



**Isolamento e caracterização biológica da lectina de sementes e
dos calos induzidos a partir de cotilédones e hipocótilos de**

Glycine wightii

FABIA MARIA BARROSO DA SILVA

ORIENTADORA: PROFa. DRA. ANA CECÍLIA GÓES HORTA

CO-ORIENTADORA: PROFa. DRA. Ma. ANGELINA DA S.

MEDEIROS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Fortaleza – 2006

**Isolamento e caracterização biológica da lectina de sementes e
dos calos induzidos a partir de cotilédones e hipocótilos de
Glycine wightii”**

FABIA MARIA BARROSO DA SILVA

Tese submetida à coordenação do programa de pós-
graduação em bioquímica, como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Fortaleza – 2006

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

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

Fabia Maria Barroso da Silva

Tese aprovada em 27 de janeiro de 2006.

Dra. Ana Cecília Goes Horta

Dpto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientadora

Dra. Maria Angelina da Silva Medeiros.

Curso de Farmácia
Universidade de Fortaleza
Co-Orientadora

Dr. Renato de Azevedo Moreira

Dpto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Dra. Ana Cristina de O. Monteiro Moreira

Curso de Farmácia
Universidade de Fortaleza

Dra. Leila Maria Beltramini

Instituto de Física de São Carlos
Universidade de São Paulo

*A Deus,
Aos meus Pais Iracema e Francisco,
Aos meus irmãos Fabiano e Vilani,
À minha orientadora Ana Cecília,
A todos os amigos, dedico*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter permitido que em meio a tantas dificuldades minha fé fosse inabalável, ter feito de minhas lágrimas motivo de ir sempre em busca da vitória e ter me dado forças para sorrir em momentos de dor.

Aos Meus Pais, que sempre foram os maiores incentivadores e torcedores para que esse “sonho” se tornasse realidade. Em especial a minha mãe que sempre acreditou que eu seria capaz e abdicou de muitos sonhos em favor dos meus.

De forma especial a minha orientadora Dra. Ana Cecília Góes Horta, que foi muito mais do que orientadora: foi amiga. Obrigada pelo incentivo diário, pela companhia em todos os momentos.

De maneira diferenciada à Professora Maria Angelina da Silva Medeiros do Curso de Farmácia da Universidade de Fortaleza, pois sua contribuição vai muito além de uma co-orientação. Obrigada por me ajudar a ser uma profissional melhor todos os dias. E a sua família, com muito carinho, Dr. Francisco Medeiros, Aline e Alice.

Ao Dr. Renato de Azevedo Moreira, pela amizade de tantos anos, por acreditar na minha capacidade e me acolher em seu grupo.

À Professora e amiga Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira pelo incentivo para que eu pudesse chegar aqui e ser co-responsável por todas as minhas conquistas profissionais conseguidas até hoje.

À Profa. Leila Maria Beltramini, por toda a atenção dispensada para a realização dessa tese e pelo carinho dispensado em sua avaliação, com certeza suas sugestões serão aceitas com carinho.

À direção do Centro de Ciências da Saúde, na pessoa da Dra. Maria de Fátima Veras por ter acreditado em meu trabalho e facilitar o desenvolvimento dessa tese.

À profa. Dra. Vânia Cordeiro de Matos, por suas sábias palavras que sempre foram de incentivo e aprendizagem.

De maneira muito carinhosa à amiga Bel, do Instituto de Física de São Carlos da *Universidade de São Paulo*, por ter me fornecido as sementes utilizadas nesse trabalho e por sua amizade.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que *contribuíram para minha formação profissional e me possibilitaram o acesso necessário a todos os laboratórios, em especial ao Prof. Francisco Campos, Prof. Tadeu, Profa. Ilka, Profa. Norma e Profa. Ana Lúcia.*

Ao Professor Fernando pela sua constante dose de bom humor passada diariamente e seu grupo: amiga Micheline, Raimundo e todos os demais que sempre estiveram presentes nas comemorações promovidas no Laboratório.

A minha amiguinha Sarah, por toda sua disposição em contribuir diariamente nos ensaios realizados.

Ao amigo André, pelas valiosas sugestões dadas nesse trabalho, sempre oportunas, e pelos longos anos de companheirismo.

A todos os meus amigos do Lablec pela jornada diária cheia de carinho: Renatinha, Daniele, Clébia, Lia, Rosinha, Marcus, Kelton, Gelinho (*in memoriam*), Cláudia, Morgana, Alessandra, Ociléia, Álvaro, Ana Angélica, Glenda, Renata Alves, Sônia, Ana Angélica (querida).

De maneira muito carinhosa a amiga Dani e Renatinha, que transformaram-se ao longo dos anos *mais do que colegas de trabalho: AMIGAS.*

A todos meus amigos neste Departamento, Admir, Alessandra, Ana Angélica, Ana Lúcia, Ângela, Bartolomeu, Cláudio, Cléber, Danielle, Dário, Edna, Elisângela, Fernanda, Gina, Glenda, Hélio Costa, Iza, Jane, Josemir, Liezelot, Lucinha, Luís Aguiar, Maria Nogueira, Maria Gonçalves, Mariza, Petrônio, Richrist, Sâmia, Sílvio, Sônia, Stélio, Vadjah que *através da amizade, compreensão, entusiasmo, companheirismo, contribuíram direto ou indiretamente para realização desse trabalho.*

Ao meu amigo Rogildo, e sua família Márcia, Pedrinho e Clarinha, que sempre foram motivos de incentivo.

Ao meu companheiro dos finais de semana, o inesquecível Wagner, juntamente com Vandí, Marília e Lucas, que já não são apenas amigos, mas pedacinhos da minha vida.

Aos amigos do departamento de final de semana: Simone, Silvinha, Silvio, Luiz Aguiar, e todos os demais.

A Gina, Raquel, Cleozinho e Carlinha, que mesmo distante sei que estão comigo nesse momento.

Ao Prof. Márcio da Universidade de Fortaleza, pelo companheirismo diário e pelos ensaios imunológicos realizados e ao Laboratório de Bioquímica Humana da Universidade Estadual do Ceará, na pessoa da Dra. Maria Izabel Florindo Guedes por permitir a realização da leitura da placa de ELISA.

À Profa. Sílvia Fernandes da Universidade de Fortaleza, por todo o apoio dado para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos extra Departamento Hermes, Oirton, Fátima Antunes, Analice, Armênia, Carlos Bruno, Geysa Aguiar, Arlândia Nobre, Everardo Albuquerque, que através da amizade, demonstrada ao longo dessa caminhada, contribuíram de forma decisiva para o meu aprimoramento pessoal.

A minha segunda família Tia Hosana, Tio Toinho (*in memoriam*), Rosiane e Alan, Adriano e Hilária, Adriano Filho e Vinícius, Geruza e Júnior, que sempre me deram colo quando eu mais precisei.

Aos amigos da Fé Odilon e Lurdirene, que em meio a tanta angústia nunca me deixaram acreditar que nada é impossível ao que crê.

A todos os funcionários do Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Fortaleza, em especial a Josy, Tânia, Gilda, Seu Newton, Zezinho, Rogério, Alexandre, Sarah, Lucélia, Geane e Arlêne por me tratarem sempre com muito carinho.

A todos os técnicos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Fortaleza, Oleandro, Conceição, Moisés, Nívea, Sandra, Patrícia, Beth, Herivaldo, Dona Ester, Dona Cleomar, Carlos.

A todos que de alguma forma colaboraram na execução deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com o apoio e a colaboração das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará, através do Centro de Ciências e do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que viabilizou a execução deste trabalho em seus laboratórios e contribuiu sobre maneira para formação do autor.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará e pela bolsa concedida ao autor.

Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP) por subsídios que favoreceram o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos convênios com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo que possibilitou a execução da caracterização físico-química deste trabalho em seus laboratórios.

Universidade de Fortaleza (UNIFOR) através do Centro de Ciências da Saúde cujos laboratórios sediaram a execução de parte deste trabalho.

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

Coríntios, 13:1-2

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XI
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 LECTINAS VEGETAIS	1
1.1.1 Definições	1
1.1.2 Ocorrências e propriedades gerais	3
1.1.3 Detecção e dosagem	6
1.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS	8
1.3 SÍNTESE DE LECTINAS	10
1.4 FUNÇÕES E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS LECTINAS	13
1.5 LECTINAS E O PROCESSO INFLAMATÓRIO	20
1.6 <i>GLYCINE WIGHTII</i> (ARN & WIGHT) VERDC.	28
2. HIPÓTESE DE TRABALHO	31
3. OBJETIVOS DO TRABALHO	32
4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	33
5. MATERIAIS	34
5.1 MATERIAL BOTÂNICO	34
5.2 ANIMAIS	34
5.3 EQUIPAMENTOS	34
5.4 REAGENTES E DROGAS	34
6. MÉTODOS	35
6.1 OBTENÇÃO DOS CALOS DE COTILÉDONES E HIPOCÓTILOS	35
6.2 OBTENÇÃO DA FARINHA	35
6.3 ISOLAMENTO DA LECTINA GALACTOSE LIGANTE DE <i>GLYCINE WIGHTII</i>	35
6.4 ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO	36
6.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE POR AÇÚCARES	37
6.6 TERMOESTABILIDADE DA LECTINA	37
6.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DOS CALOS DE COTILÉDONES E HIPOCÓTILOS	37
6.8 DETERMINAÇÃO DE CINZAS DOS CALOS DE COTILEDÓNES E HIPOCÓTILO	38
6.9 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	38
6.10 DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS	39
6.11 DICROISMO CIRCULAR (CD)	39
6.12 CÁLCULO DO CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA	40

6.13	ENSAIO DE ISOELETROFOCALIZAÇÃO	40
6.14	PREPARO DE IgG	41
6.15	TESTE POR ELISA INDIRETO	41
6.16	MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL	42
6.17	AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS INDUZIDA PELA LGW CO-INJETADA COM O AÇÚCAR INIBIDOR D-GALACTOSE	43
6.18	AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA EM RATOS, INDUZIDA PELA LGW	45
6.19	AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA EM RATOS, INDUZIDA PELA LGW CO-INJETADA COM SEU AÇÚCAR INIBIDOR	45
6.20	ENSAIO DE ATIVIDADE TÓXICA EM CAVIDADE PERITONEAL	46
6.21	DADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
7.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
7.1	CARACTERIZAÇÃO PARCIAL FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DO EXTRATO DA FARINHA DE SEMENTES E DA LECTINA DE <i>GLYCINE WIGHTII</i>	47
7.1.1	Isolamento da Lectina galactose ligante de <i>Glycine wightii</i>	47
7.1.2	Ensaio de atividade hemaglutinante	49
7.1.3	Eletroforese em gel de Poliacrilamida	52
7.1.4	Determinação de carboidratos	55
7.1.5	Espectros de CD e estimativa da estrutura secundária por dicroísmo circular	55
7.1.6	Ensaio de Isoeletrofocalização	58
7.1.7	Avaliação da toxicidade aguda do extrato total de <i>Glycine wightii</i>	60
7.1.8	Indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos pelo extrato total da farinha de sementes de <i>Glycine wightii</i>	60
7.1.9	Indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos pela lectina galactose ligante de <i>Glycine wightii</i>	68
7.1.10	Indução do edema de pata	80
7.1.11	Avaliação da toxicidade aguda pela lectina da farinha de sementes de <i>Glycine wightii</i>	84
7.2.	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS CALOS OBTIDOS A PARTIR DE COTILÉDONES E HIPOCÓTILOS DE SEMENTES DE <i>GLYCINE WIGHTII</i>	85
7.2.1	Determinação de umidade	85
7.2.2	Determinação de cinzas	85
7.2.3	Determinação de carboidratos	85
7.2.4	Isolamento da lectina	85
7.2.5	Determinação da atividade hemaglutinante	86
7.2.6	Detecção da presença de lectinas nos extratos de calos de cotilédones e hipocótilos por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	86
7.2.7	Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal	87
7.2.8	Avaliação da toxicidade aguda pelos extratos totais obtidos da farinha de calos de cotilédones e hipocótilos de sementes de <i>Glycine wightii</i>	91
8.	CONCLUSÃO	92
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE FIGURAS

	Pag
1. Diferentes modelos de interação célula-molécula e célula-célula mediado por lectinas	08
2. Múltiplos processos envolvidos na migração de leucócitos pelos através dos vasos sanguíneos.	23
3. Planta de <i>Glycine wightii</i>	30
4. Sementes de <i>Glycine wightii</i>	30
5. Administração intraperitoneal em ratos	39
6. Sacrifício do animal por deslocamento cervical	39
7. Cromatografia de afinidade em goma de guar do extrato total de sementes delipidadas de <i>Glycine wightii</i>	43
8. Curva da termoestabilidade da atividade hemaglutinante realizada na fração retida obtida por cromatografia de afinidade em goma de guar após incubação a 40 °C por 5, 10 15, 20 25 e 30 minutos.	46
9. Curva da termoestabilidade da atividade hemaglutinante realizada na fração retida obtida por cromatografia de afinidade em goma de guar, após incubação a 50 °C por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.	46
10. SDS-PAGE da fração retida em goma de guar	49
11. Espectro de dicroísmo circular da lectina de <i>Glycine wightii</i>	52
12. Focalização isoeétrica da lectina de <i>Glycine wightii</i> realizada em gel <i>Phast</i>	54
13. Indução da migração de células totais para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pelo extrato total obtido da farinha de sementes delipidadas de <i>Glycine wightii</i> .	57
14. Indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pelo extrato total obtido da farinha de sementes delipidadas de <i>Glycine wightii</i> .	58
15. Efeito dos moduladores farmacológicos pentoxifilina e talidomida sobre a migração de células totais induzida pelo extrato total da farinha de sementes delipidadas de <i>Glycine wightii</i> .	60

16.	Efeito dos moduladores farmacológicos pentoxifilina e talidomida sobre a migração de neutrófilos induzida pelo extrato total da farinha de sementes delipidadas de <i>Glycine wightii</i> .	61
17.	Indução da migração de células totais para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de <i>Glycine wightii</i> .	63
18.	Indução da migração de neutrófilos, <i>in vivo</i> , para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de <i>Glycine wightii</i> .	64
18.	Efeito da D-galactose sobre a migração de células totais induzida pela lectina de <i>Glycine wightii</i> .	68
19.	Efeito da D-galactose sobre a migração de neutrófilos induzida pela lectina de <i>Glycine wightii</i> .	69
20.	Efeito dos moduladores farmacológicos pentoxifilina e talidomida sobre a migração de células totais induzida pela lectina de <i>Glycine wightii</i> .	72
21.	Efeito dos moduladores farmacológicos pentoxifilina e talidomida sobre a migração de neutrófilos pela lectina de <i>Glycine wightii</i> .	73
22.	Indução do edema de pata em ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de <i>Glycine wightii</i> . Avaliação das médias dos edemas nos vários tempos para cada grupo.	75
23.	Indução de edema de pata em ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de <i>Glycine wightii</i> . Avaliação das médias de edema nos 5 grupos para cada tempo.	76
24.	Indução da migração de células totais para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pelos extratos de calos induzidos a partir de cotilédones e hipocótilos de sementes de <i>Glycine wightii</i> .	83
25.	Indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pelos extratos de calos induzidos a partir de cotilédones e hipocótilos de sementes de <i>Glycine wightii</i> .	84

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético
AMPC	Adenosina monofosfato
CD	Dicroísmo circular
Con A	Concanavalina A (lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>)
Con Br	<i>Canavalia brasiliensis</i>
COX	Ciclooxigenase
D.O.	Densidade ótica
DBA	Lectinas de <i>Dolichos biflorus</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FTL	Lectina de Frutalina
GalNAc	N-acetil galactosamina
Gal	Galactose
GlcNAc	N-acetil Glucosamina
HCl	Ácido clorídrico
HPA	Lectina de <i>Helix pomatia</i>
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
kDa	Kilo Daltons
KM ⁺	Lectina de jaca com especificidade para manose
LBp	Lectina galactose-ligante de sementes de <i>Bauhinia pentandra</i>
LBA	Lectina de <i>Phaseolus lunatus</i>
LEC	Lectina
LGw	Lectina de <i>Glycine wightii</i>
MS	Murashige & Skoog
NaCl	Cloreto de sódio
OPD	Orthophenylenediamine
PECAM-1	Moléculas de adesão de células endoteliais e plaquetas
PAF	Fator ativador de plaquetas

PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
PAS	Ácido Periódico/Schiff
PBS	Tampão fosfato de sódio
PHA	Fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
pI	Ponto isoelétrico
PMNs	Polimorfonucleares
RIP	Proteína inibidora de ribossoma
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SBA	Lectina de soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEL	Lectina isolada de sementes de <i>Talisia esculenta</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UH	Unidade Hemaglutinante. Definido como o inverso da maior diluição de uma dada solução protéica que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemáceas a 2%.
UEA-I	Lectina de <i>Ulex europeus</i> I
VCAM-1	Molécula de adesão vascular
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
Vh	Hertz
WGA	Lectina de germe de trigo

RESUMO

A maioria das lectinas já isoladas e caracterizadas são de sementes de *Leguminosae*, principalmente das sub-famílias *Papilionoideae*. No presente trabalho foram investigadas propriedades físico-químicas e biológicas da lectina galactose-ligante de sementes de *Glycine wightii* (LGw). Esta lectina isolada por cromatografia de afinidade em coluna de goma de guar, e eluída com tampão Glicina-HCl pH 2,6 em solução de NaCl 0,15 M. Duas frações (P₁ e P₂) foram obtidas. Foi observado que o P₁ não apresentou atividade hemaglutinante e P₂ aglutinou hemáceas humanas tripsinizadas (suspensão a 4%) do grupo A₁ sem necessitar da adição de íons metálicos. Ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida revelaram a presença de uma banda protéica cuja massa molecular aparente foi de 45 KDa. A lectina perdeu cerca de 87% de sua atividade biológica quando foi aquecida a 40 °C por 5 minutos e após 15 minutos foi totalmente inativada e ao ser aquecida a 50 °C por 5 minutos apenas 25% da atividade hemaglutinante permaneceu, sendo totalmente inativa após esse tempo. A determinação de açúcares por Dubois, usando como padrão a D-glucose, revelou que essa lectina é uma glicoproteína cujo teor é de 1,49%. As estruturas secundárias foram avaliadas por dicroísmo circular e revelaram uma predominância de β-folha. Ensaio de focalização isoeétrica revelaram uma variação de pH entre 6,35 e 7,0 sugerindo a existência de isoformas. O extrato total das sementes de *Glycine wightii* e a LGw ao ser injetados por via intraperitoneal em camundongos não provocou a morte de nenhum animal. Pode-se observar que o extrato total foi capaz de induzir, parcialmente, a migração de leucócitos em ratos, sendo os neutrófilos polimorfonucleares as células predominantes (aproximadamente 70 %) nesse processo que migraram e acumularam-se no sítio inflamatório em níveis próximos aos da carragenina. Pelos resultados obtidos observou-se que os moduladores utilizados, talidomida e pentoxifilina, foram capazes de inibir, a níveis inferiores que aos observados para o controle negativo, a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos e que ocorreu uma inibição em mais de 80% da indução na migração das células totais quando a LGw foi injetada com a D-galactose. A LGw induziu edema de pata em ratos Wistar com pico máximo entre 2 e 3 horas após a injeção subplantar. Os calos obtidos a partir de cotilédones e de hipocótilos foram caracterizados com relação ao teor de umidade (7,98% e 7,4%, respectivamente), cinzas (0,64% e 0,47%, respectivamente), carboidratos (7,98% e 7,4%, respectivamente). Nenhum pico ficou retido em coluna de goma de guar ao ser

realizada a cromatografia de afinidade dos extratos obtidos a partir de calos de cotilédones e de hipocótilos e nenhuma atividade hemaglutinante foi observada. Ao ser realizado ensaios imunológicos por ELISA identificou-se a presença de pequena quantidade (7,0%) da LGw apenas nos extratos obtidos a partir de calos cotiledonares. Ambos os extratos foram capazes de induzir, fracamente, a migração de células totais para a cavidade peritoneal de ratos. Os extratos obtidos a partir de calos cotiledonares e de hipocótilos de sementes de *Glycine wightii* não matou nenhum camundongo exposto.

ABSTRACT

Most of the already characterized lectins were isolated from *Leguminosae* (mainly *Papilionoideae*) seeds. In this thesis, the physico-chemical and biological properties of a D-galactose-binding lectin, from *Glycine wightii* (*Leguminosae-Papilionoideae*) seeds, is described. The lectin was isolated by affinity chromatography on guar gum matrix, in NaCl 0.15 M. After the elution of the non-retained fraction (F1), the retained fraction (F2) was eluted with 0.1 M, pH 2.6 glycine-HCl buffer, containing 0.15 M NaCl. Only the fraction F1 showed hemagglutinating activity. This activity was more evident with trypsin treated group A1 human erythrocytes. No divalent cations were needed. By PAGE-SDS only a single band, with Mr of 45 kDa, was found. The lectin was showed to be thermo labile, loosing all the hemagglutinating activity when heated to 40°C by 15 min. The lectin is a glycoprotein (1.49 %). The lectin secondary structure was evaluated by circular dichroism and showed a predominance of beta-sheet. By isoelectric focusing several bands were found between pI from 6.35 to 7.0, indicating the presence of isoforms. When the purified lectin and the crude extract were intraperitoneally administered to mouse, no toxicity was found. The crude extract induced the leukocyte immigration in rats, and the polymorphonuclear neutrophils were predominant (70%), with levels similar to carragenana. Modulators like talidomida and pentoxilfilin inhibited the leukocyte immigration in lower levels than the observed for the negative control, while 80% of inhibition occurred when the lectin was administered in the presence of D-galactose. The lectin induced rat paw edema in Wistar rats with a peak between 2 and 3 h after the injection. Calluses were developed from cotyledons and hypocotyls, obtained from *Glycine wightii* germinating seeds. They were characterized with respect to the water content (7.9 % and 7.4 %, respectively), ash (0.64 % and 0.47 %, respectively), and carbohydrate (7.98 and 7.4 respectively). No retained fraction was retained, when the callus crude extracts were submitted to affinity chromatography on the guar gum matrix, but a small amount of the lectin was detected by Elisa in the cotyledonary calluses. Both the callus extracts induced, although weakly, the cell immigration to the rat peritoneal cavity, but no death was observed when these extract were intraperitoneally administered to mice.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1. LECTINAS VEGETAIS

1.1.1 Definições

As lectinas de leguminosas têm, por décadas, sido um paradigma na área do reconhecimento proteína-carboidrato (LORIS, *et al*, 1998). A atividade lectínica em sementes vegetais tem sido demonstrada desde 1888 quando STILLMARK (1888) descreveu a ação de lectinas pela primeira vez, inicialmente denominadas fitohemaglutininas, devido à sua origem vegetal e o fato de aglutinarem hemácias (LIENER, 1986; RÜDIGER, 1998). O termo lectina foi originado de pesquisas com grupos sanguíneos usando hemaglutinina, e muitas lectinas, as quais têm sido descritas, podem reconhecer os diferentes antígenos dos grupos sanguíneos que possuem epítomos carboidrato (ABO, antígeno Forssman, etc) (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986; SHARON & LIS, 1995).

GOLDSTEIN *et al.* (1980) definiram as lectinas como sendo proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que interagem com carboidratos de maneira específica, aglutinando células e/ou precipitando glicoconjugados. Passado um ano KOCOUREK & HOREJSI (1981), sugeriram que lectinas são proteínas de origem não imune, ligantes a açúcares, desprovidas de atividade catalítica contra os açúcares com os quais se ligam. Posteriormente, esta definição foi ampliada passando as lectinas a serem consideradas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que possuem um ou mais sítios de reconhecimento a carboidratos e/ou glicoconjugados capazes de se ligar específica e reversivelmente a terminais carboidratos sem alterar a estrutura química dos mesmos, podendo aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. Esta definição exclui outras proteínas ligantes de açúcar, tais como as várias enzimas específicas por açúcares, hormônios e proteínas transportadoras, mas inclui as lectinas monovalentes, como as de orquídeas. Da mesma forma, a definição exclui ainda lipídeos (como o ácido oléico e o dioleil fosfatídeo) e gangliosídeos, que aglutinam eritrócitos de coelho e de rato, mas, ao contrário das lectinas, apresentam uma aglutinação insensível à variação de temperatura (RUSSEL *et al*, 1983).

KENNEDY *et al.* (1995) conceituaram lectinas como proteínas de origem não imune que reconhecem carboidratos livres ou conjugados a superfície celular através de

sítios de ligação (sítios hidrofóbicos reconhecidos por BARONDES (1988) e os sítios ligantes a carboidratos).

PEUMANS & VAN DAMME (1995) apresentaram uma definição bem mais geral quando consideraram que o único pré-requisito para uma proteína ser classificada como lectina é que esta esteja presente, pelo menos, um domínio não catalítico que se liga reversível e especificamente a carboidratos. De acordo com esta afirmativa, as lectinas vegetais podem ser definidas como todas as proteínas vegetais que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a mono e oligossacarídeos específicos. Esta nova definição inclui uma gama de proteínas que se comportam de modo diverso do ponto de vista das propriedades aglutinantes e/ou precipitação de glicoconjugados.

Segundo LIS & SHARON (1998), lectinas ligam-se a mono e oligossacarídeos reversivelmente e com alta especificidade, mas são desprovidas de atividade catalítica e em contraste aos anticorpos, não são produtos de uma resposta imune. Cada molécula de lectina pode conter dois ou mais sítios de combinação a carboidratos. Portanto, quando reagem com células, por exemplo, eritrócitos, elas não irão apenas combinar-se com os açúcares em suas superfícies, mas irão também causar ligação cruzada das células e subsequente precipitação, um fenômeno referente à aglutinação celular. A aglutinação eritrocitária, ou hemaglutinação, envolvendo lectinas é, rotineiramente, uma técnica usada para sua detecção e caracterização. Essas proteínas, também formam ligação cruzada entre moléculas de polissacarídeos ou glicoproteínas em solução e induzem sua precipitação. Ambas as reações, aglutinação e precipitação de lectinas podem ser inibidas pelo açúcar ligante para o qual a lectina tem especificidade.

Com base nas suas propriedades estruturais, PEUMANS & VAN DAMME (1995) agruparam as lectinas em três grandes grupos: as merolectinas, as hololectinas e as quimerolectinas. Merolectinas são proteínas de uma única cadeia que apresentam um único sítio de ligação a carboidratos, como a heveína e as proteínas monoméricas ligantes de manose. Elas são proteínas pequenas que, devido à sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As hololectinas também apresentam apenas um único domínio de ligação a carboidratos por cadeia, mas contêm duas ou mais cadeias polipeptídicas contendo domínios ligantes que são idênticos ou muito similares. Este grupo compreende todas as lectinas que têm sítios de ligações múltiplos e são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas caracterizadas é hololectinas. As quimerolectinas possuem além do domínio ligante a

carboidratos, outro domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica que age independentemente do domínio ligante a açúcar. Alguns exemplos deste grupo são as quitinases classe 1 e as RIPs (proteínas inativadoras de ribossomos) tipo 2, sendo essas últimas, consideradas lectinas tóxicas.

VAN DAMME *et al.* (1997), definiram as superlectinas como um grupo especial de quimerolectinas. Elas seriam proteínas de fusão, com dois domínios de ligação a carboidratos, as quais são estruturalmente diferentes e reconhecem carboidratos distintos. A natureza quimérica das superlectinas é ilustrada pela lectina de bulbo de tulipa, com dois domínios, um específico para N-acetil-galactosamina e outro para manose (CAMMUE *et al.*, 1986).

Mais recentemente, MONTEIRO-MOREIRA (2002) sugeriu um novo grupo para as lectinas, as multilectinas, que consistem de proteínas com sítios idênticos de ligação a carboidratos distintos, como por exemplo a frutalina e a jacalina que apresentam uma alta afinidade por galactose e reconhecem, também, manose e glucose.

1.1.2 Ocorrência e Propriedades Gerais

As lectinas estão amplamente distribuídas em todas as classes e famílias de organismos: plantas, bactérias, fungos, vírus, invertebrados e vertebrados. Entretanto, o maior número de lectinas já estudada e, parcialmente, caracterizadas são as de origem vegetal (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Dentro do Reino Plantae, a divisão Angiospermae, mais especificamente a classe Dicotyledoneae, apresenta sem dúvida, o maior número de espécies com lectinas já isoladas. O grupo das lectinas identificadas na família Leguminosae tem sido motivo de intensa investigação. Acredita-se que tal direcionamento seja devido à sua elevada concentração em sementes aliado ao fato do grande número de espécies pertencentes a esta família e facilidade de obtenção. Com isso, muitas destas proteínas foram e estão sendo isoladas e caracterizadas com relação a suas propriedades bioquímicas e físico-químicas e, especificidade por carboidratos. Além disso, a seqüência parcial ou completa de aminoácidos e, mais recentemente, a clonagem de genes (NOGUEIRA, 1999) têm oferecido novas informações com respeito a suas estruturas. É importante ressaltar que as lectinas de leguminosas, apesar de apresentarem especificidade diferente por carboidratos,

compartilham de considerável grau de identidade de seqüência (CAVADA *et al.*, 1993), sugerindo a possível utilização dessas proteínas como marcadores filogenéticos.

A grande maioria das lectinas vegetais conhecidas, muitas das quais já isoladas, é encontrada predominantemente nas sementes maduras, em particular das leguminosas. Embora a semente seja, normalmente, o órgão mais rico em lectinas, elas também estão presentes em outras partes da planta, como raízes, folhas, cascas, bulbos e frutos (PEUMANS & VAN DAMME, 1998) contendo, na maioria dos casos, apenas pequena quantidade, as quais, não são necessariamente idênticas em estrutura ou especificidade a carboidratos como as lectinas dos órgãos de reserva (RÜDIGER, 1998). VAN DAMME *et al.* (1998) afirmam que o número de lectinas não sintetizadas em sementes, ultrapassa aquelas lectinas de sementes.

A concentração de lectinas em sementes e tecidos vegetativos varia muito. Lectinas de sementes, usualmente, representam de 1 a 10% das proteínas totais. Em algumas espécies, têm-se descrito valores mais elevados (acima de 50%), enquanto em outras, as lectinas, dificilmente, são detectadas com as técnicas comumente utilizadas. Comportamento semelhante é verificado para lectinas dos tecidos vegetativos. Muitas espécies vegetais acumulam grandes quantidades de lectinas em seus órgãos de reserva, como em casca, bulbos, tubérculos, rizomas e caule, em que o teor de lectinas representa de 1 a 20% das proteínas totais podendo, em alguns casos, ser superior a 50%. Frutos, folhas, flores, ovários, raízes e outros tecidos, geralmente contêm baixos níveis (menos de 1% das proteínas totais) de lectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

A maioria das lectinas é glicoproteínas cujo conteúdo de carboidratos pode chegar até mais de 50% da sua massa molecular, como é o caso da lectina de batata, *Solanum tuberosum* (LIS & SHARON, 1981). Os principais açúcares encontrados nas lectinas são N-acetil-glucosamina, manose, L-fucose e xilose. Estes açúcares são característicos das lectinas de Leguminosas (SHARON & LIS, 1989), embora diversas lectinas notadamente da tribo *Phaseoleae*, subtribo *Diocleinae* como *Dioclea grandiflora* (MOREIRA *et al.*, 1983), *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA & CAVADA, 1984) e *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991) não apresentem carboidratos ligados covalentemente.

As lectinas de vegetais superiores são, caracteristicamente, ricas em aminoácidos ácidos e hidrofóbicos os quais podem perfazer até mais de 30% do conteúdo de aminoácidos e são pobres ou destituídas de aminoácidos sulfurados (LIS & SHARON,

1981). Algumas famílias de lectinas possuem uma composição de aminoácidos singular, bastante diferente das demais. As lectinas de gramíneas possuem um alto conteúdo de glicina (23%) e cisteína (21%), sendo que todos os resíduos de cisteína estão envolvidos em pontes dissulfeto (STINISSEN & PEUMANS, 1985).

É de a maior importância estabelecer a especificidade de uma lectina por açúcares de modo a poder usá-la como ferramenta em estudos bioquímicos e imunológicos. A especificidade por açúcar é, normalmente, determinada pela técnica de inibição por hapteno, comparando açúcares com base na concentração mínima necessária para inibir a reação de hemaglutinação ou de precipitação de macromoléculas reativas.

Com base no conhecimento da especificidade de muitas lectinas, certas generalizações puderam ser feitas. As lectinas são, geralmente, classificadas de acordo com o que foi estabelecido por MAKELA (1957), que dividiu os monossacarídeos inibidores de lectinas em quatro grupos conforme a configuração relativa das hidroxilas nos carbonos 3 e 4 do anel piranosídico ou furanosídico. Assim, no grupo I foram agrupadas as lectinas que interagem com L-fucose, como as *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europeus* (GOLDSTEIN *et al*, 1980). No grupo II, lectinas que se ligam a D-galactose e N-acetil-D-galactosamina, como as de *Vaitarea macrocarpa* (SALES *et al*, 1989), *Sphenostyles stenocarpa* (MACHUKA *et al*, 1999), *Erythrina indica* (KONOZY *et al*, 2002), *Bauhinia pentandra* (CARLOS, 2004) a aglutinina e a toxina de *Ricinus communis* (VILLAFRANCA & ROBERTUS, 1981) e a lectina de *Erythrina vellutina* forma *aurantiaca* (MORAES, 1992). No grupo III foram agrupadas as lectinas com afinidade por D-manose e D-glucose, como as lectinas da tribo Phasoleae subtribo Diocleinae, tais como as de *Dioclea grandiflora* (MOREIRA, *et al*, 1991), *Cratyliia floribunda* (OLIVEIRA *et al*, 1991) e *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA E CAVADA, 1984), como também as lectinas da tribo Viciaeae. Até o momento ainda não foram identificadas lectinas que interagem com açúcares do grupo IV (idose, gulose, L-xylose, L-glucose). WU *et al*, (1988) sugeriram a criação de outros dois grupos: um com lectinas específicas por N-acetil-D-glucosamina e outro com lectinas específicas por ácido siálico.

Segundo SHARON & LIS (1989), de acordo com sua especificidade, as lectinas poderiam ser classificadas em cinco grupos de acordo com os monossacarídeos pelos quais elas possuem grande afinidade: a) D-manose/D-glucose, b) D-galactose/ N-acetil- D-galactosamina, c) N-acetil- D-glucosamina, d) L-fucose e e) ácido N-acetil-neuramínico.

LORIS *et al.* (1998) afirmaram que devido à falta de conhecimento sobre a atividade *in vivo* das lectinas, elas têm demonstrado ser ferramentas úteis em imunologia e glicobiologia devido à sua larga e variada especificidade por carboidratos. Essa especificidade tem também permitido seu uso em outras aplicações como purificação e caracterização de carboidratos complexos e glicoconjugados.

Atualmente, as lectinas de leguminosas constituem um grupo bem estudado e cerca de uma centena dessas proteínas têm sido isoladas e extensivamente investigadas quanto às suas propriedades químicas, físico-químicas, estrutural e biológica (KONOZY *et al.*, 2003). Em adição, diversos estudos sobre a seqüência homóloga e estrutura tridimensional de várias lectinas vegetais sugerem que elas foram conservadas através da evolução e, assim, podem desempenhar, importantes funções fisiológicas (REYNOSO-CAMACHO *et al.*, 2003).

1.1.3 Detecção e dosagem

Para a detecção de lectina em material biológico utiliza-se uma das atividades biológicas mais conhecidas, sendo esta tão antiga quanto o estudo dessas proteínas, sua capacidade em aglutinar hemácias ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas. A aglutinação é resultado da interação de açúcares da superfície celular e os sítios ligantes de açúcar existentes nas moléculas de lectinas. Estas interações são não covalentes, envolvendo ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waal (SHARON & LIS, 2004).

Assim, a presença de uma lectina em uma dada preparação, pode ser detectada, verificando se a mesma aglutina eritrócitos ou precipita polissacarídeos e glicoproteínas, e demonstrando serem estes efeitos inibidos por açúcares simples ou complexos. A atividade hemaglutinante, é usualmente, determinada pelo método de diluição seriada e o ponto final determinado a olho nu ou com a ajuda de uma lupa ou microscópio (MOREIRA & PERRONE, 1977). A especificidade, por sua vez, pode ser determinada com a ajuda de um painel de eritrócitos de diferentes grupos sanguíneos humanos ou de outros animais. Para tentar intensificar a resposta, podem ser usados eritrócitos modificados por tratamento com enzimas proteolíticas (SHARON & LIS, 2004) ou com neuraminidase (MARIKOVSKY *et al.*, 1976) que deixa as células mais sensíveis, em geral, à aglutinação. Com a finalidade de

estabilizar as hemácias, obtendo-se assim uma preparação padrão, as células podem ainda serem tratadas com formaldeído ou glutaraldeído (LIENER; TURNER, 1975).

Lectinas localizadas na superfície celular também medeiam à interação célula-célula por combinar carboidratos com complementaridade localizados sobre as superfícies de células em oposição, as quais podem ser iguais ou diferentes (Figura 1). SHARON & LIS (1989) propuseram mecanismos para a interação célula-a-célula mediada através de superfície de lectinas. As células podem também interagir via outros mecanismos tais como:

- a) Formação de pontes por glicoproteínas solúveis que se ligam a lectinas situadas na superfície das células.
- b) As lectinas podem combinar-se com carboidratos de componentes insolúveis da matriz extracelular que promove a adesão celular.
- c) Lectinas solúveis podem ligar-se a carboidratos sobre células em oposição para agir como ponte entre as duas células.

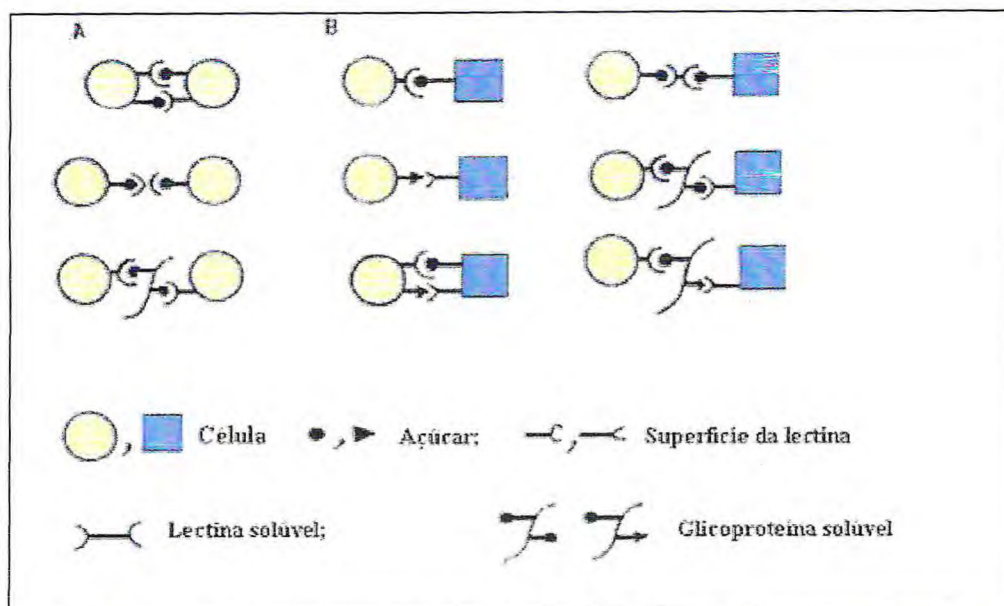


Figura 01 - Diferentes modelos de interação célula-molécula e célula-célula mediado por lectinas (A) entre células de mesmo tipo (homotípica) e (B) entre células diferentes (heterotípica). SHARON & LIS (1989), citado por SINGH (1999).

1.2. Isolamento e Caracterização de Lectinas

O isolamento e caracterização de lectinas vegetais são, tradicionalmente, realizados a partir de sementes quiescentes de leguminosas (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991), embora já tenham sido isoladas lectinas em várias outras espécies vegetais (PEUMANS & VAN DAMME, 1995, 1998). Recentemente FREIRE *et al.* (2002) isolaram e caracterizaram uma nova lectina das sementes de *Talisia esculenta*, a primeira da família Sapindaceae.

Para isolar lectinas inicia-se, geralmente, a extração do material biológico, com solução salina ou solução tampão. Algumas vezes é necessário o pré-tratamento do material em solventes orgânicos para remover lipídios. Até o final da década de 70, o isolamento de lectinas seguia o procedimento padrão para fracionamento convencional de proteínas (MOREIRA & PERRONE, 1977).

O isolamento de lectinas em vegetais inicia-se com a preparação da farinha e extração desta com solução tamponada, seguida por um fracionamento com sulfato de amônio e uma cromatografia. Pelo fato da lectina ligar-se especificamente a carboidratos

nas últimas décadas, utiliza-se com frequência a cromatografia de afinidade, onde a matriz contém o açúcar ligante da lectina (RUDIGER, 1988). Se necessário, a lectina purificada por afinidade pode ser submetida a uma segunda cromatografia de afinidade ou purificação adicional por técnicas clássicas tais como, filtração em gel, troca iônica, e interação hidrofóbica.

A purificação por cromatografia de afinidade é baseada nas seguintes propriedades biológicas das macromoléculas: seletividade, alta afinidade de reconhecimento e interação reversível com outras moléculas (WILCHEK & MIRON, 1999). Em alguns casos são empregados adsorventes comerciais, como a Sephadex, uma polidextrana (MOREIRA *et al*, 1983; MOREIRA & CAVADA, 1984; OLIVEIRA *et al*, 1991); Sepharose ligada a mono ou oligossacarídeos ou a glicoproteínas, como fetuína (CARTELLIERI *et al*, 2002) e mucina gástrica.

YEASMIN, *et al*. (2001) purificaram e caracterizaram três lectinas das sementes de *Amora* (*Morus sp.*) por cromatografia de filtração em gel seguido de cromatografia por troca-iônica em DEAE e CM-celulose que apresentaram especificidade por D-galactose.

Muitas plantas apresentam polissacarídeos sob a forma de gomas, em endospermas. Estes polissacarídeos são, nas gomas, galactomananas ramificadas contendo diferentes monossacarídeos, em proporções e posições diversas. Desta maneira, é possível ter-se as mais variadas estruturas de oligossacarídeos. Assim sendo, é possível preparar-se colunas de afinidade, onde as lectinas são capazes de interagir diferentemente, embora apresentando a mesma especificidade segundo a classificação de MAKELA (1957) mostrando afinidades diferentes (especificidade refinada) por estes oligossacarídeos.

O uso de gomas naturais para a purificação de proteínas era muito restrito (FUGITA *et al*, 1975; APPUKUTTAN *et al*, 1977). Entretanto, observa-se que nos últimos anos tem-se intensificado o uso de gomas naturais para o isolamento de proteínas, especialmente lectinas (TAVARES, 1998; GARROS-ROSA, 2000; MATOS, 2000; TEIXEIRA, 2001; BRAGA, 2001; LIMA, 2002).

TAVARES (1998) mostrou que as lectinas galactose-ligante de sementes de *Artocarpus incisa* e *Artocarpus integrifolia*, que apresentam uma elevada semelhança tanto a nível químico e físico-químico, como a nível imunológico, interagem diferentemente com a goma de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e goma de carolina (*Adenanthera pavonina*).

1.3. Síntese de Lectinas

As lectinas são sintetizadas durante o desenvolvimento da semente, atingindo os seus níveis máximos na fase de quiescência. Apesar de sua síntese mostrar-se diferenciada em relação às demais proteínas cotiledonárias, uma vez que o seu aparecimento nas sementes imaturas é detectado algum tempo depois do início da síntese das outras proteínas (ETZLER, 1986; MOREIRA *et al*, 1991), evidências bastante convincentes foram acumuladas em estudos realizados nos últimos tempos de que, pelo menos do ponto de vista de sua biossíntese, lectinas de sementes comportam-se como proteínas de reserva. Com isso, vários estudos têm detalhado a localização e o mecanismo do processamento pós-traducional da proteína. Os estudos de elucidação das etapas envolvidas neste processo têm se concentrado em duas famílias, leguminosas e gramíneas.

Como exemplo da lectina isolada da *Canavalia ensiformis* (ConA) observou-se que a mesma é sintetizada durante o processo de maturação da semente, acumulando-se nos corpos protéicos das células de reserva do parênquima cotiledonário (HERMAN *et al*, 1985). A lectina é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso na forma de uma pré-pró-lectina, com um peptídeo sinal de 29 resíduos de aminoácidos, que é removido durante o processo de tradução e interiorização da cadeia polipeptídica no lúmen do retículo endoplasmático. Um oligossacarídeo rico em manose é adicionado à porção mediana da proteína por ligação covalente ao resíduo de asparagina 153, produzindo assim o precursor glicosilado pro-ConA, cuja subunidade tem massa molecular aparente de 34 kDa (CHRISPEELS *et al*, 1986). A pro-ConA é transportada via complexo de Golgi para os corpos protéicos, onde é processada pela perda do glicopeptídeo central. Os dois polipeptídeos resultantes sofrem uma transposição e são então religados, originando a forma madura não glicosilada com 30 kDa. A adição do oligossacarídeo rico em manose é quem viabiliza o transporte da pro-ConA para os corpos protéicos (FAYE & CHRISPEELS, 1987). A existência de uma pró-lectina foi também detectada em *Canavalia brasiliensis* nos estágios iniciais de maturação da semente (ALMEIDA-SILVA, 1986), e em *Artocarpus integrifolia* da família **Moraceae**, a jacalina é também sintetizada, *in vivo*, como uma pré-pró-lectina sofrendo ambos os processamentos, co e pós-traducionais (YANG & CZAPLA, 1993), e pressupõe-se que essa lectina esteja localizada no compartimento vacuolar (PEUMANS *et al*, 2000).

Outro exemplo investigado foi a biossíntese da lectina de *Phaseolus vulgaris*, a qual ocorre em polissomos presos ao retículo endoplasmático e o processo co-traducional que também envolve a ligação de um oligossacarídeo rico em manose (BOLLINI, VITALE & CHRISPEELS, 1983). A transferência da proteína em questão, da superfície para o lúmen do retículo endoplasmático, é facilitada pela presença de um peptídeo sinal, hidrofóbico, em sua porção amino-terminal. Durante este transporte, uma peptidase específica ligada à membrana remove o peptídeo sinal, resultando na pró-lectina que após algumas modificações pós-traducionais é convertida na lectina nativa (HIGGINS *et al*, 1983a,b). Neste caso, apesar da PHA madura ser uma glicoproteína, a glicosilação não é um passo obrigatório no seu transporte para os corpos protéicos (BOLLINI *et al*, 1985).

Em linhas gerais, a biossíntese de outras lectinas assume um formato semelhante ao demonstrado acima. Algumas diferenças podem ocorrer nas subseqüentes modificações pós-traducionais. Como acontece com as lectinas heterodiméricas de *Pisum sativum* e *Vicia faba*, que são sintetizadas como pré-pro-lectinas. O processamento proteolítico resulta na formação de duas cadeias polipeptídicas, β e α , conseqüência da remoção do peptídeo sinal e transferência do polipeptídeo do lúmen do retículo endoplasmático para os corpos protéicos (HIGGINS *et al*, 1983b). As cadeias β e α estão ligadas covalentemente na pró-lectina, de modo que a cadeia β ocupa a posição N-terminal, seguida da cadeia α (HEMPERLY *et al*, 1982).

A ricina, lectina de *Ricinus communis*, pertencente à família das euforbiáceas, requer um mecanismo similar aos anteriores. A seqüência de nucleotídeo do cDNA da lectina indica que o produto inicial da síntese da ricina contém um peptídeo sinal com 24 resíduos de aminoácidos ligados à porção amino terminal da cadeia A (OLSNES & KOZLOV, 2001). Durante a transferência da pró-ricina ao lúmen do retículo endoplasmático, o peptídeo sinal é removido e a cadeia polipeptídica é simultaneamente polimanosilada. A pró-ricina é então transportada para o aparelho de golgi, onde as cadeias oligossacarídicas sofrem algumas modificações para então seguir caminho até os corpos protéicos, onde o processamento por uma proteinase a converte na sua forma madura e ativa, contendo duas cadeias polipeptídicas separadas, A e B (OLSNES & KOZLOV, 2001). A síntese da ricina na forma de um precursor inativo é o principal mecanismo pelo qual as células de *Ricinus* se auto-protégem da ação rRNA-N-glicosidase dessas proteínas (FRIGERIO *et al*, 1998).

Nas gramíneas, que foram investigadas com relação à biossíntese de lectinas (trigo, arroz, cevada), os dados disponíveis indicam um mecanismo básico semelhante ao que ocorre nas leguminosas, com algumas particularidades. Nas espécies mencionadas, após a remoção do peptídeo sinal no retículo endoplasmático, as pró-lectinas são glicosiladas com um oligossacarídeo rico em manose, mediante ligação covalente a um resíduo de ASN localizado em um peptídeo que contém os últimos 15 resíduos da porção carboxi-terminal. O glicopeptídeo carboxi-terminal é removido pós-traducionalmente durante o transporte da pró-lectina para os corpos protéicos (RAIKHEL & LERNER, 1991). A informação do correto direcionamento para os corpos protéicos não reside na estrutura do oligossacarídeo, mas na seqüência de aminoácidos do glicopeptídeo C-terminal. Uma lectina mutante de cevada que não possui o glicopeptídeo é secretada para fora da célula, enquanto que a lectina com o referido peptídeo (não glicosilado) é dirigida para os corpos protéicos (BEDNAREK *et al*, 1990).

Em estudos desenvolvidos durante o processo de germinação das sementes, dois comportamentos têm sido relatados: as lectinas de *Lathyrus ochrus*, *L. odoratus* e *L. tingitamus* são mobilizadas durante a germinação de maneira similar às proteínas de reserva dos cotilédones (ROUGÉ & PÉRE, 1983). De maneira contrária, as lectinas de *Canavalia brasiliensis* sofrem uma mobilização diferenciada em relação às proteínas de reserva, uma vez que sua degradação é retardada e a sua presença pode ser detectada até a quase completa exaustão dos cotilédones. Tal comportamento foi verificado tanto para as sementes germinadas no escuro (MOREIRA & CAVADA, 1984), como no claro (CAVADA *et al*, 1990).

De acordo com a literatura estudos envolvendo a síntese de macromoléculas e acúmulos de proteínas são mais facilitados quando compreendidos *in vitro* do que *in vivo*. A introdução de compostos chaves desses processos, a definição e controle das condições experimentais são todas, mais facilmente conseguidas sob circunstâncias pré-estabelecidas.

Segundo NAKAGAWA e colaboradores (1996) calos ou suas culturas em suspensão constituem sistemas utilizados para pesquisas bioquímicas e fisiológicas envolvendo proteínas vegetais. Além disso, a cultura de células e órgãos vegetais fornece uma importante função como um sistema eficiente na síntese de produtos naturais em larga escala (BOURGAUD *et al*, 2001).

Entretanto, apenas uns poucos estudos têm sido relatados com relação às culturas celulares de calos de lectinas. ETZLER *et al.* (1984), estudando a presença de lectinas em calos de *Dolichos biflorum*, observaram que a lectina presente nos calos de hipocótilos, flor e raiz era diferente da lectina presente na semente, e que, apresentava propriedades moleculares semelhantes àquela isolada do caule e folha. De acordo com GUPTA & SRIVASTAVA (1998), trabalhos sobre síntese de lectinas em culturas *in vitro* de plantas e seu estudo via tecido de planta e culturas de células podem elucidar sua biossíntese. Culturas de tecidos vegetais estabelecidas de embriões isolados e cotilédones foram usadas para investigar a biossíntese da lectina de *Canavalia virosa* (JAYAVARDHANAN *et al.*, 1996). Uma lectina de *Zizyphus mauritiana* lamk., foi purificada do extrato de calos de folhas cotiledonares e do extrato totais das sementes, e ambas apresentaram a mesma estrutura e propriedades (GUPTA & SRIVASTAVA, 1998). NAKAGAWA e colaboradores (1996), investigaram algumas propriedades de duas lectinas purificadas de calos de *Helianthus tuberosus*, como um passo inicial para a compreensão das funções biológicas das lectinas. Através de ensaios por Western blotting foi detectada uma banda protéica correspondente à banda principal da lectina de cotilédones de *Canavalia brasiliensis* (SILVA *et al.*, 2005).

1.4. Funções e Propriedades Biológicas das Lectinas

As lectinas isoladas de uma grande variedade de plantas têm atraído grande interesse devido sua notável atividade biológica. Essas proteínas que se ligam a carboidratos têm sido investigadas e utilizadas em várias áreas da bioquímica (YEASMIN *et al.*, 2001).

O fato das lectinas estarem amplamente distribuídas no reino vegetal, serem detectadas em vários tecidos e órgãos de muitas plantas e serem sintetizadas e mobilizadas em estágios específicos do desenvolvimento vegetal, constituem fortes evidências de que estas proteínas desempenham alguma(s) função(ões) relevantes na fisiologia das plantas onde elas são encontradas (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991).

Entretanto, de acordo com as últimas evidências experimentais, duas possíveis funções estão em maior evidência: (a) como mediadores da simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e raízes de leguminosas, e (b) como agentes de defesa das plantas contra patógenos e predadores, principalmente insetos e fungos (CHRISPEELS &

RAIKHEL, 1991; SHARON & LIS, 1989; PUSZTAI, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Na simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* e raízes de Leguminosas, existem uma pronunciada especificidade entre o microorganismo e a planta hospedeira, de modo que uma determinada espécie de *Rhizobium* só é capaz de infectar e formar nódulos funcionais nas raízes de um número restrito de leguminosas (SEQUEIRA, 1978). Portanto, atribui-se as lectinas de raízes de leguminosas um papel importante na determinação da referida especificidade (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991).

Têm-se proposto que a função biológica de lectinas pode consistir em proteger a planta ou suas sementes de ataques pelos microorganismos ou insetos invasores ou predadores (RÜDIGER, 1998; CAMACHO BARRON & GONZÁLEZ DE MEJIA, 1998).

A função de defesa das plantas contra o ataque de fungos e de insetos tem sido atribuída, principalmente, as lectinas que se ligam à quitina, um polissacarídeo de N-acetilglicosamina, que constitui um elemento estrutural importante da parede celular de muitos fungos fitopatogênicos, do exoesqueleto e do trato digestório dos insetos e da cutícula de nematóides (LERNER & RAIKHEL, 1992; FREIRE, 2002). As características biológicas destas lectinas são compatíveis com esta função. Além disso, muitas destas lectinas possuem uma alta toxicidade *in vitro* a vários insetos (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; HUESING *et al*, 1991) e fungos (VAN PARIJS *et al*, 1991).

Várias lectinas com atividades antifúngicas têm sido isoladas de espécies vegetais, sugerindo que essas proteínas podem estar envolvidas na defesa da planta, contra microrganismos do solo, durante a germinação que é quando a semente é mais susceptível ao ataque de patógenos (OLIVEIRA *et al*, 2002; DOES *et al*, 1999).

De acordo com a literatura, as lectinas de estrutura tetramérica apresentam propriedades inseticidas (BARRE *et al*, 1996) e antifúngicas (GOZIA *et al*, 1993) bem mais potentes, pois devido à presença de multivalência há a capacidade para interagir fortemente com glicoconjugados complexos.

TRIGUEROS *et al*. (2003) identificaram uma lectina com propriedades inseticidas, isolada da espécie *Xerocomus chrysenteron* apresentando alta atividade inseticida comparada a lectinas isoladas de *Lathyrus ochrus* ou *Galanthus Nivalis*, entretanto, o mecanismo de toxicidade desta nova lectina ainda não foi elucidado. Em outros trabalhos

realizados anteriormente, outras lectinas, isolada da *Griffonia simplicifolia* e *Luetzelburgia auriculata*, também mostrou atividade inseticida (ZHU *et al*, 1996; OLIVEIRA *et al*, 2002).

Nas leguminosas, a interação entre lectinas e microorganismos pode ser importante como um dos determinantes do tipo de relação a ser estabelecido entre o microorganismo e o vegetal, ou seja, saprofitismo, simbiose ou patogênese (AYOUBA *et al*, 1991). Por exemplo, a atividade hemaglutinante de várias lectinas de leguminosas específicas para glucose/manose ou galactose/N-acetil-galactosamina é inibida por ácido murâmico e ácido N-acetil murâmico, dois monossacarídeos largamente distribuídos em peptidoglicanos da parede celular de bactérias (AYOUBA *et al*, 1991). Tem sido observado que algumas sementes excretam lectinas durante a germinação dentro do meio que a envolve (RÜDIGER, 1998). A lectina de sementes de soja, por exemplo, além de interagir com os ácidos acima citados (AYOUBA *et al*, 1991), é exudada para o meio durante a germinação mostrando resistência à ação de enzimas proteolíticas do solo (CAUSSE & ROUGÉ, 1983). Além disso, interage inespecificamente e de maneira não covalente com ácidos húmicos e argilas, os principais colóides do solo, permanecendo ainda ativa quando associada a essas partículas (CAUSSE *et al*, 1985). Assim, a lectina presente no solo em volta da semente em germinação ou mesmo da plântula em desenvolvimento pode exercer alguma função antimicrobiana, como inibição do crescimento de microorganismos patogênicos (CAUSSE & ROUGÉ, 1983). Um outro exemplo é o da seringueira (*Hevea brasiliensis*) que libera o látex, substância economicamente importante, no qual, contém uma lectina chamada heveína (VAN PARIJS *et al*, 1991; GIDROL, *et al*, 1994). Esta lectina ou seu precursor, acredita-se ser a causadora de alergias à borracha, após observações em grupos clínicos (ALENIUS *et al*, 1995; BEEZHOLD *et al*, 1997; CHEN *et al*, 1997; RIHS *et al*, 1997).

Além desses prováveis papéis fisiológicos que as lectinas podem desempenhar dentro da planta, elas também apresentam diferentes atividades biológicas em outros sistemas. Essa atividade provém da sua propriedade de interagir com carboidratos, e aglutinar células (SWAIN, *et al*, 1996). Para que o processo de aglutinação ocorra, a lectina deve apresentar mais de um sítio de ligação para carboidratos, a fim de poder formar ligações cruzadas entre diferentes células. A grande maioria dos estudos sobre aglutinação celular tem sido realizada em células de animais, apesar de que outras estruturas, como vírus (STEWART *et al*, 1973), bactérias e fungos (PISTOLE *et al*, 1981),

também podem ser aglutinados. A aglutinação é do tipo lectínica quando a mesma mostrar-se seletivamente inibida por açúcares, indicando o envolvimento de receptores de natureza glicídica (LIS & SHARON, 1998).

Devido a resíduos de carboidratos presentes na superfície das hemácias, as lectinas podem ser usadas para diferenciar os grupos sanguíneos, como exemplo as lectinas de *Dolichos biflorus* (DBA), *Vicia villosa* (VVA), *Phaseolus lunatus* (LBA), *Glycine max* (SBA) e *Helix pomatia* (HPA) que reconhecem, potencialmente, o grupo A. Aquelas isoladas da *Griffonia simplicifolia* I e de *Ulex europeus* I (UEA-I) reconhece o grupo B e O, respectivamente (MATSUI *et al*, 2001).

A interação entre lectina e carboidrato ocorre no início dos eventos moleculares da resposta imune. Essas proteínas são, portanto, usadas como reagente policlonal para investigar o mecanismo molecular e controlar a ativação e proliferação de linfócitos, para identificar as células do sistema imune e como drogas (BAINS *et al*, 2005).

As lectinas apresentam vários efeitos biológicos em células, sendo a aglutinação e a mitogenicidade os mais estudados. Outras atividades biológicas detectadas para algumas lectinas, incluem: redistribuição de componentes da superfície celular, atividade insulino-mimética em células adiposas, toxicidade *in vivo* e *in vitro*, inibição do crescimento de fungos, indução da liberação de histamina, produção de interferon, inibição do crescimento de células neoplásicas, promoção de adesão celular, efeito imunossupressor, efeito inflamatório, atividade nematicida e inseticida, aumento do poder fagocitário por células, efeito anti-inflamatório, entre outros. No entanto, essas proteínas exibem tais atividades diferenciadas (MOTA, 1997). Evidências sugerem, ainda, que uma potente função das lectinas vegetais aplica-se as bactérias. Interações entre lectinas e bactérias que são patogênicas ao homem, têm sido extensivamente estudadas considerando o seu potencial para diagnóstico (SLIFKIN, 1994).

As lectinas com atividade mitogênica têm sido usadas para avaliar a imunocompetência de pacientes portadores de várias patologias e investigar o funcionamento do sistema imune em condições anormais (KRICKEBERG *et al*, 1990).

Durante a última década, o interesse pelas lectinas que apresentam atividade anticancerígena tem aumentado. Alguns estudos sugerem que as lectinas vegetais possuem atividade antitumoral, ou seja, podem ter efeito inibitório sobre o crescimento do tumor, e

atividade anticarcinogênica, podendo ser citado como exemplo um efeito inibitório sobre a indução de câncer por carcinogênese (BAINS *et al*, 2005).

Várias pesquisas desenvolvidas com lectinas vegetais demonstram que essas proteínas são ferramentas valiosas nos eventos citotóxicos: No trabalho realizado por KAWAGISHI *et al*, (1990) foi observado que a lectina isolada de *Grifolia frondosa* apresentou atividade citotóxica para células HeLa. A lectina de *Agaricus bisporus* mostrou possuir atividade anti-proliferativa contra células HT-29 responsáveis por câncer de cólon em humanos (YU, *et al*, 1993). Poucas espécies de lectinas vegetais foram identificadas quanto a sua capacidade em induzir atividade de apoptose em células tumorais, podendo-se citar como exemplo, a lectina isolada de *Viscum álbum* L. (BANTEL *et al*, 1999; PARK *et al*, 2000).

As lectinas têm uma capacidade adicional para diferenciar entre diferentes tipos celulares, inclusive células malignas e normais (REYNOSO-CAMACHO, *et al*, 2003). Trabalhos realizados, anteriormente, mostraram que células transformadas são mais, freqüentemente, sensíveis aos efeitos citotóxicos das lectinas que células normais (SCHWARTZ *et al*, 1999). Esta especificidade celular tem levado à numerosas aplicações das lectinas na área médica experimental, usando diferentes vias de administração.

Desde que as interações mediadas por lectinas estejam envolvidas em muitos processos patológicos, tais como metástase de células tumorais, interação entre microrganismo-hospedeiro e inflamação, lectinas exógenas e carboidratos, pelo bloqueio dessas interações glicobiológicas, estas podem ser, potencialmente, úteis como ferramentas ou moduladores terapêuticos nesses processos (BRANDO-LIMA *et al*, 2005).

Sabe-se, desde muito tempo, que muitas lectinas de sementes, principalmente de leguminosas, são reconhecidas como tóxicas para uma variedade de animais, quando ingeridas cruas. Ensaio alimentares com lectinas isolada de *Phaseolus vulgaris* e *Phaseolus acutifolius* demonstraram que a toxicidade dessas espécies pode ser atribuída a suas respectivas lectinas, que estão abundantemente presente nestas sementes (PUSZTAI *et al*, 1978; REYNOSO-CAMACHO *et al*, 2003). Esta atividade tóxica é devida à resistência, destas lectinas, à hidrólise enzimática no trato intestinal, e sua ligação às células da borda em escova do intestino, causando diversos efeitos, devido à endocitose que resulta num aumento da atividade metabólica e eventualmente leva à hiperplasia e hipertrofia do intestino delgado (PUSZTAI *et al*, 1990).

Não é difícil imaginar que o acúmulo de grandes quantidades de uma lectina que causa vários efeitos no intestino (além de trazer desconforto para o animal) torna o feijão comum e outras sementes que contenham tais lectinas antinutricionais, muito menos palatável para possíveis predadores. Desta forma, em vez de comerem estas sementes, eles procurarão (numa reação de rejeição) outras fontes de alimento (PEUMANS & VAN DAMME, 1997).

De fato, a expressão destas proteínas, moderadamente tóxicas, que causam vários desconfortos para os animais que as utilizam como parte de sua dieta, tem sido considerada como uma estratégia evolucionariamente adaptacional das plantas para garantir a sobrevivência das espécies (PEUMANS & VAN DAMME, 1997).

VASCONCELOS *et al.* (2001) realizaram um estudo nutricional com duas cultivares de soja (*Glycine max*) observando que todos os componentes em estudo (proteínas tóxicas e fatores antinutricionais) interferem com os parâmetros nutricionais e/ou tamanho de órgãos, embora as alterações biológicas tenham sido principalmente devido à lectina e inibidor de tripsina. Todavia estes efeitos puderam ser parcialmente eliminados ou inativados com tratamento térmico adequado.

Segundo REYNOSO-CAMACHO *et al.* (2003) algumas lectinas são tóxicas para células dos mamíferos tanto *in vivo* como *in vitro*. Elas podem reduzir o crescimento e interferir com a absorção de nutrientes. Tais lectinas são letais se ingeridas a altas concentrações (SANTORO *et al.*, 1997).

Outras lectinas cujas toxicidades têm sido investigada são: Con A, WGA e a lectina de *Robinia pseudoacacia*, que são todas tóxicas para células de mamíferos (LIS & SHARON, 1981). KULKARNI & MCCULLOCH (1995) verificaram que a lectina Concanavalina A mostrou-se indutora de apoptose em fibroblastos humanos e de camundongos. Os autores propuseram que as ligações cruzadas provocadas pela lectina ao ligar-se nos resíduos de manose presentes nas glicoproteínas da superfície celular, podem servir de sinal para dar início ao processo de apoptose. Além disso, esses cientistas afirmam que, somado a isso, a morte celular programada deve-se também à inibição da síntese protéica causada por aquela proteína. Esses resultados foram similares aos observados por KAPLOWITZ & HAAR (1988) quando verificaram que a lectina WGA induzia o bloqueio do ciclo celular também em fibroblastos. Contudo, essa toxicidade é

bem menor do que a encontrada para ricina e abrina, lectinas pertencentes ao grupo de proteínas inativadoras de ribossomas (RIPs).

As RIPs tipo 2 são conhecidas por sua ação citotóxica potente, e representam uma classe especial de quimerolectinas com uma toxicidade geral frente a todos os eucariontes. Elas inativam, cataliticamente, os ribossomas eucarióticos por clivar a ligação N-glicosídica de um resíduo de adenina situado numa região conservada da subunidade maior do RNA ribossômico (rRNA). Essa depurinação do rRNA causa uma modificação estrutural e impede que dois fatores de alongação se liguem ao ribossomo, levando a inibição da síntese protéica (NIELSEN E BOSTON, 2001).

Na última década, o interesse entre interações proteínas e carboidratos tem aumentado consideravelmente. As primeiras investigações entre proteínas e açúcares foram negligenciadas devido às investigações envolvendo peptídeos, DNA e suas interações. (NEUMANN, 2004).

Até a descoberta da atividade lectínica de ligação a carboidrato, o mecanismo relacionado à atividade biológica de lectinas vegetais permanecia enigmático. Tão logo se tornou evidente que a atividade da lectina é baseada no reconhecimento e ligação a unidades de açúcares específicos, o conceito de um receptor-lectina foi introduzido para explicar as várias atividades de lectinas vegetais em termos moleculares. Com o isolamento de muitas lectinas, recentemente, acumularam evidências que muitas das lectinas vegetais exibem diferenças com respeito à sua atividade biológica, relacionadas a células animais e humanas. Como era esperado que estas diferenças fossem intimamente relacionadas com a estrutura dos receptores glicanos da respectiva lectina, a necessidade para uma determinação detalhada da ligação específica carboidrato-lectina logo foi reconhecida e vários grupos de pesquisa voltaram seus esforços para a elucidação da especificidade fina de diferentes lectinas. Como resultado, informações detalhadas estão agora disponíveis no que diz respeito a especificidade para açúcar de muitas lectinas de plantas que são usadas como investigador molecular e/ou proteínas ativas biologicamente (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

Embora muitas funções específicas para as lectinas tenham sido propostas, o seu papel endógeno ainda é motivo de especulação pela comunidade científica.

Receptores endógenos (ligantes a lectinas) foram isolados de sementes de *Pisum sativum*, *Canavalia ensiformes*, *Vicia cracca*, *Vicia faba* e *Ricinus communis*, mas os mesmos não foram caracterizados (GANSERA *et al*, 1979; GEBAUER *et al*, 1979).

Nos anos oitenta e início dos anos noventa, um grupo alemão descreveu uma possível ocorrência de um composto endógeno ligante de lectina diante da idéia que lectina de legumes são proteínas vacuolares armazenadas nos corpos protéicos das sementes, podendo ser ligantes naturais para outros glicocompostos localizados nos corpos protéicos incluindo suas membranas (EINHOFF *et al*, 1986; RUDIGER & SCHERCHER, 1993; GERS-BARLAG *et al*, 1993; SCHERCHER & RUDIGER, 1994; WENZEL & RUDIGER, 1995). Tendo em vista o que foi descrito acima, Ramos e colaboradores (2002) evidenciaram a interação da lectina de semente de *Cratylia floribunda* com moléculas solúveis presentes nas frações protéicas obtidas de farinha da mesma semente mostrando que esta interação deve ser mediada pelo sítio de ligação de carboidrato na lectina.

Em 2002, Tavares detectou receptores endógenos de lectinas de sementes de *Dioclea sclerocarpa* a partir da cromatografia do extrato salino de cotilédones de sementes em coluna Sepharose 4B com lectinas glucose específicas acopladas.

1.5. Lectinas e o Processo Inflamatório

Segundo RANGE *et al*. (2001) o termo “reação inflamatória” refere-se aos eventos que ocorrem nos tecidos em resposta a um patógeno invasor ou à presença de uma substância nociva. Complementando tal definição ROTELLI *et al*. (2003) afirmam que tais processos inflamatórios envolvem uma série de eventos que podem ser produzidos por vários estímulos como: agentes infecciosos, isquemia, interação antígeno-anticorpo, injúrias química, térmica ou mecânica.

THANGAM & DHANANJAYAN (2003) definiram a inflamação como uma resposta normal ao tecido injuriado decorrente de trauma físico, agentes microbiológicos, agentes químicos ou tóxicos. Tal reação abrange um conjunto de fenômenos que inativa ou destrói o agente invasor, remove substâncias irritantes e prepara o reparo tecidual (UNDERWOOD, 2000). É caracterizada por uma rápida infiltração para o sítio específico no local da lesão de células polimorfonucleares, seguida de monócitos seguido por linfócitos (CUZZOCREA, 2005). A migração de neutrófilos para o sítio inflamatório

constitui a primeira linha de defesa contra microorganismos invasores (RÜDIGER & GABIUS, 2001).

CUZZOCREA (2005) afirma que nos últimos anos, tem-se obtido substancial conhecimento sobre a importância de mediadores e moléculas de adesão nos processos inflamatórios os quais finalmente resultam no recrutamento de células polimorfonucleares para o sítio inflamatório.

Os processos inflamatórios ocorrem, comumente, em pessoas e animais. E algumas condições que estão associadas com a inflamação incluem artrite, aterosclerose, asma e muitas outras patologias, infecções devido a bactérias ou vírus, resposta específica imune a antígenos e exposição a toxinas sintetizadas por microrganismos (ROTH *et al*, 2003). Nesse processo a fagocitose mostra uma notável função de defesa contra numerosos fatores infecciosos e não infecciosos (POPOV *et al*, 1999).

As reações inflamatórias consistem, geralmente, em reações imunologicamente específicas, bem como em várias reações inatas, que não têm nenhuma base imunológica. Essas reações são protetoras, ou seja, possuem valor em termos de sobrevivência do indivíduo, entretanto, se forem desenvolvidas inapropriadamente, tornam-se prejudiciais (RANGE *et al*, 2001).

Durante a inflamação vários mediadores químicos específicos são liberados, dependendo do processo inflamatório. Tais mediadores incluem aminas como a histamina, serotonina, prostaglandinas e pequenos peptídeos tais como citocinas (COTRAN *et al*, 2001).

SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY (2004) relataram que a inflamação quando excessiva pode levar a uma severa injúria tecidual e causar desequilíbrio fisiológico, disfunção em algum órgão e morte.

A inflamação costuma ser dividida em três fases distintas: aguda, subaguda e resposta imune ou crônica. Aparentemente, cada uma dessas fases é mediada por diferentes mecanismos (KATZUNG, 2003): Na fase aguda, observa-se uma vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar; a fase subaguda caracteriza-se por infiltração de leucócitos e células fagocíticas e na fase crônica ocorre degeneração tecidual e fibrose (ROTELLI *et al*, 2003).

O mecanismo da inflamação aguda envolve uma série de eventos complexos que incluem dilatação de arteríolas, veias e capilares com aumento da permeabilidade vascular com exudação de flúidos que incluem proteínas plasmáticas e migração de leucócitos para a área afetada (CUZZOCREA, 2005).

Como resultado da vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, o fluxo sanguíneo torna-se lento no sítio inflamatório. Essa lentidão faz com que os leucócitos assumam uma posição periférica, isto é, os eritrócitos são confinados a uma coluna axial central, deslocando os leucócitos em direção a parede do vaso que assumem uma posição periférica ao longo da superfície endotelial. Esse processo de acúmulo de leucócitos é denominado de *marginção*. Subseqüentemente, leucócitos individuais e depois fileiras deles rolam (*rolling*) lentamente ao longo do endotélio e aderem transitoriamente, por fim repousando em algum ponto ao qual eles aderem firmemente. Com o tempo, o endotélio pode ser revestido praticamente de leucócitos, um aspecto chamado de *pavimentação*. Após *firme adesão*, os leucócitos inserem pseudópode nas junções entre as células endoteliais e assumem uma posição entre a célula endotelial e a membrana basal. Posteriormente, eles atravessam a membrana basal e escapam para o espaço extravascular. Os neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos usam a mesma via para migrar da circulação sistêmica para os tecidos (Figura 02) (COTRAN, *et al*, 2001).

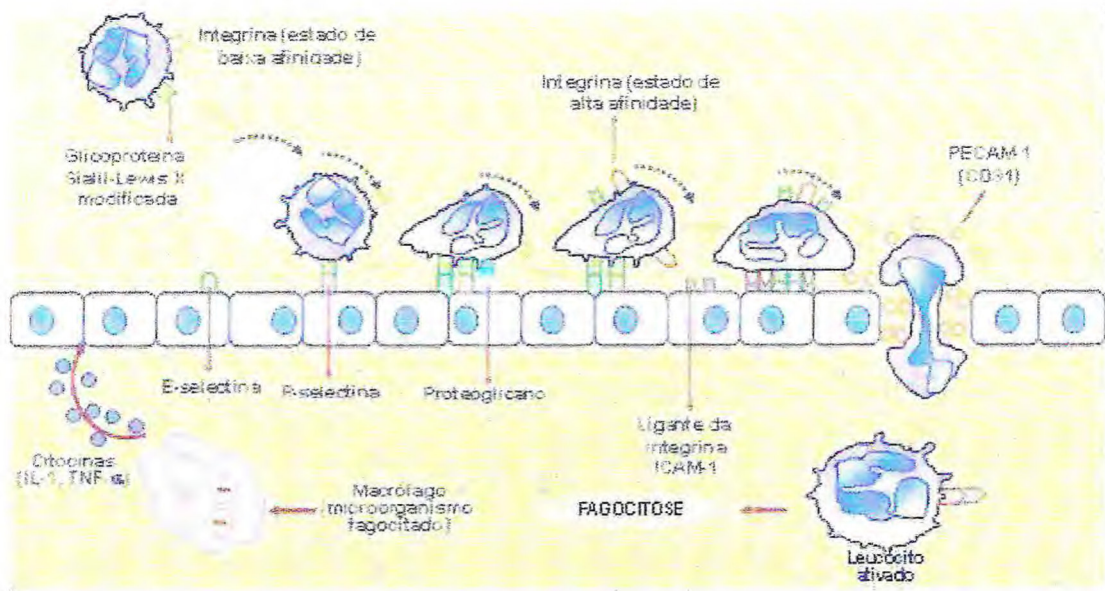


Figura 02 – Múltiplos processos envolvidos na migração de leucócitos através dos vasos sanguíneos. As seguintes etapas: (1) Ativação endotelial – mediadores presentes nos locais inflamatórios aumentam a expressão de E-selectina e P-selectina; (2) *Rolling* – há uma descendência inicial rápida e relativamente frouxa, resultando de interações de selectinas com seus ligantes de carboidratos; (3) Aderência firme – os leucócitos são então ativados por quimiocinas ou outros agentes, e (4) Transmigração – esta é mediada por interações da ICAM-1/integrinas e PECAM-1 nos leucócitos e nas células endoteliais. Diferentes moléculas têm papel predominante nas distintas etapas desses processos—selectinas no *rolling*; quimiocinas na ativação dos neutrófilos para aumentar a avidéz das integrinas; integrinas na firme adesão; e CD31 (PECAM-1) na transmigração (DEOCLECIANO JUNIOR, 2005).

A aderência e a transmigração leucocitária são determinadas basicamente pela ligação de moléculas de aderência complementares nas superfícies leucocitária e endotelial e mediadores químicos (quimioatratores e certas citocinas). Tais mediadores químicos afetam esses processos modulando a expressão na superfície dos leucócitos e das células endoteliais das moléculas de aderência. Os receptores de aderência envolvidos pertencem a quatro famílias moleculares – as selectinas, as imunoglobulinas, as integrinas e as glicoproteínas semelhantes à mucina (Tabela 01) (LUSCINSKAS, 2002).

As selectinas são moléculas de superfície do grupo das glicoproteínas que são expressas nos leucócitos (L-selectina), células endoteliais (E-selectina) e plaquetas (P-selectinas) que se ligam a determinantes sialilados de carboidratos nas células adjacentes (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

Tabela 01 – Moléculas de adesão leucócito / célula endotelial

Molécula Endotelial	Receptor no leucócito	Principal função
P-selectina	Sialyl-Lewis X PSGL-1	<i>Rolling</i> (neutrófilos, monócitos, linfócitos)
E-selectina	Sialyl-Lewis X	<i>Rolling</i> , adesão para ativar o endotélio (neutrófilos, monócitos, linfócitos, células T)
ICAM-1	CD11/CD18 (integrinas) (LFA-1, Mac-1)	Adesão, transmigração (todos os leucócitos)
VCAM-1	$\alpha 4\beta 1$ (VLA4) (integrinas) A4 β 7 (LPAM-1)	Adesão (eosinófilos, monócitos, linfócitos)
GlyCam-1	L-selectina	Linfócitos
CD31 (PECAM)	CD31	Migração dos leucócitos através do endotélio

*ICAM-1, VCAM-1, e CD31 pertencem à família das imunoglobulinas; PSGL-1, glicoproteína ligante de P-selectina-1 (OKPALA, 2004).

O grupo das selectinas, abrange a E-selectina, encontrada no endotélio, P-selectina, presente no endotélio e plaquetas e a L-selectina, presente nos leucócitos. As selectinas ligam-se, através de seus domínios de lectina, a formas sialiladas de oligossacarídeos (ex.: *sialylated Lewis X*), que por sua vez, estão ligadas de maneira covalente, a várias glicoproteínas semelhantes à mucina. As moléculas da família das imunoglobulinas incluem duas moléculas de adesão endoteliais: ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e VCAM-1 (molécula de adesão vasculares 1). Essas moléculas interagem com as integrinas encontradas nos leucócitos. As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas transmembranares, constituídas de cadeias alfa e beta, que também funcionam como receptores da matriz extracelular (CICCHETTI *et al*, 2002).

Os sistemas que reconhecem carboidratos são componentes essenciais na interação célula-célula, particularmente no tocante à resposta imune inata e na inflamação (CROCKER & FEIZI, 1996).

BENJAMIN *et al.* (1997) afirmam que o estudo da interação proteína-carboidrato envolvidos na migração de leucócitos durante a resposta inflamatória poderá ser utilizada

para identificar lectinas exógenas que apresentem características semelhantes aos efeitos das lectinas endógenas. Devido à função crucial das lectinas endógenas na mobilização e ativação de neutrófilos, o uso de lectinas exógenas, como as lectinas vegetais, como moduladores na função dos leucócitos têm sido, frequentemente, considerado. Entretanto, as diferentes propriedades das lectinas de plantas na indução específica da resposta celular têm contribuído para o delineamento do mecanismo de sinalização da ligação celular inicial até a ativação intracelular e modulação da resposta leucocitária (RÜDIGER & GABIUS, 2001).

Em trabalhos realizados por LIMA *et al.* (1999) chegou-se a conclusão que lectinas vegetais podem simular lectinas endógenas dos mamíferos, e por isso, têm sido largamente usadas para estudar diversos processos fisiopatológicos.

As galectinas, uma família altamente conservada de proteínas, presentes em todos os organismos vivos, que se ligam a glicanos, são caracterizadas pela sua capacidade de reconhecer seqüências de N-acetilgalactosamina, as quais podem ser demonstradas sobre a superfície celular glicoconjugada com N-glicanos e O-glicanos (GABIUS, 2002).

Todas as galectinas contêm domínios altamente conservados de reconhecimento a carboidrato. Até o momento, menos de 15 galectinas foram identificadas, as quais podem ser subdivididas em três grupos: aquelas contendo apenas um domínio de reconhecimento a carboidrato, aquelas que contêm dois domínios diferentes e o grupo que consiste de repetições não usuais estendidas e fundidas sobre os domínios de ligação (LIU E RABINOVICH, 2004).

Segundo a literatura, diferentes galectinas são específicas para diferentes carboidratos ligantes, essa diferença está na capacidade em acomodar certos sacarídeos ligados a galactose e poder formar seqüências regulares de complexos os quais se ligam a glicoconjugados multivalentes (LIU E RABINOVICH, 2004).

A ligação da galectina aos glicoconjugados de membrana pode modular uma grande variedade de processos imunológicos como apoptose mediada por células-T, ativação e adesão celular e secreção de citocinas (RABINOVICH *et al.*, 2002).

SANTUCCI *et al.* (2003) realizando experimentos *in vivo* e *in vitro* observaram que o pré-tratamento com galectina-1 previne a injúria hepática e a infiltração de células T CD4⁺ na hepatite induzida em camundongos por Con A (concavalina A). Os autores mostraram o efeito protetor da galectina-1 neste modelo e confirmaram que a galectina-1

atua *in vivo* promovendo a eliminação seletiva de antígenos ativados pelas células T e bloqueando a síntese de citocinas pró-inflamatória.

BRANDO-LIMA *et al.* (2005) afirmam que as lectinas vegetais que se ligam a manose ou galactose são de especial interesse, uma vez que podem interagir com diferentes moléculas endógenas envolvidas na resposta imune inata e específica. Trabalhos realizados anteriormente mostraram que algumas lectinas vegetais podem mimetizar lectinas endógenas de mamíferos, induzindo neutrófilos e a migração de células mononucleares tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BENTO *et al.*, 1993; LAVASTRE *et al.*, 2004; SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994).

FREIRE *et al.* (2003), observam que as lectinas podem agir como potentes mitógenos induzindo a proliferação *in vitro* de linfócitos por mecanismos dependentes (ITO *et al.*, 1984; BORREBACK & CARLSON, 1989).

BARRAL-NETO *et al.* (1992), observaram o comportamento da proliferação de linfócitos e estimulação da produção de interferon-gama por diversas lectinas da subtribo *Diocleinae* e compararam com a Concanavalina A. Os resultados mostraram que todas as lectinas testadas são mitogênicas apresentando, no entanto, atividade diferenciada. Os autores também sugeriram que pequenas diferenças nas seqüências de aminoácidos próximos à região envolvendo a interação com açúcar poderiam afetar a especificidade fina de cada lectina para o mesmo receptor na membrana celular, visto que tais proteínas possuem a mesma especificidade glucose/manose. SHANGARY *et al.* (1995) purificaram duas lectinas de tubérculos de *Arisaema consaguinem* e *A. curvatum* pertencentes à família das *Araceae* e que se mostraram especificamente mitogênicas para células T do sangue periférico humano. Tal atividade foi inibida por asialofetúina de maneira dose-dependente. As lectinas mitogênicas ou não, têm sido bastante utilizadas como indutoras na produção de interferon natural, a exemplo da *Dioclea grandiflora*, mas até o momento não está esclarecido o mecanismo utilizado por essas proteínas (KIYOTA, 1993).

As mesmas lectinas estudadas da subtribo *Diocleinae*, demonstraram que são capazes de estimular células *in vivo* nos nódulos linfóides de camundongos BALB/c. Esta estimulação celular é acompanhada de apoptose, inflamação e em alguns casos necrose endotelial (BARRAL-NETO *et al.*, 2001).

GOMES *et al.* (1994) observaram a indução da liberação de histamina por oito lectinas pertencentes à família das leguminosas, sub-tribo *Diocleinae*. Estas lectinas

apresentaram atividades diferentes quando comparadas a Concanavalina A, além de ter sido verificada a necessidade de íons cátions para o melhor desempenho dessa propriedade biológica para a lectina de *Dioclea virgata*.

Lectinas vegetais, quando administradas intraperitonealmente em animais, podem induzir exsudação intracavitária de leucócitos, a exemplo da lectina de *Artocarpus integrifolia* (jacalina e KM^+), estudada SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.* (1994), respectivamente. Entretanto, a lectina KM^+ , quando injetada endovenosamente, contra um estímulo inflamatório administrado em cavidade peritoneal de ratos, apresentou um efeito antiinflamatório (SAKAMOTO *et al.*, 1996).

ALENCAR *et al.* (2003), observaram que a lectina galactose ligante isolada de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML), após injeção intraperitoneal em ratos induziu a migração de neutrófilos e células mononucleares de maneira dose-dependente, para a cavidade peritoneal. Também foi demonstrado que a VML exibiu uma atividade pró-inflamatória quando dois modelos para inflamação foram utilizados: o edema de pata e a bolha de ar. Os resultados sugerem que a VML induz migração de neutrófilos por uma via indireta, mediada por macrófagos.

BENJAMIN *et al.* (1997), observaram que a lectina da soja induziu reações inflamatórias agudas quando injetada em diferentes cavidades de rato. Esta reação foi caracterizada pela intensa migração de neutrófilos e extravasamento de fluido e foi inibida pelo pré-tratamento com glicocorticóides e, em menor extensão, por um antagonista de PAF (fator ativador de plaquetas) ou por um inibidor da lipoxigenase. Este efeito foi completamente bloqueado quando a lectina foi injetada, simultaneamente, com N-acetilglucosamina.

FARIAS (1995) e COSTA (1995) verificaram que as lectinas de algas *Meristiella echinocarpa* e *Amancia multifida* apresentaram atividade mitogênica sobre células mononucleares do sangue periférico humano e que as isolectinas da alga marinha *Meristiella echinocarpa* foram inibidoras do efeito mitogênico das lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA) e *Canavalia brasiliensis* em doses bastante estimulatórias (FARIAS, 1995). Esta atividade mitogênica pode ser afetada por alterações que ocorram na superfície de linfócitos e modificação química na lectina (LIS & SHARON, 1981).

CARDENAS & FERNANDEZ (1995) observaram que a lectina obtida de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. (PHA) apresentou uma significativa diminuição do tempo de

cicatrização de feridas abertas provocadas em camundongos BALB/c, quando comparado ao tempo de feridas não tratadas com tal proteína. Esses resultados indicam que as lectinas vegetais podem servir de ferramentas úteis no tratamento mais acelerado de cicatrização de feridas abertas ou provocadas por cirurgias pós-operatórias.

As lectinas têm servido como ferramentas em laboratório de imunologia em virtude da capacidade destas para desencadear a sinalização de eventos por ligação a glicoconjugados sobre a superfície de células envolvidas na resposta imune (VILLALOBO e GABIUS, 1998).

Como observado, as lectinas vegetais possuem diferentes atividades biológicas que provavelmente estejam relacionadas, também, às características estruturais apresentadas por essas proteínas. Um exemplo é a lectina Con Br que, demonstrada por cristalografia, possui uma estrutura quaternária mais aberta quando comparada a ConA (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Essas duas proteínas apesar de pertencerem à mesma subtribo Diocleinae, possuírem 99% de identidade seqüencial e mostrarem a mesma especificidade por açúcar (glucose/manose) apresentam efeitos biológicos diferentes.

As lectinas, ao longo do tempo, mostraram ser excelentes ferramentas para investigações estruturais e funcionais de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas, e para investigações de mudanças que ocorrem sobre a superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos da diferenciação celular no câncer (RÜDIGER, 1998).

1.6. *Glycine wightii* (Arn. & Wight) Verdc.

Glycine wightii pertence à família Leguminosae, sub-família Papilionoideae, gênero *Glycine* e sub-gênero *Bracteata*. É uma espécie trapadeira perene, encontrada principalmente no leste da África, Índia e Ásia (BOGDAN, 1977; SKERMAN, 1977). No Brasil, é comumente chamada “soja perene”. No Sul da África, a planta é conhecida como “olieboontjie”, que em Uganda é chamada “agaba”, “edila”, “ekibowabowa” ou “kaihabukuru” (SMITH, 1966). WILLIAMSON (1955), relatou que em Malowi, as folhas de *G. wightii* são cozidas e frequentemente utilizadas como alimento pela comunidade local, como suplemento alimentar.

Segundo VISWANATHAN *et al.* (2001) a presença de relativa quantidade de proteína e ácidos graxos é responsável pelo elevado valor nutricional das sementes de *Glycine wightii*, o que a faz ser considerada como uma fonte alternativa de alimento para a dieta humana. Essas sementes são também excelentes fontes de aminoácidos essenciais tais como a leucina, lisina, isoleucina, valina, treonina e histidina e minerais tais como potássio, magnésio e manganês quando comparada com outras leguminosas.

As plantas de *G. wightii* possuem pequenos e finos pêlos na parte inferior das folhas e caules que são bem ramificados (Figura 3). Eles produzem pequenas flores que podem variar de coloração (branca, amarela, verde, laranja e rosa) dependendo da cultivar. Apresentam vagens de 4 a 5 cm de comprimento, peludas, contendo aproximadamente 3 a 8 sementes com coloração marrom-escura (Figura 4).

Plantas de *G. wightii* são, moderadamente, resistentes a períodos de seca estão melhores adaptadas em áreas com índices pluviométricos entre 750 a 1500 mm por ano. Nos períodos secos, crescem pouco, porém recuperam-se rapidamente quando as condições favoráveis são novamente estabelecidas. A temperatura ideal para o crescimento e produção de sementes fica entre 18 e 27 °C. Temperaturas muito baixas afetam o crescimento. Solos com o pH entre 6.0 e 6.5 são ideais para o cultivo (WHITEMAN, 1980).

A *G. wightii* é comumente utilizada no controle da erosão em vertentes, ao longo das margens de riachos e canais de irrigação. É também utilizada em consórcio com outras culturas para eliminar plantas invasoras e para fertilizar solos impróprios, por ser uma planta fixadora de nitrogênio, ela aumenta o nível de nitrogênio no solo (SKERMAN, 1998).



Figura 3: Planta de *Glycine wightii*



Figura 4: Sementes de *Glycine wightii*

HIPÓTESE DO TRABALHO

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

Como relatado por Benjamin *et al.* (1997) a aglutinina da soja (SBA) é uma lectina isolada de sementes de *Glycine max* que se liga especificamente a resíduos de N-acetilgalactosamina e galactose. Essa lectina, quando administrada em diferentes cavidades, foi capaz de induzir uma resposta inflamatória típica, caracterizada pela migração de neutrófilos, de maneira dose-dependente.

Após o isolamento e caracterização parcial da lectina de *Glycine wightii* surgiu a indagação da possível semelhança biológica entre a lectina de *Glycine wightii* e a lectina de soja. Assim a hipótese central dessa tese é investigar:

A LECTINA DE *Glycine wightii* APÓS ISOLAMENTO APRESENTARÁ AS MESMAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DA AGLUTININA DE SOJA?

OBJETIVOS DO TRABALHO

3. OBJETIVOS DO TRABALHO

- Isolar e caracterizar a lectina das sementes de *Glycine wightii*
- Investigar através dos ensaios biológicos de indução do processo inflamatório se o extrato e a lectina dessa semente, em estudo, apresentam potencial em induzir migração de neutrófilos na resposta inflamatória
- Caracterizar os calos induzidos a partir das sementes de *Glycine wightii*, quanto à presença da lectina e seu potencial inflamatório.

ESTRATÉGIA
EXPERIMENTAL

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Com o objetivo de comprovar a hipótese proposta, os seguintes procedimentos experimentais foram realizados:

Obtenção e delipidação da farinha de sementes de *Glycine wightii*.

Avaliação da atividade biológica do extrato total da farinha de sementes de *Glycine wightii*, através de ensaios de hemaglutinação e migração de neutrófilos.

Avaliação da migração de neutrófilos pelo extrato total obtido de farinha de sementes de *Glycine wightii*, na presença de modulares farmacológicos.

Isolamento e caracterização, parcial, da lectina de *Glycine wightii* (LGw) galactose ligante quanto as suas propriedades químicas e físico-químicas.

Avaliação do potencial pró-inflamatório da lectina isolada.

Avaliação da migração de neutrófilos pela lectina, na presença do açúcar inibidor e de moduladores farmacológicos.

Indução de calos de cotilédones e hipocótilos a partir da semente germinada de *Glycine wightii*.

Caracterização, parcial, dos calos induzidos a partir de cotilédones e hipocótilos e avaliação do seu potencial pró-inflamatório.

Investigação, por ensaios imunológicos, da síntese de lectinas nos extratos de calos induzidos.

Investigação da toxicidade aguda do extrato total, lectina e calos de cotilédones e de hipocótilos das sementes de *Glycine wightii* por via intraperitoneal, em camundongos.

MATERIAIS E
MÉTODOS

5. MATERIAIS

5.1. Material Botânico

As sementes de *Glycine wightii* utilizadas neste trabalho foram coletadas na cidade de São Carlos no estado de São Paulo.

5.2. Animais

Foram utilizados *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar albina, machos, e camundongos do tipo BALB/C pesando entre 180 a 200 g e 18 a 25 g, respectivamente, provenientes do Biotério Central do Campus da Universidade Federal do Ceará, mantidos em repouso por no mínimo 24 horas em caixas plásticas forradas com serragem e em salas com controle de temperatura (23 a 25 °C) c/ livre acesso à ração e água.

O projeto para desenvolvimento do trabalho foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Ceará.

5.3. Equipamentos

- ▶ Espectrofotômetro Hitachi (mod. U-2000) e Ultrospec 2000 – Amersham
- ▶ Espectropolarímetro Jasco, modelo J 720
- ▶ Centrífuga refrigerada Sorvall (mod. RC-5B)
- ▶ pH-metro micronal (mod. B-374)
- ▶ Coletores de fração – (Pharmacia – LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia)
- ▶ Banho-maria (mod. Y28) – Grant
- ▶ Câmara de Neubauer Herka
- ▶ Microscópio (model CH20BIMF200) - Olympus Optical CO., LTD. Japan
- ▶ Pletysmometer (modelo 7140, Ugo Basile, Milão, Itália)
- ▶ Câmara de fluxo laminar
- ▶ Equipamento para ELISA

5.4. Reagentes e Drogas

Foram utilizados carragenina (Sigma), talidomida (FUNED – Fundação Ezequiel Dias – Secretaria do Estado da Saúde de Minas Gerais), pentoxifilina (Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A), cloreto de sódio (Reagen), Glicina (Sigma), tris

(Reagen), ácido clorídrico (Reagen), galactose (Sigma), manose (Sigma) para a realização dos ensaios.

6. MÉTODOS

6.1. Obtenção dos Calos de Cotilédones e Hipocótilos

Os calos de cotilédones e de hipocótilos foram obtidos segundo metodologia desenvolvida por SILVA (2000). As sementes de *Glycine wightii* foram tratadas com ácido sulfúrico (P.A) por 10 minutos, lavadas exaustivamente em água destilada estéril, detergente e hipoclorito de sódio a 2,5%, e colocadas para germinar por 10 dias em placas de Petri estéreis. Em seguida, uma nova esterilização foi realizada na plântula com detergente, hipoclorito de sódio a 2,5% e água destilada estéril. Em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a obtenção dos explantes de cotilédones e hipocótilos que foram colocadas em meio ágar nutritivo MS enriquecido com vitaminas e acrescido de reguladores de crescimento cinetina, ácido 2,4 diclorofenóxiacético (2,4-D) e uma fonte de carboidrato (sacarose).

6.2. Obtenção da Farinha

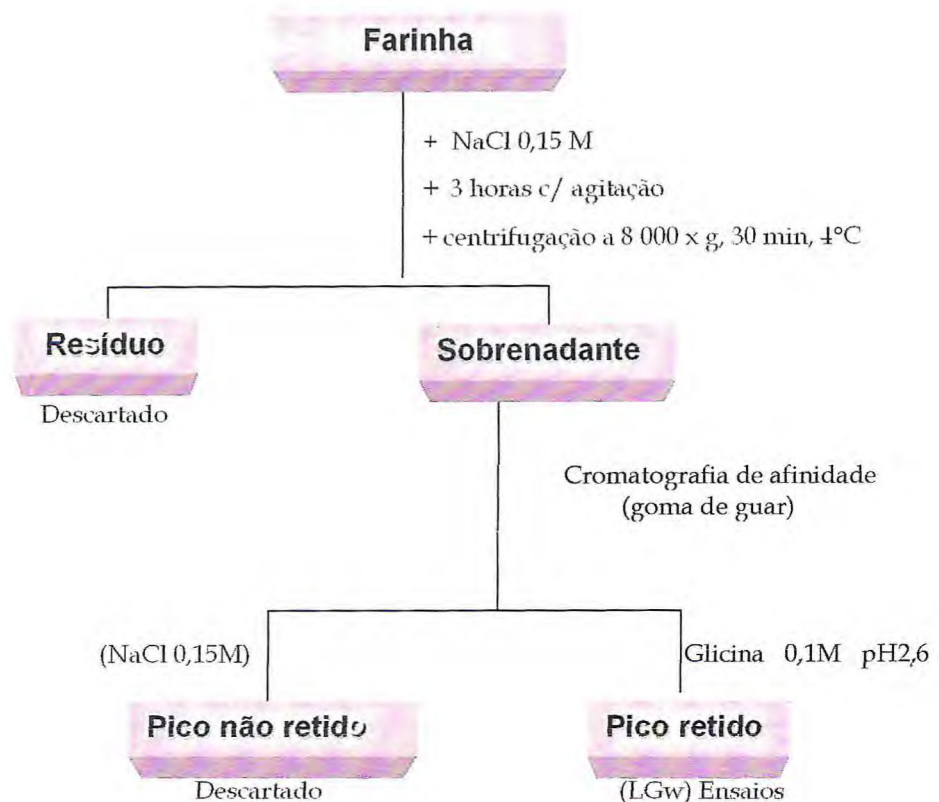
Para obtenção da farinha de sementes de *Glycine wightii*, sementes quiescentes, foram cuidadosamente descascadas e maceradas em gral com pistilo até obtenção de um pó bem fino. A farinha foi delipidada com hexano, seca em estufa a 37 °C e armazenada em frascos, hermeticamente fechados, a temperatura ambiente até seu uso posterior.

As farinhas dos calos de cotilédones e hipocótilos foram obtidas após completa liofilização destes e posterior maceração em gral com pistilo. Frascos, hermeticamente fechados, foram utilizados para armazenar as farinhas que foram mantidas à temperatura ambiente.

6.3. Isolamento da Lectina Galactose Ligante de *Glycine wightii*

Após produção da farinha de sementes e delipidação foi realizada a extração com NaCl 0,15 M (1:10, m/v), por 3 horas, com agitação, seguida por centrifugação (8 000 x g,

30 min. a 4 °C), onde separou-se o sobrenadante do resíduo. O sobrenadante foi submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna de goma de guar, e a fração retida (lectina) eluída com tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6, contendo NaCl 0,15 M. O esquema abaixo ilustra o protocolo de isolamento.



6.4. Ensaio de Hemaglutinação

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados com o extrato total, pico retido (LGw) e com os extratos de calos de cotilédones e hipocótilos conforme metodologia descrita por MOREIRA & PERRONE (1977). Adicionou-se a tubos de ensaio, 100 µL de tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6 para o ensaio com a lectina e salina 0,15M para extrato total de calos de cotilédones e hipocótilos) em seguida 100 µL da amostra foi acrescentado ao primeiro tubo de ensaio e diluída duplo-seriadamente. Posteriormente, adicionou-se a esta diluição igual volume de uma suspensão de hemácias tripsinizadas a 4% (diluída em NaCl 0,15 M). Os tubos foram incubados por 30 minutos a 37 °C, seguido por repouso de 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugados

rapidamente (30 segundos), em centrífuga de bancada. Realizou-se a leitura dos tubos e os títulos de hemaglutinação foram calculados como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de provocar aglutinação das hemácias.

6.5. Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares

Os ensaios de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares foram realizados com pico retido (LGw) conforme metodologia descrita por MOREIRA & PERRONE (1977). Adicionou-se a tubos de ensaio 100 µL de tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6, em seguida 100 µL da amostra foi acrescentado ao primeiro tubo de ensaio e diluídas duplo-seriadamente. Posteriormente, adicionou-se a esta diluição igual volume de uma solução de açúcar (D-manose e D-galactose, cada açúcar separadamente) 0,2 M e incubou-se em estufa a 37 °C por 30 minutos. A suspensão de hemácias tripsinizadas a 4% (diluída em NaCl 0,15 M) foi então adicionada. Os tubos foram, novamente, incubados por 30 minutos a 37 °C, seguidos por repouso de 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugados por 30 segundos. Realizou-se a leitura dos tubos e os títulos de hemaglutinação foram calculados como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de provocar aglutinação das hemácias.

6.6. Termoestabilidade da Lectina

A termoestabilidade da lectina foi realizada utilizando solução de LGw (Pico II de extrato salino de sementes de *Glycine wightii*, eluído de coluna de goma de Guar) com $D.O_{280nm} \geq 1,000$. A amostra foi incubada em banho-maria (mod. Y28 – Grant) às temperaturas de 40 e 50 °C, permanecendo em cada temperatura por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Foram retiradas alíquotas correspondentes a cada temperatura e submetidas à avaliação da atividade hemaglutinante de acordo com o protocolo de MOREIRA & PERRONE (1977).

6.7. Determinação do Teor de Umidade dos Calos de Cotilédones e Hipocótilos

Para determinação de umidade, pesa-filtros previamente tarados, contendo aproximadamente 2,0 g das amostras, foram colocados em estufa a 110 °C por 24 horas.

Em seguida, foram deixados em dessecador, sobre sílica, até atingir o equilíbrio com a temperatura ambiente, sendo então pesados, e assim sucessivamente, até que os pesos tornaram-se constantes. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo esse valor expresso em porcentagem.

6.8. Determinação de Cinzas dos Calos de Cotilédones e Hipocótilo

Para a determinação do teor de cinzas, cadinhos de porcelana previamente tarados contendo aproximadamente 2,0 g das amostras foram colocados em forno mufla a 600 °C até completa incineração da matéria orgânica, sendo posteriormente, mantidos em um dessecador sobre sílica, até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, os cadinhos foram pesados e o teor de cinzas calculado pela relação entre o peso do resíduo e o peso inicial da amostra e expresso em porcentagem.

6.9. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Os experimentos envolvendo eletroforese foram todos efetuados seguindo-se a metodologia descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para uso em placas verticais medindo 17,5 x 16,5 cm, com espaçamento de 1 mm. O gel de aplicação foi preparado de forma a conter 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e o gel de separação 12,5% de poliacrilamida e 1,0% de SDS. A mobilidade eletroforética foi realizada sob amperagem constante de 30 mA.

Após corrida eletroforética, as bandas protéicas foram reveladas com prata (BLUN *et al.*, 1987). O gel retirado da placa foi imerso numa solução de metanol 50% mais ácido acético 12% e 0,5ml/L de formaldeído por 1 hora para fixar as bandas. Em seguida foi realizado um pré-tratamento utilizando etanol 50%, no qual o gel ficou três vezes por vinte minutos nessa solução. Após esse procedimento, utilizou-se tiosulfato de sódio 0,2g/L por um minuto e enxágüe três vezes por trinta segundo com água milli-Q. O gel foi colocado na solução de nitrato de prata (2g/L mais formaldeído 0,75ml/L) por vinte minutos. Novamente, o gel foi lavado com água milli-Q três vezes por vinte segundos. A revelação foi realizada utilizando uma solução de carbonato de sódio (60g/L) acrescida de tiosulfato de sódio 0,2g/L e formaldeído (0,5ml/L). Após surgimento das bandas reveladas, lavou-se

o gel três vezes por vinte segundos com água milli-Q e o mesmo foi imerso em solução de metanol 50% acrescida de ácido acético 12% por dez minutos para parar a reação. O gel foi guardado em geladeira em solução de metanol 50%.

6.10. Determinação de Carboidratos

O teor de carboidratos foi determinado segundo metodologia descrita por DUBOIS *et al.* (1956).

A uma alíquota de 0,5 mL da fração retida (Pico II) foram adicionados 0,5 mL de fenol a 5%, 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e, após agitação, a mistura foi deixada em repouso por 15 minutos. Subseqüentemente, foi realizada a leitura da absorbância a 490 nm. A concentração de carboidratos foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com glucose.

A lectina galactose-ligante de sementes de *Glycine wightii* foi investigada quanto à presença de carboidrato em sua estrutura utilizando o reagente de Schiff. Após eletroforese, o gel foi fixado em ácido acético 7,5% durante 60 minutos à temperatura ambiente, e então transferido para uma solução de ácido periódico 0,2% , deixando por cerca de 45 minutos a 4 °C. Em seguida o gel foi transferido para o reagente de Schiff, sendo mantido durante cerca de 45 minutos a 4 °C. O descoramento foi feito com ácido acético 10% (Silva-Júnior, 2001).

6.11. Dicroísmo Circular (CD)

O espectro de dicroísmo circular foi determinado para amostras da lectina nativa, purificada em coluna sepharose D-Gal, diluída em tris-HCl 20 mM pH 8 com NaCl 100 mM. As medidas foram feitas em um espectropolarímetro Jasco, modelo J 720 (*Jasco Corporation*, Japão). As soluções de lectina em na concentração 0,22mg/dL, foram medidas em cubetas cilíndricas de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram gravados num intervalo de 195-250 nm à temperatura de 25 °C, com uma média de 32 varreduras. Os espectros de CD foram obtidos numa escala de elipticidade (θ) e expressos em mgraú, transformados em elipticidade molar $[\theta]$ considerando a concentração da proteína (mg/mL), o caminho óptico da cubeta em cm (l).

6.12. Cálculo do Conteúdo de Estrutura Secundária

Para o cálculo das frações de estrutura secundária foi utilizado o programa **SELCON 3 – Self Consistent Method** (Sreerama, *et al.*, 1993). Para estimar o conteúdo de estrutura secundária pelo SELCON-3 foi utilizado um grupo de 43 proteínas denominado espectros de referência.

6.13. Ensaio de Isoeletrofocalização

Os ensaios de isoeletrofocalização foram realizados no sistema *Phast System*, utilizando o *Phast gel* (concentração 5%) que separa proteínas de pI 3 a 9. A lectina (500 µg/poço) foram submetidas a focalização isoeétrica seguindo o seguinte programa:

- 1) 2000 V, até atingir 75 Vh
- 2) 200 V, até atingir 15 Vh
- 3) 2000 V, até atingir 410 Vh.

A corrida tomou cerca de 30 minutos, e ocorreu com 2,5 mA e 3,5 W a 15 °C. O gel foi revelado com nitrato de prata de acordo com a metodologia de BLUM *et al.* (1987). Os pontos isoeétricos das amostras foram determinados a partir da reta padrão obtida com os RFs dos marcadores de pI comerciais (Sigma).

Marcadores:	pI
Amiloglucosidase	3.5
Inibidor de Tripsina	4.5
(beta)-Lactoglobulina	5.2
Anidrase carbônica b (de eritrócito bovino)	5.85
Anidrase carbônica b (de eritrócito humano)	6.5
Myoglobina	6.7, 7.3
Lectina de lentilha from <i>Lens culinaris</i>	8.1, 8.4, 8.6
Tripsinogênio	9.3

6.14. Preparo de IgG

Foram utilizados cinco camundongos do tipo BALB/C pesando entre 18 e 25 g, para a produção de anticorpos, contra a lectina isolada de farinha de sementes de *Glycine wightii*. Foram realizadas imunizações com injeção intramuscular da lectina purificada (1mg/mL) com adjuvante completo de Freud. Aplicou-se após 15 e 7 dias, injeções subcutâneas de 200 µL da LGw (dose reforço). Após a terceira dose reforço, foram realizadas coletas de sangue, através da órbita ocular. Os sangues foram identificados, incubados a temperatura ambiente por 2 horas. Os soros foram separados dos coágulos por centrifugação a aproximadamente 1000 rpm por 15 minutos e utilizados nos ensaios por ELISA.

6.15. Teste por ELISA Indireto

Para verificar se a lectina de *Glycine wightii* estava presente nos extratos obtidos da farinha dos calos de cotilédones e hipocótilos induzidos das sementes, anticorpos anti-lectina foram produzidos em camundongos e submetidos ao teste de ELISA indireto (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Para esse ensaio, uma placa de ELISA com 96 poços, foi sensibilizada com 100 µL das amostras (extratos de calos de cotilédones e de hipocótilos) e 100 µL da LGw (controle positivo) em cada poço. A placa foi incubada em estufa a uma temperatura de 37 °C por uma hora. Em seguida, foi lavada, três vezes, com solução salina 0,9% contendo tween-20 0,05% (solução de lavagem) e bloqueadas com a solução de bloqueio (solução salina 0,15 M contendo leite desnatado a 5%), por 2 horas em estufa a 37 °C. Após esse período de incubação, novamente três lavagens foram realizadas na placa e adicionados 100 µL do antissoro (obtidos dos camundongos imunizados) diluídos seriadamente a partir da diluição inicial de 1:10, na solução de bloqueio, nos devidos poços. A placa foi incubada “overnight” a uma temperatura de 4 °C. Posteriormente, foi novamente lavada por três vezes, e em cada poço adicionado o conjugado, imunoglobulinas policlonais anti-camundongos conjugadas à peroxidase, em uma diluição de 1:1000 diluído em solução de bloqueio e incubou-se por uma hora e meia, em estufa, a uma temperatura de 37 °C. Finalizado o tempo, a placa foi lavada, novamente por três vezes, com a solução de lavagem. A reação final foi desenvolvida pela a adição de orthophenylenediamine (OPD) e após a placa ter sido incubada por 30 minutos a

temperatura de 37 °C procedeu-se a leitura, cuja intensidade da reação foi avaliada espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 490 nm com um micro ELISA espectrofotômetro BECKMAN.

6.16. Migração de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal

A LGw foi diluída em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, estéril, em três diferentes concentrações: 10 µg/animal, 30 µg/animal e 60 µg/animal. Os extratos obtidos da farinha de semente delipidada e de calos de cotilédones e hipocótilos obtidos de sementes de *Glycine wightii*, foram diluídos em NaCl 0,15 M estéril, e injetados intraperitonealmente (IP) em ratos Wistar machos, pesando entre 180 e 200 g (Figura 5). Injetou-se por via intraperitoneal 1 mL de cada amostra, nos grupos devidamente marcados. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical (Figura 6), e imediatamente, tiveram a cavidade peritoneal lavada com 10 mL de NaCl 0,9% heparinizada a 0,1%(v/v). Aproximadamente 5,0 mL do lavado peritoneal foi removido para contagem total em câmara de Neubauer e contagem diferencial das células. Em câmaras de Neubauer, procedeu-se uma diluição, partindo-se de 20 µl do lavado peritoneal de cada animal em 380 µL de solução de Turk (15 mL de ácido acético glacial, 200 µl de azul de metileno a 2% m/v, completando-se o volume com água destilada para 500 mL) e a contagem diferencial de células foi feita através de esfregaços corados pelo método pancrômico de Rosenfeld (0,97 g de Giensa – azul – eosina - azul de metileno; 0,53 g May-Grünwald – eosina – azul de metileno e metanol q.s.p.1000 mL).

Os resultados de cada grupo foram expressos pela média (\pm Desvio Padrão Médio) de número de neutrófilos (%).

Cada grupo teste, foi composto de 5 animais, tomados ao acaso. O tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 e a salina 0,15 M, ambos estéril, foram utilizados como controle negativo nos respectivos ensaios onde foram utilizados. Para controle positivo, foi utilizado carragenina na concentração de 300 µg/animal. Em alguns grupos experimentais de ratos, um pré-tratamento, por via oral, com 0,5 mL de talidomida e Pentoxifilina (80 mg/Kg de peso corpóreo, por via oral) foi realizado de acordo com a metodologia de ALENCAR *et al.* (2003) para avaliar a ação desses moduladores farmacológicos.

6.17. Avaliação da Migração de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal de Ratos Induzida pela Lgw Co-Injetada com o Açúcar Inibidor D-Galactose

A capacidade de induzir a migração de neutrófilos para a cavidade intraperitoneal de ratos pela LGw, foi avaliado co-injetando-se a D-galactose (açúcar inibidor):

Os animais foram divididos em grupos de 6 e receberam, por via intraperitoneal:

- ▶ 1 mL da solução contendo lectina na concentração de 60 µg/mL em tris-HCl 0,1 M pH 7,6 estéril (controle positivo)
- ▶ 1 mL da solução contendo lectina na concentração de 60 µg/mL, previamente incubada em tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6 estéril contendo galactose nas concentrações 0,05M, 0,1 M e 0,15M.
- ▶ 1 mL de tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6 estéril (controle negativo).

Após 4 horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a avaliação da migração realizada como descrito anteriormente.



Figura 5 – Administração intraperitoneal em ratos



Figura 6 – Sacrifício do animal por deslocamento cervical

6.18. Avaliação do Edema de Pata em Ratos, Induzida pela LGw

O edema de pata em ratos foi induzido pela carragenina (300 µg/pata), a qual foi injetada 0,1 mL na superfície planar da pata direita (controle positivo) em um grupo de seis animais (WINTER *et. al.*, 1962). No mesmo grupo, 0,1 mL de tampão tris-HCl-0,1 M pH 7,6 estéril foi administrado na pata esquerda (controle negativo). Um terceiro grupo recebeu 0,1 mL da LGw (60 µg/pata). Os volumes das patas traseiras de cada animal foram medidos em mililitros (mL) usando-se um pletysmometer (modelo 7140) de acordo com a metodologia descrita por FERREIRA (1979). O registro foi realizado antes da injeção dos estímulos inflamatório (tempo 0). Assim, os animais divididos em 3 grupos de 6 animais cada, receberam através de injeção intraplantar, os estímulos de:

- ▶ Grupo 1: 0,1 mL de carragenina na concentração de 300 µg/0,1 mL de tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6 estéril (controle positivo)
- ▶ Grupo 2: 0,1 mL de LGw na concentração de 100 µg/0,1 mL de tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6 estéril.
- ▶ Grupo 3: 0,1 mL de tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6 estéril (controle negativo)

Os volumes das patas dos animais foram avaliados 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção do estímulo. O edema foi calculado como a variação de volume (Δ de volume), definido como sendo a diferença entre o volume obtido antes da injeção do estímulo (tempo 0) e aquele determinado em um período de tempo após a injeção do estímulo inflamatório.

6.19. Avaliação do Edema de Pata em Ratos, Induzida pela Lgw Co-Injetada com seu Açúcar Inibidor.

Detectada a capacidade da lectina (LGw) de induzir edema de pata em ratos, esta foi avaliada, utilizando-se 2 grupos de 6 animais cada, os quais receberam, através de injeção intraplantar:

- ▶ 0,1 mL de solução contendo lectina na concentração de 60 µg previamente incubada (30 minutos) em 0,1 mL de tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6 estéril contendo o açúcar inibidor (D-galactose 0,1 M).
- ▶ 0,1 mL de tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6 estéril (controle negativo).

A avaliação da formação de edema foi realizada como descrito no item anterior.

6.20. Ensaio de Atividade Tóxica em Cavidade Peritoneal

Com o intuito de verificar se a LGw e os extratos da farinha de sementes e dos calos de cotilédones e hipocótilos, induzidos a partir de sementes de *Glycine wightii*, apresentam atividade tóxica, camundongos swiss foram divididos em 5 grupos de 6 animais (18 a 25 g), nos quais foram ministrados, na cavidade intraperitoneal, solução contendo a lectina e os extratos da farinha das sementes e dos calos. As amostras foram injetadas, por via intraperitoneal, em cada animal dos diferentes grupos partindo-se da dose de 60 µg/animal para a LGw. Cada animal recebeu um volume de 1,0 mL das respectivas amostras, sendo a lectina diluída em tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6 estéril e o extrato obtido da farinha de sementes de *Glycine wightii* em NaCl 0,15M. A solução diluente (tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6) e NaCl 0,15M serviram como controles negativos para o experimento. A atividade tóxica foi caracterizada pela morte do animal no período de até 48 horas após a injeção das amostras.

6.21. Dados e Análises Estatísticas

Os dados foram analisados através da ANOVA (análises de variância) seguido pelos testes Bonferroni e/ou teste de Student para determinar a diferença significativa entre os grupos. Foram consideradas as diferenças para $P \leq 0,05$.

RESULTADOS E
DISCUSSÕES

7. RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1. Caracterização parcial físico-química e biológica do extrato da farinha de sementes e da lectina de *Glycine wightii*

7.1.1. Isolamento da Lectina galactose ligante de *Glycine wightii*

O isolamento da lectina galactose-ligante de sementes delipidadas de *Glycine wightii*, foi realizado em uma matriz de goma de Guar eluída com tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M sem adição de íons metálicos. A cromatografia de afinidade apresentou dois picos sendo o pico II a lectina de *Glycine wightii*, denominada LGw (Figura 7).

MOREIRA *et al.* (1998) isolaram a frutalina (FTL), uma lectina galactose ligante, presente nas sementes de *Artocarpus incisa* (utilizando galactomanana de *Adenanthera pavonina*), que apresenta semelhanças estruturais com outras lectinas galactose ligante, como a de *Artocarpus integrifolia* e a *Artocarpus integer* (ABDUL RAHMAN *et al.*, 2002). Ao contrário da LGw e de muitas outras lectinas já isoladas, a FTL e a jacalina têm capacidade de interagir também com outros açúcares estruturalmente não relacionados, como por exemplo a glucose e galactose (CAMPANA *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2002).

Contrário ao relatado por LORIS *et al.*, (1998) no qual afirmam que a atividade ligante a carboidratos das lectinas de leguminosas depende da presença simultânea tanto de cálcio quanto de íon de metal de transição, a LGw não necessitou da adição dos íons citados para ligar-se a galactose. Entretanto para a lectina isolada das sementes de *Bauhinia pentandra* houve a necessidade da presença de íons Ca^{++} e Mn^{++} (SILVA, *et al.*, 2001) assim como para a lectina de *Dioclea guianensis* que contém íons cálcio e manganês ligado próximos do sítio de ligação a carboidratos (WAH, *et al.*, 2001). Com isso pode-se sugerir que os sítios de ligação a metal, conservados em muitas lectinas de leguminosas (LORIS, *et al.*, 1998), pode não estar presente na LGw ou se estiver, esses metais estão fortemente ligados a proteína de maneira que não são perdidos no processo de purificação. A ausência desses sítios de ligação a metais também foi observado em duas proteínas isoladas de *Phaseolus vulgaris*: inibidor de α -amilase e arcelina (MORENO, *et al.*, 1989; MIRKOV, *et al.*, 1994).

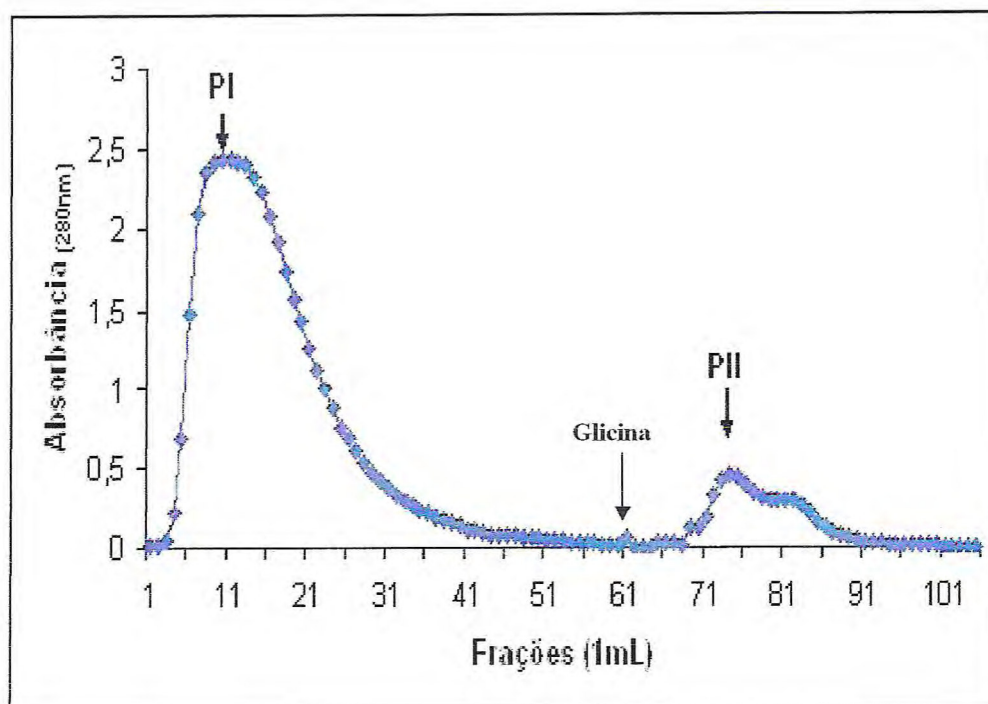


Figura 7: Cromatografia de afinidade, em goma de guar, de 2,0 mL do extrato total de farinha de sementes delipidadas de *Glycine wightii*, eluída com NaCl 0,15M (PI) e tampão Glicina 0,1M em NaCl 0,15M (PII) pH 2,6 e frações coletadas de 1,0 mL/minuto. Leitura em DO a 280nm.

7.1.2. Ensaio de atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi realizada, em tubos, com o extrato total obtido da farinha de sementes delipidadas de *Glycine wightii* e com a LGw usando tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6. Observou-se que apenas a fração retida apresentou atividade com suspensão de eritrócitos humanos A₁ tripsinizados a 4% cuja atividade específica foi de 16UH/mL. Tal resultado só pode ser confirmado quando a leitura foi realizada após 12 horas de incubação a temperatura ambiente. A atividade hemaglutinante observada quando a lectina foi testada com hemácias não tripsinizadas foi cerca de 50% inferior em relação à observada com as hemácias tratadas. Para atividade hemaglutinante observada não foi necessário à adição de íons metálicos. Não foi observada nenhuma inibição hemaglutinante quando realizou-se o ensaio de inibição por açúcares.

Semelhante a LGw, em trabalhos anteriormente realizados por HOSKINS *et al.* (1995), foi observado que a lectina de *Dolichos biflorus* (DBA) é específica para o grupo sanguíneo A₁ do sistema ABO, sendo por isso usada para diferenciar os subgrupos A₁ de A₂. Segundo a literatura, as lectinas grupo sanguíneo específicas reconhecem, principalmente, os resíduos terminais não-reduzidos de α -N-acetilgalactosaminil, α -galactosil e α -fucosil presente nos grupos A, B e O, respectivamente. Mas muitos estudos usando lectina imobilizada e oligossacarídeos, estruturalmente caracterizados, indicam que essas proteínas podem reconhecer não apenas resíduos de monossacarídeos, mas também cadeias de açúcar interna mais complexas (YAMAMOTO, *et al.*, 1998).

Em trabalhos realizados anteriormente (SILVA *et al.* 2001; CARLOS, 2004) foi possível observar que a atividade hemaglutinante no extrato total obtido da farinha de *Bauhinia pentandra* era detectada somente após 12 horas da adição dos eritrócitos. Esses resultados sugerem que há uma competição entre as subunidades monoméricas e os oligômeros presentes no extrato, uma vez que a ligação da lectina a carboidrato é reversível. Após o isolamento da lectina de *Bauhinia pentandra* em matriz de goma de Guar esse tempo é reduzido para 1 hora, podendo representar um aumento na relação oligômero/monômero, e as moléculas protéicas ficariam passíveis de aglutinar em maior número, uma vez que para ocorrer hemaglutinação é necessário que a lectina apresente pelo menos dois sítios para carboidratos. Diferentemente da LGw, a LBp necessitou da adição de íons Ca⁺⁺ e Mn⁺⁺ para sua atividade.

Assim como a LGw a lectina isolada de *Sphenostyles stenocarpa* não apresentou atividade hemaglutinante com suspensão de hemácias tripsinizadas a 2%, mas com suspensões de hemácias a 4% e 3%. Sugere-se que um aumento na concentração de hemácias possibilita uma maior probabilidade em acontecer a interação da lectina com o carboidrato presente na superfície da hemácia que estará mais exposto após o tratamento enzimático. Outras lectinas de plantas também aglutinam melhor na presença de suspensão de hemácias a 4% (KONOZY *et al.*, 2002).

KONOZY *et al.* (2003) observaram que tanto o extrato total quanto a lectina isolada de sementes de *Erythrina speciosa* por cromatografia de afinidade em coluna de lactose-sepharose mostrou atividade hemaglutinante para hemácias de coelho e para todos os grupos sanguíneos humanos, sendo a atividade no grupo “O” menos intensa.

Para monitorar a estabilidade térmica da LGw (DO a 280nm $\geq 1,000$) utilizou-se a atividade hemaglutinante frente a eritrócitos humanos A₁. A proteína foi incubada em banho-maria (mod. Y28 – Grant) por 40 e 50 °C até 30 minutos. Foram coletadas alíquotas a cada 5 minutos para a realização do ensaio. As alíquotas coletadas nos respectivos tempos de cada temperatura foram submetidas à determinação da atividade hemaglutinante. Observou-se que a lectina tem reduzida estabilidade térmica, uma vez que perdeu aproximadamente 87% de sua atividade após 5 minutos de aquecimento a 40 °C e após 15 minutos foi completamente inativada. Ao ser aquecida a 50 °C por 5 minutos apenas 25% da atividade hemaglutinante permaneceu, sendo totalmente inativa após esse tempo (Figuras 8 e 9).

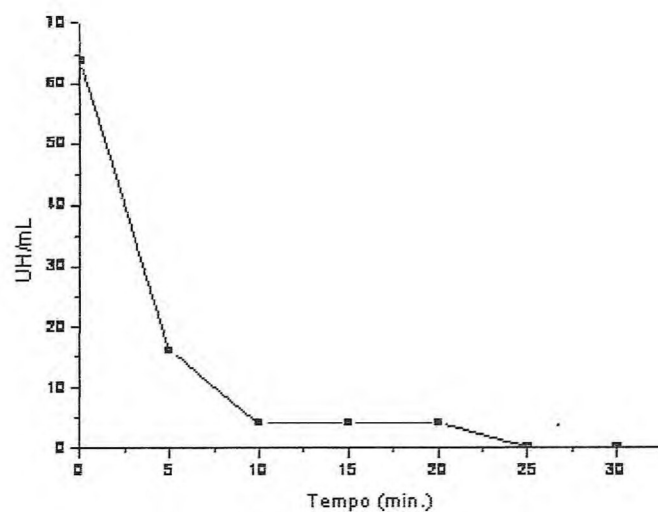


Figura 8 Termostabilidade da Lectina realizada na fração retida obtida por cromatografia de afinidade em goma de guar, após incubação a 40 °C por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.

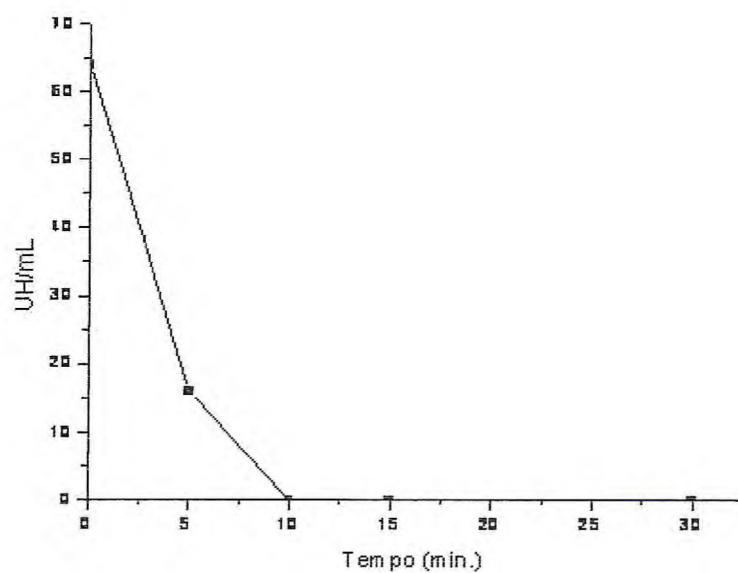


Figura 9: Termostabilidade da Lectina realizada na fração retida obtida por cromatografia de afinidade em goma de guar, após incubação a 50 °C por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.

Em trabalho desenvolvido por CARLOS (2004), foi observado que a lectina de *Bauhinia pentandra* foi aquecida por 5 minutos a diferentes temperaturas e mostrou-se estável até 40 °C, aos 55 °C a atividade dessa proteína foi perdida em mais de 80%, sendo completamente inativada a partir de 70 °C. Por outro lado estes dados estão de acordo com SILVA *et al.* (2001) que demonstrou a perda de atividade desta lectina aos 80 °C. CARLOS (2004) relata ainda que a perda de 80% da atividade da lectina de *Bauhinia pentandra* ocorre a 10°C antes da temperatura de transição da estrutura (medida por dicroísmo circular), e sugere que, provavelmente, isso esteja relacionado a alterações em torno do sítio de ligação da proteína decorrentes do rompimento de interações fracas (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações de van der Waals, interações iônicas) devido ao aumento da energia cinética destas moléculas.

A LGw apresentou estabilidade térmica relativamente baixa ao ser comparada com outras lectinas de leguminosas, que, em geral, são estáveis até 60 °C, (MACHUKA *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2002; SUSEELAN *et al.*, 2002). Esses resultados assemelham-se aos observados por BAINS *et al.* (2005) ao isolaram a lectina de *Sauromatum venosum*, uma monocotiledônea da família das Araceae, cuja atividade permaneceu estável somente até 15 minutos a 55 °C, sendo totalmente perdida após essas condições. De maneira semelhante, a lectina, galactose ligante, isolada das folhas de *Erythrina indica* também perdeu rapidamente sua atividade quando aquecida em temperaturas acima de 50 °C (KONOZY *et al.*, 2002).

7.1.3 Eletroforese em gel de Poliacrilamida

A fim de avaliar a pureza da LGw obtida em goma de guar e estimar a massa molecular aparente realizou-se eletroforese em PAGE-SDS e β-mercaptoetanol. Após corrida eletroforética o gel foi revelado com prata segundo metodologia de BLUM *et al.* (1987) e pode-se observar a presença de uma banda protéica bem definida cuja massa molecular aparente foi de aproximadamente 45 KDa (Figura 10). Estes resultados fornecem um indicativo de pureza da lectina.

Em trabalhos anteriormente realizados observou-se que a SBA, denominada aglutinina da soja, é uma glicoproteína bem caracterizada isolada das sementes da soja

(*Glycine max*) cuja eletroforese revelou que a mesma tem massa molecular aparente de 120 KDa e que se trata de uma proteína tetramérica de idênticas subunidades (30 KDa) (MALEK-HEDAYAT, *et al*,1987).

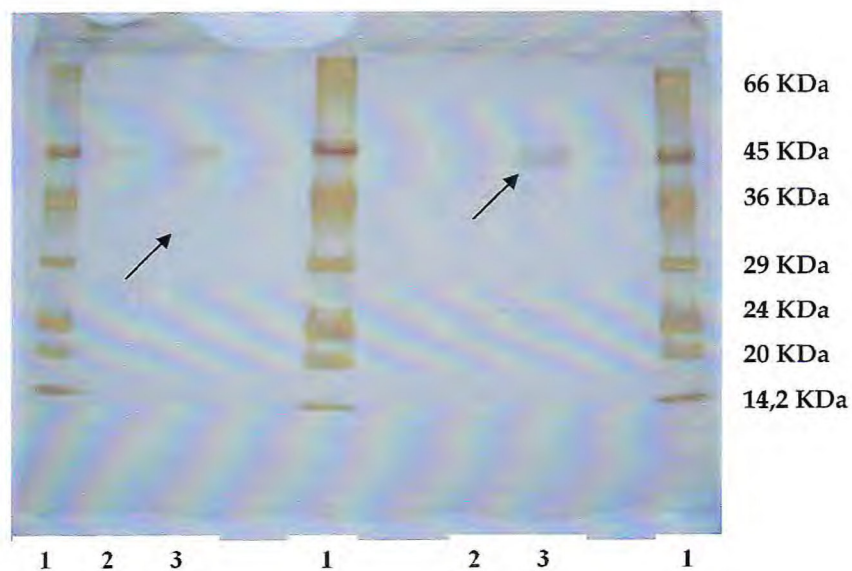


Figura 10: SDS-PAGE com β -mercaptoetanol da fração retida em goma de guar (P II), em gel de poliacrilamida 12.5% cuja $DO_{280nm} \geq 1,000$. A corrida eletroforética ocorreu com 30 mA. 1 – marcador; 2 – lectina 5 μ L; 3 – lectina - 10 μ L. Padrões: BSA 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, gliceraldeído-3P 36 kDa, anidrase carbônica 29 kDa, tripsinogênio (pâncreas bovino) 24 kDa. Inibidor de tripsina 20 kDa, α -lactoalbumina 14,2 kDa.

7.1.4 Determinação de carboidratos

Foi realizada também a determinação de açúcar pelo método de DUBOIS *et al.* (1956) para verificar se a LGw em estudo é uma glicoproteína. Foi utilizada a D-glucose como padrão sendo encontrado um teor 1,49% de carboidrato na amostra analisada. Como o teor de carboidrato nessa lectina foi baixo uma nova eletroforese em PAGE-SDS foi realizada e o gel foi revelado com o reagente “PAS – stain” (Ácido Periódico/Schiff) indicado para glicoproteínas. Esse teste revelou a banda protéica da lectina indicando que a mesma possui carboidrato em sua estrutura, podendo, portanto ser considerada uma glicoproteína.

Em trabalho realizado por CARLOS (2004) com a lectina de *Bauhinia pentandra* foi observado que a referida proteína também galactose ligante trata-se de uma glicoproteína com 13% de açúcar em sua estrutura.

GUZMÁN-PARTIDA *et al.* (2004) após isolamento da lectina das sementes de *Acacia constricta* verificaram através de PAGE-SDS corada com “PAS-stain”, a presença de carboidratos na estrutura da proteína. Esses resultados foram comprovados após determinação de carboidratos totais pelo método fenol sulfúrico cujo resultado identificou a presença de 7,5% de açúcar na glicoproteína isolada. Outros trabalhos realizados com lectinas isoladas de plantas por cromatografia de afinidade também mostraram que as subunidades das lectinas purificadas são glicosiladas (REYNOSO-CAMACHO, *et al.*, 2003; REGO *et al.*, 2002; FREIRE *et al.*, 2002).

De acordo com os resultados encontrados na literatura, o teor de carboidratos encontrado na LGw está bem abaixo dos valores comumente encontrados para leguminosas que variam de 4 a 11% (CAVADA *et al.*, 1998). Concentrações de carboidratos inferiores (0,35%) aos valores encontrados para leguminosas também foram encontrados em uma das quatro lectinas isoladas de sementes de *Sphenostyles stenocarpa* Harms (MACHUKA *et al.*, 1999).

7.1.5 Espectros de CD e estimativa da estrutura secundária por dicroísmo circular

Com a lectina purificada, como descrito, na concentração de 0,22mg/dL calculada por DO_{280nm} e concentradas por dialofiltração em tris-HCl 20 mM pH 8,0 com NaCl 100 mM em um sistema Centricon (Amicon) foi realizada medida do espectro de CD que

apresentou uma banda positiva em 231nm, dois mínimos negativos em 207 e 216 nm e um crossover negativo-positivo em 199nm (Figura 11).

A determinação das frações de estrutura secundária foi realizada utilizando o programa Selcon 3 que é um programa de desconvolução, ou seja, extrai as componentes comuns de um grupo de espectros calculando assim suas curvas básicas. Teoricamente a partir da combinação destas curvas básicas pode-se obter qualquer curva contida no grupo de espectros. Este programa utiliza um banco de 43 proteínas que recebe a denominação de espectros de referência (SREERAMA, 1993). Os resultados mostraram que a LGw apresenta 29% de estrutura em α -hélice, 11% de β -folha, 26% de β -turn e 34% de estrutura desordenada com um RSM de 1,2. O programa Cluster foi utilizado para classificar a LGw que é uma glicoproteína D-galactose ligante, o espectro indicou uma proteína $\alpha + \beta$.

O programa Selcon 3 fracionou o espectro da LGw mostrando a presença de cerca de 30% da estrutura em α -hélice contrariando dados da literatura mostrando que na estrutura secundária da aglutinina de *Glycine max* (SBA) predominou estruturas em folha β (CHATTERJEE & MANDAL, 2003). Geralmente, os espectros de folha β são difíceis de caracterizar devido a variações na geometria estrutural da folha β particularmente quando também há a ocorrência de quantidades consideráveis de estruturas não ordenadas (WALLACE & JANES, 2001; SREERAMA & WOODY, 2004).

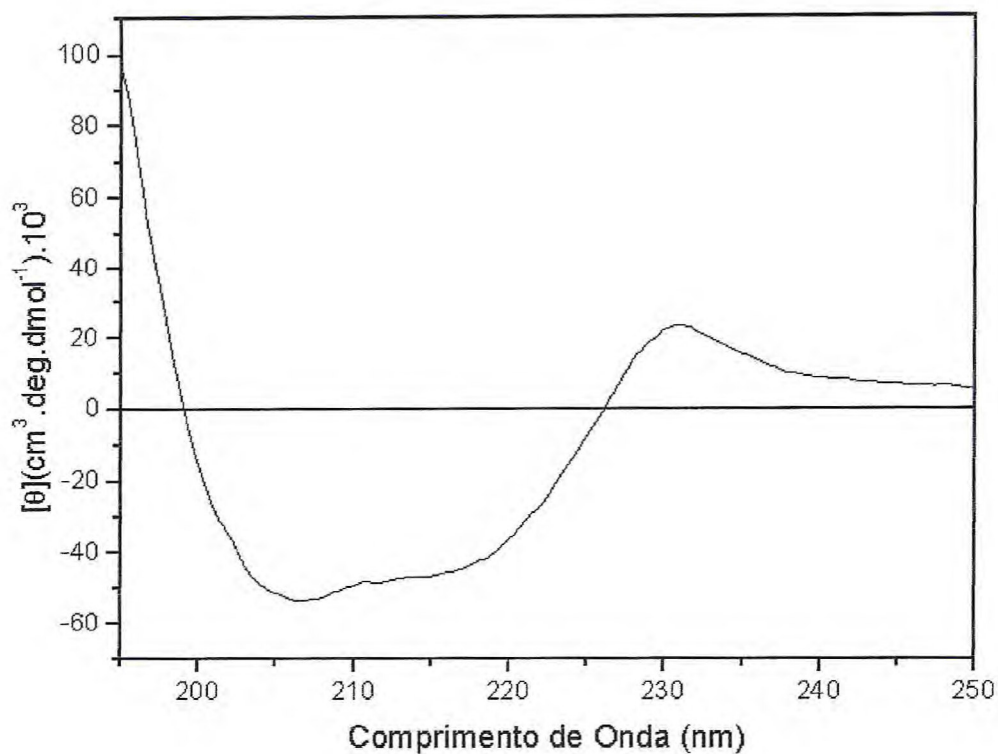


FIGURA 11: Espectro de dicroísmo circular da LGw ($D.O_{280 \text{ nm}} 0.35$) diluída em Tris-HCl 20 mM, pH 8. Os espectros foram gravados num intervalo de 195-250 nm à temperatura ambiente, 25 °C, com uma média de 32 varreduras em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho ótico.

7.1.6 Ensaio de Isoeletrofocalização

A lectina de *Glycine wightii* submetida à focalização isoelétrica mostrou componentes com diferentes pontos isoelétricos entre pH 6,35 a aproximadamente 7,0, sugerindo a existência de isoformas (Figura 12). Os resultados encontrados sugerem diferenças nas subunidades protéicas e cuja natureza variou de ácida a neutra nesta lectina.

Esses valores foram semelhantes aos encontrados para as lectinas de *Talisia esculenta* (5,2 e 6,55) e *Dioclea lehmanni* (6,55 e 6,60) (FREIRE *et al*, 2002; PÉREZ, 1998). Resultados diferentes foram encontrados para as lectinas isoladas da *Acacia constricta* (vinorama), as quais mostraram padrões de pH variando de 5,5 a 8,4 (GUZMÁN-PARTIDA *et al*, 2004).

Segundo OLIVEIRA *et al*, (2002) valores de pI (ponto isoelétrico) ácidos é comumente encontrado nas diversas lectinas galactose ligante tais como as isoladas das espécies *Erythrina* (BHATTACHARYYA *et al*, 1986), *Machura pomifera* e *S. japonica* (HANKINS *et al*, 1988).

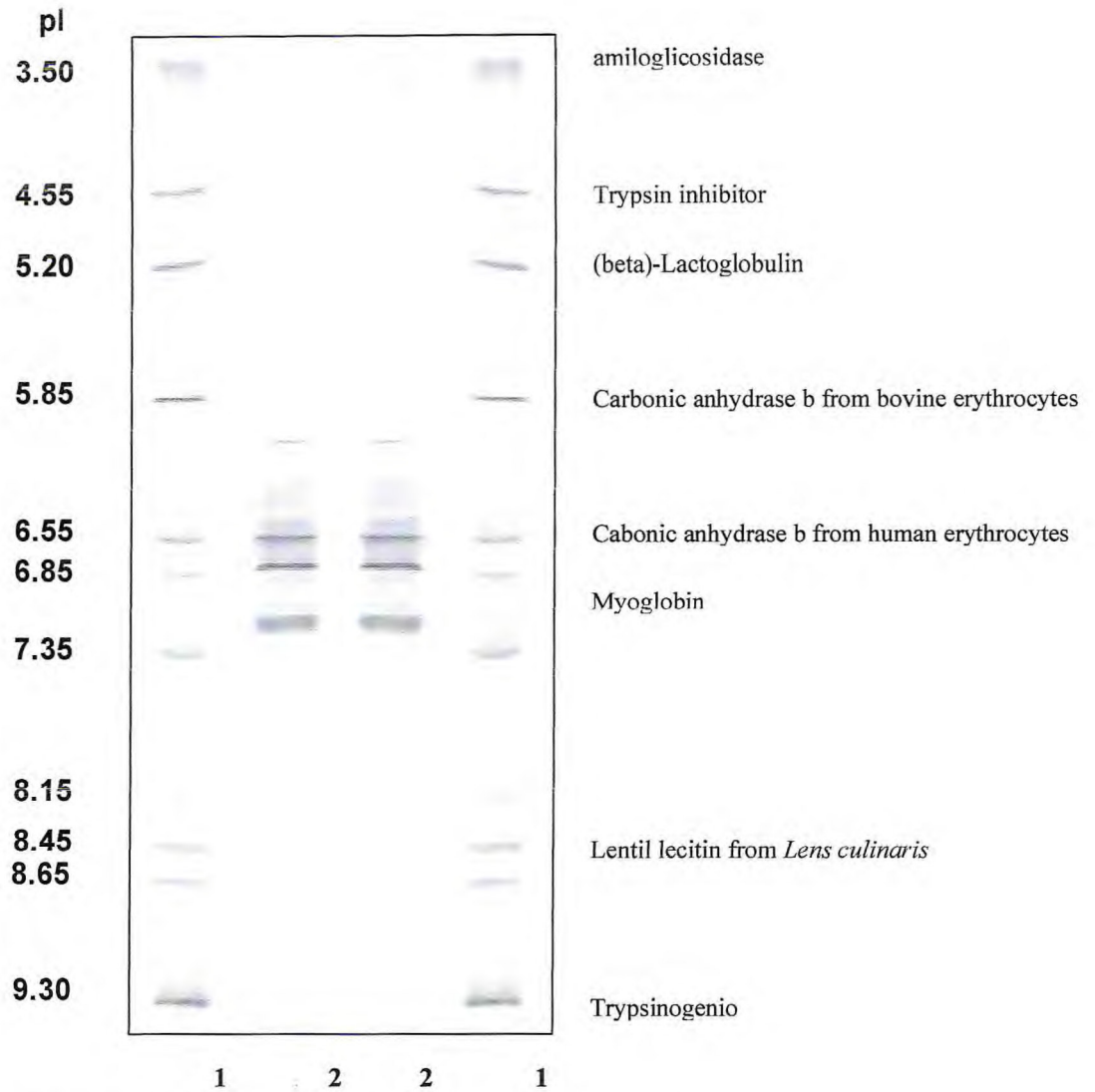


FIGURA 12: Focalização isoelétrica da lectina de *Glycine wightii* realizada em gel Phast (concentração 5%) nos programas 2000 V até atingir 75 Vh, 200V até atingir 15 Vh, 2000 V até atingir 410 Vh. A corrida foi realizada com 2,5 mA e 3,5 W a 15 °C por cerca de 30 minutos. O Gel foi revelado com prata. (1 – marcadores. 2 – Lectina 500 µg/poço)

7.1.7 Avaliação da toxicidade aguda do extrato total de *Glycine wightii*

De acordo com a literatura, a presença de proteínas tóxicas e de outros fatores antinutricionais em sementes de diversas plantas tem sido conhecida à quase um século (CARLINI & GUIMARÃES, 1981; HERGET *et al*,1990).

Com base nessas evidências o extrato total de *Glycine wightii*, obtido a partir da farinha de sementes delipidadas em NaCl 0,15 M, foi injetado intraperitoneal em camundongos. Os animais foram divididos em 2 grupos de 6 camundongos cada, onde um grupo recebeu 1,0 mL do extrato total e o outro 1,0 mL de NaCl 0,15M (controle negativo). Os camundongos foram observados por 24, 48 e 72 horas, não tendo sido verificado a morte em nenhum grupo de camundongos que receberam as amostras citadas na dose administrada.

Contrário ao observado com o extrato total de semente de *Glycine wightii*, a administração intraperitoneal, intramuscular e subcutânea do extrato total da farinha de sementes de *Glycine max* após causar dispnéia e convulsões clônico-tônicas em camundongos, teve efeito letal em todos os animais usados no experimento (VASCONCELOS *et al*,1994). Efeitos semelhantes aos da *Glycine max*, foram observados com o extrato total de *Canavalia ensiformes* (CARLINI *et al*,1988).

7.1.8 Indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos pelo extrato total da farinha de sementes de *Glycine wightii*

A fim de avaliar a capacidade do extrato total obtido a partir da farinha de sementes delipidadas de *Glycine wightii* em induzir a migração de neutrófilos, ensaios biológicos utilizando grupos de 5 ratos Wistar macho pesando entre 180 e 200g, foram realizados. Inicialmente, utilizou-se 1,0 mL do extrato total e 1,0 mL das diluições 1:2 e 1:5 do referido extrato feitas em NaCl 0,15 M estéril. Um grupo de animais foi tratado com carragenina (300µg/animal) – controle positivo e outro grupo com solução de NaCl 0,15 M estéril – controle negativo.

Após 4 horas da administração do extrato por via intraperitoneal, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e após injeção de 10,0 mL de solução NaCl 0,15 M heparinizada na cavidade intraperitoneal, coletou-se aproximadamente 5,0 mL do

exsudato peritoneal, com auxílio de pipeta “Pasteur” para contagem total e diferencial das células.

A injeção de carragenina produz uma reação inflamatória caracterizada pela síntese de mediadores químicos no fluido exsudado, incluindo prostaglandinas e leucotrienos, assim como, influxo significativo de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos (MORIKAWA *et al*, 2003).

Pode-se observar que o extrato total foi capaz de induzir, fracamente, a migração de leucócitos, seus níveis ficaram abaixo aos observados pelo controle positivo. Pode-se observar que do total de células exudadas, aproximadamente 70% corresponde aos neutrófilos polimorfonucleares que migraram e acumularam-se no sítio inflamatório em níveis inferiores aos da carragenina (controle positivo). Pode-se ainda verificar que ao se diluir o extrato total, houve um leve aumento do percentual de neutrófilos em relação ao número de células totais (Figura 13 e 14). Segundo COTRAN *et al.*, 2001, o tipo de leucócito que migra varia com a fase da lesão inflamatória e com o tipo de estímulo. Na maioria das vezes, neutrófilos predominam nas primeiras 24 horas da fase aguda da reação inflamatória, e então são substituídos por macrófagos nas próximas 24 a 48 horas.

Logo, pode-se sugerir que ocorreu o mecanismo de defesa inicial, caracterizado por migração de leucócito na contagem total. O extrato total de *Glycine wightii* foi capaz de induzir uma resposta inflamatória caracterizada por predomínio de neutrófilos nas primeiras 4 horas da administração.

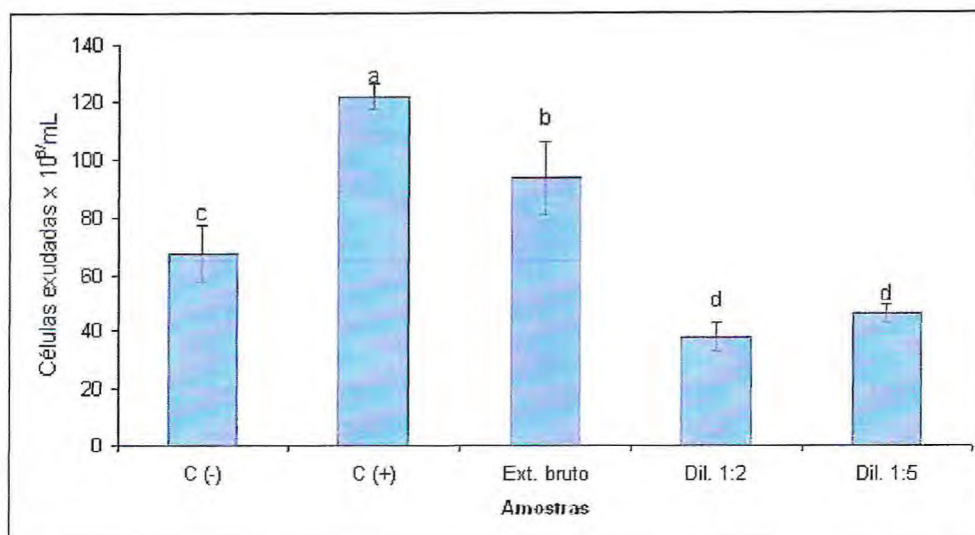


Figura 13: Indução da migração de células totais para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pelo extrato total obtido da farinha de sementes delipidadas de *Glycine wightii*. O extrato foi diluído em NaCl 0,15M estéril que foi utilizada como controle negativo C(-). Carragenina (300 µg/animal) foi usada como controle positivo – C (+). A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

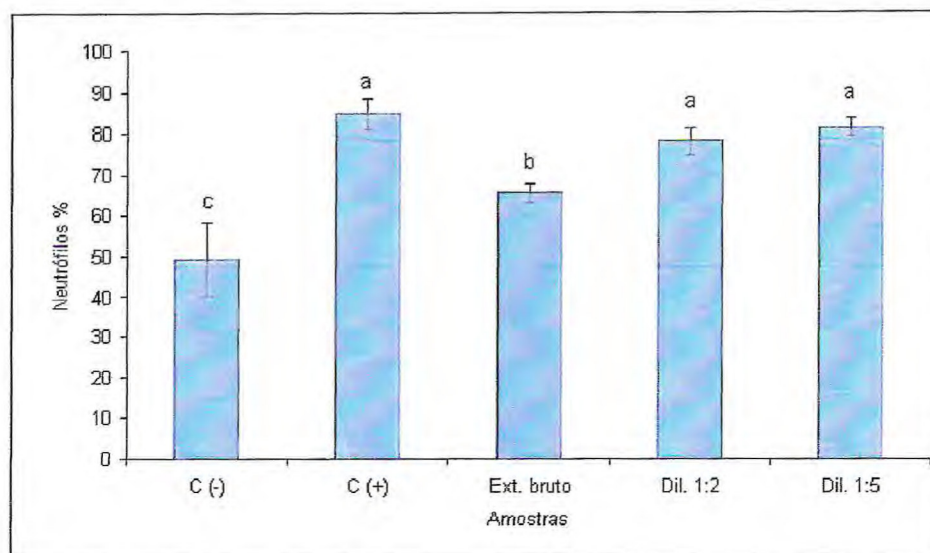


Figura 14: Indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pelo extrato total obtido da farinha de sementes delipidadas de *Glycine wightii*. O extrato foi diluído em NaCl 0,15 M estéril que foi utilizada como controle negativo - C(-). Carragenina (300 µg/animal) foi usada como controle positivo - C (+). A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Com o objetivo de identificar o possível mecanismo de ação do extrato total e da lectina de sementes de *Glycine wightii*, foram utilizados os moduladores farmacológicos, talidomida e pentoxifilina, cujo mecanismo de ação antiinflamatório é conhecido, nos ensaios de migração de neutrófilos.

Inicialmente, os animais (grupos de 5 animais) receberam por via intraperitoneal (i.p) 1,0 mL do extrato total das sementes de *Glycine wightii*, sendo um grupo previamente tratado (30 minutos) com 0,5 mL de talidomida (80 mg/Kg por via oral) e outro com 0,5 mL de pentoxifilina (80 mg/Kg por via oral). A carragenina (300 µg/animal) foi utilizada como controle positivo e solução de NaCl 0,15 M estéril como controle negativo. Após quatro horas, os animais foram sacrificados e tiveram a cavidade peritoneal lavada com solução de NaCl 0,15M heparinizada. Após o procedimento citado, procedeu-se a coleta do líquido peritoneal.

Observou-se que os moduladores utilizados foram capazes de inibir, a níveis inferiores que aos observados para o controle negativo da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (Figura 15), não apresentando diferenças estatísticas entre si. Os efeitos desses moduladores na migração de neutrófilos foram semelhantes aos observados pela carragenina, ou seja, das células que migraram para os sítios inflamatórios, os neutrófilos predominaram no mecanismo de defesa (Figuras 16).

De acordo com a literatura a talidomida (N-alfa-ftalimido-glutarimida) é um derivado sintético do ácido glutâmico (MARRIOT *et al*, 1999) com ação imunomodulatória e antiinflamatória que foi, originalmente, utilizada como sedativa, embora seja na atualidade largamente associada a propriedades teratogênicas e neurotóxicas (MARRIOT *et al*, 1998 citado por FERNÁNDEZ-MARINÉZ *et al*, 2004). O exato mecanismo de ação da talidomida ainda não é conhecido, mas as hipóteses incluem uma redução dos níveis de TNF- α , inibição da interleucina 12 (IL 12) e produção e co-estimulação de linfócitos CD8 (TORAÑO *et al*, 1999).

A pentoxifilina é uma droga que inibe a síntese de citocinas de maneira não seletiva. Esta droga inibe a síntese de TNF- α pelo bloqueio da transcrição do gene responsável pela síntese de TNF- α . Como um inativador não seletivo de fosfodiesterase, ele aumenta os níveis de AMPc na célula, inibindo não somente a síntese de TNF- α mas também, de interleucinas: IL 1B, IL 6, IL 8 (WORDLICZEC *et al*, 2000).

De acordo com os mecanismos de ação proposto para a talidomida e pentoxifilina, pode-se sugerir, diante dos resultados obtidos, que o extrato total da farinha de sementes de *Glycine wightii*, provavelmente, exerce seu efeito inflamatório pelo aumento da liberação de pelo menos, TNF- α e de IL 1, uma vez que são citocinas de ação inflamatória (BORGES & FRÖHLICH *et al*, 2003) e que os moduladores utilizados inibiram a síntese desses mediadores inflamatórios.

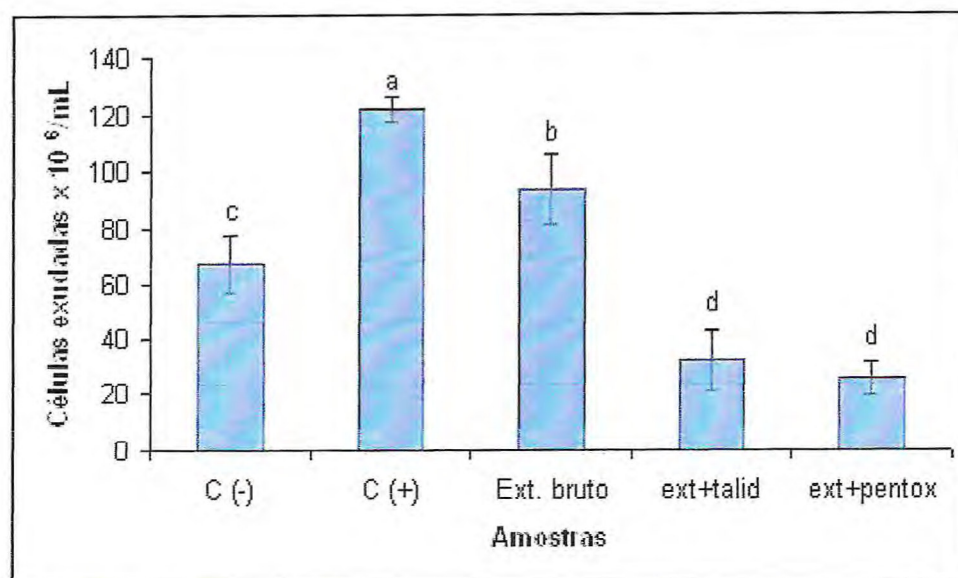


Figura 15: Efeito dos moduladores farmacológicos pentoxifilina e talidomida sobre a migração de células totais induzida pelo extrato total da farinha de sementes delipidadas. O extrato foi dissolvido em NaCl 0,15M estéril que foi utilizada como controle negativo - C(-). Carragenina (300 µg/animal) foi usada como controle positivo - C (+). A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

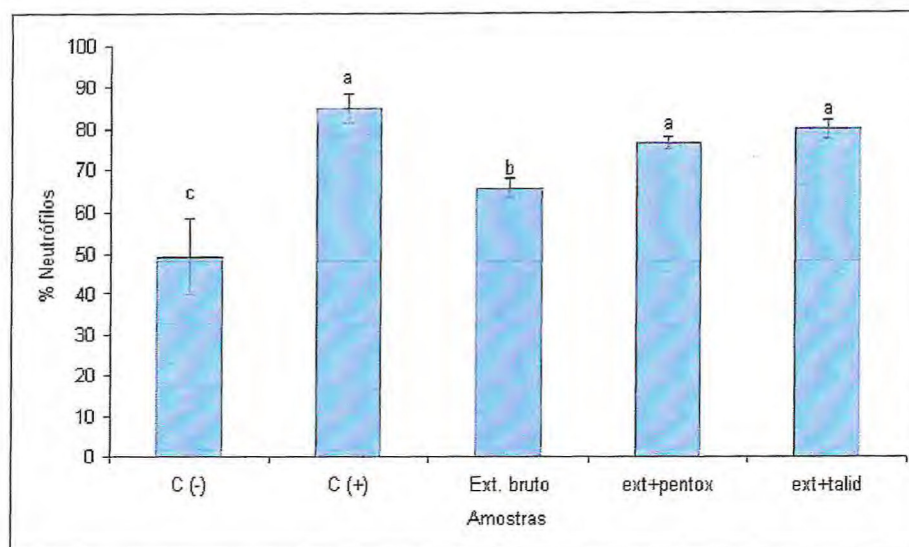


Figura 16: Efeito dos moduladores farmacológicos pentoxifilina e talidomida sobre a migração de neutrófilos induzida pelo extrato total da farinha de sementes delipidadas de *Glycine wightii*. O extrato foi dissolvido em NaCl 0,15M estéril que foi utilizada como controle negativo - C(-). Carragenina (300 µg/animal) foi usada como controle positivo - C (+). A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

7.1.9 Indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos pela lectina galactose ligante de *Glycine wightii*

Uma das propriedades das lectinas muito investigada tem sido a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos iniciada por NOWELL em 1960 (SHARON & LIS, 1989). Estes estudos levaram a resultados interessantes sobre a interação célula-lectina, demonstrando que pequenas diferenças na seqüência de aminoácidos próximos a região envolvendo a interação com açúcar poderiam afetar a especificidade de cada lectina para o mesmo receptor na membrana celular (BARRAL-NETO *et al.*, 1992).

A lectina galactose ligante de *Glycine wightii*, foi avaliada quanto a sua capacidade em induzir a migração de neutrófilos quando administrada por via intraperitoneal em ratos Wistar macho pesando entre 180 e 200g. Inicialmente, 1,0 mL da solução de LGw foi injetada em três doses diferentes, todas suspensas em Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 (1ª dose: 10 µg/mL, 2ª dose: 30 µg/mL, 3ª dose: 60 µg/mL). Em ambos os casos 1,0 mL de carragenina na concentração de 300µg/animal foi utilizada como controle positivo. E o controle negativo foi realizado usando o 1,0 mL do tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 estéril. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e após injeção de 10,0 mL de NaCl heparinizada na cavidade intraperitoneal, coletou-se aproximadamente 5,0 mL do exsudato peritoneal, com auxílio de pipeta “Pasteur” para contagem total e diferencial das células.

Foi observado que a LGw induziu a migração de células totais (Figura 17) para a cavidade peritoneal dos ratos. No tempo avaliado (4 horas) as células polimorfonucleares predominaram em relação às demais (aproximadamente 70%), nas três doses administradas (Figura 18). Segundo BRANDO-LIMA *et al.*, (2005) as lectinas vegetais que se ligam a manose ou galactose são de especial interesse, já que elas podem interagir com diferentes moléculas endógenas que estão envolvidas na resposta imunológica inata e específica. Além de que, a migração de neutrófilos do sangue para os tecidos é um evento que envolve várias etapas, em grande parte mediada por moléculas identificadas como proteínas que se ligam a carboidratos (CROCKER & FEIZI, 1996; KILPATRICK, 2002; RABINOVICH, *et al.*, 2002).

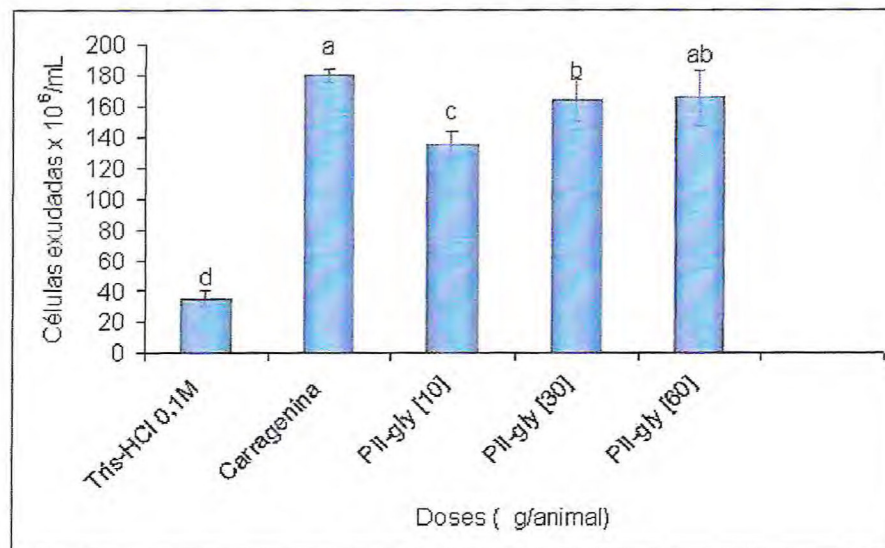


Figura 17: Indução da migração de células totais, in vivo, para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-ligante de sementes de *Glycine wightii*. A lectina foi dissolvida em Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 controle negativo - C(-). Carragenina (300 µg/animal) foi usada como controle positivo - C (+). As doses administradas foram: D₁ - 10 µg; D₂ - 30 µg e D₃ - 60 µg. A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Doses (µg/animal).

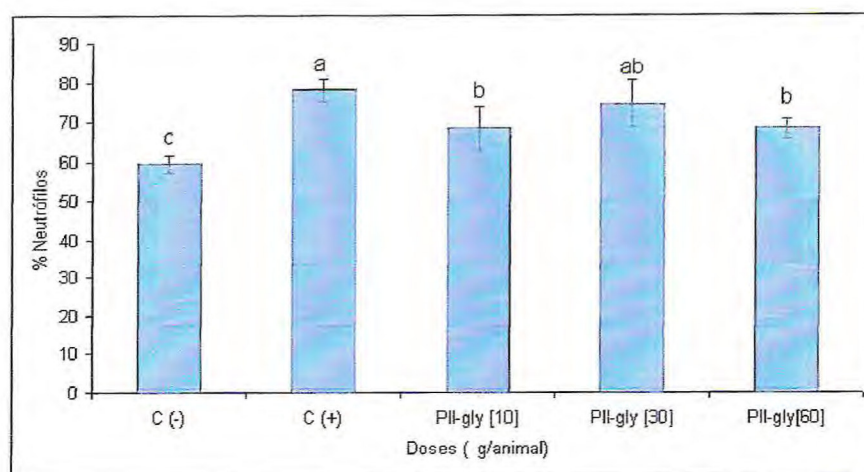


Figura 18: Indução da migração de neutrófilos, in vivo, para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de *Glycine wightii*. A lectina foi dissolvida em Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 controle negativo - C(-). Carragenina (300 $\mu\text{g}/\text{animal}$) foi usada como controle positivo - C (+). As doses administradas foram: D₁ - 10 μg ; D₂ - 30 μg e D₃ - 60 μg . A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Doses ($\mu\text{g}/\text{animal}$).

A resposta inflamatória consiste no aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos levando a migração e ativação de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs). A função antimicrobiana dos PMNs baseia-se na sua habilidade fagocítica e capacidade para liberar enzimas proteolíticas e espécies oxigênio reativa, as quais mostram uma importante função nos tecidos afetados durante a inflamação (SELLOUM *et al*, 2003).

Os neutrófilos, inicialmente, são os tipos de células predominantes no processo inflamatório, considerando que os macrófagos se tornam mais abundantes depois (ARRUDA *et al*, 2003). A capacidade do neutrófilo em orientar sua locomoção ao longo do gradiente da molécula indutora de migração é denominada quimiotaxia; nessa situação os neutrófilos alteram sua forma, tornando-se morfologicamente orientados em direção ao gradiente, sendo a posição do neutrófilo dependente do padrão de receptor de membrana e da concentração de quimiocina presente no meio, implicando que essas células sejam capazes de detectar o gradiente através de uma resposta espacial, e não temporal (ROITT *et al*, 1999).

Em trabalhos realizados anteriormente observou-se que a lectina de soja (SBA), uma proteína presente em produtos alimentícios à base de soja crua, pode ligar-se às células epiteliais intestinais, sendo considerada, nutricionalmente, tóxica para a maioria dos animais. Esses estudos mostraram que SBA (5-200 µg/cavidade) quando injetada em diferentes cavidades de ratos induziu uma resposta inflamatória típica caracterizada por exudação dose-dependente e migração de neutrófilo 4h depois da injeção. Após administração intravenosa, a SBA aumentou o número de neutrófilos circulante e inibiu de maneira dose-dependente a migração de neutrófilo induzida por carragenina na cavidade peritoneal. Estes dados indicam que a lectina de soja induz reação inflamatória local mas tem um efeito anti-inflamatório quando presente na circulação sanguínea (BENJAMIN *et al*, 1997).

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com a LGw podem estar associados a um mecanismo semelhante aos resultados apresentados para SBA, pois a migração de leucócitos observada na contagem total (Figura 17 e 18) sugere ser dose-dependente e aumenta com o aumento da dose, sendo a dose D₃ (60 µg) administrada capaz de induzir essa migração em níveis, estatisticamente, semelhantes aos níveis da carragenina (controle positivo).

A LGw mostrou estar envolvida no processo inflamatório e induziu a migração de leucócitos, pois, a migração direcionada de células sanguíneas para o tecido perivascular, é uma característica do processo inflamatório, que tem como pré-requisito a adesão de leucócitos ao endotélio vascular (COLDITZ, 1985).

Todavia na contagem diferencial de células observa-se uma migração de neutrófilos polimorfonucleares, estatisticamente, semelhante entre as três diferentes doses administradas: D₁ (10 µg), D₂ (30µg) e D₃ (60 µg), sendo que a dose D₂ teve resultado, estatisticamente, semelhante ao controle positivo (carragenina) (Figura 18). Pode-se então sugerir que, independente das doses utilizadas nesse trabalho, os neutrófilos são ativados, migram e acumulam-se no sítio inflamatório após algum tempo da administração do estímulo.

Outras lectinas têm apresentado resposta significativa na indução da migração de neutrófilos e células mononucleares. A lectina de sementes de *Talisia esculenta* induziu a migração de leucócitos para cavidade peritoneal e bolha de ar de forma dose (10-40µg) e tempo dependentes. Para neutrófilos a resposta máxima foi observada 16 horas após a injeção de lectina, enquanto o acúmulo máximo de células mononucleares ocorreu após 24 horas, retornando aos níveis do controle após 72 horas da injeção (FREIRE *et al*, 2003).

A frutalina lectina galactose ligante obtida de sementes de *Artocarpus incisa* é uma glicoproteína que apresentou atividade indutora de migração de neutrófilos in vivo, demonstrado nos ensaios realizados na cavidade peritoneal de ratos (ROCHA, 2003).

A fim de avaliar a influência de carboidratos sobre a atividade pró-inflamatória da lectina galactose ligante de sementes de *Glycine wightii*, induzida na cavidade peritoneal de ratos, os animais receberam as amostras via intraperitoneal (i.p), cuja concentração utilizada de lectina foi de 60µg/mL a qual foi, previamente, incubada com três diferentes concentrações de D-galactose 0,05 M, 0,10M e 0,15M por 30 minutos. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e procedida à contagem total e diferencial das células.

Observou-se que ocorreu uma inibição em mais de 80% da indução na migração das células totais, sendo que a dose de 60µg que foi incubada com D-galactose 0,15M apresentou maior inibição (Figura 19), destacando-se em relação às outras doses. Estes

dados sugerem que a migração de leucócitos para cavidade peritoneal induzida pela LGw está associado aos sítios de ligação a carboidrato.

Ao contrário dos resultados observados pela lectina de SBA a LGw na presença do seu açúcar inibidor não inibiu a migração de neutrófilos no tempo e doses testados (Figura 20), o que leva a sugerir que o acúmulo de neutrófilos observado na indução causada pela LGw não é dependente de sua propriedade ligante a carboidrato nas concentrações testadas (BENJAMIN, *et al*, 1997).

De acordo com RABINOVICH *et al* (2002) a migração de neutrófilos do sangue para os tecidos é um evento que envolve várias etapas, em grande parte é mediada por moléculas identificadas como proteínas que se ligam a carboidratos.

Tem sido demonstrado que muitas lectinas de leguminosa glucose-manose ligante estimulam efeitos pró-inflamatórios mediados por seus sítios ligantes de monossacarídeos. Acredita-se que a lectina galactose específica de *Vatairea macrocarpa* (VML), deve produzir efeito similar no reconhecimento de células através de receptores distintos na superfície celular. Foi observada inibição na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por VML, quando esta se encontrava na presença de α -D-galactose 0,1M um conhecido inibidor desta lectina (ALENCAR *et al*, 2003).

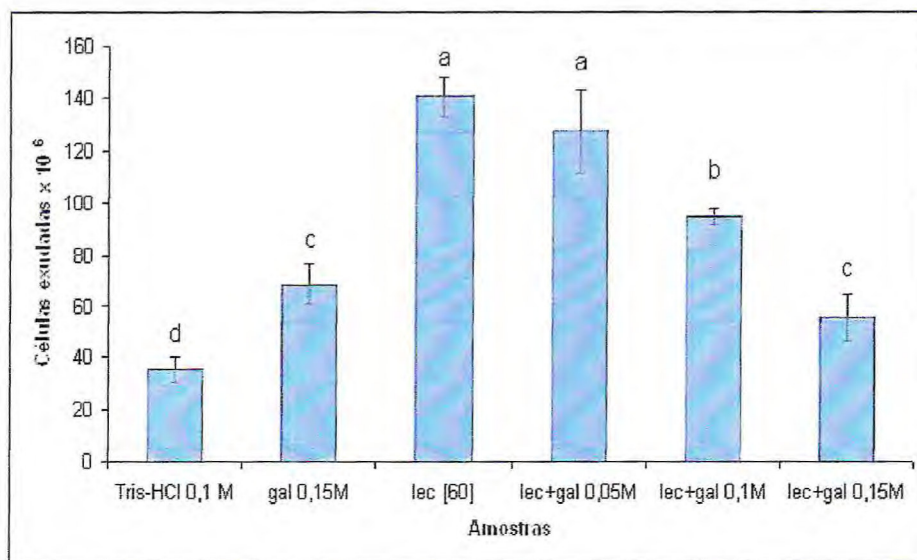


Figura 19: Efeito da D-galactose sobre a migração de células totais induzida pela lectina de *Glycine wightii*. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Doses ($\mu\text{g}/\text{animal}$).

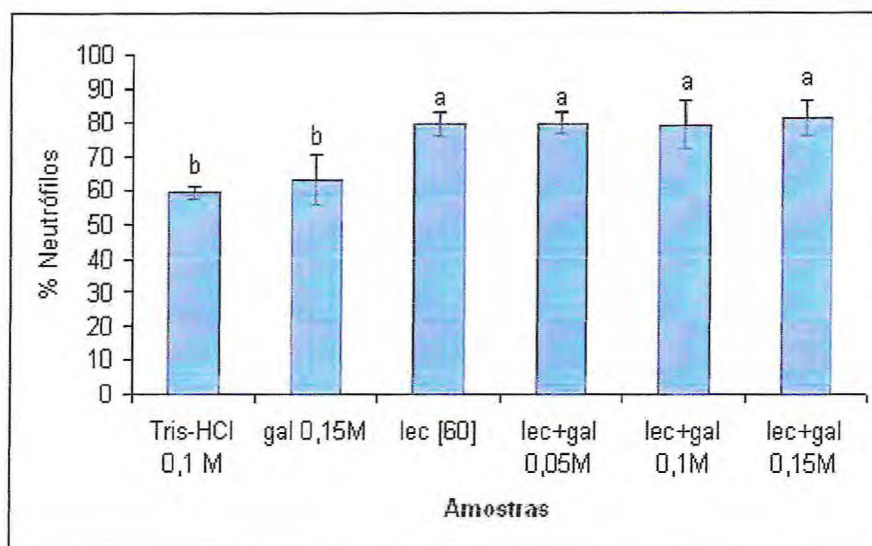


Figura 20: Efeito da D-galactose sobre a migração de neutrófilos induzida pela lectina de *Glycine wightii*. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Doses ($\mu\text{g}/\text{animal}$).

Nesse contexto, as lectinas ligantes de galactose são de interesse particular. Estas lectinas foram identificadas em células animais como componentes da membrana de macrófago, linfócitos e hepatócitos (ROSEMBERG *et al*, 1991), também como proteínas solúveis em vários órgãos de muitas espécies (KOTTGEN *et al*, 1992). Foram investigados os papéis funcionais destas proteínas, e muitas delas parecem participar do sistema imune e eventos fisiopatológicos (KOTTGEN *et al*, 1992; TEDDER *et al*, 1995).

Reconhecimento de carboidrato célula-específica tem sido usado para mediar, pelo menos em parte, a adesão das células no endotélio vascular e a migração de leucócitos para tecidos inflamados. Uma lectina galactose ligante liberada por macrófago ativado foi identificada como um atraente específico para neutrófilo *in vivo* e *in vitro*. Assim, estudar a interação de proteína-carboidrato envolvida na migração de leucócitos durante a resposta inflamatória seria útil para identificar lectinas exógenas que apresentem características semelhantes das lectinas endógenas e que minimizam o efeito da lectina endógena (BENJAMIN *et al*, 1997).

A lectina galactose ligante obtida de sementes de *Vatairea macrocarpa* induziu a migração de neutrófilo em ratos por um mecanismo indireto, não envolvendo os mediadores lipoxigenase, cicloxigenase ou fator ativador de plaquetas. Sua ação deve estar relacionada com mediadores pró-inflamatórios ainda não identificados. A migração promovida pela lectina galactose/N-acetilgalactosamina específica de *Vatairea macrocarpa* foi, parcialmente, bloqueada na presença de galactose. Estes achados indicam que essas lectinas podem ser usadas, como ferramentas para entender melhor os mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias (ALENCAR *et al*, 2003).

O efeito de moduladores farmacológicos talidomida e pentoxifilina sobre a migração de neutrófilos, em ratos machos, induzida pela LGw para cavidade peritoneal, também foi avaliado. Os animais (grupos de 5) receberam por via intraperitoneal (i.p) 1,0 mL da solução de lectina na concentração de 60 µg/mL suspensa em tampão tris-HCl 0,1M pH 7,6, sendo um grupo previamente tratado (30 minutos) com 0,5 mL de talidomida (80 mg/Kg por via oral) e outro com 0,5 mL de pentoxifilina (80 mg/Kg por via oral).

Pelos resultados obtidos foi possível observar que os moduladores farmacológicos utilizados foram capazes de reduzir, parcialmente, a migração de leucócitos causada pela LGw, quando comparado à migração causada pela carragenina (controle positivo) (Figura

21). Entretanto, observou-se que os moduladores farmacológicos utilizados não reduziram a migração de neutrófilos quando comparada à migração dessas células causadas pela lectina (60 µg/mL) e pela carragenina - controle positivo (Figura 22).

Diante do mecanismo de ação farmacológico dos moduladores utilizados, pode-se sugerir que a LGw exerça sua atividade inflamatória através do aumento da síntese TNF- α e interleucinas.

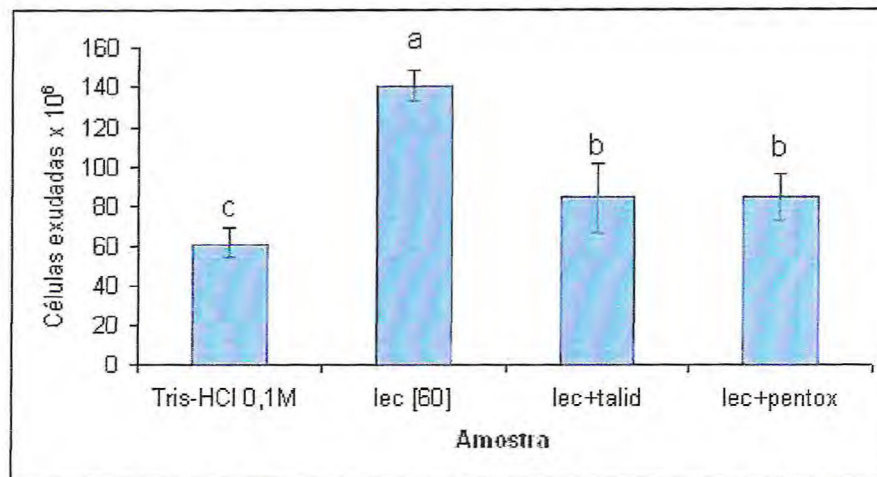


Figura 21: Efeito dos moduladores farmacológicos pentoxifilina e talidomida sobre a migração de células totais induzida pela lectina de *Glycine wightii*. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Doses ($\mu\text{g}/\text{animal}$).

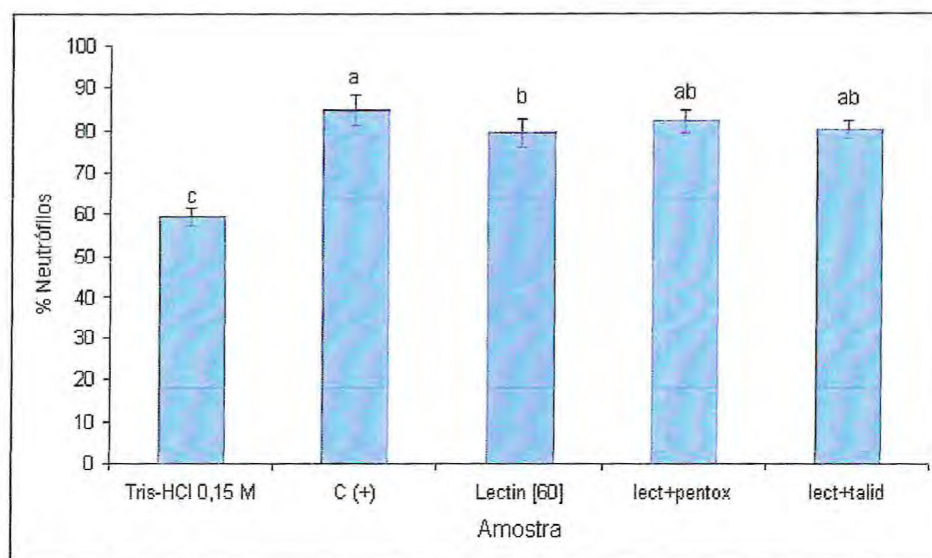


Figura 22: Efeito dos moduladores farmacológicos pentoxifilina e talidomida sobre a migração de neutrófilos pela lectina de *Glycine wightii*. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Doses ($\mu\text{g}/\text{animal}$).

7.1.10 Indução do edema de pata

O edema de pata foi induzido em ratos, machos (180 – 200 g), divididos em grupos de 6 animais, que receberam, na pata posterior esquerda, 0,1 mL por injeção subplantar da solução de lectina de *Glycine wightii* (60 µg) em tampão tris-HCl 0,1M pH 7,6 estéril (controle negativo), carragenina (controle positivo) e LGw previamente incubada com D-galactose 0,15M. Os grupos receberam as seguintes soluções: grupo 1 tampão tris-HCl 0,1M pH 7,6, grupo 2 carragenina 1%, grupo 3 LGw 60 µg/mL, grupo 4 lectina 60 µg/mL + D-galactose 0,15M.

A lectina galactose-ligante de sementes de *Glycine wightii* induziu edema de pata em ratos Wistar com pico máximo entre 2 e 3 horas após a injeção subplantar (Figura 23). O edema induzido pela a LGw foi semelhante aquele apresentado pela carragenina usada como controle positivo e 5 vezes maior que o edema induzido pelo controle negativo nas primeiras 2 horas. Quanto a lectina que foi previamente incubada com a D-galactose 0,15M o edema induzido pela LGw foi inibido consideravelmente, em torno de 55% (Figura 24). Este resultado sugere que parte da ação na indução do processo inflamatório da LGw em provocar o edema está associado aos sítios de ligação a carboidrato.

Semelhantes resultados foram obtidos por FREIRE *et al.* (2003) com a lectina isolada de sementes de *Talisia esculenta* manose específica, onde uma fraca inibição do edema de pata foi observada quando a lectina foi administrada junto com D-manose 0,1 M, entretanto, não foi observada a redução do edema quando a lectina foi incubada com D-glucose ou D-galactose. Resultados semelhantes foram encontrados para lectinas isoladas das sementes de *Artocarpus integrifolia* (SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994) e *Erythina velutina* (MORAES *et al.* 1996) testadas em ratos.

De acordo com BENTO *et al.* (1993) é provável que diferentes afinidades das lectinas por carboidratos presentes na superfície celular possam estar envolvidas na migração de neutrófilos. O efeito inibitório do carboidrato injetado juntamente com a lectina mostrou que os efeitos pró-inflamatórios dessas proteínas estão claramente relacionados à sua propriedade de ligar-se especificamente a açúcar.

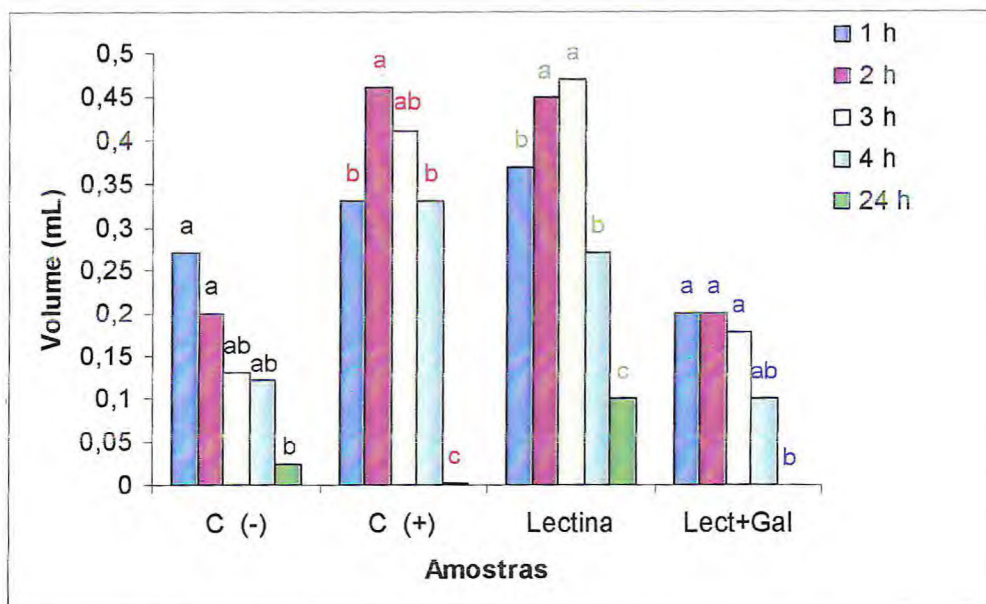


Figura 23 – Indução do edema de pata em ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de *Glycine wightii*. A lectina foi dissolvida em tampão tris-HCl 0,1M pH 7,6 que foi utilizado como controle negativo - C(-). Carragenina (1%) foi usada como controle positivo – C (+). As amostras administradas foram: tampão tris-HCl 0,1M pH 7,6; carragenina 1%; lectina - 60µg (LEC) e lectina - 60µg + D-galactose 0.15 M (LECT+GAL). O edema foi avaliado 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Neste gráfico o teste de Tukey foi usado para avaliar médias de edema nos vários tempos para cada grupo.

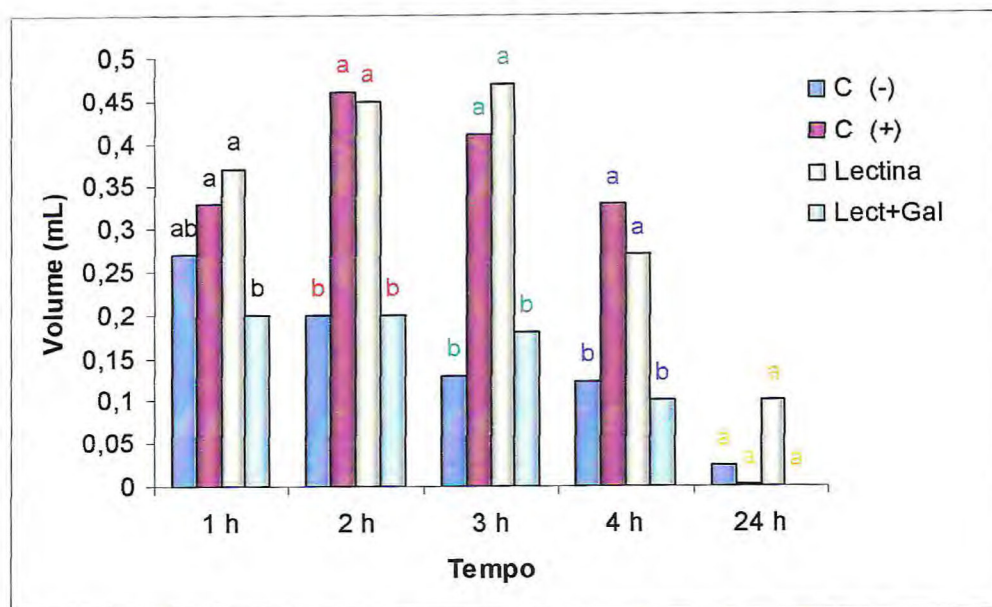


Figura 24 – Indução de edema de pata em ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de *Glycine wightii*. A lectina foi dissolvida em tampão tris-HCl 0,1M pH 7,6 que foi utilizado como controle negativo - C(-). Carragenina (1%) foi usada como controle positivo – C (+). As amostras administradas foram: tampão tris-HCl 0,1M pH 7,6; carragenina 1%; lectina - 60µg (LEC) e lectina - 60µg + D-galactose 0,15 M (LECT+GAL). O edema foi avaliado 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Neste gráfico o teste de Tukey foi usado para avaliar médias de edema nos 5 grupos para cada tempo.

NOGUERA *et al.* (2004) afirmam que a injeção intraplanar de carragenina em ratos leva a edema de pata, no qual há na primeira fase liberação concomitante de histamina, serotonina e cinina e na segunda fase aumento na síntese de prostaglandinas, radicais livres derivado do oxigênio, produção de ciclooxigenase induzida e ativação e infiltração para o local.

O edema surge como consequência de vários eventos que ocorrem durante a inflamação aguda caracterizada por alteração vascular levando a um aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade e migração de leucócitos. Os sinais cardinais são: dor, calor e rubor. O aumento da permeabilidade causado pela inflamação permite o extravasamento de um líquido rico em proteínas para o interstício. Este fato gera o acúmulo de líquido no interstício promovendo o edema. Além disso, ocorre vasodilatação a qual leva ao aumento do fluxo sanguíneo caracterizando o calor e o rubor (ROITT *et al.*, 1999).

De acordo com SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY (2004) o edema, um dos sinais da inflamação, é causado por um fluxo transvascular de um fluido rico em proteínas do compartimento intravascular para o interstício como resultado da ação de histamina, bradicinina, leucotrienos, sistema complemento, substância P e fator ativador de plaquetas (PAF).

UENO *et al.* (2000) afirmam que a injeção intraplanar na pata de rato induz a liberação de bradicinina, a qual induz a biossíntese de prostaglandina e outros autocóides, os quais são responsáveis pela formação do exudato inflamatório. Além disso, no modelo de edema de pata induzido pela carragenina, a produção de prostanóides ocorre no soro durante a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) por um mecanismo *feedback* positivo (NANTEL, *et al.*, 1999)

Segundo SELLOUM *et al.* (2003) a fase inicial do edema induzido pela carragenina está relacionada à síntese de mediadores inflamatórios tais como o ácido aracônico e seus metabólitos. Entretanto, nas fases mais avançadas da resposta inflamatória têm-se uma ligação entre a migração de neutrófilos para os sítios inflamatórios onde ocorrerá a liberação de enzimas proteolíticas e espécies oxigênio reativa (CUZZOCREA *et al.*, 1998).

A migração de neutrófilos promovida pela lectina galactose/N-acetilgalactosamina específica de *Vatairea macrocarpa* observada em cavidade peritoneal, também foi observado através do edema de pata de ratos Wistar. Os resultados sugerem que a migração induzida por esta lectina ocorre por um mecanismo indireto mediado por macrófago (ALENCAR *et al.*, 2003).

7.1.11 Avaliação da toxicidade aguda pela lectina da farinha de sementes de *Glycine wightii*

A LGw diluída em tampão tris-HCl 0,1M pH 7,6 foi injetada por via intraperitoneal, na concentração de 60µg/animal, em camundongos. Os animais foram divididos em 2 grupos de 6 camundongos cada, onde um grupo recebeu 1,0mL da lectina e outro 1,0mL do tampão tris-HCl 0,1M pH 7,6 (controle negativo). Os camundongos foram observados por 24, 48 e 72 horas, não tendo sido verificado a morte em nenhum grupo de camundongos que receberam as amostras citadas na dose administrada. A partir desse experimento podemos sugerir que LGw não apresenta toxicidade na concentração testada.

A LGw, uma lectina galactose ligante, com relação à toxicidade, difere de outras lectinas vegetais galactose ligante identificadas como tóxicas, como por exemplo lectinas de *Abrus pulchellus*, que é fortemente inibida por galactose e açúcares derivados e que são altamente tóxicas (RAMOS *et al.*, 1998). A especificidade por galactose tem sido uma característica muito preservada nas RIPs tipo II, e a funcionalidade de seus sítios ligantes de carboidratos têm-se mostrado essencial para a internalização da toxina e endereçamento dentro da célula eucariótica (LORD *et al.*, 1994).

7.2. Caracterização química e biológica dos calos obtidos a partir de cotilédones e hipocótilos de sementes de *Glycine wightii*

A fim de caracterizar os calos de cotilédones e de hipocótilos obtidos a partir das sementes de *Glycine wightii* e avaliar se a lectina (LGw) estava sendo sintetizada nos calos induzidos alguns testes foram realizados:

7.2.1 Determinação de umidade

A determinação do teor de umidade presente nos calos de cotilédones e de hipocótilos foi realizada partindo de aproximadamente, 2,0g de amostra. Os calos de cotilédones e de hipocótilos utilizados foram já estabelecidos de uma terceira geração, conforme metodologia descrita por SILVA (2000). Obteve-se para os calos de cotilédones um percentual de 95,3% e para os calos de hipocótilos 95,7% de umidade.

7.2.2 Determinação de cinzas

Utilizando-se 2,0g de calos de cotilédones e hipocótilos já estabelecidos SILVA (2000) foi feita a determinação do teor de cinzas. Obteve-se para os calos de cotilédones um percentual de 0,64% e para os calos de hipocótilos 0,47% de cinzas.

7.2.3 Determinação de carboidratos

A determinação do teor de carboidrato nos extratos totais dos calos de cotilédones e de hipocótilos liofilizados foi realizada pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), tendo sido determinado para os calos cotiledonares um teor de 7,98% e para os calos de hipocótilos 7,4%.

7.2.4 Isolamento da lectina

A fim de investigar se a lectina presente nas sementes de *Glycine wightii* estava presente nos calos de cotilédones e hipocótilos, foi realizado cromatografia de afinidade em goma de Guar dos extratos totais obtidos a partir dos calos liofilizados, mas nenhum pico ficou retido. Sugere-se com isso que a lectina ou não foi sintetizada, ou está presente

em quantidades insuficientes ou ainda, está presente na forma de pré-pró-lectina (SILVA, 2001), não permitindo que os sítios de ligação a carboidratos da lectina estejam expostos nos extratos utilizados, como ocorre no extrato total obtido a partir de *Morus* sp. (YEASMIN *et al*, 2001).

SIRCAR *et al.* (1985) relataram que os calos obtidos de hipocótilos de *Canavalia glatiata*, após diversos subcultivos mostram a ausência da lectina (Con A). Nesta conclusão inicial, é sugerido que os calos não tem totipotência para a produção de RNAm (RNA mensageiro) da Con A.

A cultura de tecidos também tem sido utilizada para avaliar a síntese de substâncias naturais com conhecida propriedades farmacológicas. Com esse objetivo, PASQUA *et al.*, (2003), investigando a síntese de hipericina, hiperforinas e flavonóides em calos e culturas em suspensão de *Hypericum perforatum* cv. Topas, observaram que a hipericina, utilizada no tratamento da depressão leve não foi sintetizada nas culturas analisadas, e sugeriram que as enzimas envolvidas na síntese e dimerização, desse metabólito, estão ausentes.

7.2.5 Determinação da atividade hemaglutinante

A avaliação da atividade hemaglutinante foi realizada no extrato total dos calos de cotilédones e de hipocótilos, usando um painel de eritrócitos do sistema ABO e de coelho. A atividade foi realizada com eritrócitos não tratados, com eritrócitos tratados com tripsina e bromelaina, não tendo sido observado nenhuma atividade com nenhuma das hemácias testadas.

7.2.6 Detecção da presença de lectinas nos extratos de calos de cotilédones e hipocótilos por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

A fim de verificar se a lectina de *Glycine wightii* estava presente nos extratos de calos de cotilédones e hipocótilos foram realizados ensaio imunológico por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), utilizando anticorpos contra a LGw produzido em camundongos. Os resultados mostraram que a lectina está presente em pequenas quantidades, apenas no extrato dos calos cotiledonares, numa concentração de aproximadamente 7%.

Os resultados encontrados estão de acordo com o trabalho realizado por SILVA *et al.* (2005), no qual foi demonstrado que a lectina dos calos cotiledonares de *Canavalia brasiliensis* foi sintetizada em pequenas quantidades, sendo detectada apenas por ensaios de Western blotting e que a mesma vai desaparecendo à medida que os calos são subcultivados.

A não detecção da lectina no extrato dos calos de hipocótilos sugere que a mesma pode estar realmente ausente, em concentrações não detectáveis e cuja estrutura não seja idêntica a estrutura da lectina isolada, o que dificulta sua identificação por métodos imunológicos.

7.2.7 Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal

Os calos, obtidos a partir de sementes de *Glycine wightii*, foram avaliados com relação a sua atividade inflamatória. Foram utilizados extratos 1:5 m/v (em NaCl 0,15 M) obtidos das farinhas dos calos de cotilédones e hipocótilos liofilizados. Os animais (grupos de 5 ratos machos) receberam por via i.p. 1,0 mL dos extratos obtidos. A solução de NaCl 0,15 M estéril foi utilizada como controle negativo e a carragenina como controle positivo. Pode-se observar que tanto os extratos dos calos cotiledonares como os de hipocótilo da referida semente, foram capazes de induzir, fracamente, a migração de células totais para a cavidade peritoneal (Figura 25). Os calos de hipocótilos mostraram efeito inflamatório, discretamente, maior quando comparado com o efeito causado pelos calos cotiledonares na indução de leucócitos na contagem total. Na migração de neutrófilos polimorfonucleares observou-se que em ambos os extratos utilizados, essas células (neutrófilos) predominaram, ocorrendo migração em níveis próximos aos observados pelo controle positivo (carragenina), não se diferenciado estatisticamente entre si (Figura 26). A concentração de proteínas baseada na DO a 280nm, injetada por grama de peso corpóreo nos animais foi de aproximadamente 10µg/Pcorpóreo. Pode-se sugerir que a LGw seja sintetizada em quantidades menores nos calos cotiledonares, o que determina menor efeito inflamatório observado na contagem de leucócitos.

Em trabalho realizado por SILVA *et al.* (2005) observaram que a lectina de *Canavalia brasiliensis* era sintetizada nos calos induzidos a partir de cotilédones da referida semente em baixas concentrações.

Por outro lado, esses resultados podem estar relacionados com outro composto presente nos calos, uma vez que não foi possível isolar a lectina nesses calos.

De acordo com TOKER *et al.* (2003), a cucurbitacina B é uma substância com propriedade antiinflamatória sintetizada na *Ecballium elaterium*, e que foi sintetizada apenas nos primeiros calos obtidos a partir de caules e folhas da referida planta em quantidades muito pequenas.

POPOV *et al.* (1999), demonstraram que os polissacarídeos de calos obtidos de *Silene vulgaris* podem ser usados como substância imunoativa, pois foram capazes de estimular macrófagos através de diferentes mecanismos.

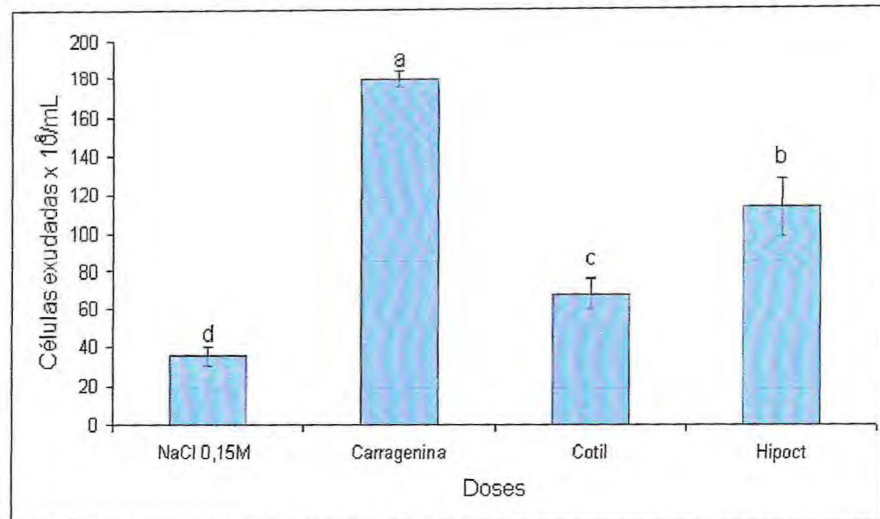


Figura 25: Indução da migração de células totais para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pelos extratos de calos induzidos a partir de cotilédones e hipocótilos de sementes de *Glycine wightii* na concentração de 1:15. Os extratos foram feitos em solução de NaCl 0,15M estéril que foi usada como controle negativo - C(-). Carragenina (300 µg/cavidade) foi usada como controle positivo - C (+). A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

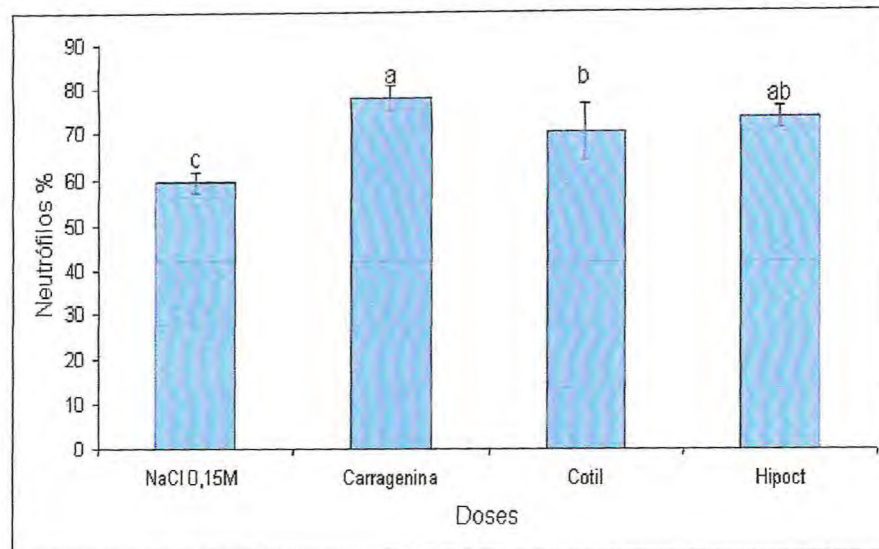


Figura 26: Indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pelos extratos de calos induzidos a partir de cotilédones e hipocótilos de sementes de *Glycine wightii* na concentração de 1:15. Os extratos foram feitos em solução de NaCl 0,15M estéril que foi usada como controle negativo - C(-). Carragenina (300 µg/cavidade) foi usada como controle positivo - C (+). A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

7.2.8 Avaliação da toxicidade aguda pelos extratos totais obtidos da farinha de calos de cotilédones e hipocótilos de sementes de *Glycine wightii*

O extrato da farinha de calos induzidos a partir de cotilédones e hipocótilos de sementes de *Glycine wightii* em NaCl 0,15 M foi injetado por via intraperitoneal, na concentração de 1:5 (m/v), em 2 grupos de camundongos, tendo cada um dos grupos 6 animais. Os camundongos foram observados por 24, 48 e 72 horas, não tendo sido verificado a morte em nenhum grupo de camundongos que receberam as amostras citadas na dose administrada. A partir desse experimento podemos sugerir que o extrato da farinha de calos induzidos a partir de cotilédones e de hipocótilos de sementes de *Glycine wightii* não apresenta toxicidade na concentração testada.

Ao contrário do trabalho realizado por SATO *et al.* (1993) trabalhando com culturas de suspensão celular, obtidas a partir de calos cotiledonares de *Canavalia ensiformes*, conseguiram detectar a canatoxina (CNTX), uma proteína tóxica que induziu convulsões e morte em camundongos.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

A lectina isolada das sementes de *Glycine wightii* (LGw) é uma glicoproteína ligante a D-galactose, que apresenta atividade hemaglutinante para eritrócitos humanos tripsinizados do grupo A₁, não necessitando da adição de cátions bivalentes. Mostrou baixa estabilidade térmica, perdendo totalmente a atividade quando aquecida a 40^oC por 15 minutos. Apresenta estrutura secundária, predominantemente, em β-conformação (40 %) e ponto isoelétrico em pH variando de 6,55 a 7,0, sugerindo a existência de isoformas.

A LGw não apresenta toxicidade aguda na concentração administrada (60µg/animal). Induziu edema de pata que foi, significativamente, reduzido quando a administração foi realizada com açúcar inibidor (D-galactose), reduzindo também a migração de neutrófilos em cavidade peritoneal de ratos, provavelmente por aumentar a liberação de TNF-α e interleucinas.

A LGw foi identificada em baixas concentrações apenas nos calos cotiledonares, quando pesquisada nos extratos de calos de cotilédones e de hipocótilos, por técnicas imunológicas de reação antígeno-anticorpo (ELISA). A mesma não mostrou nenhuma atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho e humano e não se ligou a coluna cromatográfica testada. O efeito inflamatório observado foi bem inferior ao observado pela lectina isolada da semente.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENIUS, H.; KALKKINEN, N.; LUKKA, M.; REUNALA, T.; TURJANMAA, K.; MAKINEN-KILJUNEN, S.; YIP, E.; PALOSUO, T., Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen, **Clin. Exp. Allergy**, **25**:659-665, 1995.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A, The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, **35**:1674-1681, 2003.

ALMEIDA-SILVA, L.M., **Lectina de *Canavalia brasiliensis* Mart. Comportamento durante a maturação das sementes.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 105pp., 1986.

APPUKUTTAN, P.S.; SUROLIA, A.; BACHHAWAT, B.K., Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian J. Biochem. Biophys.**, **14**:382-384, 1977. Citado por: Tavares, 2002.

ARRUDA, V.A.; GUIMARÃES, A.Q.; HYSLOP, S.; ARAUJO, P.M.F.; BON, C., ARAUJO, A.L., Bothrops lanceolatus (Fer de lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. **Toxicon.**, **41**:99-107, 2003.

AYOUBA, B.; CHATELAIN, C.; ROUGÉ, P., Legume lectins interact with muramic acid and N-acetylmuramic acid. **FEBS Letters**, **289(1)**:102-104, 1991.

BAINS, J.S.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.S.; NIJJAR, K.K.; AGREWALA, J.N.; KUMAR, V.; KUMAR, A.; SAXENA, A.K., Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). **Biochimica et Biophysica Acta** **1723(1-3)**:163-174, 2005.

BANTEL, H.; ENGELS, I.H.; VOELTER, W.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; WESSELBORG, S., Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis, **Cancer Res.**, **59**:2083-2090, 1999.

BARONDES, S. H., Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **TIBS**, **13(12)**: 480-482, 1988.

- BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. ; CAVADA, B. S., Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* Tribe. **Immunol. Invest.**, **21(4)**:297-303, 1992.
- BARRE, A.; VAN DAMME, E.J. M.; PEUMANS, W.J., ROUGE, P., Structure-function relationship of monocot mannose-binding lectin. **Plant Physiol.**, **112**:1531-1540, 1996.
- BHATTACHARYYA, L.; GHOSH, A.; SEN, A., A comparative study on lectins from four *Erythrina* species. **Phytochemistry**. **24**:2117-2122, 1986.
- BEDNAREK, S.Y.; WILKINS, T.A.; DOMBROWSKI, J.E.; RAIKEL, N.V., A carboxyl-terminal propetide is necessary for proper sorting of barley lectin in vacuoles of tobacco. **The Plant Cell**, **2**:1145-1155, 1990.
- BEEZHOLD, D. H.; KOSTYAL, D. A.; SUSSMAN, G. L., IgE epitope analysis of the hevein pre-protein: A major latex allergen. **Clin. Exp. Immunol**, **108**:114-121, 1997.
- BENJAMIN, C.F.; FIGUEIREDO, R.C.; HENRIQUES, M.G.; BARJA-FIDALGO, C., Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **30**:873-881, 1997.
- BENTO, C. A. M.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A., MOREIRA, R. A., BARJA-FIDALGO, C., Study on endematogenic and leucocyte migratory effects of plant lectins. **Agents and actions**, **38**:48-54, 1993.
- BLUM, H.; BEIER, H; GROSS, H.J., Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. **8**:93-99, 1987.
- BOGDAN, A.V., **Tropical pasture and fodder plants**. Longman, London and New York, 1977. In: <www.nsr1.uiuc.edu/aboutsoy/history_introNA.html>Em 08/07/2005.
- BOLLINI, R.; VITALE, A.; CHRISPPEELS, M. J.; *In vivo* and *in vitro* processing of seed reserve protein in the endoplasmic reticulum: evidence for two glycosylation steps, **The Journal of Cell Biology**., **96**: 999-1007, 1983.
- BOLLINI, R.; CERIOTTI, A.; DAMINATI, G. S.; VITALE, A., Glycosylation is not needed for the intracellular transport of phytohemagglutinin in developing *Phaseolus vulgaris* cotyledons and for the maintenance of its biological activities, **Physiologia Plantarum**, **65**:15-22, 1985.

- BORGES, L.G.; FRÖEHLICH, P.E., Talidomida – Novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Rev Assoc Med Brás**, **49(1)**:96-102, 2003.
- BORREBACK, C.A.K., CARLSON, R., Lectins as mitogens. **Adv. Lectin Res.**, **2**:10-27, 1989.
- BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, S., GONTIER, E., Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Sci.**, **161**:839-851, 2001.
- BRAGA, R.C., **Uso de galactomananas de *Caesalpinia pulcherrima* para isolamento de lectina galactose-ligante**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 95pp., Fortaleza, 2001.
- BRANDO-LIMA, A.C.; SALDANHA-GAMA, R.F.; HENRIQUES, M.G.M.O.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, R.A., BARJA-FIDALGO, C., Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: Involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. **Toxicology and Applied Pharmacology**, **28(2)**:145-154, 2005.
- BARRON, M.C; MEJÍA, E.G; Comparative study of enzymes related to proline metabolism in therapy beans (*Phaseolus acutifolius*) and common beans (*Phaseolus vulgaris*) under drought and irrigated conditions and various urea concentrations. **Plant Food for Human Nutrition**. **52**:119-132, 1998.
- CAMMUE, B.P.A., PEETERS, B., PEUMANS, W.J., A new lectin from tulipa. **Planta**, **169**:583-588, 1986.
- CAMPANA, P.T.; MORAES, D.I.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; BELTRAMINI, L.M., Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin. **Eur. J. Biochem**. **268**:5647-5652, 2001.
- CARDENAS, M.A.B.; FERNANDEZ, C.M., Efecto de la Fitohemaglutinina sobre la Cicatrización. **Acta Farm. Bonaerense**, **14(4)**:225-228, 1995.
- CARLINI, C. R.; BARCELLOS, G. B. S.; BAETA-NEVES, A. D. V.; GUIMARÃES, J. A., **Phytochemistry**, **27**:25-30, 1988.

- CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; **Toxicon**, 19:667-676, 1981. Citado por: Vasconcelos *et al.*, 1994.
- CARLOS, E.R.C., **Caracterização físico-química e biológica da lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra***. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 102 pp., Fortaleza, 2004.
- CARTELLIERI, S.; HAMER, O.; HELMHOLZ, H.; NIEMEYER, B., One-step affinity purification of fetuin from fetal bovine serum. **Biotechnology Appl. Biochem.**, 35:83-89, 2002.
- CAVADA, B. S.; VIEIRA, C. C.; SILVA, L. M. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A., Comportamento da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. durante a germinação em presença de luz. **Acta Bot. Bras.** 4(2):13-20, 1990.
- CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GRANJEIRO, T.B., Primary structure and functions of plant lectins. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 5(2):193-201, 1993.
- CAVADA, B. S.; SANTOS, C.F.; GRANGEIRO, T.B.; NUNES, E.P.; SALES, P.V.P.; RAMOS, R.L.; DE SOUSA, F.A.M.; CRISOSTOMO, C.V.; CALVETE, J.J., Purification and characterization of a lectin from seed of *Vatairea macrocarpa* duke. **Phytochemistry**. 49:675-680, 1998.
- CHEN, Z.; POSCH, A.; LOHAUS, C.; RAULF-HEIMSOOTH, M.; MEYER, H. E.; BAUR, X., Isolation and identification of hevein as a major IgE-binding polypeptide in *Hevea* latex. **J. allergy. Clin. Immunol**, 99:402-409, 1997.
- CICCHETTI G.; ALLEN P.G.; GLOGAUER M., Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. **Crit. Rev. Oral Biol Med.**, 13(3):220-228, 2002.
- CHATTERJEE, M.; MANDAL, D.K.; Kinetic Analysis of Subunit Oligomerization of the Legume Lectin Soybean Agglutinin. **Biochemistry**, 42:12217-12222, 2003.
- CHRISPEELS, M. J.; HARTL, P. M.; STURM, A.; FAYE, L.; Characterization of the endoplasmatic reticulum associated precursor of concanavalin A. Partial amino acid sequence and lectin activity. **J. Biol. Chem.**, 261:10021-10024, 1986.

- CHRISPEELS, M.J.; RAIKHEL, N.V., Lectins, lectin genes and roles in plant defense. **Plant Cell**, **3**:1-9, 1991.
- COLDITZ, I.G., Margination and emigration of leukocytes. **Survey of Synthetic and Pathological Research**, **4**: 44-68, 1985. Citado por: Alencar *et. al.*, 2003.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T., **Robbin`s pathological basis of disease**. 6th ed. W.B. Saunders Company Philade; pg. 861, 2001. Citado por: Thangam & Dhananjayan, 2003.
- COSTA, F.H.F., **Purificação e Caracterização Parcial de uma lectina mitogênica presente na Alga Marinha Vermelha *Amansia multifida* Lamouroux**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 126pp., Fortaleza, 1995.
- CROCKER, P. R.; FEIZI, T. Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. **Curr. Opin. Struct. Biol.** **6**:679-691, 1996.
- CUZZOCREA , S.; ZINGARELLI, B.; HAKE, P.; SALZMAN, B.; SZABD,C. Anti-inflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carragenan-induced models of inflammation. **Free Rad Biol Med**. **24**:450-459, 1998. Citado por: Selloum *et. al.*, 2003.
- CUZZOCREA , S., Shock, inflammation and PARP. **Pharmacological Research**, **5(1)**:72-82, 2005.
- DOES, M.P.; HOUTERMAN, P.M.; DEKKER, H.L.; CORNELISSEN, B.J.C., Processing, targeting, and antifungal activity of stinging nettle agglutinin in transgenic tobacco. **Plant Physiol.**, **120**:42- 431, 1999.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chem.**, **28(3)**:350-356, 1956.
- EINHOFF, W.; FLEIISCHMANN, G.; FREIER, T.; KUMMER, H.; REDIGUER, H. Interaction of leguminous seed lectins with seed proteins-lectins as packing aids of storage proteins. In: DRIESSCHEE, V.; BOG-HANSEN, T. C., Eds. **Lectins: Biol., Biochem., Clinical Biochem.** **5**:45-52, 1986, citado por Ramos, 2002.

ETZLER, M.E.; MACMILLAN, S.; SCATES, S.; GIBSON, D.M.; JAMES Jr, D.W.; COLE, D.; THAYER, S., Subcellular localizations of two *Dolichos biflorus* lectin. **Plant Physiology**, 76:871-878, 1984.

ETZLER, M.E., Distribution and function of plant lectins. Citado por: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. (Eds), **The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**, Academic Press, Orlando, FL., pp. 371-435, 1986.

FARIAS, W. R. L., **Purificação, Caracterização Parcial e Atividade Biológica da Lectina da Alga Marinha Vermelha *Meristielle echinocarpa* (Areschoug) Cheney et Gabrielson**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 104pp., Fortaleza, 1995.

FAYE, L.; CHRISPPEELS, M. J., *Transport and processing of the glycosylated precursor of concanavalin A in jack bean*. **Planta**, 170:217-224, 1987.

FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, E.; MORALES-RÍOS, M.S.; PÉREZ-ÁLVAREZ, V.; MURIEL, P., Immunomodulatory effects of thalidomide analogs on LPS-induced plasma and hepatic cytokines in the rat. **Biochemical Pharmacology**, 68(7):1321-1329, 2004.

FERREIRA, S.H., A new method for measuring variation of rats paw volumes. **Journal of Pharmaceutical and Pharmacology**, 31:648, 1979. Citado por: Neto *et. al.*, (2005).

FREIRE, M.G.M.; GOMES, V.M.; CORSINI, R.E.; MACHADO, O.L.T.; SIMONE, S.G.; MARANGONI, S.; NOVELLO J.C.; MACEDO, M.L.R.; Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiol. Biochem.**, 40:61-68, 2002.

FREIRE, M.G.M.; DESOUSA, I.A.; SILVA, A.C.M.; MACEDO, M.L.R.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S., *Inflammatory responses induced in mice by lectin from Talisia esculenta seeds*. **Toxicon**, 42:275-280, 2003.

FRIGERIO, L.; VITALE, A.; LORD, J.M.; CERIOTTI, A.; ROBERTS, L.M., Free ricin A chain, proricin and native toxin have different cellular fates when expressed in tobacco protoplasts. **J. Biol. Chem.**, 273:14194-14199, 1998.

FUJITA, Y.; OISHI, K.; SUZUKI, K.; IMAHORI, K., Purification and properties of an anti-B hemagglutinin produced by *Streptomyces* sp. **Biochem.**, **14**:4465-4470, 1975. Citado por: Tavares, 2002.

GABIUS, H. J.; GABIUS, S., Tumor lectinology: a glycobiological approach to tumor diagnosis and therapy. **Lectin Reviews**, 1991.

GABIUS, H. J., Animal lectin. **Biochem Biophys Acta.**, **1572**:163-434, 2002.

GANSERA, R.; SCHURZ, H.; RUDIGER, H. Lectin-associated proteins from the seeds of Leguminosae **Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie**, **360**:(11), 1579-85, 1979.

GARROS-ROSA, I., **Galactomananas de *Parkinsonia aculeate* L.: Caracterização estrutural e aplicação no isolamento de lectinas ligantes de galactose.** Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 114pp., Fortaleza, 2000.

GEBAUER G, SCHILTZ E, SCHIMPL A, RUDIGER H. Purification and characterization of a mitogenic lectin and a lectin-binding protein from *Vicia-sativa*. **Hoppe-seylers zeitschrift fur physiologische chemie** **360** (12), 1727-1735, 1979, citado por Ramos, 2002

GERS-BARLAG, H.; SCHECHER, G.; KUMAR, N. S.; RUDIGER, H. Protein body membranes as binding partners of lectins. In: Van Driessche E, Franz H, Beeckmans S, Pfuller U, Kallikorm A, Bog-Hansen TC (eds.), *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* v. 8, pp.97-100. Textop, Hellerup (Denmark) (1993), citado por Ramos, 2002.

GIDROL, X. H.; CHRESTIN, L.; KUSH, T. A., Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber-tree) is involved in the coagulation of latex. **J. Biol. Chem.**, **269**:9278-9283, 1994.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N., What Should Be Called A Lectin? **Nature**, **285**:66, 1980.

GOLDSTEIN, I.J.; PORETZ, R.D., Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectin. In: Liener, I.E.; Sharon, N.; Goldstein, I.J. eds.

The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, Academic Press, New York, pp 33-50, 1986. Citado por: Matsui, *et al.*, 2001.

GOMES, J.C.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J. T. A., Histamine release induced by glucose (manose) specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents and Action**, **41**:132-135, 1994.

GOZIA, O.; CIOPRAGA, J.; BENTIA, T.; LUNGU, M.; ZAMFIRESCU, I.; TUDOR, R., ROSEANU, F.; NITU, F., Antifungal properties of lectin and new chitinases from potato tubers. **C. R. Acad. Sci. (III)**, **316(8)**:788-792, 1993.

GUPTA, N.; SRIVASTAVA, P.S., Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus mauritiana*. **Plant Cell Reports**, **17**:552-556, 1998.

GUZMÁN-PARTIDA, A.M.; ROBLES-BURGUEÑO, M.R.; ORTEGA-NIEBLAS, M.; VÁZQUEZ-MORENO, I., Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie**, **86**:335-342, 2004.

HANKINS, C.N.; KINDINGER, J.I.; SHANNON, L.M., The lectins of *Sophora japonica* 2. Purification, properties and N-terminal amino acid sequences of five lectins from bark. **Plant Physiol.** **86**:67-70, 1988.

HELMHOLZ, H.; CARTELLIERI, S.; HE, L.; THIESEN, P.; NIEMEYER, B., Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. **Journal of Chromatography A**, **1006(1-2)**:127-135, 2003.

HEMPERLY, J.J.; MOSTOV, K.E.; CUNNINGHAM, B.A., *In vitro* translation and processing of a precursor from of favin, a lectin from *Vicia faba*. **J. Biol. Chem.**, **257(13)**:7903-7909, 1982.

HERGET, T.; SCHELL, J.; SCHREIER, T.H., Elicitor-specific induction of one member of the chitinase gene family in *Arachis hypogaea* **Mol. Gen. Genet.**, **224(3)**:469-476, 1990. *In: Vasconcelos et al.*, 1994.

HERMAN, E.M.; SHANNON, LM.; CHRISPEELS, M.L., Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. **Planta**, **165**: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. **The Journal of Biological Chemistry**, **258**: 9544-9549, 1983a.
- HIGGINS, T.J.V.; CHRISPPEELS, M.J.; CHANDLER, P.M.; SPENCER, D., Intracellular sites of synthesis and processing of lectin in developing pea cotyledons. **The Journal of Biological Chemistry**, **258**: 9550-9553, 1983b.
- HOSKINS, L.C.; LARSON, G.; NAFF, G.B., Blood group A immunodeterminants on human red cells differ in biologic activity and sensitivity to alpha-N-acetylgalactosaminidase. **Transfusion**, **35**:813-821, 1995.
- HUESING, J.E.; MURDOCK, L.L., SHADE, R.E., Rice and stinging nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. **Phytochemistry**, **30(11)**: 3565-3568, 1991.
- ITO, Y.; TSURUDOME, M.; YAMADA, A.; HISHIYAMA, M., Interferon induction in mouse spleen cells by mitogenic and nonmitogenic lectins. **Journal of immunology**, **132**:2440-2444, 1984.
- JAYARVARDHA, K.K.; PADIKKALA, J.; PANDIKKAR, K.R.; Lectin biosynthesis in callus culture established from seeds of *Canavalia virosa*. **Biologia Plantarum**, **38(3)**:329-334, 1996.
- KAPLOWITZ, P.; HAAR, B. Antimitogenic actions of lectins in cultured human fibroblasts. **Journal Cell Physiology**, **136**:13-22, 1988.
- KATZUNG, B.G., *Farmacologia Básica e Clínica*. 8ª Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.
- KAWAGISHI, H.; NOMURA, A.; MIZUNO, T.; KIMURA, A.; CHIBA, S., Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies, **Biochim. Biophys. Acta**, **1034**:247-252, 1990. Citado por: Bains *et al.*, 2005.
- KELLY, S.M.; PRICE, N.C., The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochimica et Biophysica**, **1338**:161-185, 1997.
- KENNEDY, J.F.; PAIVA, P.G.; CORREIA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B., Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydr. Polym.**, **24**:219-230, 1995.

KIYOTA, S., **Lectina de sementes de *Dioclea grandiflora* Mart. Atividade Mitogênica e Indução da Produção de Interferon.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 66p.p., Fortaleza, 1993.

KOCOUREK, J.; HOREJSI, V., Defining a lectin, **Nature**, **290**:188-190, 1981.

KONOZY, E.H.; MULAY, R.; FACA, V.; WARD, R.J.; GREENE, L.J.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; SABHARWAL, S., BHIDE. S.V., Purification, some properties of a D-galactose-binding leaf lectin from *Erythrina indica* and further characterization of seed lectin. **Biochimie**. **84**:1035-1043, 2002.

KILPATRICK, D.C., Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim. Biophys. Acta**. **1572**:187-197, 2002.

KONOZY, E.H.E.; BERNARDES, E.S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L.J.; WARD, R.J., Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **410**:222-229, 2003.

KOTTGEN, E.; HELL, B.; KAGE, A.; TAUBER, R., Lectin specificity and binding characteristic of human C-reactive protein. **Journal of Immunology**., **149**:445-453, 1992.

KRICKEBERG, H.; MAUFF, G.; MERTENS, T.; PLUM, G.; HEITMANN, K., Lymphocyte proliferation in AIDS-related complex/Walter-Reed 5 patients: response to herpes simplex virus and tuberculin antigen and mitogen during intravenous immunoglobulin treatment the ARC-IVIG study group, **Vox Sang**, **59**:38-43, 1990. Citado por: Bains *et al.*, 2005.

KULKARNI, G.V.; McCULLOCH, C.A.G., Concanavalin A Induced Apoptosis in Fibroblasts: The Role of Cell Surface Carbohydrates in Lectin Mediated Cytotoxicity. **Journal of Cellular Physiology**, **165**:119-133, 1995.

LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**:680-5, 1970.

LAVASTRE, V.; CAVALLI, H.; RATTHE, C.; GIRARD, D., Anti-inflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): Induction of apoptosis in activated neutrophils and

- inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation *in vivo*. **Clin. Exp. Immunol.**, **137**:272-278, 1994.
- LIENER, I. E.; TURNER, R.H., The use of glutaraldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutination activity of lectins. **Anal. Biochem.**, **68**:651-653, 1975.
- LERNER, D.R.; RAIKHEL, N.V., The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase. **J. Biol. Chem.**, **267**(16):11085-11091, 1992.
- LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J., **The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**, Academic Press, Orlando, F L., pp 371-345, 600p., 1986.
- LIS, H., SHARON, N., Lectins in higher plants. In MARCUS, A., ed. **The Biochemistry of plant. A Comprehensive Treatise. Protein and Nucleic Acids**. Academic Press, **6**:371-447, 1981.
- LIS, H.; SHARON, N., Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.**, **98**:637-674, 1998.
- LUSCINKAS FW; MA S; NUSRAT A; PARKOS CA; SHAW SW. Leukocyte transendothelial migration is a junctional affair Seminars. **Immunology**, vol. N/A, pp. 105-113, 2002
- LIMA, J.E.; SAMPAIO, A.L; HENRIQUES, M.G.; BARJA-FIDALGO, C., Lymphocyte activation and cytokine production by *Pisum sativum* agglutinin (PSA) *in vivo* and *in vitro*. **Immunopharmacology**. **41**:147-155, 1999.
- LIMA, R.S.N., **Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) como biossensor para lectinas vegetais**. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 125pp., Fortaleza, 2002.
- LIU, F.T., RABINOVICH, G.A., Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer**. **5**:29-41, 2005.
- LORD, J. M.; ROBERTS, L. M.; ROBERTUS, J. D., Ricin: Structure, mode of action and some current applications. **FASEB Journal**. **8**:201-208, 1994. Citado por Ramos *et al.*, 1998.

LORIS R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L., Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1383**:9-36, 1998.

LUSCINSKAS FW, et al: Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. **Semin Immunol.**, **14**:105, 2002.

MACHUKA, J.S.; OKEOLA, O. G.; VAN DAMME E J.M.; CHRISPEELS, M.J.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J., Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, **51**:721-728, 1999.

MAKELA, O., Studies in hemagglutinin of Leguminosae seeds. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, **35**(11):1-133, 1957. Citado por: Tavares, 2002.

MALEK-HEDAYAT, S.; MEINERS, S.A.; METCALF III, T.N.; SCHINDLER, M.; WANG, J.L.; HO, S., Endogenous lectin from cultured soybean cells. Chemical characterization of the lectin of SB-1 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, **232**(16):7825-7830, 1987.

MANNING, M.C., ILLANGASEKARE, M., WOODY, R.W., Circular dichroism studies of distorted alpha-helix, twisted beta-sheet and beta turns. **Biophys. Chem.**, **31**:77-86, 1988.

MARIKOVSKY, Y.; LOTAN, R.; LIS, H.; SHARON, N.; DANON, D., Agglutination and labeling density of soybean agglutinin on young and old human red blood cells. **Exp. Cell Res.**, **99**:453-456, 1976.

MARRIOT, J.B.; WESTBY, M.; COOKSON, S.; GUCKIAN, M.; GOODBOURN, S.; MULLER, G.; SHIRE, M.G.; STIRLING, D.; DALGLEISH, A.C. CC-3052: a water-soluble analog of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF-alpha production. **J. Immunol**, **161**:4236-4243, 1998.

MARRIOT, J.B.; MULLER, G.; DALGLEISH, A.G., Thalidomide as an emerging immuno therapeutic agent. **Immunol Today.**, **20**:538-540, 1999.

MATOS, V.C., **Gomas endospérmicas de *Delonix regia* e *Schizolobium paraiba***. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 113pp., Fortaleza, 2000.

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y.; O., TITANI, K., Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoprotein and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1525**:50-57, 2001.

MONTEIRO, A.C.O., **Características químicas, físico-químicas e estruturais da frutalina, uma lectina D-galactose-ligante de *Artocarpus incisa***. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. **Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de fruta pão (*Artocarpus incisa* L.)**. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 113pp., Fortaleza, 2002.

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

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

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S., Lectin from *Canavalia brasiliensis* (mart). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**. **26**:113-120, 1984.

MOREIRA, R. A.; AINOUS, I. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S., Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **86(2)**:211-218, 1991.

MOREIRA, R.A.; CASTELO-BRANCO, C.C.; MONTEIRO, A.C.O.; TAVARES, R.O.; BELTRAMINE, L.M., Isolation and characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* l. seeds. **Phytochemistry**. **47**:1183-1188, 1998.

MOREIRA R.A., **Lectinas vegetais uma abordagem química e físico-química**. Tese de Titular, Universidade Federal do Ceará, 600pp., Fortaleza, 1998.

- MOREIRA, R. A.; PERRONE, J.C., Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, **59**:783-787, 1977.
- MORIKAWA, K.; NONAKA, M.; NARAHARA, M.; TORII, I.; KAWAGUCHI, K.; YOSHIKAWA, T.; KUMAZAWA, Y.; MORIKAWA, S., Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. **Life Sciences**, **74**:709-721, 2003.
- MOTA, D. M., **Pulchelinas, Lectinas galactose-específicas, de sementes de *abrus pulchellus*: purificação e estudos de propriedades químicas e biológicas**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.
- NAKAGAWA, R.; YASOKAWA, D.; IKEDA, T.; NAGASHIMA, K., Purification and characterization of two lectins from callus of *Helianthus tuberosus*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, **60(2)**:259-262, 1996.
- NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K.M.; CHAN, C.C., Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, **128**:853-859, 1999.
- SRECRAMA, N.; WOODY, R.W., Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. **Methods in Enzymology, Numerical Methods Part D (IN PRESS)**, 1-27, 2004.
- NETO, A.G.; COSTA, J.M.L.C.; BELATI, C.C.; VINHÓLIS, A.H.C.; POSSEBOM, L.S.; DA SILVA FILHO, A.A.; CUNHA, W.R.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K.; SILVA, M.L.A. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pederson. **Journal of Ethnopharmacology**, **96**:87-91, 2005.
- NIELSEN, K.; BOSTON, R.S., Ribosome-inactivating proteins: A plant perspective. **Annual Review Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, **52**:785-816, 2001.
- NOGUERA, B.; DÍAZ, E.; GARCÍA, M.V.; FELICIANO, A. S.; LÓPEZ-PEREZ, J.L.; ISRAEL, A., Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, **92**:129-133, 2004.
- NOGUEIRA, N.A.P., **Purificação e caracterização biológica da lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* (rConBr) produzida em *Escherichia coli***, Tese de Doutorado

apresentada ao Curso de Doutorado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 95pp., Fortaleza, 1999.

NOWELL, P.C., *Phytohemagglutinins: on iniciator of mitosis in culture of normal and human leucocytes*. **Cancer Res.** **20**:462-466, 1960. Citado por Moreira, 1998.

OKPALA, I., The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red cell disorder. **Blood Reviews**, **18**:65-73, 2004.

OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A., Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. **Rev. Bras. Bot.**, **14**:61-66, 1991.

OLIVEIRA, J.T.A.; MELO, V.M.M.; CÂMARA, M.F.L.; VASCONCELOS, I.M.; BELTRAMINI, L.M.; MACHADO, O.L.T.; GOMES, V.M.; PEREIRA, S.P.; FERNANDES, C.F.; NUNES, E.P.; CAPISTRANO, G.G.G.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, **61**: 301-310; 2002.

OLSNES, S., KOZLOV, J.V., Ricin. **Toxicon**, **39**:1723-1728, 2001.

PARIKH, I., CUATRECASAS, P., Affinity chromatography: Chemical and Engineering News. 63(64) pages 17-29,1985.

PARK, R.; KIM, M.S.; SO, H.S.; JUNG, B.H.; MOON, S.R.; CHUNG, S.Y.; KO, C.B.; KIM, B.R.; CHUNG, H.T., Activation of of *c-jun* N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Biochem. Pharmacol.**, **60**:1685-1691, 2000.

PASQUA, G.; AVATO, P.; MONACELLI, B.; SANTAMARIA, A. R.; ARGENTIERI, M. P., Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. **Plant Science**, **165**:977-982, 2003.

PÉREZ, G. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, **30**:843-853, 1998.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E. J. M., Lectin as plant defence proteins. **Plant Physiology**, **109**:347-352, 1995.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E. J. M., The role of lectins in plant defence. **Histochemical Journal**, **27**:253-271, 1995.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E. J. M.; PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S., Handbook of Plant Lectin: Properties and Biomedical Applications; John Wiley & Sons, USA , 1997.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E. J. M., Plant Lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, **33**:209-258, 1998.

PEUMANS, W.J.; HAUSE, B.; VAN DAMME, E.J.M., The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. **FEBS Letters**, **477**:186-192, 2000.

PISTOLE, T. G., Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances. **Annual Review Microbiology**, **35**:85-112, 1981.

POPOV, S.V.; POPOVA, G.Y.; OVODOVA, R.G.; BUSHNEVA, O.A.; OVODOV, Y.S., Effects of polysaccharides from *Silene vulgaris* on phagocytes. **International Journal of Immunopharmacology**, **21**:617-624, 1999.

PUSZTAI, A.; STEWART, J.C., Isolectins of *Phaseolus vulgaris*. Physicochemical studies. **Biochim. Biophys. Acta**, **536**:38-49, 1978.

PUSZTAI, A.; EWEN, S. W. B.; GRANT, G.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; RUBIO, L.; BARDOCZ, S., Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. **Digestion**. **46**:308-316, 1990.

PUSZTAI, A., Plants lectins. Cambbridge University Press: Cambridge, 1991. 263pp.

RABINOVICH, G.A.; BAUM, L.G.; TINARI, N.; PAGANELLI, R.; NATOLI, C.; LIU, F.T.; IACOBELLI, S., Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response. **Trends Immunol.**, **23**:313-320, 2002. Citado por Brando-Lima *et al.*, 2005.

RABINOVICH, G.A., BIANCO, G. A., TOSCANO, M.A., ILARREGUI, J. M., Impact of protein-glycan interactions in the regulation of autoimmunity and chronic inflammation. **Autoimmunity Reviews**, **5**:349-356, 2006.

RAHMAN, M.A.; KARSANI, S.A; OTHMAN, I.; RAHMAN, P.S.A.;HASHIM, O.H, Galactose-binding lectin from the seeds of champedak (*Artocarpus integer*): sequences of

- its subunits and interactions with human serum O-glycosylated glycoproteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **295**:1007-1013, 2002.
- RAIKHEL, N. V.; LERNER, D. R., Expression and regulation of lectin genes in cereals and rice, **Dev. Genet.**, **12**:255-260, 1991.
- RAMOS, M.V.; MOTA, D.M.; TEIXEIRA, C.R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A., Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds **Toxicon**, **36 (3)**: 477-484, 1998.
- RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; MAZARD, A.; ROUGÉ, P. Interaction of Diocleinae lectins with Glycoproteins based in surface plasmon resonance, **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, **97**, 275-279, 2002.
- RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., Farmacologia. 4^a Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
- REGO, E.J.; CARVALHO., D.D, MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., NOVELLO, J.C., Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**. **60**:441-446, 2002.
- REYNOSO-CAMACHO, R., GONZÁLEZ DE MEJIA, E., LOARCA-PIÑA, G., Purification and acute toxicity of a lectin extracted from therapy bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicology**, **41**:21-27, 2003.
- ROCHA, C.R., **Indução da migração de neutrófilos polimorfonucleares para a cavidade peritoneal de ratos por frutalina – lectina D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* (fruta-pão)**. Monografia (Trabalho de conclusão de Curso de Farmácia), Universidade de Fortaleza, 2003.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D., **Imunologia.**, São Paulo: Manole, 1999.
- ROSEMBERG, I.; CHERAYIL, B.J.; ISSELBACHER, K.J.; PILLAI, S., Mac-2 binding glycoproteins. **Journal of Biological Chemistry.**, **266**:18731-18736, 1991. Citado por Benjamin *et al.*, 1997.
- ROTELLI, A.E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A.O.; ROCHA, N.E.; PELZER, L.E., Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, **48**:601-606, 2003.

ROTH, R.A.; LUYENDYK, J.P.; MADDOX, J.F.; GANEY, P.E., Inflammation and drug idiosyncrasy – is there a connection? **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **307**:1-8, 2003.

RUDIGER, H.; SCHERCHER The protein body membrane of soybean seeds as a possible lectin-binding component. In: Van Driessche E, Franz H, Beeckmans S, Pfuller U, Kallikorm A, Bog-Hansen TC (eds) *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* v. 8, pp.101-104. Textop, Hellerup (Denmark), 1993, citado por Ramos, 1998.

RÜDIGER, H.; Plants lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica**, **161**:130–152, 1998.

RÜDIGER, H., GABIUS, H.J., Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj. J.**, **18**:589-613, 2001.

RUSSEL, C. S., RODRIGUES, J., LAI, P.S., Hemagglutinin activity in *Nereis* coelomic fluid. **Comp. Biochem, Physiol.** **75(A)**:57, 1983.

SAKAMOTO, M., DIAS-BARUFFI, M., SANTOS-OLIVEIRA, R., CUNHA, F. Q., ROQUE-BARREIRA, M. C., An intravascular chemoattractant lectin inhibits neutrophil migration glycoconjugate Journal. **15(5)**: 527-529. **J. In press**, 1996.

SALES, P.V.P., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A., CAVADA, B.S., Isolation and characterization of a lectin from *Vatairea macrocarpa* Duke seeds. **Arq. Biol. Tecnol.**, **32(1)**:151-, 1989

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.; BELTRAMINI, L. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C., A Neutrophil Migration-Inducing Lectin from *Artocarpus integrifolia*. **The Journal of Immunology**, **153**: 1798-1807, 1994.

SANTORO, L.G.; GRANT, G.; PUSZTAI, A., Effects of short-term feeding of rats with a highly purified phaseolin preparation. **Plant Foods for Human Nutrition**, **51**:61-70, 1997.

SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; RUBINSTEIN N.; MENCARELLI, A.; PALAZETTI, B.; FEDERICI, B.; *et al.*, Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. **Hepatology**, **31**:399-406, 2000. Citado por RABINOVICH, *et al.* 2006.

- SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; RUBINSTEIN N.; MENCARELLI, A.; PALAZETTI, B.; FEDERICI, B.; RABINOVICH, G.A; MORELLI, A, Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, **124(5)**1381-1394,2003.
- SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANJEIRO, 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 proprieties from Concanavalina A., **FEBS Letters**, **405**:114-118, 1997.
- SATO, A.; BARCELLOS, G. B. S.; RIEDEL, E. C.; CARNEIRO, J. A.; CARLINI, C. R.; ESQUIBEL, M. A., The presence of concanavalin A and canatoxin in *Canavalia ensiformis* DC tissue culture, **Plant Cell Reports**, **12**:233-236, 1993.
- SCHWARTZ, R.E.; WOJCIECHOWICZ, D.C.; PICON, A.I.; SCHWARZ, M.A.; PATY, P.B., Wheat germ agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells. **British Journal of cancer**, **80**:1754-1762, 1999.
- SELLOUM, L.; BOURICHE, H.; TIGRINE, C.; BOUDOUKHA, C., Antiinflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. **Exp Toxic Pathol**, **54**:313-318, 2003.
- SEQUEIRA, L., Lectins and their role in host-pathogen specificity. **Ann. Rev. Phytopathol**, **16**:453-481, 1978.
- SHANGARY, S.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.S.; KAMBOJ, K.K.; SANDHU, R.S. Purification and properties of four monocot lectins from family *Araceae*. **Phytochemistry** **40**:449-455, 1995.
- SHARON, N.; LIS, H., **Lectins**. London: Chapman and Hall, 126pp.,1989.
- SHARON, N.; LIS, H., Lectins – proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochem.**, **30**:59-75, 1995.
- SHARON, N., LIS, H., History of lectins: from hemagglutinins to biological recongnition molecules. **Glycobiology**, **14(11)**:53-62, 2004.
- SCHERCHER, G.; RUDIGER, H. Interaction of the soybean (*Glycine max*) seed lectin with components of the soybean protein body membrane. **Biological Chemistry** **375**, 829-232, 1994.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T., Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, **18(3)**:385-405, 2004.

SILVA, A.L.C., **Indução e caracterização bioquímica da calogênese *in vitro* de *Glycine wightii* (Wight & Arn.) Verdc.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 72pp., Fortaleza, 2000.

SILVA, A.L.C.; HORTA, A.C.G.; MOREIRA, R.A., Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. Ex. Steua. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, **13(3)**: 262-269, 2001.

SILVA, F.M.B.; MOREIRA, R.A.; HORTA, A.C.G.; SILVA, A.L.C., The Lectin Content of Cotyledonary Callus from *Canavalia brasiliensis* (Mart. ex. Benth). **Asian Journal of Plant Sciences**, **4(3)**:214-219, 2005.

SILVA JUNIOR, J.G., **Eletroforese de proteínas: guia teórico e prático.** Interciência, 125p. Rio de Janeiro, 2001.

SINGH, R.S., TIWARY, A.K., KENNEDY, J.F., Lectins: Sources, activities, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, **19(2)**:145-178, 1999.

SKERMAN, P.J., Tropical forage legumes. **FAO Plant Production and Protection Series** n^o2, FAO, Rome. <www.nsrl.uiuc.edu/aboutsoy/history_introNA.html> Acesso 08/07/2005.

STEWART, M. L., SUMMERS, D. F., SOEIRO, R. FIELDS, B. N., MAIZEL, J. V., Purification of oncornovirus by agglutination with concanavalin A. **Jr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. **70**: 1308-1312, 1973. Citado por Almeida-Silva, 1986.

STILLMARK, H., **Über Ricin ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiacees.** Inaugural Dissertation Dorpat (Tartu). Citado por Loris, *et al.*, 1998.

SUSEELAN, K.N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K.B.; KRISHNA, T.G., Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. **407**:241-247. 2002.

SWAIN, L. J.; EBRAHIMI, S. A.; ROGERS, D. J., Quantitative determination of haemagglutinating activity of lectins. In: Van DRIESSCHE, E.; ROUGE, P.;

BEECKMANS, S.; BOG-HANSEN, T.C. Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, **11**: 112-118, 1996.

TAVARES, R. A., **Galactomanana de *Adenantha pavonina* L. aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas**. Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 85pp., Fortaleza, 1998.

TAVARES, R.A., **Sementes de *Dioclea Sclerocarpa* Ducke: Um sistema endógeno lectina-recetor**. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 117pp., Fortaleza, 2002.

TEDDER, T.F.; STEEBER, D.A.; CHEN, A.; ENGEL, P., The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB Journal**. **9**:866-873, 1995.

TEIXEIRA, D.M.A., **Goma exsudada de *Spondias purpurea* uma nova matriz para o isolamento de lectinas galactose ligantes**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 80pp., Fortaleza, 2001.

THANGAM, C.; DHANANJAYAN, R., Antiinflammatory potential of the seeds of *Carum copticum* Linn. **Indian Journal of Pharmacology**, **35**:388-391, 2003.

TOKER, G., M.; MEMISOGLU, M.; TOKER, M.C.; YESILADA, E., Callus formation and cucurbitacin B accumulation in *Ecballium elaterium* callus culture. **Fitoterapia**, **74**:618-623, 2003.

TORAÑO, J.S., VERBON, A., GUCHELAR, H.J., Quantitative determination of thalidomide in human serum with high-performance liquid chromatography using protein precipitation with trichloroacetic acid ultraviolet detection. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.**, **734**:203-210, 1999.

TRIGUEROS, V.; LOUGARREA, A.; ALI-AHMEDA, D.; RAHBE, Y.; GUILLOT, J.; CHAVANTA, L.; FOURNIERA, D.; PAQUEREAU, L., *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1621**:292– 298; 2003.

UENO, A.; NARABA, H.; IKEDA, Y.; USHIKUBI, F.; MURATA, T.; NARUMIYA, S., OHISHI, S., Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin: a study on the paw edema-induced in ip-receptor-deficient mice. **Life Science**, **66**:155-160, 2000.

UNDERWOOD, J.C.E., General and systematic pathology. 3rd ed. Churchill Livingstone, p.201, 2000. Citado por THANGAM, C.; DHANANJAYAN, R.; 2003.

VAN DAMME, E. J. M.; BRIKÉ, F.; WINTER, H. C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I.J., PEUMANS, W. J., Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from ulip bulbs. **Eur. J. Biochem.**, **236**:419-427, 1996(a). Citado por PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E. J. M., 1998.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W.J., PUSZTAI, A., BARDCZ, S., Handbook of **Plant Lectins: Properties and Biochemical Application**. John Wiley & Sons, Chichester, UK. Citado por VAN DAMME, E. J. M., 1998.

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

VASCONCELOS, I.M.; MAIA, A.A.B.; SIEBRA, E.A.; OLIVEIRA, J. T.A., CARVALHO, A.F.F.U.; MELO, V.M.M.; CARLINI, C. R.; CASTELAR, L.I.M., Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**. **12**: 55-62, 2001.

VASCONCELOS, I. M., TRENTIM, A., GUIMARÃES, J. A., CARLINI, C. R., Purification and Physicochemical Characterization of Soyatoxin, a Novel Toxin Protein Isolated from Soybeans (*Glycine max*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **312**(2):357-366, 1994.

VILLAFRANCA, J.E., ROBERTUS, J.D., Ricin B chain is a product of gene duplication. **J. Biol. Chem.**, **252**(2):554-556, 1981.

VILLALOBO, A., GABIUS, H.J., Signalin pathway for transduction of the initial message of the glycode into cellular responses. **Acta Anat.**, **161**:110-129, 1998.

VISWANATHAN, M.B., THANGADURAI, D., RAMESH, N., Biochemical and nutritional evaluation of *Neonotonia wightii* (Wight & Arn.) Lackey (Fabaceae). **Food Chemistry**, **75**:275-279, 2001.

WALLACE, B.A., JANES, R.W., **Curr. Opin. Chem. Biol.**, **5**:567, 2001.

WAH, D. A., Romero, A., Sol, F. Gallego Del, Cavada, B.S., Ramos, M. V., Grangeiro. T. B., Sampaio, A. H. & Calvete, J.J. () Crystal Structure of Native and Cd/Cd-substituted *Sioclea guianensis* Seed Lectin, A novel Manganese-binding Site and Structural Basis of Simer-tetramer Association. **J. mol. Biol.**, **310**:885-894, 2001.

WENZEL, M.; RUDIGER, H. Interaction of pea (*Pisum sativum*) lectin with pea storage proteins. **Journal of Plant Physiology** **145**, 191-194, 1995.

WHITEMAN, P.C., Tropical pasture science. **Oxford University Press**, Oxford, 1980. In: www.nsrl.uiuc.edu/aboutsoy/history_introNA.html >Em 08/07/2005.

WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUSS, G.W., Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, **111**:544, 1962. In: Neto *et. al.*, 2005.

WORDLICZEC, J., SZCZEPANIK, A.M., BANACH, M., TURCHAN, J., ZEMBALA, M., SIEDLAR, M., PRZEWLOCKI, R., SEREDNICKI, W., PRZEWLOCKA, B., The effect of pentoxifiline on post-injury hyperalgesia in rats and postoperative pain in patients. **Life Science**. **66(12)**:1155-116, 2000.

WU, A.M., SUGII, S., HERP, A., A guide for carbohydrate specificities of lectins. In: Wu, 1988.

WU, A.M., ed. The Molecular Immunology of Complex Carbohydrate, Plenum Publishing Co., New York, 819-847, 1988.

YAMAMOTO, K., TSUJI, T., OSAWA, T., Analysis of asparagine-linked oligosaccharides by sequential lectin-affinity chromatography. **Methods Mol. Biol.**, **76**:35-51, 1998.

YANG, H., CZAPLA, T. H., Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins. **J. Biol. Chem.**, **268**:5905-5910, 1993.

YEASMIN, T., TANG, M. A. K., RAZZAQUE, A., ABSAR, N., Purification and characterization of three galactose specific lectins from Mulberry seeds (*Morus* sp.). **Eur. J. Biochem.**, **268**:6005-6010, 2001.

YU, L., FERNIG, N.G., SMITH, J.A., MILTON, J.D., RHODES, J.M., Reversible inhibition of proliferation of epithelial cells lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin, **Cancer Res.**, **53**:4627-4632, 1993. *In: Bains et al.*, 2005.

ZHU, K., HUESING, J. E., SHADE, R. E., BRESSAN, R. A., HASEGAWA, P. M., MURDOCK, L. L., An insecticidal N-Acetylglucosamine-specific lectin from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae). **Plant Physiol.**, **110**:195-202, 1996. *In: Oliveira et al.*, 2002.