., SAITO, M., KONAMI, Y., OSAWA, T. & IRIMURA, T. Cloning and sequence analysis of the *Maackia amurensis* haemagglutinin cDNA. **Glycoconj. J.**, v. 11, n. 6, p.572-575, 1994.
- YAMAUCHI, D., NAKAMURA, K., ASAHI, T. & MINAMIKAWA, T. Nucleotide sequence of cDNA for concanavalina A from *Canavalia gladiata* seeds. **Plant Cell Physio.**, v.30, n.1, p.147-150, 1989.
- WU, A.M., SUGII, S., & HERP, A. A guide for carbohydrate specificities of lectins. In: WU, A. M., ed **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates**, p.819-847, Plenum Publishing Co. New York, 1988.
- ZENTENO, E., OCHOA, J.L., MONTANO, L.F., DEBRAI, H. & MONTREUIL, J.. *Machaerocereus eruca* cactus isolectins. Purification and characterization. **Plant Science**, v.77, p.11-19, 1991.