

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

HÉVILA OLIVEIRA SALLES

**Papel da lectina de folhas de *Ipomoea asarifolia*
R. et Schult. na toxicidade a animais e seu
envolvimento no mecanismo de defesa da planta**

FORTALEZA
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**Papel da lectina de folhas de *Ipomoea asarifolia*
R. et Schult. na toxicidade a animais e seu
envolvimento no mecanismo de defesa da planta**

HÉVILA OLIVEIRA SALLES

Tese submetida à Coordenação
do Programa de Pós-graduação
em Bioquímica, da Universidade
Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do
grau de Doutor em Bioquímica.

**FORTALEZA
2008**

HÉVILA OLIVEIRA SALLES

**PAPEL DA LECTINA DE FOLHAS DE *Ipomoea asarifolia*
R. *et* SCHULT. NA TOXICIDADE A ANIMAIS E SEU
ENVOLVIMENTO NO MECANISMO DE DEFESA DA
PLANTA**

**Tese submetida à Coordenação
do Programa de Pós-graduação
em Bioquímica, da Universidade
Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do
grau de Doutor em Bioquímica.**

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

**FORTALEZA
2008**

S164p

Salles, Hévila Oliveira

Papel da lectina de folhas de *Ipomoea asarifolia* R. et Schult. na toxicidade a animais e seu envolvimento no mecanismo de defesa da planta / Hévila Oliveira Salles , 2008.

129 f. ;il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências.
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2008.

1.Plantas tóxicas 2. *Ipomoea asarifolia* 3. Lectina 4. Mecanismo de defesa de plantas I. Oliveira, José Tadeu Abreu de (orient.) II.Universidade Federal do Ceará – Curso de Pós-graduação em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

HÉVILA OLIVEIRA SALLES

PAPEL DA LECTINA DE FOLHAS DE *Ipomoea asarifolia* R. et SCHULT. NA
TOXICIDADE A ANIMAIS E SEU ENVOLVIMENTO NO MECANISMO DE
DEFESA DA PLANTA

Tese submetida à Coordenação do
Programa de Pós-graduação em
Bioquímica, da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em
Bioquímica.

Aprovada em 29/02/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Depto. Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro
Depto. Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
Universidade Estadual do Ceará

Dr. Antônio Sílvio do Egito
Embrapa Caprinos

À **Deus**, pelo amor incondicional,
disponibilizando-me soluções nas
etapas mais difíceis.

Aos **meus pais, Maria Aurineide
Sales e Japhet Castro Salles**, pelos
ensinamentos e apoio.

Ao **meu esposo, Carlos Henrique
Rodrigues Figueiredo**, pelo amor e,
em especial, pela paciência e
compreensão de meus anseios
profissionais.

E aos meus mais valiosos tesouros,
**Meus filhos, Hugo Salles Figueiredo
e Carla Salles Figueiredo**, pela
inocência e alegria de viver.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira** pela oportunidade, orientação, confiança e amizade.

À **Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos** e seus orientandos pelo apoio, amizade e valiosa colaboração.

À **Dra. Lúcia de Fátima Lopes dos Santos**, da Universidade Estadual do Ceará, pelo desprendimento em me repassar seus conhecimentos, pela ajuda nos contatos e amizade.

Ao **Dr. Aurino Alves Simplicio**, da Embrapa Caprinos, pelos ensinamentos e incentivos sempre presentes nas etapas de minha vida profissional.

À **Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro**, da Universidade Federal do Ceará, e ao **Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento**, da Universidade Estadual do Ceará, por terem aberto as portas de seus laboratórios para execução desse trabalho e pela disponibilidade e sugestões.

Ao **Dr. Antônio Sílvio do Egito**, da Embrapa Caprinos, pelas palavras amigas e pela disponibilidade em aceitar participar da avaliação desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas**, da Universidade Estadual do Ceará, pela colaboração.

À **Dra. Sumika Kiyota**, do Instituto Biológico de São Paulo, e ao **Dr. Marcelo Porto Bemquerer**, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por terem dedicado seu tempo e repassado sua experiência.

Ao **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará**, pela oportunidade de ingressar no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pelos valiosos ensinamentos e acolhida.

Ao **Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** pela liberação e apoio para a realização do curso.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro.

A todos os **estudantes de pós-graduação, bolsistas e estagiários** do Laboratório de Proteínas de Defesa Vegetal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC pelo companheirismo, amizade, estímulo constante e pelo convívio alegre.

A todos os **estudantes de pós-graduação, bolsistas e estagiários** do Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Ceará (UECE) e do Centro Nordestino de Aplicação e uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará pela acolhida, carinho, solidariedade e auxílio na execução desse trabalho.

Às amigas **Lúcia Betânia da Silva Andrade e Darcy Mayra Furtado Gondim** pelo carinho e preciosa amizade.

MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELA

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 - INTRODUÇÃO	16
2 - HIPÓTESE	18
3 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1 - A biodiversidade como fonte de moléculas bioativas	21
3.2 - Plantas invasoras	22
3.3 - Plantas tóxicas para animais	23
3.4 - <i>Ipomoea asarifolia</i>	25
3.5 - Compostos tóxicos presentes nos vegetais	29
3.6 - O mecanismo de defesa das plantas	30
3.7 - Lectinas	32
3.7.1 - Definição e classificação	32
3.7.2 - Papel fisiológico nas plantas e aplicações das lectinas	33
3.7.3 - Interação de lectinas com ovócitos	34
3.7.3.1 - Glicoconjugados de membranas com os quais as lectinas podem interagir	34
3.7.3.2 - A interação de lectinas com a zona pelúcida	36
4 – OBJETIVOS	39
4.1 – Objetivo Geral	40
4.2 – Objetivos Específicos	40
5 - MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 - LOCAL DE EXECUÇÃO	42
5.2 - MATERIAIS	42
5.2.1 - Folhas	42
5.2.2 - Animais Experimentais	42
5.2.3 - Reagentes	43
5.3 - MÉTODOS	45
5.3.1 - Preparação das folhas de <i>Ipomoea asarifolia</i>	45

5.3.2 - Preparação da farinha	45
5.3.3 - Extração de proteínas	45
5.3.4 - Fracionamento de proteínas com sulfato de amônio	46
5.3.5 - Dosagem de proteína	46
5.3.6 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose	46
5.3.7 - Cromatografias de afinidade	47
5.3.8 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100	48
5.3.9 - Cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 acoplada a FPLC	48
5.3.10 - Cromatografia hidrofóbica em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast Flow	48
5.3.11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida	49
5.3.12 - Atividade hemaglutinante	49
5.3.13 - Estabilidade térmica	50
5.3.14 - Determinação da especificidade lectínica	50
5.3.15 - Determinação da dependência de cálcio e manganês para atividade hemaglutinante	51
5.3.16 - Determinação do efeito do ditioneitol (DTT) na atividade hemaglutinante	51
5.3.17 - Análise de compostos secundários na fração protéica rica em lectina	51
5.3.18 - Digestibilidade <i>in vitro</i>	52
5.3.18.1 - Digestão por pepsina	52
5.3.18.2 - Digestão por tripsina e quimotripsina	52
5.3.19 - Digestibilidade <i>in vitro</i> de forma seqüencial	52
5.3.20 - Avaliação da digestibilidade por eletroforese em gel de poliacrilamida	53
5.3.21 - Preparo e purificação de anticorpos contra esporamina	54
5.3.22 - <i>Western Blot</i>	54
5.3.23 - Determinação da seqüência de aminoácidos <i>N</i> -terminal	55
5.3.24 - Atividades biológicas da fração rica em lectina	56
5.3.24.1 - Avaliação da toxicidade aguda após administração pela via intra-orbital	56
5.3.24.2 - Bioatividade em canal deferente de camundongos	56
5.3.24.3 - Bioatividade em rim isolado de ratos	57
5.3.25 - Marcação das proteínas da fração rica em lectina com FITC	60
5.3.26 - Marcação da zona pelúcida com proteínas da fração rica em lectina conjugadas ao FITC	61

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
6.1 - Protocolo de purificação da lectina de <i>I. asarifolia</i> estabelecido por Santos (2001)	63
6.2 - Despigmentação das folhas de <i>I.asarifolia</i> antes da extração	64
6.3 - Redução na concentração do NaCl no tampão de eluição da DEAE-celulose	64
6.4 - Avaliação do perfil eletroforético e hemaglutinante de amostras submetidas a diferentes colunas cromatográficas	68
6.5 - Indução da expressão da lectina mediante aplicação foliar de ácido jasmônico ou injúria mecânica	79
6.6 - Especificidade lectínica	83
6.7 - Reestruturação do protocolo de isolamento da FPRL	85
6.8 - Efeito tóxico da <i>I. asarifolia</i>	87
6.9 - Digestibilidade <i>in vitro</i> da FPRL	95
6.10 - Estabilidade térmica e necessidade de metais e DTT para a atividade hemaglutinante da FPRL	99
6.11 - Eletro-transferência e seqüenciamento das bandas protéicas presentes na FPRL	102
6.12 - Capacidade do anticorpo contra esporamina de reconhecer as lectinas de <i>I. asarifolia</i>	103
6.13 - Prospecção biotecnológica da lectina de <i>I. asarifolia</i>	105
7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
8 - CONCLUSÃO	114
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – *Ipomoea asarifolia* (salsa) 27
- FIGURA 2** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS, de amostra de extrato bruto oriunda de folhas despigmentadas de *Ipomoea asarifolia*. 65
- FIGURA 3** - Cromatografia em DEAE-celulose da F_{0-30%} oriunda do extrato protéico de folhas não despigmentadas de *Ipomoea asarifolia* eluída com 200, 400 e 600 mM de NaCl em tampão de equilíbrio. 67
- FIGURA 4** - Cromatografia em DEAE-celulose da F_{0-30%} oriunda do extrato protéico de folhas não despigmentadas de *Ipomoea asarifolia* eluída com 50 e 100 mM de NaCl em tampão de equilíbrio. 67
- FIGURA 5** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS de amostra obtida em coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, aplicada em cromatografias de afinidade. 69
- FIGURA 6** - Eletroforese em gel de poliacrinamida (20,0%) na presença de SDS de amostra obtida em coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, aplicada na coluna de goma de guar. 70
- FIGURA 7** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS de amostra obtida em DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, aplicada em coluna de Sepharose 4B-ConA/ConBr. 72
- FIGURA 8** - Cromatografia em coluna de Sepharose 4B-fetuína de amostra obtida a partir de coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. 73
- FIGURA 9** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS de pico retido em coluna de Sepharose 4B-fetuína. 73
- FIGURA 10** - Cromatografia em coluna de exclusão molecular Sephadex G-100 de amostra obtida em coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. 75
- FIGURA 11** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS de picos obtidos de cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-100. 75
- FIGURA 12** - Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12 de amostra obtida em coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. 77
- FIGURA 13** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS de amostra aplicada em coluna de exclusão molecular Superose 12. 77
- FIGURA 14** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%) na presença de SDS de amostra obtida em coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, aplicada em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast Flow 78
- FIGURA 15** - Atividade hemaglutinante específica (UH/mg de proteína) em extratos de folhas de *I. asarifolia* cultivadas a 25°C, no escuro, injuriadas ou não. 80

FIGURA 16 - Atividade hemaglutinante específica (UH/mg de proteína) em extratos de folhas de <i>I. asarifolia</i> cultivadas a 25°C, no escuro, tratadas ou não com ácido jasmônico.	80
FIGURA 17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%) na presença de SDS de amostras do grupo controle e de amostras do grupo injúria 72 h, no escuro, obtidas em coluna de DEAE-celulose.	82
FIGURA 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%) na presença de SDS de amostras do grupo controle e de amostras do grupo injúria 72 h, no escuro, obtidas em coluna de Phenyl Sepharose.	82
FIGURA 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS, de amostra de extrato bruto, das Frações 0-30%, 30-60% e 60-90%, dos picos de DEAE-celulose das Frações 0-30%, 30-60% e 60-90% eluídos com 200 mM de NaCl em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e do sobrenadante após a Fração 60-90%.	84
FIGURA 20 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, de amostra obtida em coluna de Phenyl Sepharose utilizada nos ensaios biológicos.	86
FIGURA 21 - Efeito da FPRL e do extrato bruto de <i>I. asarifolia</i> na contração neurogênica em músculo do canal deferente de camundongos.	89
FIGURA 22 - Pressão de perfusão (mmHg) de rins perfundidos com 10 µg/mL de FPRL de <i>I. asarifolia</i> .	92
FIGURA 23 - Resistência vascular renal – RVR (mmHg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rins perfundidos com 10 µg/mL de FPRL de <i>I. asarifolia</i> .	92
FIGURA 24 - Fluxo urinário – FU (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rins perfundidos com 10 µg/mL de FPRL de <i>I. asarifolia</i> .	92
FIGURA 25 - Ritmo de filtração glomerular - RFG (/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rins perfundidos com 10 µg/mL de FPRL de <i>I. asarifolia</i> .	93
FIGURA 26 - Percentual de transporte tubular de sódio (%TNa ⁺) em rins perfundidos com 10 µg/mL de FPRL de <i>I. asarifolia</i> .	93
FIGURA 27 - Percentual de transporte tubular de potássio (%TK ⁺) em rins perfundidos com 10 µg/mL de FPRL de <i>I. asarifolia</i> .	93
FIGURA 28 - Percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl ⁻) em rins perfundidos com 10 µg/mL de FPRL de <i>I. asarifolia</i> .	94
FIGURA 29 - Clearance osmótico- Cosm (mL.g ⁻¹ .min ⁻¹) em rins perfundidos com 10 µg/mL de FPRL de <i>I. asarifolia</i> .	94
FIGURA 30 - Corte histológico de rim de rato perfundido ou não com a FPRL.	94
FIGURA 31 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, da albumina sérica bovina (BSA) e da fração protéica rica em lectina (FPRL) de <i>I. asarifolia</i> submetida a diferentes tempos de tratamento enzimático com pepsina.	96
FIGURA 32 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, da albumina sérica bovina (BSA) e da fração protéica rica em lectina (FPRL) de <i>I. asarifolia</i> submetida a diferentes tempos de tratamento enzimático com tripsina.	96

- FIGURA 33** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, da albumina sérica bovina (BSA) e da fração protéica rica em lectina (FPRL) de *I. asarifolia* submetida a diferentes tempos de tratamento enzimático com quimotripsina. **98**
- FIGURA 34** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, da albumina sérica bovina (BSA) e da fração protéica rica em lectina (FPRL) de *I. asarifolia* submetida a tratamento enzimático seqüencial com pepsina, tripsina e quimotripsina. **98**
- FIGURA 35** - Atividade hemaglutinante residual (UH/mL) na FPRL submetida a diferentes temperaturas e intervalos de tempo **101**
- FIGURA 36** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, de amostra de pico obtido em DEAE-celulose eluído com 200 mM de NaCl em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e de picos retidos e não retido em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast flow, todos acrescidos com 5 mM de DTT. **101**
- FIGURA 37** - *Western blot* contra anticorpo de esporamina de *I. batatas*, revelado com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho, conjugado à fosfatase alcalina. **104**
- FIGURA 38** - Análise à luz visível e sob luz de fluorescência de ovócito imaturo com zona pelúcida (ZP) rompida, após marcação com lectinas de *I. asarifolia* conjugadas a FITC. **107**

LISTA DE TABELA

TABELA 1 – Atividade específica e rendimento das cromatografias de afinidade

72

LISTA DE ABREVIATURAS

AJ	Ácido jasmônico
BCIP/NDT	5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato e azul de nitrotetrazólio
CENAUREMN	Centro Nordeste de Aplicação e uso da Ressonância Magnética Nuclear
CNBr	Brometo de cianogênio
Con A	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
Con Br	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
D₂O	Água deuterizada
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FPRL	Fração protéica rica em lectina
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gauld
¹H	Hidrogênio comum
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IgG	Imunoglobulina G
kDa	Kilo Dalton
LAFAVET	Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas
LMW	Low molecular weight
MHz	Megahertz
mmHg	Milímetro de mercúrio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato de sódio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PVDF	Polyvinylidene difluoride
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RMN	Ressonância magnética nuclear
RIP	Proteína inativadora de ribossomos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris hidroximetil-aminometano
UH	Unidade de hemaglutinação
UI	Unidade internacional
ZP	Zona pelúcida
μE.m⁻².s⁻¹	Micro Einstein por metro quadrado por segundo

RESUMO

PAPEL DA LECTINA DE FOLHAS DE *Ipomoea asarifolia* R. et SCHULT. NA TOXICIDADE A ANIMAIS E SEU ENVOLVIMENTO NO MECANISMO DE DEFESA DA PLANTA. Doutoranda: Hévila Oliveira Salles. Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira. Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. 2008.

Ipomoea asarifolia R. et Schult (salsa) é uma planta tóxica da família Convolvulaceae, arbustiva, de crescimento rápido, amplamente distribuída no Brasil. O presente estudo foi conduzido de forma a se obter uma fração protéica rica em lectina (FPRL) a ser utilizada em ensaios biológicos. Várias estratégias foram testadas. No melhor protocolo, as folhas de *Ipomoea asarifolia* foram coletadas, lavadas, secadas, mecanicamente injuriadas (6 mm de diâmetro) e mantidas em câmara a 25 °C (± 3 °C), no escuro, sob atmosfera úmida, por 72 h. As proteínas das folhas foram extraídas em 25 mM Tris-HCl (1:3, m/v), pH 7,5, contendo 3% de PVPP e 5 mM de ácido ascórbico, sob agitação, por 2 h a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em pano de nylon e centrifugado a 10000 g, por 30 min, a 4 °C. O extrato foi fracionado com sulfato de amônio na faixa de 0-30%, diálisado, submetido à cromatografia em coluna de DEAE-celulose e, após nova diálise, à cromatografia em coluna de Phenyl Sepharose 6-Fast Flow. A fração obtida foi denominada de FPRL. Os achados mostraram a existência de duas proteínas com atividade hemaglutinante nas folhas de *I. asarifolia*. Uma proteína de 44 kDa, que apresentou 65% de identidade da região N-terminal (AVNLPAGHLSPPGGVGNYYVTVGLCTP) com uma proteína de ligação ao DNA de nucleóide de cloroplasto de *Nicotiana tabacum*, e uma outra proteína de 20,1 kDa, que apresentou 72% de identidade da região N-terminal (AGYTPVLDIGAEVLAAGEPY) com a esporamina, uma proteína de tubérculo de *I. batatas*. Foi sugerido que a primeira proteína seja expressa constitutivamente e que a segunda seja induzida após injúria. Com base na reatividade imunológica, foi observado que a proteína de 44 kDa também apresenta similaridade com a esporamina. Os efeitos observados nos ensaios de toxicidade aguda após injeção intra-orbital em camundongos, de perfusão renal em ratos e de junção neuromuscular autonômica em camundongos foram atribuídos à lectina de 44 kDa que se apresentou em maior concentração na FPRL usada nos ensaios. As lectinas contidas na FPRL perderam sua atividade hemaglutinante após aquecimento a 90 °C, por 10 min, e após diálise contra 5 mM de EDTA e EGTA. Marcação das lectinas com FITC permitiu observar sua ligação à zona pelúcida de ovócito de caprino sugerindo que as mesmas possam ser usadas como marcador de sua integridade. A FPRL não apresentou contaminação por metabólitos secundários. Os achados obtidos indicam a forte participação da lectina no mecanismo de defesa e de toxicidade da *I. asarifolia*.

Palavras-chave: Plantas tóxicas; *Ipomoea asarifolia*; Lectina; Mecanismo de Defesa de Plantas; Ácido Jasmônico; Injúria mecânica.

ABSTRACT

INVOLVEMENT OF *Ipomoea asarifolia* R. et SCHULT. LEAVES LECTIN IN ANIMAL TOXICITY AND IN PLANT DEFENSE MECHANISM. Doctor of Sciences: Hévila Oliveira Salles. Professor: Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira. Federal University of Ceará. Post-Graduation Program in Biochemistry. 2008.

Ipomoea asarifolia R. et Schult (common name: salsa) is a tropical plant of the Convolvulaceae family, is a shrubby, quickly growing toxic plant, widely distributed throughout Brazil. The present study was carried out towards the preparation of a lectin-enriched fraction (LEF) which could be used in biologic assays. To obtain LEF devoid of contaminants various purification strategies were tested. As a result of these approaches the excised leaves of *Ipomoea asarifolia* from plants growing in the field were washed with distilled water, mechanically wounded (6 mm - cuttings) and maintained in a chamber at 25 ± 3 °C, in the dark, under near 100% relative humidity., for 72h. The leaf proteins were extracted (1:3, m/v) in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 3% PVPP and 5 mM ascorbic acid, under mechanical stirring, for 2h, at 4 °C. The suspension was filtered through a nylon cloth and centrifuged at 10,000 g, for 30 min, at 4 °C. The crude extract obtained was precipitated to 30% ammonium sulfate, dialyzed, submitted to DEAE-cellulose chromatography, and after new dialysis, loaded on a Phenyl Sepharose 6-Fast Flow column. The fraction obtained was called lectin-enriched fraction (LEF). From this chromatographic step two proteins with hemagglutinating activity were identified in *I. asarifolia* leaves. A 44 kDa protein that has 65% amino-terminal identity (AVNLPAGHLSPGGVGNVVTVGLCTP) with a DNA binding protein from chloroplast nucleoids of *Nicotiana tabacum* and a 20,1 kDa protein that has 72% amino-terminal identity (AGYTPVLDIGAEVLAAGEPY) with sporamin, a tuber protein of *I. batatas*. The 44 kDa protein seems to be constitutively expressed whereas the second one was apparently induced by leaf wounding. With respect to their immunological reactivity, it was found that the 44 kDa protein was also recognized by the antibody raised against sporamin. Nevertheless, the toxic effects of LEF observed after injection in the mouse intra orbital region, rat kidney perfusion and mouse vas deferens stimulation were attributed to the 44 kDa lectin, which was in much higher concentration in this fraction. The toxic lectin-containing LEF lost its haemagglutination activity after heating at 90 °C for 10 min and also after dialysis against 5 mM EDTA or EGTA. The LEF didn't present secondary metabolites. In addition, fluorescent studies showed that the lectin binds to the goat oocyte zona pellucida suggesting that it could be used as an integrity maker of this cell. Altogether the results of the present study strongly suggest that the lectin is involved in the defense mechanism and in the toxic effects of *I. asarifolia*.

Keywords: Toxic plant, *Ipomoea asarifolia*, Lectin, Plant defense mechanism, Jasmonic acid, Mechanical injure.

1 - *INTRODUÇÃO*

A biotecnologia permeia inúmeros segmentos industriais utilizando técnicas inovadoras e promovendo revoluções no tratamento de doenças, no uso de novos medicamentos para aplicação humana e animal, na multiplicação e reprodução de espécies vegetais e animais, no desenvolvimento e melhoria de alimentos, na utilização sustentável da biodiversidade, na recuperação e tratamento de resíduos, dentre outras áreas com potencial crescente de aplicação.

A utilização de agentes de controle biológico e semioquímicos se insere no agronegócio através do controle natural de pragas e doenças de plantas, em substituição ou complementação aos pesticidas químicos no manejo integrado de pragas. Seu uso melhora e aumenta a qualidade do produto agrícola e reduz a poluição do meio ambiente, contribuindo para a preservação dos recursos naturais e aumentando a sustentabilidade dos agroecossistemas.

Diversas plantas são detentoras de características peculiares que as diferenciam das demais por serem mais resistentes às adversidades provocadas por agentes físicos e/ou biológicos, dentre essas destacam-se as plantas invasoras e tóxicas. Desvendar a natureza química dessa resistência pode proporcionar a descoberta de novas moléculas com potencial biotecnológico, seja para uso na própria planta em estudo, ou em outras plantas de interesse comercial ou, ainda, para outras áreas do conhecimento.

Várias moléculas de natureza tóxica vêm sendo testadas como bioferramentas. Como exemplo, podemos citar a toxina do *Bacillus thuringiensis*, a canatoxina de *Canavalia ensiformis*, a ricina de *Ricinus communis*, dentre outras (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002). Essa última, destacando-se por ser uma lectina vegetal.

As lectinas são providas de uma série de propriedades que as tornam ferramentas biotecnológicas amplamente usadas nos mais diversos campos, desde a biologia molecular, bioquímica, histoquímica até na clínica médica e agropecuária.

A *Ipomoea asarifolia* é uma planta perene, invasora de culturas, amplamente distribuída no Brasil e tóxica para animais. Essa atividade tóxica foi sugerida ser devido a uma lectina. Poder avançar no conhecimento e entender o papel fisiológico dessa proteína na planta, bem como reconhecer sua potencialidade como ferramenta auxiliar no estudo de vários sistemas biológicos abre um leque de possibilidades de uso dessa molécula com características tão peculiares.

2 - HIPÓTESE

O efeito tóxico da *Ipomoea asarifolia* está associado a uma ou mais proteínas com atividade hemaglutinante presentes em suas folhas.

3 – *FUNDAMENTAÇÃO*

TEÓRICA

3.1 – A biodiversidade como fonte de moléculas bioativas

A produção de alimentos com a mínima degradação dos recursos naturais é, hoje, uma demanda crescente, com destaque para os produtos portadores de selos que garantem a correta ou a não utilização de agrotóxicos no processo produtivo.

As moléculas de origem natural são consideradas importantes fontes de novos princípios ativos para o controle de pragas agrícolas. O conhecimento de tais substâncias e de sua biossíntese pode possibilitar o desenvolvimento de cultivares resistentes a pragas e patógenos, contribuindo para a diminuição do uso de agrotóxicos.

A produção nacional de grãos em 2007 gerou 133,0 milhões de toneladas, sendo 13,7% maior que a obtida em 2006, que foi de 117,0 milhões de toneladas. A produção de grãos prevista para 2008 é 2,1% maior que a do ano de 2007, ou seja, de 135,7 milhões de toneladas (IBGE, 2008). Embora tenhamos os subsídios e a mão de obra qualificada como entraves para obter e manter essa produção em alta, são os gastos com insumos que mais têm reduzido os lucros no agronegócio brasileiro.

O consumo anual de agrotóxicos no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais. Expresso em quantidade de ingrediente-ativo (i.a.), são consumidas anualmente no país cerca de 130 mil toneladas de agrotóxicos, representando aumento de 700% no consumo nos últimos 40 anos, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse período (SPADOTTO *et al.*, 2004). Além dos perigos aos seres humanos quanto aos aspectos ocupacionais, alimentares e de saúde pública, sabe-se que a introdução de agrotóxicos no ambiente pode provocar efeitos indesejáveis, tendo como consequência mudanças no funcionamento do ecossistema afetado.

E se não bastasse, as plantações ainda estão vulneráveis à invasão de ervas daninhas, as quais competem pelos nutrientes acrescidos ao solo. Essas, por serem mais resistentes aos desafios do campo, se sobressaem frente ao ataque de invasores, dominando as áreas cultivadas caso não sejam controladas. Para evitar e/ou controlar essa invasão, é alta a quantidade usada de herbicida nas plantações, cujos resíduos permanecem nas plantas após serem colhidas, podendo comprometer a saúde de quem as consomem.

O conceito de agricultura sustentável implica na redução da dependência de produtos químicos e outros insumos energéticos e o maior uso de processos biológicos nos sistemas agrícolas.

É sabido que a biodiversidade do Brasil abriga hoje entre 15% e 20% das espécies vegetais, animais e microrganismos do mundo (MMA, 2007). Mas apesar do crescente interesse internacional pela megabiodiversidade brasileira, sabe-se que ela, por si só, não é garantia de crescimento econômico, tampouco de desenvolvimento sustentável.

A demanda por tecnologias limpas reforça a necessidade de se intensificar esforços na busca de alternativas como a descoberta de novas moléculas bioativas a partir da nossa biodiversidade, mostrando as plantas invasoras e tóxicas excelentes fontes dessas biomoléculas. Nesse contexto, tem-se procurado desenvolver sistemas de cultivo mais sustentáveis e menos dependentes do uso de agrotóxicos.

3.2 - Plantas invasoras

Uma planta é considerada invasora quando ocorre em local e momento indesejado (LORENZI, 1982), interferindo negativamente no cultivo. Em geral, é também conceituada como sinônimo de planta daninha, erva daninha, planta espontânea, silvestre, infestante, inço, planta ruderal, mato etc.

O Prof. Dr. Paulo Nogueira de Camargo, no prefácio do livro de Lorenzi (1982), define mato como uma vegetação natural, característica dos ecossistemas perturbados, ou seja, daqueles em que o equilíbrio biológico é constantemente rompido. Em adição, destaca que as espécies vegetais que compõem o mato são altamente agressivas, suportam largas amplitudes climáticas e amplas variações de solos e de disponibilidade de água. Por isso, são infestantes e altamente competitivas com as plantas cultivadas. Suas espécies podem viver e proliferar em vários países, tornando-se cosmopolitas. Ressalta, ainda, que as piores espécies de mato são cosmopolitas.

Segundo Lorenzi (1982), as perdas devido à competição entre plantas invasoras e culturas agrícolas, em todo o mundo, se situa em torno de 30-40%. Igualmente, sua presença onera, sobremaneira, a condução das culturas, a colheita e até a qualidade das sementes.

As plantas daninhas podem ainda, indiretamente, comprometer certas culturas agrícolas por hospedarem pragas e doenças. Bem como, sendo naturalmente selecionadas para as condições adversas, se tornarem muito mais aptas que as plantas cultivadas em adquirir seus elementos vitais. Como exemplo, sua habilidade na

extração de água, nitrogênio, fósforo e potássio do solo é, respectivamente, 4, 5, 3 e 6 vezes maior que as plantas cultivadas (LORENZI, 1982).

Outras características que permitem a sobrevivência das espécies de plantas daninhas, sob as mais diferentes adversidades são:

- Grande produção de sementes;
- Eficiente mecanismo de dispersão de sementes;
- Grande longevidade de suas sementes, com dormência que pode variar de algumas semanas a algumas centenas de anos.

Encontra-se, também, a presença de plantas daninhas, que têm diminuído a capacidade de lotação das pastagens e, conseqüentemente, a produtividade de carne, leite e lã. E como se não fosse suficiente, muitas das plantas daninhas são também tóxicas para animais.

Denominam-se plantas tóxicas todo o vegetal que, introduzido no organismo do homem ou de animais domésticos, em condições naturais, é capaz de causar danos que se refletem na saúde e vitalidade desses seres, ocasionando um desequilíbrio que se traduz como sintomas de intoxicação (HARAGUCHI, 2003).

3.3 - Plantas tóxicas para animais

No Nordeste, a oferta de alimento no campo flutua ao longo do ano em resposta à disponibilidade de água e nutrientes no solo. Assim, diante do pastoreio extensivo nas áreas de vegetação nativa predominar como tipo de exploração dos pequenos ruminantes na Região, nas épocas de escassez de chuva e, em conseqüência, da indisponibilidade de alimentos no pasto, algumas espécies vegetais passam a ser incluídas na dieta de uma forma mais expressiva, pois ainda verdes e em boas condições, apresentam-se como pastagens aproveitáveis. Dentre essas espécies, várias são plantas tóxicas que são evitadas, instintivamente, quando não há escassez de alimentos, mas ao serem ingeridas produzem uma série de efeitos nos diversos tecidos, órgãos ou sistemas, interferindo na produção dos rebanhos e ocasionando, fatalmente, envenenamentos, favorecidos pelo estado de debilidade física e orgânica dos animais nos períodos de estiagem.

Planta tóxica, sob o ponto de vista pecuário, é somente aquela que, quando ingerida pelo animal em condições naturais, causa danos à sua saúde ou mesmo a morte (TORKANIA *et al.*, 1979).

Tendo em vista a ocorrência disseminada de plantas tóxicas, torna-se difícil definir o impacto econômico causado e quase impossível estabelecer as perdas monetárias, diretas e indiretas, provocadas por elas (MELO e OLIVEIRA, 2000). No Brasil, devido à carência de dados sobre as causas de mortalidade freqüente de animais em diversos Estados, é difícil estimar as perdas por morte ocasionadas pelas plantas tóxicas. Segundo Riet-Correa e Medeiros (2001), em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul, a mortalidade anual de bovinos é de 5%, e dessa mortalidade anual de bovinos 10-14% são causadas pela ingestão de plantas tóxicas. Considerando um rebanho hipotético de 160 milhões de cabeças, pode-se projetar perdas de 800.000 a 1.120.000 bovinos, representado prejuízos da ordem de US\$ 160.000.000 a 224.000.000, com preço médio de US\$ 200/cabeça. Relativo a ovinos, no Rio Grande do Sul, a mortalidade anual é de 15-20% e a mortalidade causada por plantas tóxicas representa 7,2%. Assim, para um rebanho hipotético de 5.000.000 cabeças, estima-se em 54.000 a 72.000 mortes, acarretando prejuízo de US\$ 1.080.000 a 1.440.000, com preço médio de US\$ 20/cabeça.

Na pecuária, há dois tipos principais de perdas advindas da intoxicação de animais por plantas:

1. Perdas diretas. São aquelas causadas pela morte de animais, diminuição dos índices reprodutivos (abortos, infertilidade, malformações), redução da produtividade nos animais sobreviventes e outras alterações devidas a doenças transitórias, enfermidades subclínicas com diminuição da produção de leite, carne ou lã e aumento da susceptibilidade a outras doenças devido à depressão imunológica.

2. Perdas indiretas. Representadas pelos custos do controle de plantas tóxicas nas pastagens, as medidas de manejo para evitar as intoxicações como a utilização de cercas e o pastoreio alternativo, a redução do valor da forragem devido ao atraso na sua utilização, a redução do valor da terra, a compra de gado para substituir os animais mortos e os gastos associados ao diagnóstico das intoxicações e ao tratamento dos animais afetados.

A intoxicação de animais domésticos por plantas tem sua ocorrência explicada por diversos fatores, dentre os quais:

1. Palatabilidade. As intoxicações ocorrem tanto por plantas não palatáveis como palatáveis. Dentre essas estão incluídas, principalmente, as forrageiras, como os sorgos, que podem causar intoxicação por ácido cianídrico e as leguminosas. Outras plantas pouco palatáveis são ingeridas somente em condições especiais.

2. Fome. Este fator é importante uma vez que os animais consomem as plantas tóxicas em consequência de carência de forragem ou por período de privação de alimento. Muitas vezes, quando as pastagens têm pouca disponibilidade de forragem, principalmente no inverno ou em épocas de estiagem, algumas plantas tóxicas permanecem verdes tais como *Senecio spp.* e *Ipomoea sp.*

3. Sede. Quando os animais são transportados, eles bebem água devido à sede e, assim, perdem a palatabilidade e a capacidade de seleção. Conseqüentemente, ingerem plantas tóxicas pouco palatáveis ocasionando casos de intoxicação.

4. Desconhecimento. Algumas plantas como *Baccharis coridifolia* (mio-mio) são ingeridas somente por animais que as desconhecem, por terem sido criados em lugares onde não existe a planta.

5. Acesso às plantas tóxicas. Os animais se intoxicam por ingestão somente quando tem acesso a elas, após essas árvores serem cortadas ou derrubadas por ventos.

6. Dose tóxica.

7. Período de ingestão.

8. Variação de toxicidade. Podem existir variações de toxicidade dentro de uma espécie vegetal, devido a diversos fatores: diferentes variedades, épocas do ano, fase de crescimento, tipo de solo, fertilizações.

Dentre as várias espécies de plantas ingeridas pelos animais em pastoreio extensivo no Ceará, Santa Rosa (1989) identificou a Salsa (*Ipomoea asarifolia*), o Pau Mocó (*Luetzelburgia auriculata*), a Timbaúba (*Enterolobium contortisilignuum*) e o Canudo (*Ipomoea fistulosa*) como tóxicas para caprinos. Também são reportadas em caprinos intoxicações espontâneas no Rio Grande do Sul por Grandiúva (*Trema micrantha*) (TRAVERSO *et al.*, 2003) e por Vassoura (*Sida carpinifolia*) (COLODEL, 2005), em São Paulo por Erva de Rato (*Palicourea marcgravii*) (SOTO-BLANCO *et al.*, 2004), e intoxicação experimental por *Nerium oleander* (BARBOSA *et al.*, 2007).

3.4 - *Ipomoea asarifolia*

Diversas espécies do gênero *Ipomoea* estão incluídas dentre as plantas daninhas que ocorrem com frequência em áreas cultivadas (BLANCO 1978; GROTH 1991; KISSMAN e GROTH 1992). A *Ipomoea asarifolia* (Desr.) Roem. *et* Schult.

(FIGURA 1), planta herbácea prostrada ou trepadeira, da família Convolvulaceae, popularmente conhecida como salsa, batata-salsa, batatarana, salsa-brava, é encontrada entre várias culturas e em margens de rios, lagoas e praias marítimas, em terrenos abandonados, nas margens de estradas e em lugares próximos de habitações, de preferência em solos arenosos (BLANCO 1978). Segundo Austin e Cavalcanti (1982), quanto à sua distribuição e habitat, essa Convolvulaceae é pantropical, ocorrendo no Brasil nas Regiões Norte e Nordeste (DÖBEREINER *et al.*, 1960).

Kiill e Ranga (2003), estudando os aspectos da fenologia, polinização e reprodução da *I. asarifolia*, observaram que por essa espécie apresentar ampla distribuição, altas taxas de frutificação e de germinação, elevado número de sementes por fruto e forma de propagação vegetativa, pode ser considerada como “planta invasora ideal”, segundo a terminologia descrita por Baker (1974).

Sob condições naturais, ocorrem casos de intoxicação em bovinos, ovinos e caprinos (BARBOSA *et al.*, 2005); experimentalmente tem sido provocada a intoxicação por essa planta nessas mesmas espécies (BARBOSA *et al.*, 2005), em camundongos (SANTOS, 2001) e em búfalos (BARBOSA *et al.*, 2005). A intoxicação natural é favorecida pela fome, que induz os animais à ingestão dessa planta, que se mantém verde durante o ano todo. A maioria dos casos de intoxicação ocorre em animais jovens que se intoxicam comendo as partes aéreas da planta. No entanto, para que os animais mostrem sinais de intoxicação, é necessário o consumo de salsa em grandes quantidades, quase como alimento exclusivo. Os bovinos, mesmo ingerindo a planta por apenas um dia, já mostram sintomas de intoxicação. Enquanto os ovinos e caprinos necessitam ingerir a salsa durante semanas para evidenciarem sintomas (DÖBEREINER *et al.*, 1960; TOKARNIA *et al.*, 2000).

Os sintomas de intoxicação da salsa são de ordem nervosa, porém, diferentes nas três espécies citadas. Nos bovinos, foram observados tremores musculares, balanço da cabeça, desequilíbrio do trem posterior e queda do animal ao solo. Interrompida a ingestão da planta, os sintomas desaparecem em poucos dias, exceto quando as doses são bastante elevadas, ocorrendo a morte. Os ovinos mostram tremores musculares e perturbações na locomoção. Interrompida a ingestão da planta, os sintomas perduram ainda por vários dias e somente morrem os animais que continuam a ingerir a planta após mostrarem sintomas (DÖBEREINER *et al.*, 1960; TOKARNIA *et al.*, 2000). Em caprinos, os sinais clínicos são caracterizados por



FIGURA 1 – *Ipomoea asarifolia* (salsa)

depressão, sonolência, tremores dos músculos da cabeça e pescoço, tremores da cabeça, principalmente após exercício, incoordenação, hipermetria, permanência com os membros abertos ao serem colocados em estação, opistótono e nistagmo. Ao serem movimentados, os animais podem cair em posições atípicas e apresentar tremores generalizados. Em todas as espécies acometidas, os sinais são bem parecidos, variando apenas na intensidade. Os sinais clínicos são revertidos poucos dias depois de cessada a ingestão da planta (PINHEIRO e SANTA ROSA, 1996a; MEDEIROS *et al.*, 2003b, BARBOSA *et al.*, 2005).

A *I. asarifolia* foi, primeiramente, classificada como uma planta que causava armazenamento lisossomal (MEDEIROS *et al.*, 2000), ou seja, doença do armazenamento de oligosacarídeos incompletamente processados nos lisossomas, como observada após intoxicação por *I. carnea*, *I. sericophylla* e *I. riedelii* (HARAGUCHI *et al.*, 2003; BARBOSA *et al.*, 2006). Experimentos realizados posteriormente demonstraram que, na verdade, ela é responsável pelo surgimento de uma síndrome tremorgênica (MEDEIROS *et al.*, 2003b, BARBOSA *et al.*, 2005). O mecanismo de ação proposto é que a *I. asarifolia* possa induzir perturbação na neurotransmissão, por interferir nos seus mecanismos bioquímicos (BARBOSA *et al.* 2005).

Pinheiro e Santa Rosa (1996a), após intoxicarem caprinos experimentalmente com *I. asarifolia*, na dose diária de 0,50% de matéria seca das folhas por kilo de peso vivo, observaram alterações degenerativas dos hepatócitos, distúrbios renais e sintomatologia nervosa progressiva e dependente da administração da planta. Pinheiro e Santa Rosa (1996b) avaliaram, também, parâmetros hematológicos, a bioquímica sérica e a urinálise após a intoxicação experimental por *I. asarifolia*, sugerindo, após análise dos dados obtidos, um quadro diabetogênico reversível nos animais que receberam salsa até cinco dias após o início do aparecimento dos sintomas.

Embora a toxicidade da salsa para ruminantes seja conhecida desde a década de sessenta (DÖBEREINER *et al.*, 1960) e tenha sido registrado que os efeitos adversos nos animais (bovinos, caprinos e ovinos), oriundos do seu consumo, decorram de alterações neurológicas (TOKARNIA *et al.*, 2000), apenas recentemente é que foi sugerida a natureza do princípio tóxico. Santos (2001), utilizando camundongo como modelo animal, os intoxicou por via oral com uma fração protéica (F_{0-30%}) da *I. asarifolia*, obtida por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio (0-30%). Esta fração induziu retardamento no crescimento e alterações

hepáticas e renais na lactante e nos lactentes, embora nesses últimos tenham sido de menor intensidade. Dessa fração (F_{0-30%}), foi purificada uma proteína, denominada Lectina Tóxica da Salsa (LTS), de natureza glicoprotéica, com afinidade para fetuína, avidina e ácido *N*-acetil-D-neuramínico (ácido siálico), em ordem decrescente. Santos (2001) relata também a baixa taxa de rendimento da lectina no protocolo de purificação, aproximadamente, 1 mg de proteína por 100 g de farinha de folha, o que representou algo em torno de 0,42% da proteína total extraída. Esse fato respalda a necessidade de se testar outras estratégias para purificação da lectina e avançar nos estudos bioquímicos e de toxicidade dessa molécula.

3.5 - Compostos tóxicos presentes nos vegetais

As toxinas vegetais são em sua maioria metabólitos secundários produzidos pelas plantas como proteção às pragas e às doenças, podendo por em risco a saúde humana e animal se presentes em grande quantidade.

As substâncias podem agir no organismo como: (1) agentes tóxicos – que são capazes de produzir anormalidades fisiológicas e ou anatômicas em curto espaço de tempo, ou (2) agente antinutricional – nesse caso são substâncias que inibem ou bloqueiam importantes rotas do metabolismo, especialmente a digestão. Eles impedem a máxima utilização dos nutrientes, especialmente proteínas, vitaminas e minerais, agindo dessa forma como antienzimas, antivitaminas, ou seqüestradores de minerais, e como conseqüência reduzem o valor nutritivo do alimento. Essas ocorrências impactam negativamente o metabolismo normal do ser vivo. E isso, com o decorrer do tempo, estabelece anormalidades fisiológicas e/ou anatômicas. Em adição, muitos fatores antinutricionais podem se comportar como agentes tóxicos quando presentes em altas concentrações na planta.

Segundo Novak e Haslberger (2000) as classes mais freqüentes de toxinas e fatores antinutricionais de plantas são:

- glicocídeos cianogênicos;
- glicosinolatos;
- glicocalcóides;
- gossipol;
- oxalatos;
- fenóis;
- fitatos;

- saponinas;
- taninos;
- inibidores de proteases; e
- lectinas.

A gravidade do quadro de intoxicação depende de fatores, tais como: grau de toxicidade da substância; complexidade metabólica do organismo intoxicado; via de absorção; tempo de exposição; quantidade da substância tóxica ingerida e forma de excreção da substância tóxica. Dessa maneira, o risco real para a saúde é provavelmente muito pequeno, quando as substâncias tóxicas estão presentes em baixas concentrações na planta.

3.6 - O mecanismo de defesa das plantas

Interações entre patógenos e plantas têm, sem dúvida, causado grande impacto na produtividade agrícola, desde que os seres humanos começaram a depender extensivamente do cultivo de plantas para alimento.

No seu ecossistema natural, as plantas são resistentes ou mesmo imunes à grande maioria dos inúmeros patógenos existentes. Embora esses sejam portadores de atributos bioquímicos suficientes para degradar a matéria vegetal morta, são inócuos em seus efeitos sobre a planta ainda viva. As plantas são afetadas, na verdade, por um número muito pequeno de componentes da flora microbiana a elas associados. Geralmente, menos de uma centena de patógenos consegue afetar cada espécie de planta, incluindo-se nesse número os fungos, as bactérias, os vírus, os viróides e os nematóides (MEDEIROS *et al.*, 2003).

Assim, pode-se afirmar que, se de um lado os microrganismos possuem mecanismos deletérios à maioria dos tecidos e dos órgãos vegetais, por outro, apenas alguns conseguiram desenvolver maneiras de anular ou contornar os mecanismos de defesa das plantas.

A interação de um patógeno com uma planta é, freqüentemente, considerada como um processo multi-estágio, com mecanismos de reconhecimento em vários níveis, sendo que de cada um, ou da combinação entre eles, pode depender o resultado final dessa interação. A co-evolução dessa interação tem originado uma ampla gama de troca de sinais e respostas. Microorganismos que provocam uma resposta no hospedeiro podem receber diversos tipos de reação: uma aceitação 'hospitaleira', como é o caso de simbiontes, tais como as bactérias fixadoras de nitrogênio, um

reconhecimento tardio seguido de defesas moderadamente efetivas, como a maioria das interações que resultam em doença, conhecida como interação compatível, ou uma resposta de defesa rápida e forte que bloqueia o avanço da infecção, conhecida como interação incompatível.

Esses mecanismos de defesa vegetal podem ser de natureza estrutural, quando funcionam como barreiras físicas, impedindo a penetração nos órgãos ou a colonização de tecidos pelo patógeno, ou de origem bioquímica, quando se trata da produção pela planta de substâncias capazes de inibir o crescimento do patógeno, ou de criar condições para impedir a sobrevivência dele em células ou em tecidos vegetais (MEDEIROS *et al.*, 2003a).

Na medida em que os aspectos básicos da interação planta-patógeno são esclarecidos, torna-se evidente a importância dos mecanismos bioquímicos de defesa, os quais estão muitas vezes desvinculados de alterações morfológicas. Pode-se afirmar que os mecanismos estruturais explicam apenas alguns casos de resistência, mas é na bioquímica da planta que está a chave da imunidade diante de milhares de espécies de microrganismos livres na natureza e com potencial para atacar a matéria vegetal.

À semelhança da defesa estrutural, os componentes bioquímicos da defesa vegetal podem ser divididos em pré-formados ou preexistentes e induzidos, ou seja, produzidos em resposta à tentativa de infecção pelo patógeno. O grau de envolvimento dos fatores estruturais e bioquímicos pré- e pós-formados nas respostas de resistência varia entre as diferentes interações hospedeiro-patógeno e, numa mesma interação, em função da idade da planta, do órgão/tecido afetado, do estado nutricional e das condições ambientais.

Existem duas características fundamentais na resistência induzida: a amplitude de efetividade, onde uma infecção localizada pode induzir resistência à ulterior infecção por uma gama de patógenos, e a sistemicidade, onde a resistência, após induzida, pode se expressar não só no sítio primário de inoculação, mas, também, sistemicamente, ou seja, em tecidos remotamente distantes do local da primeira infecção (ROMEIRO, 2002). Tem-se sugerido a existência de sinais biológicos os quais devam ter sua gênese no sítio de indução e serem enviados a locais mais distantes, numa espécie de reação biológica em cadeia. Dentre esses sinais, há o ácido salicílico, jasmonatos e ésteres do ácido jasmônico, sistemina e etileno (SCHMELZ *et al.*, 2003).

Uma reação comum da planta frente ao ataque de um patógeno é a resposta de hipersensibilidade, na qual as células adjacentes ao local de infecção morrem rapidamente, privando o patógeno de nutrientes e impedindo sua propagação. Esse tipo de resposta é, muitas vezes, precedido pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas ROS podem contribuir para a morte celular como parte da resposta de hipersensibilidade ou agir diretamente na morte do patógeno.

Outra resposta de defesa à infecção é a formação de proteínas relacionadas à infecção do patógeno, conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas). São conhecidas 17 famílias de PR-proteínas, sendo várias hidrolases como as glucanases e quitinases, e outras inibidores de proteases (VAN LOON *et al.*, 2006).

Dentre os diversos componentes do arsenal de defesa das plantas, destacam-se, também, proteínas que interferem no processo digestivo dos herbívoros, além dos inibidores de protease já destacados. São os inibidores de α -amilases, que inibem a ação dessa enzima e, por consequência, a digestão do amido (FRANCO *et al.*, 2002) e as lectinas, proteínas de defesa que interagem reversivelmente com carboidratos, glicoproteínas ou glicolipídeos e que após serem ingeridas por alguns herbívoros, ligam-se às células epiteliais que revestem o trato digestório, interferindo na absorção de nutrientes (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004).

3.7 - Lectinas

3.7.1 - Definição e classificação

Lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar, de maneira reversível, a mono- ou oligossacarídeos específicos, podendo ou não apresentar em sua estrutura domínios catalíticos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). De acordo com Van Damme *et al.* (1998), as lectinas podem ser classificadas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. As merolectinas possuem um único domínio de ligação a carboidratos sendo, então, incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As hololectinas possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, sendo consideradas verdadeiras aglutininas. As quimerolectinas possuem um ou mais domínios de ligação a carboidratos e, ainda, um outro domínio com atividade enzimática ou outra atividade biológica que atua independentemente.

As superlectinas são proteínas que contêm, no mínimo, dois domínios ligantes a carboidratos, os quais são estruturalmente distintos, reconhecendo carboidratos diferentes.

As lectinas podem também ser classificadas conforme a afinidade por açúcares simples, sendo distribuídas em quatro grupos: grupo I (L-fucose), grupo II (D-galactose, *N*-acetil-D-galactosamina), grupo III (D-glucose, D-manose) e grupo IV (D-idose, L-glucose e L-xilose) (MAKELA, 1957). Goldstein e Poretz (1986) acrescentaram três novos grupos: *N*-acetil-D-glucosamina, ácido siálico e estruturas complexas. Em 1998, Van Damme *et al.* propuseram subdividir as lectinas de acordo com a similaridade entre suas seqüências. Com isso, as lectinas foram agrupadas em sete famílias: lectinas de leguminosas, lectinas de monocotiledôneas ligantes à manose, lectinas ligantes à quitina, RIPs do tipo 2, lectinas relacionadas à jacalina, lectinas relacionadas à amarantina e lectinas do floema das curcubitáceas.

As lectinas não são exclusivas de plantas como originalmente se pensava, elas são ubíquas na natureza (LAKHTIN, 1994; LIS e SHARON, 1998), podendo ser encontradas na superfície celular e em compartimentos intracelulares (RÜDIGER, 1998).

3.7.2 - Papel fisiológico nas plantas e aplicações das lectinas

Para as lectinas, vários papéis na planta têm sido atribuídos, como proteínas de defesa (PEUMANS e VAN DAMME, 1995), exercendo efeito anti-nutricional em animais e insetos (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004), como proteínas de reserva, crioprotetoras, e moduladoras de atividade enzimática (RÜDIGER, 1998). Mais recentemente, foi sugerido o envolvimento delas, também, na regulação e sinalização celular (VAN DAMME *et al.*, 2004a). No entanto, é a aplicação biológica em espécies ou organismos distintos ao de origem que tem colocado as lectinas em lugar de destaque nos estudos bioquímicos.

É sabido que várias técnicas estão disponíveis para detectar a presença de carboidratos nas células, tecidos e glicoproteínas (DUBOIS *et al.*, 1956, KIM *et al.*, 2000), mas são as lectinas que possibilitam a detecção e localização de resíduos de açúcares específicos em células e tecidos, podendo com o auxílio de glicosidases, por exemplo, predizer a seqüência desses resíduos em glicoconjugados (MORI *et al.*, 1997; ROSENFELD, *et al.*, 2007). Por isso, são amplamente utilizadas na citologia

para estudo de estrutura de membrana, de vias intracelulares de glicosilação de proteínas e das mudanças que ocorrem nos glicoconjugados durante a diferenciação, crescimento, desenvolvimento, divisão celular e estado patológico (SHARON e LIS, 1989; SHERWANI *et al.*, 2003), bem como ferramenta farmacológica, como é o caso da Proteína C reativa (ROSKAMP *et al.*, 2005).

No campo da reprodução, tem sido relatado o uso de lectinas vegetais para o mapeamento da membrana do espermatozóide (SERRANO *et al.*, 2001; NGO *et al.*, 2003) e zona pelúcida (PARILLO *et al.*, 2000). No estudo da membrana de espermatozóides, lectinas marcadas com fluoresceína (SERRANO *et al.*, 2001) ou acopladas a esferas de agarose (NGO *et al.*, 2003) têm sido usadas. Para o estudo da zona pelúcida (ZP), lectinas conjugadas à peroxidase (PARILLO *et al.*, 1996; 2000); à biotina (MORI *et al.*, 1997) ou à fluoresceína (OZGUR *et al.*, 1998; MACEDO *et al.*, 2005) têm, também, sido empregadas.

3.7.3 - Interação de lectinas com ovócitos

3.7.3.1 - Glicoconjugados de membranas com os quais as lectinas podem interagir

A membrana plasmática, presente em células de todas as espécies, define a periferia da célula, separando o seu conteúdo da circunvizinhança. Ela serve como uma barreira de permeabilidade, que permite à célula manter uma composição citoplasmática definida. Ela é composta de grande número de moléculas de lipídios e proteínas que se mantêm juntas principalmente por interações hidrofóbicas, formando uma bicamada lipídica fina, resistente e flexível, em volta da célula (VOET e VOET, 1995; NELSON e COX, 2000; BERG *et al.*, 2002). Algumas proteínas presentes na membrana celular permitem a passagem de certos íons e moléculas (proteínas transportadoras). Outras proteínas exercem o papel de receptores, transmitindo o sinal do exterior para o interior da célula. Há, ainda, proteínas que funcionam como enzimas, participando de reações que ocorrem em membranas. Muitas das proteínas e dos lipídeos presentes na membrana celular apresentam-se como conjugados de carboidratos, denominando-se glicoproteínas e glicolipídeos, respectivamente (VOET e VOET, 1995; NELSON e COX, 2000; BERG *et al.*, 2002). As glicoproteínas, em especial, são fundamentais em muitos processos biológicos incluindo fecundação, ativação do sistema imune, replicação viral, crescimento e renovação celular, inflamação, dentre outros (DWEK *et al.*, 1996).

A glicosilação em proteínas e lipídeos é capaz de produzir um modelo único de glicoconjugado característico de cada tipo celular ou de diferentes estádios de desenvolvimento celular ou patológico. Essa diversidade de glicoconjugados se mostra como um potencial para estudo da capacidade funcional das células.

A glicosilação é uma das principais modificações químicas que ocorrem nas proteínas. Algumas acontecem no lúmen do retículo endoplasmático rugoso e outras no lúmen do *cis*-, *medial*- ou *trans*-Golgi. As glicoproteínas podem conter uma ou mais cadeias de oligossacarídeos ligadas a elas, podendo o carboidrato representar de 1,0 a 70,0% da massa da glicoproteína, ou até mais (LODISH *et al.*, 1999).

A presença de agregados de carboidratos altamente hidrofílicos altera a polaridade e a solubilidade das proteínas com as quais estão conjugados, além de influenciar a seqüência dos eventos que se processam durante o enovelamento do polipeptídeo, impedindo, por exemplo, uma rota de enovelamento e favorecendo outra. Os carboidratos conjugados podem, ainda, proteger algumas proteínas do ataque de enzimas proteolíticas (LODISH *et al.*, 1999).

Os carboidratos se ligam covalentemente às proteínas de duas maneiras: através de ligação glicosídica (*O*-ligação) do carboidrato anomérico com o grupo hidroxila do resíduo de serina (Ser) ou treonina (Thr); ou por meio de ligação *N*-glicosídica (*N*-ligação) do carboidrato anomérico com o nitrogênio do grupo amida de um resíduo de asparagina (Asn).

A diferença na estrutura dos oligossacarídeos *N*- e *O*-ligados reflete a diferença da biossíntese dessas estruturas (LODISH *et al.*, 1999). Os açúcares *O*-ligados são adicionados no complexo de Golgi, um por vez, e a transferência de cada resíduo adicional é catalisada por uma glicosiltransferase distinta. Em contrapartida, a biossíntese dos oligossacarídeos *N*-ligados começa no retículo endoplasmático rugoso com a adição de um oligossacarídeo pré-formado contendo 14 resíduos de carboidratos. A estrutura desse precursor é a mesma em plantas, animais e eucariotos unicelulares, ou seja, um oligossacarídeo ramificado contendo três glicoses (Glc), nove manoses (Man) e duas *N*-acetil-D-glicosaminas (GlcNac), podendo ser representado por $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNac})_2$. Cinco desses 14 resíduos são conservados na estrutura de todos os oligossacarídeos *N*-ligados ($\text{Man}_3(\text{GlcNac})_2$). Subseqüentemente à adição do oligossacarídeo de 14 resíduos, certos resíduos são removidos. Após a remoção de três glicoses, a glicoproteína é direcionada para o complexo de Golgi ; onde outros resíduos são removidos e adicionados, um por vez, em uma ordem

definida, sendo cada reação catalisada por enzimas distintas. Resíduos de ácido siálico podem ser adicionados à porção terminal, bem como resíduos de fucose à primeira GlcNac do núcleo $\text{Man}_3(\text{GlcNac})_2$.

As estruturas dos oligossacarídeos *N*- e *O*-ligados além de serem distintas, diferentes resíduos de carboidratos são normalmente encontrados em cada tipo. Por exemplo, os oligossacarídeos *O*-ligados podem ser do tipo mucina quando *N*-acetil-D-galactosamina se liga a serina ou treonina; do tipo proteoglicano quando xilose se liga a serina; do tipo colágeno quando galactose se liga a hidroxilisina; do tipo extensina quando arabinose se liga a hidroxiprolina; do tipo levedura quando manose se liga a serina ou treonina; do tipo glicogênio quando glicose se liga a tirosina; ou do tipo nuclear ou citossólico quando *N*-acetil-D-glicosamina se liga a serina (MONTREUIL, 1995). Os oligossacarídeos *N*-ligados são caracterizados pela ligação do resíduo de *N*-acetil-D-glicosamina a asparagina. Os oligossacarídeos *O*-ligados são geralmente curtos. Os oligossacarídeos *N*-ligados, ao contrário, contêm vários ramos, estando sempre presente manose e *N*-acetil-D-glicosamina. Esses oligossacarídeos podem ser classificados em três tipos: oligomanosídeos ou *high* manose quando resíduos de manose são adicionados ao núcleo $\text{Man}_3(\text{GlcNac})_2$, *N*-acetilactosamina ou complexo quando unidades de lactosamina ($\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNac}$) são distribuídas entre os resíduos de manose do núcleo $\text{Man}_3(\text{GlcNac})_2$ e do tipo híbrido quando possui características estruturais dos dois tipos anteriormente descritos (MONTREUIL, 1995).

Essas frações oligossacarídicas *O*- e *N*-ligadas às proteínas são ricas em informações estruturais, compondo sítios altamente específicos para reconhecimento e ligação de alta afinidade com outras proteínas como lectinas e glicosidases.

3.7.3.2 - A interação de lectinas com a zona pelúcida

A zona pelúcida (ZP) é uma matriz extracelular que envolve o ovócito e é composta por glicoproteínas sintetizadas durante o crescimento folicular, tanto pelo ovócito como pelas células da granulosa (LUCCI *et al.*, 2001). Em várias espécies, como nos bovinos, a zona pelúcida é formada sobre o ovócito nos folículos primários (BASSOS e ESPER, 2002), já em caprinos, Lucci *et al.* (2001) só observaram sua presença a partir de folículos secundários.

Além da importância para fecundação, a zona pelúcida protege o ovócito contra danos físicos e representa uma barreira sanitária que evita a contaminação de

ovócitos e embriões pré-implantação por microorganismos presentes no trato reprodutivo feminino (SALLES *et al.*, 1998; CAVALCANTE *et al.*, 1998) ou nos meios de cultivo *in vitro* (LAMARA *et al.*, 2002).

A natureza molecular e bioquímica das proteínas da zona pelúcida tem sido estudada principalmente em suínos e em camundongos (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2000). Esses autores reportam a identificação de três glicoproteínas como os principais constituintes da zona pelúcida, chamadas de ZP1/ZPB, ZP2/ZPA e ZP3/ZPC. Dessas, há relatos de que seja a ZP3 ou ZPC a glicoproteína envolvida na primeira interação espermatozóide-ovócito (AVILÉS *et al.*, 2000).

Embora se saiba que as glicoproteínas da zona pelúcida estão envolvidas na interação espermatozóide-ovócito (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2000), ainda há controvérsia quanto à estrutura da porção glicídica funcional nessa interação. Zara e Naz (1998) revisando os vários resíduos que têm sido sugeridos como ligantes a espermatozoides em camundongos, ratos, hamsters, porco da guiné e em humanos, sugeriram que mais de um resíduo possa estar envolvido nessa interação. Estes mesmos autores ainda especularam que a interação seja multivalente, envolvendo interação proteína-proteína, carboidrato-carboidrato, ou proteína-carboidrato.

No entanto, pouco se pode inferir sobre as características bioquímicas da zona pelúcida de ovócitos caprino diante do número limitado de trabalhos que abordam esse aspecto. Apenas Parrillo *et al.* (1996 e 2000) relatam informações sobre o perfil da zona pelúcida de ovócitos imaturos, ainda no ovário. Em seus estudos de 1996, Parrillo e colaboradores utilizaram nove lectinas conjugadas à peroxidase e detectaram a marcação da zona pelúcida apenas com *Ricinus communis* (RCA-I), *Arachis hypogaea* (PNA); *Glycine max* (SBA) e *Triticum vulgare* (WGA), sugerindo, de acordo com a especificidade dessas lectinas, a presença de resíduos de β -galactose (RCA-I e PNA), *N*-acetil-D-galactosamina (SBA), *N*-acetil-D-glicosamina e ácido siálico (WGA) na posição terminal dos glicoconjugados. Os autores estudaram, também, a zona pelúcida de ovócitos bovino, ovino e suíno e observaram existir diferença na composição química da zona pelúcida, sugerindo uma interação espécie-específica entre os gametas.

Rodeheffer e Shur (2004) observaram a presença de um ligante do espermatozóide na zona pelúcida de ovócitos ovulados de camundongos, o qual não

estava presente na zona pelúcida de ovócitos ovarianos. Esse achado sugere existir diferença no perfil da zona pelúcida durante a maturação do ovócito.

4 - OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral

Estudar as proteínas com atividade hemaglutinante nas folhas de *Ipomoea asarifolia* e sua relação com os efeitos tóxicos dessa planta.

4.2 - Objetivos específicos

- Determinar a fração protéica a ser usada nos ensaios de toxicidade, através de cromatografias, eletroforeses e atividade hemaglutinante.
- Testar alternativas de indução da expressão da lectina em folhas de *I. asarifolia*.
- Estudar os efeitos provocados no sistema nervoso autônomo pela fração protéica rica em lectina.
- Estudar os efeitos renais da fração protéica rica em lectina.
- Caracterizar bioquimicamente a fração protéica rica em lectina.
- Fazer uma prospecção de uso biotecnológico da lectina como marcador de zona pelúcida em ovócitos caprinos.

***5 -MATERIAIS E
MÉTODOS***

5.1 - LOCAL DE EXECUÇÃO

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Proteínas de Defesa Vegetal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). Contamos também com a colaboração do Laboratório de Proteínas Tóxicas Vegetais, do mesmo Departamento, do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Ceará (UECE), do Laboratório de Farmacologia de Venenos e Toxinas (LAFAVET) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, do Centro Nordestino de Aplicação e uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da UFC, do abatedouro da Embrapa Caprinos, e do Laboratório de Reprodução da UECE.

5.2 - MATERIAIS

5.2.2 - Folhas

As folhas de *Lasarifolia* foram coletadas de plantas distribuídas no Campus do Pici, UFC, Fortaleza. A identificação foi realizada pelo Professor Edson Paula Nunes, sistemata do Herbário Prisco Bezerra da UFC, onde um exemplar do espécime foi depositado, sendo o seu número de acesso 040477.

5.2.3 - Animais Experimentais

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

Camundongos (*Mus musculus*) Swiss, utilizados para experimentos de toxicidade através da administração intra-orbital, foram provenientes de colônias do Biotério Central da UFC. Já os animais utilizados para experimentos de toxicidade no nervo do ducto deferente foram provenientes do Biotério da UECE.

Ratos Wistar, utilizados nos experimentos de toxicidade renal, foram provenientes de colônias do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da UFC.

Os animais utilizados foram mantidos de acordo com princípios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.2.4 - Reagentes

Materiais obtidos da Sigma Chemical Company, St Louis, EUA: Pepsina, extraída da mucosa estomacal de suínos (código P-7012, lote 18C-8080); Tripsina, Tipo 1, extraída de pâncreas bovino (código T-8003, lote 70K-0946); α -Quimotripsina, tipo 1-S, extraída de pâncreas bovino (código C-7762, lote 83K-7680); Papaína (código P-4762, lote 101K7670); Albumina Sérica Bovina-BSA para ensaio de digestibilidade (código A-8022, lote 70K-0946); Albumina Sérica Bovina (BSA) utilizada para curva do Bradford (código A-2153, lote 36H1183); Polivinilpirrolidona-PVPP (código P-6755, lote 14K0080); Fetuína (código F-2379, lote 110K72701); Azul de bromofenol (código B-0126, lote 055K3684); Adjuvante Completo de Freund (código F-5881, lote 63H8800); Azul Brilhante de Coomassie G (código B0770, lote 25H0482), IgG de cabra contra IgG de coelho conjugada à fosfatase alcalina (código A-3812, lote 12K9171), SIGMA *FAST* BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato e azul de nitrotetrazólio) substrato em pastilha (SIGMA *FAST_{TM}*, código B-5655), coluna de quitina de concha de carangueijo (código C-7170, lote 84H7175), isotiocianato de fluoresceína – FITC (código F-1628, lote 90K5316), coluna de agarose Proteína-A (código PA, lote 39H7832), e ácido jasmônico (código J-2750)

Materiais obtidos da Amersham Biosciences Corporation, Piscataway, EUA : Marcadores de massa molecular LMW (código 17.044601); Coluna Sepharose 4B ativada com CNBr (código 17-0430-01, lote 302266); Coluna Hitrap desalting (código 17-1408-01); e Membrana de PVDF Hybond-P (código RPN303F).

Materiais obtidos da Pharmacia Biotech, Uppsala Suécia: Coluna Sephadex G-100 e Coluna Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (código 17-0965-05).

Azul Brilhante de Coomassie R-250, Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, Brasil (código 1021).

Membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore Corporation, código IPVH00010, lote KGAN3442W).

Coluna de Dietilaminoetil (DEAE) Celulose (Whatman International Ltd, Maidstone, Inglaterra).

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

5.3 - MÉTODOS

5.3.1 - Preparação das folhas de *Ipomoea asarifolia*

As folhas de *I.asarifolia*, logo após a coleta, foram lavadas em água corrente, seguida de lavagem com água destilada. Essas foram secadas com papel toalha, pesadas e armazenadas a -85 °C até o uso. Um segundo grupo de folhas após coleta, lavagem e secagem foram despigmentadas através da imersão em solução de etanol:clorofórmio 3:1 (v:v), seguida de três trocas dessa solução. Após nova secagem, as folhas foram pesadas e armazenadas a -85 °C até o uso. Outros dois grupos de folhas, após serem secados, foram tratados com ácido jasmônico - AJ (100 µM em 0,05% de etanol) ou injuriados mecanicamente mediante o uso de um perfurador (4 cortes equidistantes/folha, com 6 mm de diâmetro). Esses, juntamente com seus controles, 0,05% de etanol e folhas não injuriadas, respectivamente, foram cultivados sob atmosfera úmida, utilizando para isso placas ou sacos plásticos contendo três papéis de filtro, tipo germitest, umedecidos com água destilada autoclavada, de forma a permitir 2,5 vezes seu peso de saturação em água. O cultivo foi realizado em câmara escura, a 25 °C, ou em câmara com fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro, intensidade luminosa de $90 \pm 5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a 27 °C, por um período de 24 h, 48 h, 72 h ou 96 h. Após os diferentes tempos de cultivo, as folhas foram secadas, pesadas e armazenadas a -85 °C até seu uso.

5.3.2 - Preparação da farinha

Ainda congeladas e dentro dos sacos utilizados para armazenagem, as folhas foram maceradas mediante o uso de pistilo e gral previamente resfriados a -20 °C. Ao primeiro sinal de descongelamento, o macerado era retirado do saco plástico e a maceração retomada no interior do gral. O macerado final foi denominado de farinha.

5.3.3 - Extração de proteínas

A extração das proteínas das folhas foi realizada suspendendo a farinha, imediatamente após a maceração, em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo

polivinilpolipirrolidona 3% e ácido ascórbico 5 mM, na proporção de 1:3 (p/v). A suspensão foi deixada sob agitação contínua por 2 h, a 4 °C, sendo, em seguida, filtrada em pano de trama fina. O filtrado foi centrifugado a 10.000 g, por 30 min, a 4 °C, e o sobrenadante obtido denominado de extrato bruto.

5.3.4 - Fracionamento de proteínas com sulfato de amônio

Visando a obtenção de uma fração rica em lectina, o extrato bruto foi fracionado com sulfato de amônio nos intervalos de 0-30%, 30-60% e 60-90% de saturação, com 12 h de contato, 4 °C. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 g, 40 min, a 4 °C. As frações obtidas foram dialisadas, exaustivamente, contra água destilada, liofilizadas e resuspensas em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5.

5.3.5 - Dosagem de proteína

Os teores de proteína do extrato bruto e das frações protéicas obtidas foram determinados segundo metodologia descrita por Bradford (1976). Brevemente, para cada 100 µL de amostra, em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada por alguns segundos e após 10 min. sobre a bancada e à temperatura ambiente, procedeu-se a leitura das absorbâncias a 595 nm, em espectrofotômetro tipo Novapesc II, Pharmacia LKB. A concentração de proteína foi estimada usando-se o fator de calibração obtido através de uma curva padrão constituída com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina. A absorbância a 280 nm foi usada para estimar o conteúdo de proteínas nos eluatos das colunas cromatográficas.

5.3.6 - Cromatografia de Troca Iônica em coluna de DEAE-celulose

Alíquotas das frações 0-30%, 30-60% e 60-90% de saturação foram aplicadas em coluna de DEAE-celulose (2,9 x 7,5 cm). A coluna foi previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, seguindo a aplicação da amostra, a qual permaneceu por uma hora em contato, com leve agitação a intervalos aleatórios. Posteriormente, a coluna foi percolada com este mesmo tampão até completa remoção das proteínas não

retidas (pico não retido). A eluição das proteínas retidas na matriz foi realizada com aplicação sequencial do tampão de equilíbrio contendo NaCl nas concentrações de 50 mM, 100 mM, 200 mM, 400 mM e 600 mM. A cromatografia foi realizada a um fluxo de 1 mL/min, sendo coletadas frações de 3 mL por tubo. Todo procedimento foi monitorado através de leituras das absorvâncias em 280 nm, bem como através de ensaio de hamaglutinação. As frações que encerravam atividade hemaglutinante foram reunidas e dialisadas, exaustivamente, contra água destilada e, posteriormente, liofilizadas.

5.3.7 - Cromatografias de afinidade

- Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-fetuína (1,7 x 6,5 cm)
- Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-papaína (1,7 x 6,5 cm)
- Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-tripsina (1,7 x 18 cm)
- Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-ConA-ConBr (1,7 x 6,5 cm)
- Cromatografia de afinidade em coluna de quitina (1,2 x 6 cm)
- Cromatografia de afinidade em coluna de goma de guar (1,7 x 6,5 cm)

Todas as matrizes cromatográficas usadas nos procedimentos listados acima, foram equilibradas com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, antes da aplicação de amostra vinda da cromatografia de DEAE-celulose (F_{0-30%}) eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo 3,068 mg de proteína em 400 µL de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. A mesma permaneceu por uma hora em contato com a matriz. Posteriormente, a coluna foi percolada com esse mesmo tampão até completa remoção das proteínas não retidas (pico não retido). A eluição das proteínas retidas nas matrizes foi realizada com 100 mM de ácido acético acrescido de 150 mM de NaCl, pH 3,0. Após zerada leitura a 280 nm, eluição adicional com 100 mM de tampão glicina-NaOH, pH 11, nas colunas de Sepharose 4B-papaína e goma de guar foi realizada. Na cromatografia de afinidade em coluna de goma de guar, a eluição com 100 mM de ácido acético acrescido com 150 mM de NaCl pH 3,0, foi precedida de eluição com 100 mM de galactose. As cromatografias foram realizadas a um fluxo de 1 mL/min, sendo coletadas frações de 2 mL por tubo. Todo procedimento foi monitorado através de leituras das absorvâncias em 280 nm, bem como através de

ensaio de hemaglutinação. As frações eluídas foram reunidas e dialisadas, exaustivamente, contra água destilada e, posteriormente, liofilizadas.

5.3.8 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100

A matriz (95 x 1,6 cm) foi equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, sendo aplicados 2,0 mL desse tampão contendo 5,34 mg de proteína de amostra obtida de fracionamento com sulfato de amônio na faixa de 0-30% seguido de DEAE-celulose. A percolação da coluna se deu com o tampão de equilíbrio a um fluxo de 0,5 mL/min, sendo coletadas frações de 2,5 mL por tubo.

5.3.9 - Cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 acoplada a FPLC

A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, sendo aplicados 0,350 mg de proteína de amostra obtida de fracionamento com sulfato de amônio na faixa de 0-30% seguido de cromatografia de DEAE-celulose. A percolação da coluna foi feita a um fluxo de 0,5 mL/min, em frações de 1,5 mL por tubo.

5.3.10 - Cromatografia hidrofóbica em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (1,2 x 6 cm)

As amostras obtidas de fracionamento com sulfato de amônio na faixa de 0-30% seguido de DEAE-celulose foram resuspensas em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de 420 mM de sulfato de amônio, seguido de centrifugação a 10.000 g por 20 min, a 4 °C. Após equilíbrio da matriz com esse tampão, a amostra foi aplicada, permanecendo em contato com a matriz cromatográfica por uma hora, com leve agitação a intervalos aleatórios. Posteriormente, a coluna foi percolada com esse mesmo tampão até completa remoção das proteínas não retidas (pico não retido). A eluição das proteínas retidas na matriz foi realizada com aplicação seqüencial do tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de 100 mM de sulfato de amônio, seguindo do tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e, posteriormente, água destilada. A cromatografia foi realizada a um fluxo de 1 mL/min, sendo coletados 2 mL por tubo. Todo procedimento foi monitorado através de leituras das absorvâncias em 280 nm,

bem como através de ensaio de hemaglutinação. As frações que encerravam atividade hemaglutinante foram reunidas e dialisadas, exaustivamente, contra água destilada e, posteriormente, liofilizadas.

5.3.11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

As frações obtidas nos passos cromatográficos descritos acima foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para uso em placas. Foram utilizados géis de aplicação com 3,5% e de separação com 12,5%, 15,0% ou 20,0% de acrilamida. As amostras protéicas (3 µg de proteína) foram dissolvidas em tampão de amostra 4x concentrado. O tampão 1x consistia em Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, contendo 2,6% de SDS, 12,6% de glicerol e 0,015% de azul de bromofenol, acrescido ou não de 1% de β-mercaptoetanol. Depois de aquecidas a 100 °C, durante 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g, durante 10 minutos, a 25 °C, e aplicadas no gel. Como marcadores de massa molecular foram utilizados α-lactoalbumina – 14,4 kDa, inibidor de tripsina da soja – 20,1 kDa, anidrase carbônica - 30 kDa; ovoalbumina – 45 kDa, albumina sérica bovina 66 kDa e fosforilase b – 97 kDa. As corridas foram conduzidas a corrente constante de 20 mA por placa. As bandas protéicas foram visualizadas revelando-se o gel com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987).

5.3.12 - Atividade hemaglutinante

A detecção da atividade hemaglutinante foi realizada em placas de micro titulação seguindo-se a metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977). As amostras foram submetidas a diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8...) em NaCl 150 mM ou Tris-HCl 1,0 M, pH 7,5, utilizando esse último quando o pH da amostra a ser analisada era ácido (pH 3,0). A 50 µL de cada diluição, foi adicionado igual volume da suspensão de eritrócitos de coelho a 2%, tratados enzimaticamente com tripsina (0,1 mg/10 mL da solução de eritrócito a 2%), objetivando promover uma maior exposição de grupos de carboidratos e glicoconjugados presentes na superfície externa da membrana plasmática, facilitando o reconhecimento da lectina, e assim,

melhorando a eficiência da aglutinação. As placas foram deixadas em repouso, por, aproximadamente, 12 h à temperatura ambiente. A visualização dos aglutinados foi feita macroscopicamente. Os resultados foram expressos como unidade de hemaglutinação por mL (UH/mL), sendo definida como o recíproco da maior diluição ainda capaz de provocar aglutinação visível a olho nu. A atividade hemaglutinante específica (UH/mg de proteína) em uma fração testada foi obtida dividindo-se a atividade hemaglutinante (UH/mL) pela quantidade de proteína obtida por mL (mg de *próteína/mL*) nessa fração.

5.3.13 - Estabilidade térmica

Para avaliar a estabilidade térmica as amostras foram incubadas a 70, 80 e 90 °C. Alíquotas das amostras incubadas foram retiradas com 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, e 60 min, e submetidas a ensaio de hemaglutinação. Uma amostra não aquecida foi utilizada como controle. Os resultados foram expressos como atividade hemaglutinante residual (UH/mL).

5.3.14 - Avaliação da especificidade lectínica

A especificidade lectínica das amostras frente a açúcares simples e glicoproteínas foi investigada por ensaios de inibição da atividade hemaglutinante. Os ensaios de inibição da hemaglutinação foram realizados através da incubação das amostras em soluções com 200 mM de açúcares simples ou soluções de glicoproteínas. Inicialmente, as soluções de açúcares ou glicoproteínas foram diluídas seriadamente em NaCl 150 mM. A 25 µL de cada diluição, foi adicionado igual volume de amostra a ser analisada, apresentando 4 UH. A incubação foi de 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL da suspensão de hemácias a 2% tratadas com tripsina foram adicionados. As placas foram deixadas em repouso por, aproximadamente, 12 h à temperatura ambiente. A inibição da hemaglutinação foi observada a olho nu.

5.3.15 - Avaliação da dependência de cálcio e manganês para atividade hemaglutinante

Para verificar a dependência de cálcio e manganês na atividade hemaglutinante da *I.asarifolia*, amostra da fração protéica rica em lectina (FPRL), com atividade hemaglutinante conhecida, oriunda de cromatografia em Phenyl Sepharose eluída com 25 mM de Tris-HCl acrescido de 100 mM de sulfato de amônio, pH 7,5, foi dialisada contra 25 mM de Tris-HCl, pH 7,5 contendo 5 mM de EDTA e 5 mM de EGTA. Após diálise, a atividade hemaglutinante foi testada. Num experimento complementar, após tratamento com os agentes quelantes, a amostra foi dialisada contra 25 mM de Tris-HCl pH 7,5, contendo 5 mM de cálcio e 5 mM de manganês, para reposição dos íons. Para assegurar a não existência de quelante residual livre na amostra, o ensaio de hemaglutinação foi realizado acrescentando 50 μ L de solução contendo 150 mM de NaCl acrescido de 10 mM de cálcio e manganês.

5.3.16 - Determinação do efeito do ditioneitol (DTT) na atividade hemaglutinante

Amostras liofilizadas da FPRL, com atividade hemaglutinante conhecida, foram solubilizadas em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo 5, 10, 50 ou 100 mM de DTT. Alíquotas dessas diluições foram submetidas a ensaio de hemaglutinação e SDS-PAGE.

5.3.17 – Análise de compostos secundários na fração protéica rica em lectina

O experimento foi realizado em espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker Avance DPx300, operando a 300 MHz na frequência do ^1H .

Amostra de 5 mg da FPRL foi dissolvida em 0,2 μ L de Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e acrescentados 0,4 μ L de D_2O . A aquisição foi realizada com 256 transientes, com tempo de relaxação de 5 segundos.

5.3.18 - Digestibilidade *in vitro*

A metodologia utilizada para digerir as frações *in vitro* foi baseada na técnica descrita por Sathe (1993).

5.3.18.1 - Digestão por pepsina

Foram utilizados 3,5 mg de FPRL, dissolvidos em 1,75 mL de HCl 0,1 N, pH 1,78. Após estabilização a 37 °C, foram retirados 250 µL de amostra, tempo zero do ensaio. Aos 1,5 mL restantes foram acrescentados 300 µL de uma solução de pepsina (0,1 mg/mL de HCl 0,1 N, pH 1,78) previamente estabilizada a 37 °C, equivalendo a uma relação enzima/fração de 1:100. Mantida essa solução enzima/fração a 37 °C, alíquotas de 300 µL foram retiradas após 1/2, 1, 2, 4 e 6 h da adição da enzima. Metade de cada alíquota retirada (150 µL) foi acrescida, imediatamente, de tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 2%) dez vezes concentrado e aquecida a 100 °C, por 5 min. A outra metade da alíquota (150 µL) foi aquecida a 70 °C/1 h para inativar a enzima, e submetida a ensaio de hemaglutinação. Como controle da ação catalítica da enzima, foi digerida amostra de albumina sérica bovina, na mesma proporção e condições da amostra teste, porém coletadas alíquotas apenas no tempo zero e após 2 h do início da digestão.

5.3.18.2 - Digestão por tripsina e quimotripsina

A metodologia utilizada na digestão pela tripsina e quimotripsina obedeceu à mesma seqüência descrita para o tratamento enzimático pela pepsina, modificando-se, além das enzimas, o tampão utilizado (Tris-HCl 100 mM, pH 8,1, em lugar de HCl 0,1 N).

5.3.19 - Digestibilidade *in vitro* de forma seqüencial

Após estabilização das soluções a 37 °C, 1,0 mg da amostra da FPRL foi dissolvido em 500 µL de solução de pepsina (0,02 mg/mL dissolvido em HCl 0,1 N, pH 1,78) permanecendo incubada a 37 °C, por 2 h. Ao término desse período, foram

retirados 250 μL de amostra, sendo 150 μL acrescidos, imediatamente, de tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 2%) dez vezes concentrado e aquecido a 100 $^{\circ}\text{C}$, por 5 min, e os outros 100 μL acrescidos de igual volume de tampão Tris-HCl 250 mM, pH 8,91, objetivando inativar a pepsina e realizar ensaio de hemaglutinação. Aos 250 μL restantes, foram acrescidos 250 μL de uma solução de tripsina mais quimotripsina (0,02 mg/mL dissolvido em Tris-HCl 250 mM, pH 8,91) previamente estabilizada a 37 $^{\circ}\text{C}$, e permanecendo nessa temperatura por 3 h. As soluções enzimáticas foram preparadas de forma a proporcionar uma relação enzima/amostra de 1:100. Ao término das três horas, à alíquota de 250 μL foi acrescido, imediatamente, tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 2%) dez vezes concentrado, sendo aquecida a 100 $^{\circ}\text{C}$, por 5 min. Dos 250 μL restantes, 50 μL foram submetidos a ensaio de hamaglutinação e os outros 200 μL foram aquecido a 70 $^{\circ}\text{C}$ /1 h para inativar a enzima e, posteriormente, submetido a ensaio de hemaglutinação. Como controle da ação catalítica das enzimas, amostra de albumina sérica bovina foi digerida na mesma proporção e condições da amostra teste, sendo coletadas alíquotas nos mesmos tempos que as amostras teste.

5.3.20 - Avaliação da digestibilidade por eletroforese em gel de poliacrilamida

Para verificar o grau de hidrólise enzimática das proteínas, nos diferentes tempos de exposição, foram montados géis de separação com 15,0% de acrilamida, em tampão Tri-HCl 1,5 M, pH 8,8, contendo SDS 0,1%. As amostras, previamente adicionadas do tampão de amostra (10x concentrado) e aquecidas a 100 $^{\circ}\text{C}$, por 5 min, foram centrifugadas a 10.000 g, por 20 min. Um volume de 17 μL de cada amostra, contendo 30 μg de proteína, foi aplicado em cada poço do gel. A metodologia para eletroforese e os marcadores de massa molecular foram os mesmos descritos anteriormente.

As bandas protéicas foram visualizadas revelando-se o gel com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987).

5.3.21 - Preparo e purificação de anticorpos contra esporamina

Soro imune contra esporamina de *I. batatas* foi obtido a partir de coelhos. Os animais foram, inicialmente, inoculados via intramuscular com emulsão contendo 1,0 mg de esporamina, 0,5 mL de NaCl 150 mM e 0,5 mL de adjuvante completo de Freund. Esse procedimento foi repetido após 21 e 36 dias (1º e 2º reforço), mas através de injeção subcutânea e sem a adição de adjuvante de Freund. Após sete dias do 2º reforço, foi feita a primeira sangria, através de punção com agulha da veia média da orelha e aplicada nova dose de reforço preparada de forma idêntica à anterior. Esse procedimento foi realizado semanalmente até a obtenção de quantidade suficiente de soro imune. A colheita do sangue foi efetuada em tubos de ensaio (10 mL), os quais permaneciam à temperatura ambiente até ocorrer retração do coágulo, quando, então, eram centrifugados e o soro separado e congelado.

As imunoglobulinas foram obtidas por precipitação com sulfato de amônio (a 33% de saturação), durante 12 h. Procedeu-se, então, três diálises alternadas com água e tampão acetato 50 mM, pH 5,0, segundo metodologia descrita por Harboe e Ingild (1973). A última diálise foi feita contra água, após a qual a amostra foi centrifugada (10000 g, por 20 min, 4°C) e o sobrenadante liofilizado.

Para purificar as imunoglobulinas G, o soro imune liofilizado foi resuspenso em Tampão A: 20 mM NaH₂PO₄ e 150 mM NaCl, pH 8,0. Posteriormente, centrifugado a 10000 g, por 20 min, e aplicado em matriz de Agarose-Proteína A. Após 1 h de contato, a coluna foi lavada com o Tampão A, 10 vezes o seu volume. As imunoglobulinas G retidas na coluna foram eluídas com o Tampão B: 200 mM Na₂HPO₄ e 100 mM ácido cítrico, pH 3,0, três vezes o volume da coluna. A fração eluída foi neutralizada com 100 mM NaOH e, posteriormente, dialisada contra água destilada e liofilizada.

5.3.22 - Western Blot

A existência de identidade entre a esporamina de *I. batatas* e as lectinas de *I. asarifolia* foi investigada por *Western Blot*.

O estudo dessas relações imunológicas foi feito usando a metodologia descrita por Towbin *et al.* (1979), com modificações descritas a seguir. Após eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, as proteínas foram transferidas para

membrana de PVDF em uma unidade de transferência, usando como tampão Tris-HCl 25 mM/glicina 182 mM, pH 8,3, metanol 10%, e SDS 0,1%. A eletrotransferência foi feita a corrente constante de 80 mA, por 1,5 h. Após a eletrotransferência, a membrana foi bloqueada por 17 horas, sob agitação orbital constante, em tampão base contendo Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, acrescido de 150 mM de NaCl, 0,05% de Tween-20 (v/v), 100 mM de glicose, 5% de leite desnatado (m/v) e 50 UI/mL de gonadotrofina coriônica humana (hCG), à temperatura ambiente (25 °C). A composição de carboidratos no hCG é semelhante à da fetuína (BLITHE e ILES, 1995; RATHNAM e SAXENA, 1980). Diante da capacidade do hCG em inibir a hemaglutinação na FPRL e da disponibilidade desse hormônio no Laboratório, utilizou-se o mesmo para bloquear o sítio de ligação a carboidrato das lectinas presentes na FPRL. Ao término do período de bloqueio, a membrana foi imersa no mesmo tampão acrescido de anticorpo primário (IgG de coelho anti-esporamina), diluído 1:50, por 2 h, sob agitação orbital constante. Em seguida, a membrana foi lavada 5 vezes com o tampão base, a intervalos de 10 min cada lavagem. Ao final, foi imersa no tampão base, agora acrescido do anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada com fosfatase alcalina), diluído 1:20000, por 2 h, sob agitação orbital constante. Em seguida, a membrana foi lavada 5 vezes com o tampão base, a intervalos de 10 min cada lavagem. Por fim, a reação foi visualizada após a adição do substrato para revelação da fosfatase alcalina, composto de um tablete de BCIP/NBT (Sigma *FAST_{TM}*). Após o desenvolvimento da cor, a membrana foi lavada com água grau milli-Q. Todo o processo foi realizado à temperatura ambiente (25 °C).

5.3.23 - Determinação da seqüência de aminoácidos *N*-terminal

A seqüência de aminoácidos *N*-terminal das bandas presentes na FPRL foi determinada através da degradação de Edman utilizando-se seqüenciador automático de proteínas (Shimadzu, modelo PPSQ-21/23). Para tanto, amostra da FPRL acrescida de 5 mM de DTT foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo SDS e, em seguida, eletrotransferida para membrana de PVDF em uma unidade de transferência, usando como tampão Tris-HCl 25 mM/glicina 182 mM, pH 8,3, metanol 10%, e SDS 0,1%. A eletrotransferência foi feita a corrente constante de 80 mA, por 1,5 h. Ao término, a membrana foi saturada com metanol 100% e, em seguida, lavada com água grau milli-Q e corada com “Coomassie Brilliant Blue” R-

250 0,1% em metanol 50% e ácido acético 10%, por 15 minutos. Decorrido esse tempo, a membrana foi descorada com uma solução de metanol 50% e ácido acético 10%, tendo sido trocada várias vezes até a visualização das bandas protéicas. As bandas correspondente à 44 kDa, 23 kDa e a 20,1 kDa foram recortadas da membrana, lavadas várias vezes com água grau milli-Q e submetidas à determinação de sua seqüência de aminoácidos *N*-terminal. As seqüências obtidas foram submetidas ao alinhamento automático em bancos de dados de proteínas (<http://www.expasy.ch> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

5.3.24 - Atividades biológicas da fração rica em lectina

5.3.24.1 - Avaliação da toxicidade aguda após administração pela via intra-orbital

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada em camundongos pesando entre 15,5 –20,5 g. A existência de atividade tóxica aguda foi considerada quando se observou alterações no comportamento ou morte dos camundongos, no período de 1 h após injeção intra-orbital da amostra testada.

5.3.24.2 - Bioatividade em canal deferente de camundongos

Amostras de *Lasarifolia* foram investigadas quanto à atividade na junção neuromuscular autonômica adrenérgico-purinérica de canal deferente de camundongos, seguindo metodologia descrita por Hughes *et al.* (1975).

Camundongos Swiss, albinos, pesando entre 38 e 42 g, foram sacrificados por deslocamento cervical e os canais deferentes rapidamente removidos. Um segmento de aproximadamente 1 cm de comprimento, livre de tecido adiposo e conjuntivo aderentes, bem como de vasos sanguíneos, foi retirado da porção prostática de um dos canais. O tecido foi montado sob tensão de repouso de 0,3 g, em uma cuba orgânica de 5 mL de volume, contendo solução de Krebs livre de Mg^{2+} , pH 7,4, com a seguinte composição: NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, $CaCl_2$ 2,54 mM, KH_2PO_4 0,93 mM, $NaHCO_3$ 24 mM, glicose 11 mM, EDTA 0,027 mM, ácido ascórbico 0,1 M. O meio foi mantido a 37 °C e aerado com 95% de O_2 e 5% de CO_2 .

Os nervos intramurais foram estimulados por campo elétrico produzido por pulsos simples retilíneos (voltagem supramáxima, duração de 1 ms, frequência de

0,1 Hz) entre dois eletrodos de platina em forma de anéis, situados acima e abaixo do tecido isolado. As contrações longitudinais foram registradas através da fixação da extremidade superior do tecido a um transdutor de força isométrico, o qual foi conectado a um amplificador e esse a um registrador. Cada preparação foi previamente padronizada quanto à sua sensibilidade, utilizando-se 10 μM de morfina (agonista opióide) e, posteriormente, seu antagonista (naloxone, 10 μM). Em seguida, a preparação foi lavada por um período de 15 min, durante o qual o conteúdo da câmara foi completamente substituído a cada 5 min de intervalo. Foram utilizadas para teste amostras de extrato bruto nas concentrações de 2,5; 7,5; 25,0; 75,0; 250,0 e 750,0 $\mu\text{g/mL}$, e amostras da FPRL nas concentrações de 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100,0 e 300,0 $\mu\text{g/mL}$, ambas adicionadas de maneira cumulativa à preparação. O efeito de cada dose foi registrado por um intervalo de 10 min. Ao final de cada experimento, prosseguia-se lavagem do sistema, a fim de ver a reversibilidade das alterações, bem como para confirmar a responsividade da preparação frente à morfina 10 μM . O efeito de cada concentração testada foi expresso como percentual de variação da contração, considerando-se a amplitude da contração imediatamente anterior à adição das amostras.

5.3.24.3 - Bioatividade em rim isolado de ratos

Ratos Wistar, adultos, machos, pesando entre 240 e 300 g, foram mantidos em jejum por 24 h antes dos experimentos e com fornecimento de água *ad libitum*.

O sistema utilizado consistiu na perfusão de rim isolado com recirculação (FONTELES *et al.*, 1983) com dois subsistemas, um *in situ* e outro em circuito fechado, para perfusão *in vitro*, mantidos ambos à mesma temperatura de 37 °C. Esse sistema apresenta a vantagem da manutenção constante de parâmetros funcionais renais com utilização de albumina na solução perfusora, em menor volume, mantendo constante as substâncias dialisáveis com oxigenação adaptada ao próprio sistema.

O sistema foi calibrado sempre antes do início dos experimentos, com o objetivo de conhecer o fluxo de perfusão em face da resistência da própria cânula. Foi avaliado em cada uma das cinco bombas a pressão de perfusão (PP) em mmHg, o fluxo urinário (L/h) e o volume de urina coletado em um minuto (mL/min).

A solução perfusora utilizada foi Krebs-Henseleit, pH 7,4, contendo: NaCl 114 mM; KCl 4,96 mM; CaCl₂.2H₂O 2,1 mM; KH₂PO₄ 1,24 mM; MgSO₄.7H₂O 0,5 mM; NaHCO₃ 24,99 mM; e glicose 3,60 mM. Por fim, a solução perfusora foi acrescida de 6,0% de albumina sérica bovina e dialisada por 48 horas antes dos experimentos para retirar substâncias contaminantes como citrato, piruvato, lactato (HANSON e BALLARD, 1968). Ao final da diálise, 0,5 mg/mL de inulina, um polímero de frutose utilizado como marcador de filtração glomerular, foi acrescentado. A solução foi mantida a 37 °C e aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/Kg de peso corporal. Inicialmente, foi isolada a veia femoral e administrados 3 mL de manitol a 20%, objetivando facilitar o acesso cirúrgico e a fixação da cânula ao ureter.

Após assepsia da parede abdominal, foi realizada incisão mediana e duas incisões perpendiculares à linha alba para uma melhor visualização das estruturas anatômicas. Com o auxílio de uma lupa (7X), a artéria mesentérica superior foi identificada e dissecada, bem como o ureter. O rim direito foi descapsulado. A cânula renal foi introduzida na artéria mesentérica superior até a artéria renal, onde foi feita a fixação da cânula.

No início do procedimento cirúrgico, uma parte da solução perfusora de Krebs-Henseleit, pH 7,4 (40 mL) foi desviada para o sistema de perfusão *in situ*, já oxigenada, para perfundir o rim ainda *in vivo*, evitando qualquer isquemia do órgão. Finalmente, o rim foi transportado para o sistema de perfusão *in vitro*, sem interrupção do fluxo.

Os experimentos foram iniciados após a estabilização e adaptação do órgão às novas condições. Os 30 min iniciais foram utilizados como controle interno do sistema. Após esse período, a FPRL de *I. asarifolia*, na concentração de 10 µg/mL (n=4) foi adicionada. O uso dessa dose se baseou em trabalhos anteriores que utilizaram lectinas vegetais em experimentos de perfusão renal (TEIXEIRA *et al.*, 2001; HAVT *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2005). A cada cinco minutos, foram registrados a pressão de perfusão e o fluxo de perfusão em manômetro e fluxômetro, respectivamente, em um período total de 120 min. As amostras de urina e perfusato foram coletadas a cada 10 min e, depois, congeladas a -20 °C para posterior dosagem de sódio, potássio, cloreto, inulina e osmolaridade, importantes na determinação dos parâmetros de função renal. As dosagens de sódio, potássio, cloreto foram realizadas

em aparelho AVL-9180 Electrolyte Analyzer utilizando Kit AVLAB Ise Pak (ref DP 5186) da Diagnostics. A inulina foi determinada por hidrólise direta, conforme metodologia descrita por Walser *et al.* (1955), modificada por Fonteles *et al.* (1983). A osmolaridade foi medida em osmômetro (Wescor, modelo 5100c).

A seguir, são apresentadas as fórmulas utilizadas para determinação dos parâmetros funcionais renais (MARTINEZ-MALDONADO *et al.*, 1978; FONTELES, 1980).

➤ $FU \text{ (mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \text{Fluxo Urinário}$

$FU = \text{Peso do volume urinário/Peso do rim esquerdo} \times 10$

➤ $PP \text{ (mmHg)} = \text{Pressão de perfusão}$

* Obtida diretamente através da análise em manômetro de mercúrio.

➤ $FPR \text{ (mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \text{Fluxo plasmático renal ou fluxo de perfusão}$

* Fluxo registrado a cada 10 min/intervalo de tempo x Peso do rim.

➤ $RVR \text{ (mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \text{Resistência vascular renal}$

$RVR = PP \text{ (mmHg)/FPR}$

➤ $RFG \text{ (mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \text{Ritmo de filtração glomerular}$

$RFG = \text{DOU}_{in} / \text{DOP}_{in} \times FU$

$\text{DOU}_{in} = \text{Densidade ótica da inulina na urina}$

$\text{DOP}_{in} = \text{Densidade ótica da inulina no perfusato}$

➤ $\text{FNa}^+ \text{ (}\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \text{Sódio filtrado}$

$\text{FNa}^+ = RFG \times \text{PNa}^+$

$\text{PNa}^+ = \text{Concentração de sódio no perfusato}$

➤ $\text{ENa}^+ \text{ (}\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \text{Sódio excretado}$

$\text{ENa}^+ = FU \times \text{UNa}^+$

$\text{UNa}^+ = \text{Concentração de sódio na urina}$

➤ $TNa^+ = (\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Sódio transportado}$

$$TNa^+ = FNa^+ - ENa^+$$

➤ $\%TNa^+ = \text{Percentual de sódio transportado}$

$$\%TNa^+ = TNa^+ \times 100/FNa^+$$

➤ $Cosm (mL.g^{-1}.min^{-1}) = \text{Clearance osmótico}$

$$Cosm = (Uosm/Posm) \times FU$$

Uosm = Osmolaridade Urinária

Posm = Osmolaridade do perfusato

Todos os cálculos que foram realizados para a determinação dos parâmetros do sódio, acima citados, foram repetidos para o potássio e o cloro.

Ao final de cada experimento, um fragmento longitudinal do rim perfundido (direito) e não perfundido (esquerdo) foi retirado e colocado em formol a 10%, para posterior exame histológico.

5.3.25 - Marcação das proteínas da fração rica em lectina com FITC

O isotiocianato de fluoresceína (FITC) é um fluorocromo que tem a capacidade de reagir com os grupamentos aminas, sendo dessa forma amplamente utilizados no preparo de proteínas fluorescentes conjugadas.

Foram pesados 5,0 mg da fração protéica rica em lectina (FPRL) e solubilizada em 1,0 mL do tampão carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,5. Posteriormente, foi acrescentado 1,0 mg de FITC, ficando a mistura por 1,5 h sob agitação, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (25 °C). Ao término do período de incubação, a amostra foi centrifugada e aplicada em coluna de exclusão molecular Hitrap desalting, previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Após desprezados os primeiros 1,5 mL, 2,5 mL foram recuperados, em fluxo de 0,5 mL/min. A fração recuperada foi dividida em alíquotas de 500 µL e congelada a -20 °C até uso.

5.3.26 - Marcação da zona pelúcida com proteínas da fração rica em lectina conjugadas ao FITC

Ovários de cabras obtidos no abatedouro da Embrapa Caprinos foram isolados e congelados. Após descongelação, os ovários foram mantidos em NaCl 150 mM e os folículos puncionados com auxílio de seringa. Os complexos *cumulus*-ovócito foram separados em placa de Petri e transferidos para tubos tipo eppendorf, onde, sob agitação em vortex, por 3 min, foram desnudos. Os ovócitos desnudos foram lavados em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina. Depois de descongelada a solução contendo as proteínas da FPRL conjugadas ao FITC, os ovócitos foram transferidos para essa, onde, após duas lavagens sucessivas com novas gotas dessa solução, foram deixados em contato com a mesma por 30 min, à temperatura ambiente. Ao término do período, foram lavados novamente com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina, e levados para análise em microscópio óptico em campo claro e sob luz fluorescente.

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 - Protocolo de purificação da lectina de *I. asarifolia* estabelecido por Santos (2001)

Para determinar a fração protéica a ser testada nos ensaios biológicos, buscou-se, inicialmente, seguir o protocolo já estabelecido por Santos (2001), através do qual Santos (2001) purificou uma proteína com atividade hemaglutinante, com afinidade à fetuína e com massa molecular aparente de 44 kDa.

O protocolo consistiu na obtenção do extrato bruto de folhas de I. asarifolia previamente lavadas, secadas, mergulhadas em nitrogênio líquido, picotadas e maceradas. A extração foi feita sob agitação por duas horas, a 4°C, na presença do tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de PVPP 3%, DTT 5 mM e ácido ascórbico 5 mM, na proporção de 1:3 (m:v). O extrato foi filtrado em pano de trama fina, centrifugado a 10.000 g, por 30 min e, então, submetido à precipitação com sulfato de amônio sólido no intervalo de 0-30%. Após diálise contra Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, a fração 0-30% foi aplicada em coluna de DEAE-celulose, previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. A coluna foi, então, percolada com esse mesmo tampão até completa remoção das proteínas não retidas. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido com 600 mM de NaCl. A fração protéica eluída foi dialisada contra água destilada e liofilizada. Após resuspensa em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e centrifugada a 10.000 g, por 20 min, a fração foi aplicada em coluna de afinidade Sepharose 4B-fetuína, previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. A amostra foi deixada em contato com a matriz por 1 h, sendo percolada com o mesmo tampão até completa remoção das proteínas não retidas. Em seguida, procedeu-se a eluição das proteínas retidas com solução tamponada de glicina-HCl 50 mM, contendo NaCl 150 mM, pH 2,6. O fluxo nas duas cromatografias foi de 1 mL/min, sendo recuperados 3 e 2 mL por fração, respectivamente. O monitoramento da presença de proteína nas frações foi realizado através de leitura em espectrofotômetro a 280 nm.

Embora se tenha, inicialmente, conseguido obter leitura a 280 nm na fração retida na coluna de Sepharose 4B-fetuína, a natureza pigmentada da fração provinda da DEAE-celulose foi aos poucos danificando a capacidade de retenção da coluna. Como apenas preparar uma nova coluna não resolveria o problema, alternativas foram tentadas para despigmentar as frações que antecederiam a cromatografia em Sepharose 4B-fetuína.

6.2 - Despigmentação das folhas de *Lasarifolia* antes da extração

A despigmentação das folhas com uma solução de etanol:clorofórmio 3:1 (v:v), foi atingida com sucesso. A lectina permaneceu ativa após o tratamento, apresentando atividade específica de 44,44 UH/mg de proteína, bem próxima da amostra controle (50,2 UH/mg de proteína). No entanto, ao se avaliar o rendimento das frações após despigmentação das folhas, extração, precipitação com sulfato de amônio (0-30%) e cromatografia em DEAE-celulose, apenas foi possível a obtenção de 0,03 mg proteína/100 g de farinha de folhas despigmentadas, enquanto na amostra controle foram obtidas 14 mg proteína/100 g de farinha.

Em associação à atividade hemaglutinante e ao rendimento protéico, o perfil eletroforético foi, também, avaliado. Foi observada ausência da banda associada à lectina, correspondendo a 44 kDa (FIGURA 2, seta). Esses achados foram decisivos para abandonar essa alternativa de despigmentação.

Quanto à persistência de atividade hemaglutinante nessa preparação protéica, mesmo na ausência da banda de 44 kDa, foi cogitada, a possibilidade da existência de uma outra proteína com atividade hemaglutinante em folhas de *Lasarifolia*, posteriormente sugerida ser a banda de 20,1 kDa (FIGURA 2, seta).

A título de curiosidade foi verificada a presença de lectina nas sementes de *Lasarifolia* a partir da extração de proteínas com o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5, na proporção de 1:10 (m:v). Observou-se uma fraca atividade específica nesse material, 0,24 UH/mg de proteína.

6.3 - Redução na concentração do NaCl no tampão de eluição da DEAE-celulose

Até então, o tampão de eluição estabelecido anteriormente por Santos (2001) para eluição da Fração 0-30% em coluna de DEAE-celulose, ou seja, tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo 600 mM de NaCl, vinha sendo utilizado nesse presente trabalho. Ao se testar, alternativamente, a eluição seqüencial com duas concentrações inferiores de NaCl, ou seja, 200 mM e 400 mM, dois picos bem pronunciados foram obtidos: um com máximo de absorção superior a 3000 e o outro com 2684 unidades, respectivamente, lidos a 280 nm. Após essa eluição seqüencial, nenhum outro pico de proteína emergiu quando a coluna foi percolada utilizando o tampão Tris-HCl

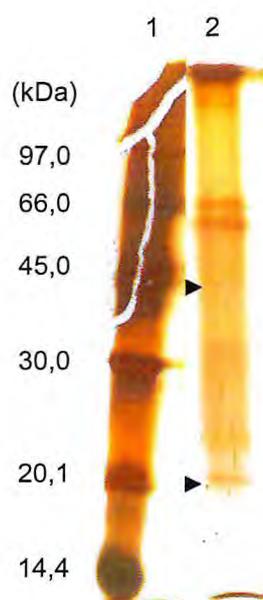


FIGURA 2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS, de amostra de extrato bruto (linha 2) em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5, oriunda de folhas despigmentadas de *Ipomoea asarifolia*. Linha 1 - Marcadores de massa molecular (α -lactoalbumina – 14,4 kDa, inibidor de tripsina da soja – 20,1 kDa, anidrase carbônica - 30 kDa; ovoalbumina – 45 kDa, albumina sérica bovina 66 kDa e fosforilase b – 97 kDa). As bandas foram reveladas com prata. Setas indicam ausência da banda de 44 kDa e presença da banda de 20,1 kDa. Aplicados 2 μ g de proteína.

contendo 600 mM de NaCl (FIGURA 3). Quando a atividade hemaglutinante dos dois picos protéicos obtidos foi avaliada, somente no pico eluído com 200 mM de NaCl foi detectada a presença de lectina.

Buscando ver se era possível obter fração ainda menos pigmentada, foram testadas concentrações inferiores a 200 mM de NaCl, ou seja, 50 mM e 100 mM de NaCl, sendo obtidos dois picos com eluição nessas concentrações (FIGURA 4). A atividade hemaglutinante se fez presente nos dois picos e não foi possível, após a eluição com 100 mM de NaCl, zerar a leitura a 280 nm, nem tampouco a atividade hemaglutinante. Dessa forma, a concentração de 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, mostrou-se a mais apropriada para se obter uma fração menos pigmentada e detentora de atividade hemaglutinante.

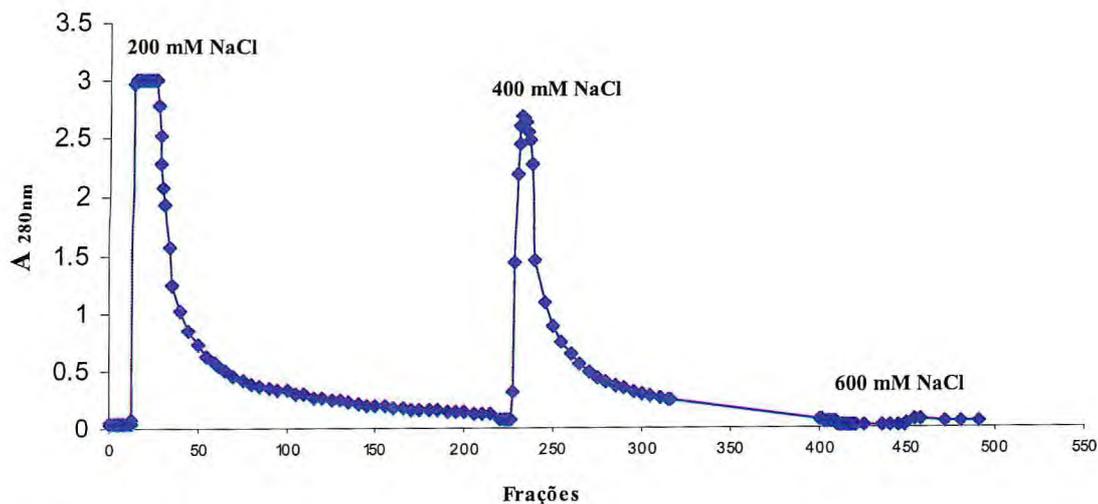


FIGURA 3 – Cromatografia em coluna de DEAE-celulose. Amostra da $F_{0-30\%}$ (185 mg de proteína) oriunda do extrato protéico de folhas não despigmentadas de *Ipomoea asarifolia* precipitado com sulfato de amônio (0-30%) foi aplicada em coluna de DEAE-celulose (2,9 x 7,5 cm) previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo diferentes concentrações de NaCl (200 mM; 400 mM e 600 mM). Fluxo: 1 mL/min; fração: 3 mL.

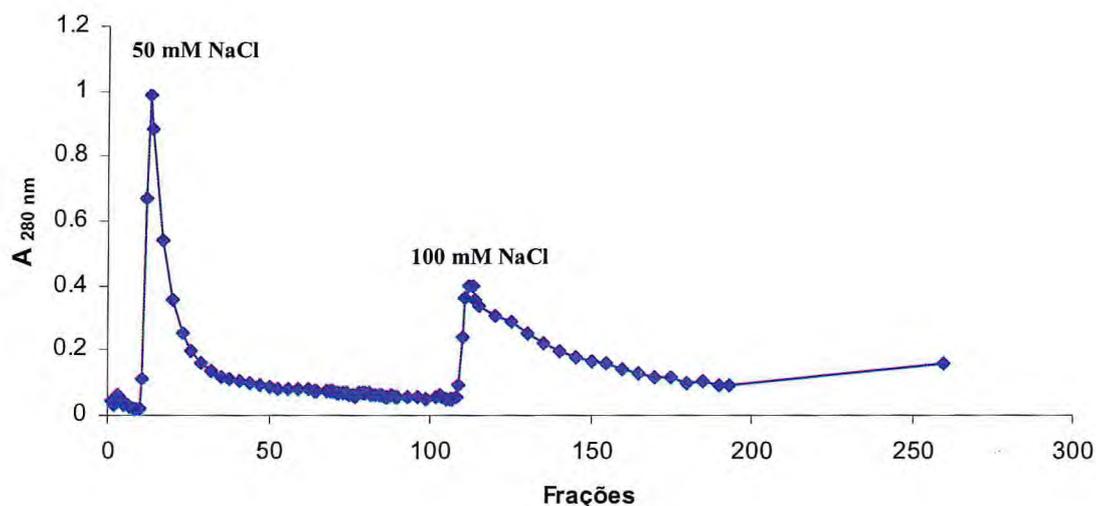


FIGURA 4 – Cromatografia em coluna de DEAE-celulose. Amostra da $F_{0-30\%}$ (100 mg de proteína) oriunda do extrato protéico de folhas não despigmentadas de *Ipomoea asarifolia* precipitado com sulfato de amônio (0-30%) foi aplicada em coluna de DEAE-celulose (2,9 x 7,5 cm) previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo diferentes concentrações de NaCl (50 mM e 100 mM). Fluxo: 1 mL/min; fração coletada: 3 mL.

6.4 – Avaliação do perfil eletroforético e hemaglutinante de amostras submetidas a diferentes colunas cromatográficas

Estabelecida a melhor estratégia a ser seguida para obtenção do extrato bruto e da fração protéica vinda da coluna de DEAE-celulose, foram empregadas outras cromatografias, além da Sepharose 4B-fetuína, buscando uma fração protéica rica em lectina (FPRL) com alta repetibilidade de obtenção, rendimento aceitável e com menor taxa de contaminação por outras proteínas.

Para tanto, foram testadas cromatografias em colunas de Sepharose 4B-tripsina, quitina, Sepharose 4B-papaína, Goma de guar, Sepharose 4B-Con-A/Con-Br, cromatografias de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-100 e em Superose 12, bem como cromatografia hidrofóbica em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast Flow.

Inicialmente, alíquotas de uma mesma fração protéica obtida na DEAE-celulose, eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, com igual quantidade de proteína (3,068 mg), foram submetidas, individualmente, às cromatografias de afinidade descritas acima.

Avaliando as cromatografias de afinidade realizadas, através dos ensaios de hemaglutinação, foi observada atividade hemaglutinante em todas as frações protéicas retidas e eluídas com 100 mM de ácido acético acrescido de 150 mM de NaCl (TABELA 1). No entanto, a banda protéica correspondente a 44 kDa, que se refere à lectina purificada por Santos (2001), estava presente apenas nas frações adsorvidas nas colunas de Sepharose 4B-fetuína, na coluna de quitina e na Sepharose 4B-papaína (FIGURAS 5, setas; e FIGURA 6). Dessas, a coluna de Sepharose 4B-papaína foi a que mostrou melhor grau de purificação da banda correspondente a 44 kDa (FIGURA 5, linha 12). Em adição, quando eluída com 100 mM de glicina, pH 11, a coluna de Sepharose 4B-papaína proporcionou a obtenção de uma única banda a 44 kDa (FIGURA 5, seta linha 13).

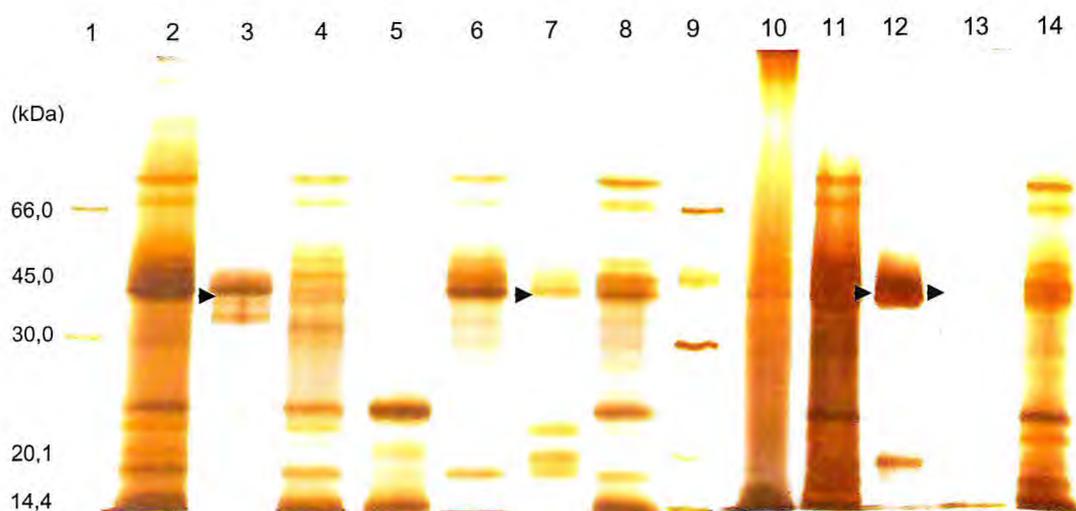


FIGURA 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS, de amostra submetida às cromatografias de afinidade, obtida a partir de coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (linhas 2 e 11), do pico retido em Sepharose 4B-fetuína eluído com 100 mM de ácido acético acrescido de 150 mM de NaCl, pH 3,0 (linha 3), de pico não retido em Sepharose 4B-fetuína (linha 4), de pico retido em Sepharose 4B-tripsina eluído com 100 mM de ácido acético acrescido de 150 mM de NaCl, pH 3,0 (linha 5), de pico não retido em Sepharose 4B-tripsina (linha 6), de pico retido em coluna de quitina eluído com 100 mM de ácido acético acrescido de 150 mM de NaCl, pH 3,0 (linha 7), de pico não retido em coluna de quitina (linha 8), de extrato bruto de folhas pigmentadas (linha 10), de pico retido Sepharose 4B-papaína eluído com 100 mM de ácido acético acrescido de 150 mM de NaCl, pH 3,0 (linha 12), de pico retido em Sepharose 4B-papaína eluído com 100 mM de glicina, pH 11 (linha 13), de pico não retido em Sepharose 4B-papaína (linha 14), e de marcadores de massa molecular (linhas 1 e 9). As bandas foram reveladas com prata. As setas indicam a banda de 44 kDa. Aplicados 3 µg de proteína/poço.

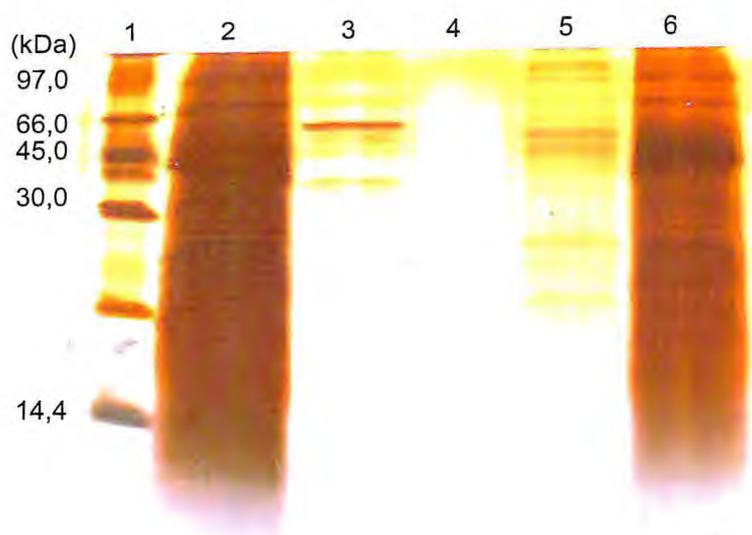


FIGURA 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (20,0%), na presença de SDS, de amostra submetida à cromatografia de afinidade em goma de guar, obtida a partir de coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (linha 2), do pico retido na coluna de goma de guar eluído com 100 mM de galactose (linha 3), do pico retido na coluna de goma de guar eluído com 100 mM de ácido acético acrescido de 150 mM de NaCl, pH 3,0 (linha 4), do pico retido na coluna de goma de guar eluído com 100 mM de glicina, pH 11 (linha 5), do pico não retido na coluna de goma de guar (linha 6), e de marcadores de massa molecular (linha 1). As bandas foram reveladas com prata. Aplicados 3 µg de proteína por poço.

Com poucas exceções, a maioria das lectinas são glicoproteínas cujo conteúdo de carboidratos pode chegar a mais de 50% da sua massa molecular (SHARON e LIS, 1989). Santos (2001) observou ser a lectina de 44 kDa uma glicoproteína contendo 4,4% de carboidratos, sendo 29,2% de manose, 27% de fucose, 23,6% de *N*-acetil-D-glicosamina e 20,2% de xilose. Tentando tirar proveito da presença de glicose e manose na constituição da lectina, cromatografia de afinidade em Sepharose 4B-ConA/ConBr de fração obtida em DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, foi realizada.

A fração protéica adsorvida na coluna de Sepharose 4B-ConA/ConBr, após eluição com 100 mM de ácido acético contendo 150 mM de NaCl, apresentou atividade hemaglutinante (TABELA 1), contudo, a banda protéica correspondente à massa molecular de 44 kDa estava ausente (FIGURA 7), sendo detectada presença de uma banda protéica à altura do marcador de 20,1 kDa (FIGURA 7, setas indicativas). Esta observação reforçou a hipótese, já levantada anteriormente, da presença de uma outra lectina nas folhas de *I. asarifolia*. Foi proposto que pudesse ser essa molécula com massa molecular aparente de 20,1 kDa e que pelo fato da mesma ter ficado retida na coluna de Sepharose 4B-ConA/ConBr, essa possa a ser uma glicoproteína.

Reavaliando o gel de eletroforese correspondente a extrato do experimento de despigmentação das folhas com etanol-clorofórmio, foi possível constatar também a presença de uma banda à altura de 20,1 kDa (FIGURA 2, seta indicativa), fato que pode explicar a detecção de atividade hemaglutinante nessa amostra, mesmo estando ausente a banda de 44 kDa. Associado a esse achado, uma amostra obtida de coluna de DEAE-celulose, após eluição com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM pH 7,5, submetida a cromatografia de afinidade em Sepharose 4B-fetúina (FIGURA 8), resultou na purificação de uma proteína com atividade hemaglutinante e massa molecular em torno de 20,1 kDa (FIGURA 9, linha 1). Após transferência desta banda protéica para membrana de PVDF e seqüenciamento automático da porção *N*-terminal, 20 resíduos de aminoácidos foram obtidos – AGYTPVLDIGAEVLAAGEPY. Análise desta seqüência em banco de dados (www.expasy.ch) revelou 72% de identidade desta proteína com um precursor da esporamina B, uma proteína de estocagem de tubérculo

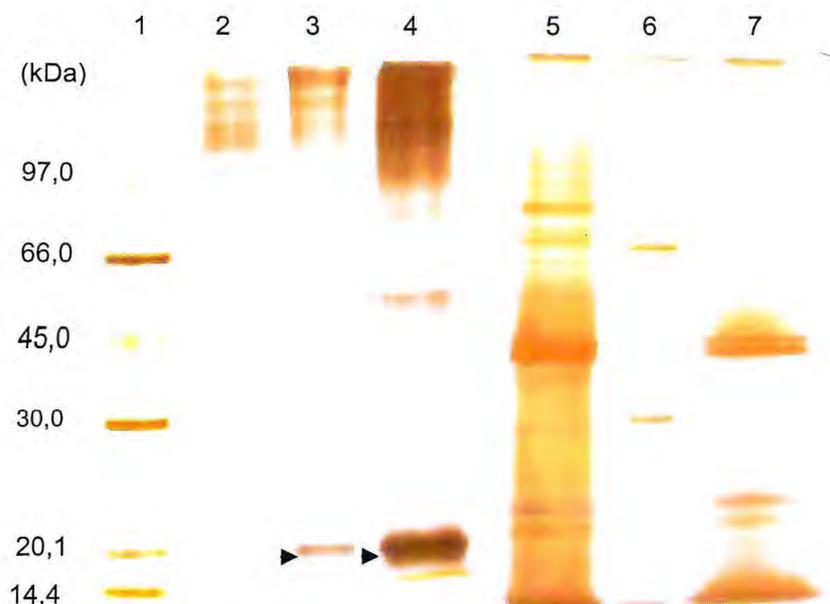


FIGURA 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS, de amostra submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-ConA/ConBr, obtida a partir de coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (linha 5), de frações obtidas em coluna de Sepharose 4B-ConA/ConBr após eluição com 100 mM de ácido acético acrescido de 150 mM de NaCl, pH 3,0 (linhas 2, 3 e 4), de pico não retido em coluna de Sepharose 4B-ConA/ConBr (linha 7), e de marcador de massa molecular (linhas 1 e 6). As bandas foram reveladas com prata. Setas indicam banda de 20,1 kDa. Aplicados 3 µg de proteína por poço.

TABELA 1 – Atividade específica e rendimento das cromatografias de afinidade

Cromatografias	UH/mg de proteína	µg de proteína*
Sepharose 4B-fetúína ¹	36,0	109,9
Sepharose 4B-tripsina ¹	459,8	278,4
Quitina ¹	1269,5	403,3
Sepharose 4B-papaína ¹	629,9	50,8
Sepharose 4B-papaína ²	174,7	68,7
Goma de guar ³	41,6	50,0
Goma de guar ¹	298,5	50,0
Goma de guar ²	125,6	60,0
Sepharose 4B-ConA/ConBr ¹	3018,30	202,1

* µg de proteína recuperada após eluição.

¹ Eluída com 100 mM de ácido acético acrescido de 150 mM de NaCl, pH 3,0.

² Eluída com 100 mM de glicina, pH 11.

³ Eluída com 100 mM de galactose.

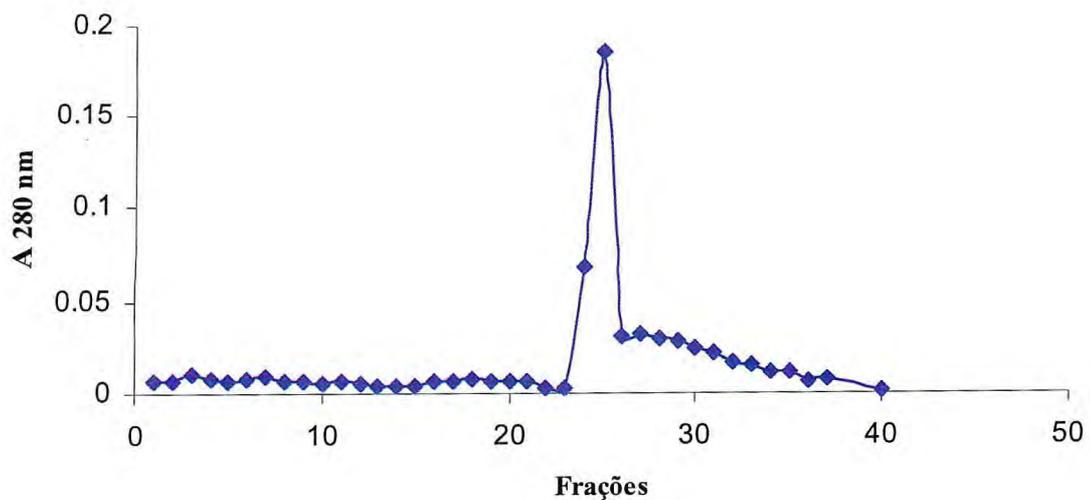


FIGURA 8 – Cromatografia em coluna de Sepharose 4B-fetuína. Amostra (15,34 mg de proteína) obtida a partir de coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, foi aplicada em coluna de Sepharose 4B-fetuína (1,7 x 6,5 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As proteínas retidas foram eluídas com 100 mM de ácido acético acrescido de 150 mM de NaCl, pH 3,0. Fluxo: 1 mL/min; fração coletada: 2 mL.



FIGURA 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS, de pico retido em coluna de Sepharose 4B-fetuína eluído com 100 mM de ácido acético acrescido de 150 mM de NaCl, pH 3,0 e de marcadores de massa molecular (linha 2). As bandas foram reveladas com prata. Seta indica banda de 20,1 kDa. Aplicados 3 µg de proteína.

de batata doce, *Ipomoea batatas* (SHEWRY, 2003), formada por 216 resíduos de aminoácido, sendo observada a similaridade entre os resíduos 39 e 55. O perfil cromatográfico, com uma única banda à eletroforese, não se repetiu após outras cromatografias realizadas na coluna de Sepharose 4B-fetuína.

A utilização da coluna de afinidade Sepharose 4B-tripsina se baseou nos achados obtidos a partir do seqüenciamento da banda protéica de 20,1 kDa. Na literatura, é atribuída à esporamina atividade de inibidor de tripsina (YEH *et al.*, 1997). Buscando isolá-la da outra banda com atividade hemaglutinante, foi testada essa cromatografia. Embora haja a separação das duas bandas entre o pico retido e o não retido, no material protéico advindo da DEAE-celulose após eluição com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM pH 7,5, existem outras proteínas com afinidade à tripsina além da proteína de 20,1 kDa (FIGURA 5, linha 5), fato que inviabiliza a purificação dessa proteína de 20,1 kDa utilizando apenas essa matriz.

Baseado nos resultados obtidos nas cromatografias de afinidade avaliadas por eletroforese, foi selecionada a cromatografia de afinidade Sepharose 4B-papaína para compor o protocolo de isolamento da fração protéica rica em lectina, após a amostra da F_{030%} ser submetida à coluna de DEAE-celulose e eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. No entanto, após várias cromatografias utilizando essa coluna, a capacidade de retenção da lectina pela coluna Sepharose 4B-papaína foi reduzida até não mais se obter pico retido. Foi descartada então a utilização de cromatografias de afinidade e se buscou outras cromatografias, como a de exclusão molecular. Inicialmente, a Sephadex G-100 foi testada. Essa coluna tem, teoricamente, a capacidade de separar entre si moléculas com massa molecular inferior a 150 kDa. No entanto, os picos 1, 2 e 3 obtidos (FIGURA 10), advindos a partir de amostra de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM pH 7,5, apresentaram, todos, tanto atividade hemaglutinante como a presença da banda correspondente a 44 kDa (FIGURA 11, setas indicativas).

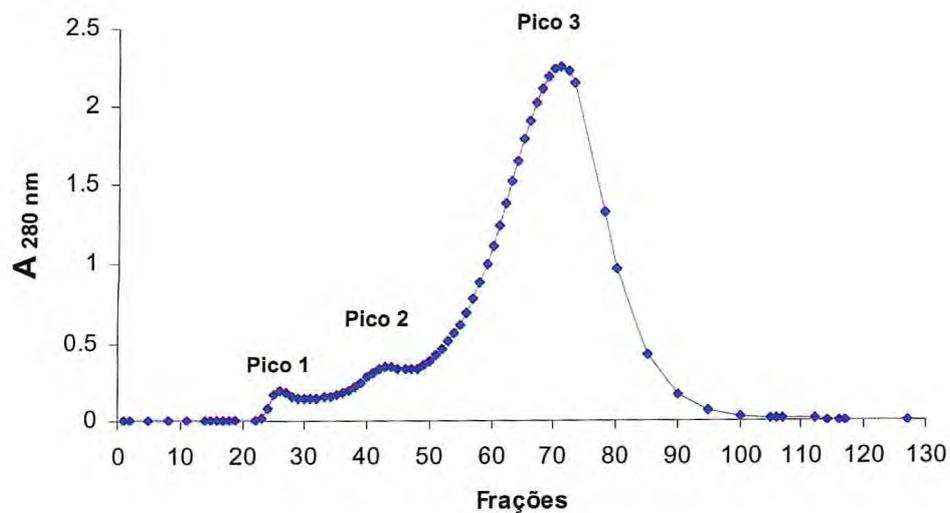


FIGURA 10 – Cromatografia em coluna de exclusão molecular Sephadex G-100. A amostra aplicada na coluna de Sephadex G-100 foi obtida a partir de coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. A coluna Sephadex G-100 (1,6 x 95 cm) foi previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e, após aplicação da amostra (5,34 mg de proteína), percolada o mesmo tampão, dando origem a três picos (Pico 1, 2 e 3). Fluxo: 0,5 mL/min; fração coletada: 2,5 mL.

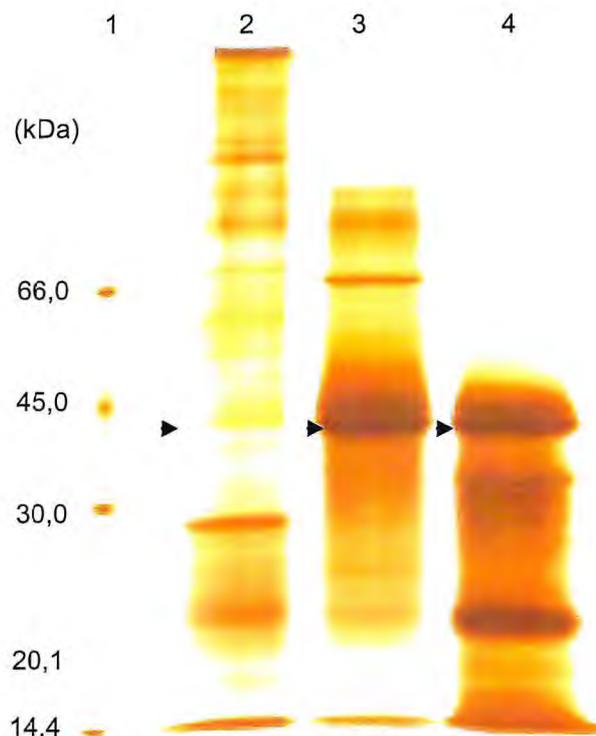


FIGURA 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS, de picos obtidos de cromatografia em Sephadex G-100 percolada com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Pico 1 (linha 2). Pico 2 (linha 3). Pico 3 (linha 4), e marcadores de massa molecular (linha 1). As bandas foram reveladas com prata. Setas indicam banda de 44 kDa. Aplicados 3 μ g de proteína por poço.

Foi testada também cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superose 12, acoplada a um sistema FPLC. Três frações (FIGURA 12, frações 9, 10 e 11 - setas indicativas), correspondentes à subida do pico de maior área (Pico II), apresentando atividade hemaglutinante foram detectadas. Por eletroforese na presença de SDS, a banda de 44 kDa foi visualizada nas três frações correspondentes (FIGURA 13, setas), bem como na fração subsequente (fração 12), porém, nesta última, não sendo detectada atividade hemaglutinante. Nova cromatografia foi realizada, sendo repetido o mesmo perfil de eluição, de atividade hemaglutinante e eletroforético.

Utilizou também cromatografia hidrofóbica em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast flow. Após aplicação da amostra de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM pH 7,5, as proteínas retidas foram eluídas da coluna, seqüencialmente, com três tampões: primeiro o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de 100 mM de sulfato de amônio, seguindo do tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e, posteriormente, água destilada. Foram obtidos três picos, todos com atividade hemaglutinante. Avaliação dos picos através de eletroforese desnaturante, em presença de SDS, revelou que o primeiro pico, além de apresentar as bandas protéicas com atividade hemaglutinante (44 kDa e 20,1 kDa), possuía, também, menor grau de contaminação por outras proteínas. Destacava-se, além das duas bandas, uma banda protéica à altura, aproximada, de 23 kDa (FIGURA 14, setas linha 3).

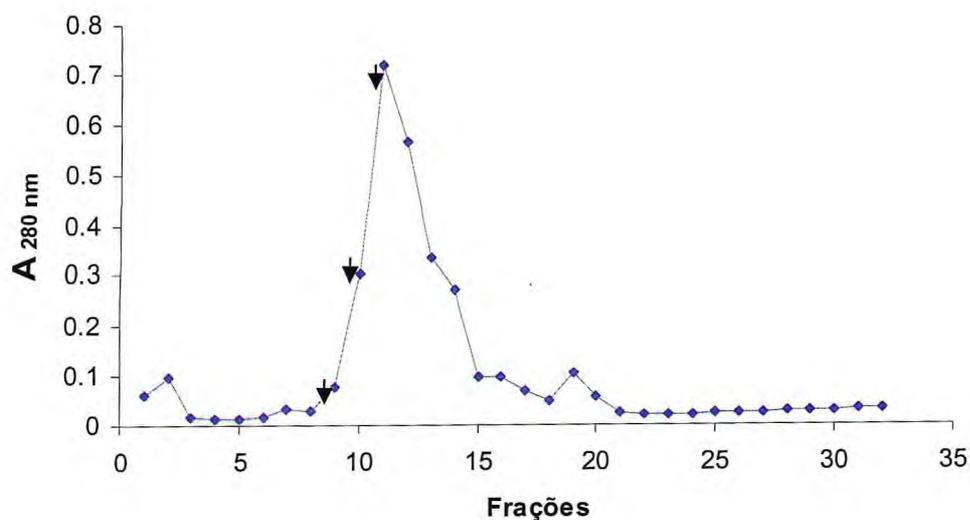


FIGURA 12 – Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12 para FPLC. A amostra aplicada nessa coluna foi obtida a partir de coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. A coluna foi previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e, após aplicação da amostra (0,350 mg de proteína), percolada com o mesmo tampão. Fluxo de 0,5 mL/min; fração coletada: 1,5 mL. Setas indicam frações 9, 10 e 11.

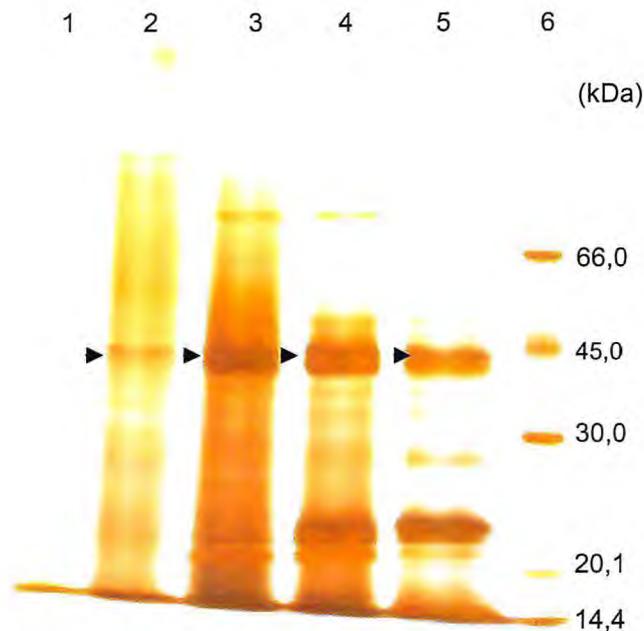


FIGURA 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS, de amostra aplicada em coluna de exclusão molecular (Superose 12) obtida a partir de coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. Frações 8, 9, 10, 11 e 12 (linhas 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente) obtidas após percolação com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e marcadores de massa molecular (linha 6). Fluxo: 0,5 mL/min; fração coletada: 1,5 mL. As bandas foram reveladas com prata. As setas indicam a banda de 44 kDa. Aplicados 3 μ g de proteína por poço

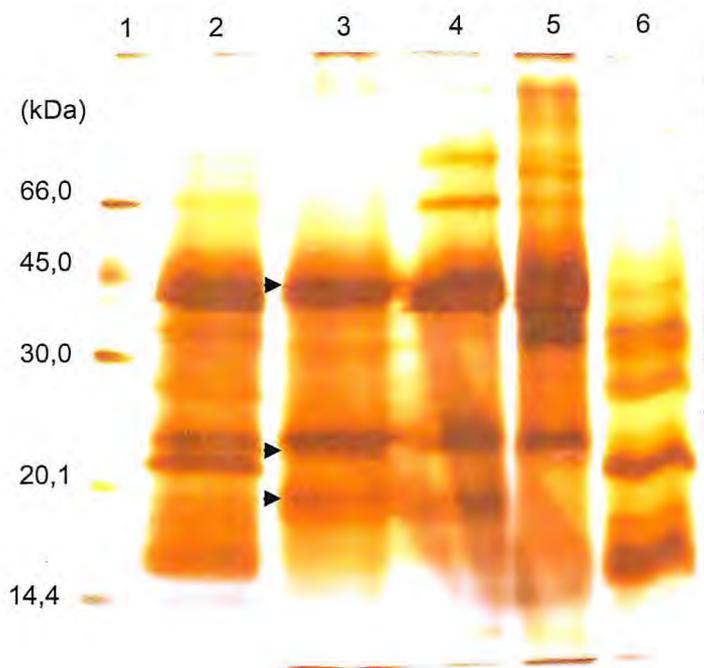


FIGURA 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, de amostra aplicada na coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, obtida a partir de coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (linha 2), de pico retido em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast Flow eluído com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de acrescido de 100 mM de sulfato de amônio (linha 3), de pico retido eluído com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (linha 4), de pico retido eluído com água destilada (linha 5), de pico não retido (linha 6), e de marcadores de massa molecular (linha 1). As bandas foram reveladas com prata. Setas indicam bandas de 20,1, 23 e 44 kDa. Aplicados 3 μ g de proteína por poço.

6.5 - Indução da expressão da lectina mediante aplicação foliar de ácido jasmônico ou injúria mecânica

Com base nos resultados obtidos até então, ficou claro haver no material protéico oriundo das folhas de *I.asarifolia* duas proteínas com atividade hemaglutinante, com uma delas apresentando 72% de identidade da seqüência *N*-terminal com a esporamina de *I. batatas*. Analisando a literatura sobre *I. batatas*, foi constatado que essa espécie também apresenta, além da esporamina (25 kDa), uma proteína de 18 kDa, a ipomoelina, com atividade hemaglutinante (IMANISHI *et al.*, 1997). Buscando entender melhor essas proteínas da *I.batatas*, foi visto, através de revisão da literatura, que as mesmas foram induzidas na folha pela injúria mecânica (IMANISHI *et al.*, 1997; WANG, *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2005) e que o metiljasmonato estaria envolvido na indução da ipomoelina, mas não da esporamina (IMANISHI *et al.*, 1997). No entanto, posteriormente, Wang *et al.* (2002) observaram que o metiljasmonato estaria, também, envolvido na indução da esporamina.

Com base nos achados acima, foi levantada a hipótese de que as proteínas de *I.asarifolia* poderiam responder, de maneira semelhante, à injúria mecânica e ao tratamento das folhas com ácido jasmônico (100 µM em 0,05% de etanol), influenciando, assim, na expressão da atividade hemaglutinante. Foi observado que o simples cultivo das folhas destacadas no escuro e a 25 °C (grupo controle) foi suficiente para elevar a atividade hemaglutinante específica já a partir de 48 h do início do cultivo. Nas folhas injuriadas, o aumento na atividade foi visto apenas às 72 h e, nesse período, a atividade foi superior ao grupo controle ($P < 0,05$, FIGURA 15). O uso de etanol 0,5% também elevou a atividade específica, tendo sido observado aumento a partir de 72 h. No grupo tratado com ácido jasmônico, esse aumento somente foi observado as 24 h (FIGURA 16). Dessa forma, assim como na *I. batatas*, a atividade hemaglutinante na *I. asarifolia* também pode ser induzida.

Diante da maior atividade específica ter sido observada às 72 h após injúria mecânica, bem como ter esse grupo apresentado baixo coeficiente de variação associado ao baixo custo da técnica, essa metodologia foi adotada para obtenção da fração protéica rica em lectina.

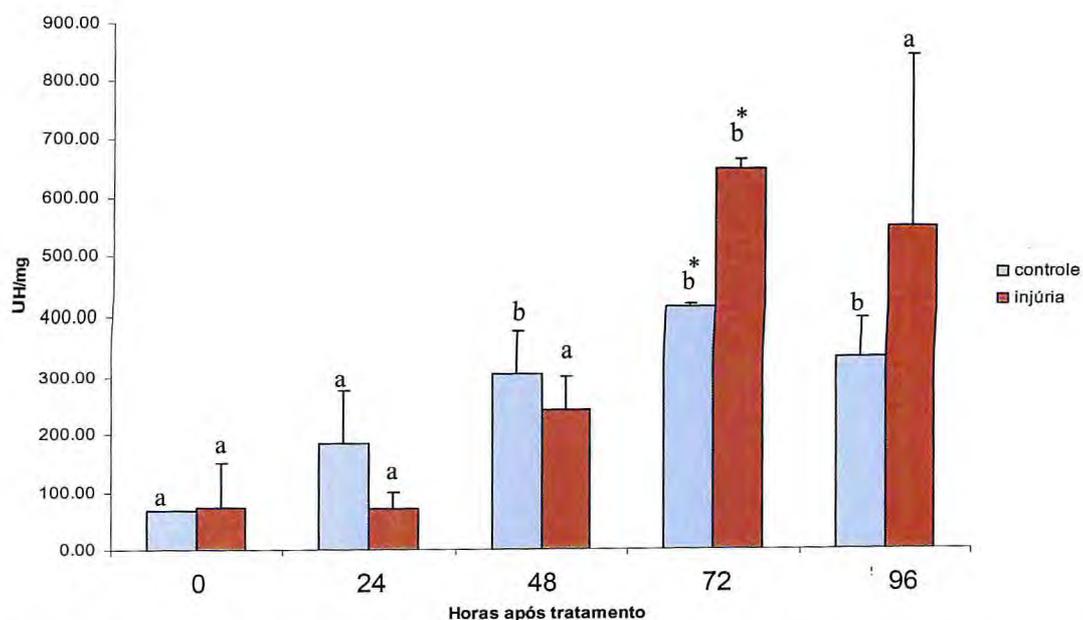


FIGURA 15 – Atividade hemaglutinante específica (UH/mg de proteína) em extratos de folhas de *I. asarifolia* cultivadas a 25 °C, no escuro, por 0, 24, 48, 72 e 96 h. Controle – folhas não tratadas. Injúria – folhas mecanicamente injuriadas. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos de cultivo e o tempo de 0 h no mesmo tratamento. Asterisco indica diferença estatística entre o grupo tratado e o não tratado no mesmo tempo de cultivo. ($P < 0,05$). Teste t-Student.

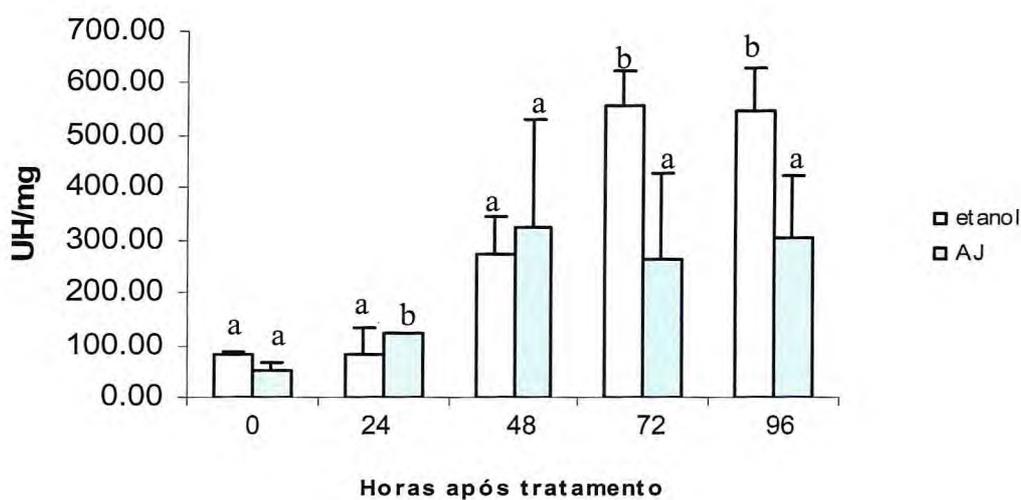


FIGURA 16 - Atividade hemaglutinante específica (UH/mg de proteína) em extratos de folhas de *I. asarifolia* cultivadas a 25 °C, no escuro, por 0, 24, 48, 72 e 96 h. Etanol – folhas tratadas com 0,5% de etanol. AJ – folhas tratadas com 100 μ M de ácido jasmônico diluído em 0,5% de etanol. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos de cultivo e o tempo de 0 h no mesmo tratamento. Teste t-Student.

Na busca do perfil eletroforético das frações obtidas após indução, três extrações distintas de grupo controle (sem injúria) e de grupo mecanicamente injuriado foram realizadas.

A média da atividade específica das frações protéicas mostrou, claramente, haver aumento da atividade em todas as frações após a injúria em relação às mesmas frações do grupo controle. Ou seja, 551,25 UH/mg de proteína, 3607,90 UH/mg de proteína, 11873,10 UH/mg de proteína e 4889,07 UH/mg de proteína, respectivamente, para as amostras do extrato bruto, da F_{0-30%}, da DEAE-celulose e da Phenyl Sepharose do grupo mecanicamente injuriado versus 141,07 UH/mg de proteína, 339,24 UH/mg de proteína, 341,16 UH/mg de proteína e 320,84 UH/mg de proteína, respectivamente, para as amostras do extrato bruto, da F_{0-30%}, da DEAE-celulose e da Phenyl Sepharose do grupo controle. Foi verificado, também, que a atividade hemaglutinante no grupo controle era devido à presença da banda protéica de 44 kDa, já que na amostra controle 3 (C₃), a qual não apresentava atividade hemaglutinante após DEAE-celulose e Phenyl Sepharose, não se observou a presença da banda de 44 kDa (FIGURAS 17 e 18, seta linha 3). Quanto à atividade hemaglutinante após a injúria, essa parece receber um incremento com a indução da banda de 20,1 kDa (FIGURAS 17 e 18, setas linhas 5 e 7).

É sabido da existência de genes que são dependentes da luz para se expressarem (RAKWAL *et al.*, 2001). Objetivando verificar se a luz teria algum efeito na indução da lectina após injúria, novo experimento foi conduzido, onde folhas controle (sem injúria) e injuriadas foram cultivadas na presença de luz com intensidade luminosa de $90 \pm 5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, a 27 °C, e com fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro. Um terceiro grupo foi injuriado mecanicamente e cultivado no escuro por 72 h como já preconizado. Uma resposta bem diferente, comparada ao início do cultivo, foi observada. A atividade hemaglutinante inexistiu nas amostras injuriadas e cultivadas na presença de luz por 24, 72 e 96 h. No entanto, as 48 h do cultivo na luz do grupo injuriado, a atividade se mostrou superior à atividade às 72 h do grupo injuriado cultivado no escuro, e com alta repetibilidade entre as amostras. À eletroforese, não se conseguiu visualizar as bandas de 44 kDa e de 20,1 kDa, a pigmentação do extrato bruto impediu a distinção entre as proteínas no gel. Optou-se pelo cultivo no escuro, com coleta das folhas após 72 h, para compor metodologia de obtenção da FPRL.

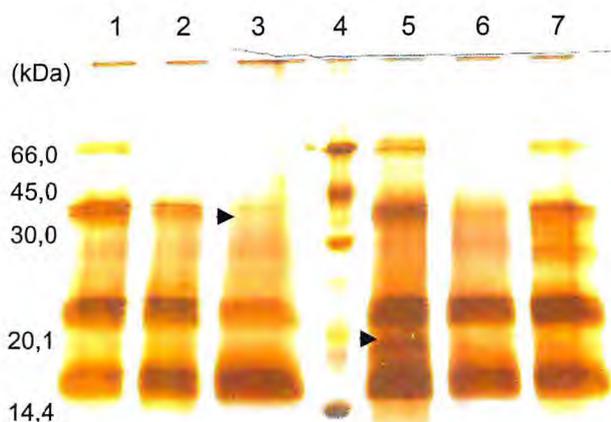


FIGURA 17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, de amostras obtidas a partir de coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, de folhas não submetidas à injúria ou grupo controle (linhas 1, 2 e 3), de amostras obtidas a partir de coluna de DEAE-celulose eluída com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, de folhas submetidas a injúria mecânica e cultivo por 72 h no escuro (linhas 5, 6. e 7), e de marcador de massa molecular (linha 4). As bandas foram reveladas com prata. Seta linha 3 indica ausência da banda de 44 kDa. Seta linha 5 indica presença da banda de 20,1 kDa. Aplicados 3 µg de proteína por poço.

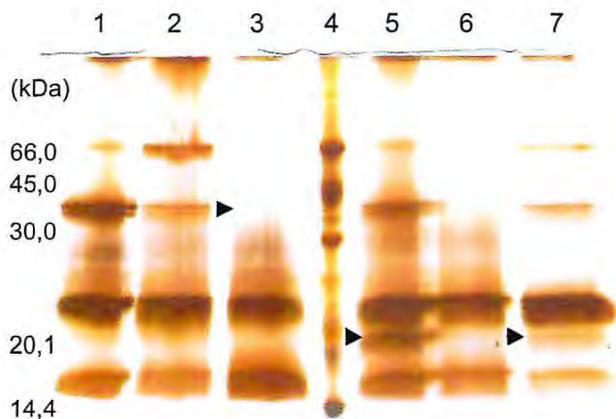


FIGURA 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, de amostras obtidas em coluna de Phenyl Sepharose eluída com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de 100 mM de sulfato de amônio, de folhas não submetidas à injúria ou grupo controle (linhas 1, 2 e 3), amostras obtidas em coluna de Phenyl Sepharose eluída com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de 100 mM de sulfato de amônio, de folhas submetidas a injúria mecânica e cultivo por 72 h no escuro (linhas 5, 6. e 7), e de marcadores de massa molecular (linha 4). As bandas foram reveladas com prata. A seta na linha 3 indica ausência da banda de 44 kDa. As setas nas linhas 5 e 7 indicam presença da banda de 20,1 kDa. Aplicados 3 µg de proteína por poço.

6.6 - Especificidade lectínica

Amostra de extrato bruto obtida após injúria das folhas e cultivo no escuro por 72 h, contendo 1024 UH/mL, perdeu por completo sua atividade hemaglutinante após fervura a 100 °C, por 20 minutos, mostrando que esta atividade estava associada à presença de moléculas protéicas ativas. Em adição, a atividade nessa amostra não foi inibida por açúcares simples, mas apenas por fetuína (0,22 µg fetuína/µg de proteína do extrato bruto), reforçando que a indução elevou a atividade hemaglutinate de lectinas com a mesma especificidade já anteriormente atestada.

Para verificar se a fração 0-30%, obtida após injúria das folhas, cultivo no escuro por 72 h e precipitação com sulfato de amônio, continuava sendo a mais apropriada para o isolamento da FPRL, a precipitação foi levada à frente nas faixas de 30-60% e 60-90%, bem como cromatografadas em DEAE-celulose. Nessas frações, a atividade hemaglutinante foi mensurada e o perfil eletroforético analisado.

Embora a atividade hemaglutinante estivesse presente em todas as frações, a fração 0-30% foi a que possibilitou a obtenção, após sua aplicação em DEAE-celulose, da maior atividade específica, 3438,55 UH/mg de proteína, versus 7,67 e 9,16 UH/mg de proteína nas frações 30-60% e 60-90%, respectivamente, da mesma forma cromatografadas. O perfil protéico na eletroforese desnaturante (FIGURA 19) reforçou esse dado, sendo bem mais evidente a banda de 44 kDa, após cromatografia em DEAE-celulose da fração 0-30% (FIGURA 19, seta linha 4) em relação às amostras de DEAE-celulose das frações 30-60% e 60-90% (FIGURA 19, setas linhas 7 e 9, respectivamente). O sobrenadante obtido após centrifugação para aquisição da última fração (F_{60-90%}), não apresentou atividade hemaglutinante, estando ausentes na eletroforese as bandas correspondente a 44 kDa e a 20,1 kDa (FIGURA 19, linha 10)

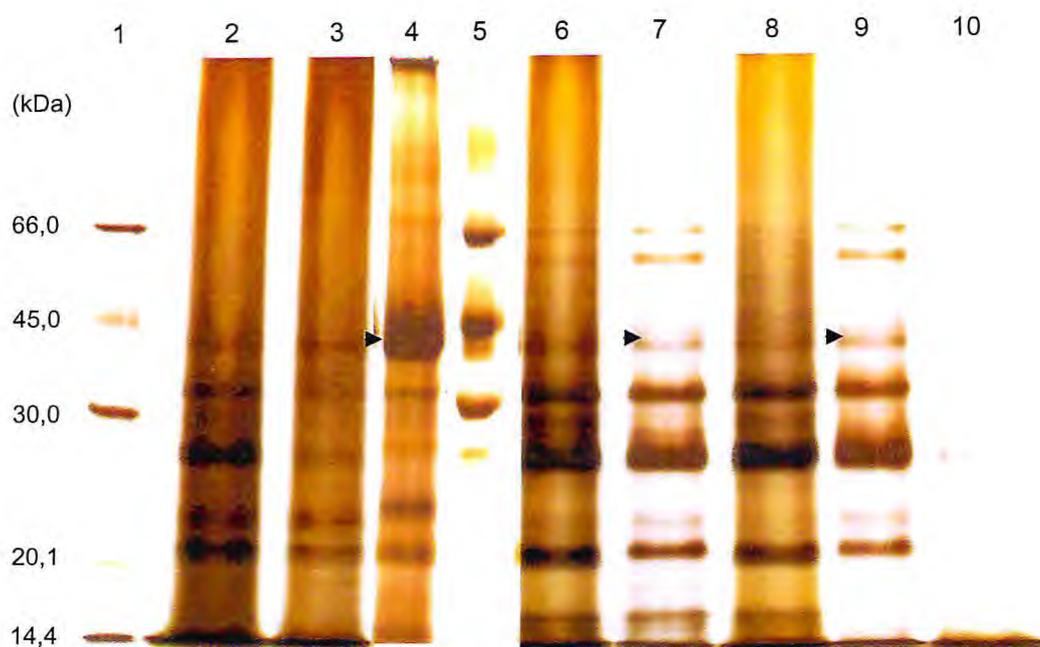


FIGURA 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS, de amostra de extrato bruto (linha 2), de Fração $_{0-30\%}$ (linha 3), de pico de DEAE-celulose da $F_{0-30\%}$ eluído com 200 mM de NaCl em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (linha 4), de Fração $_{30-60\%}$ (linha 6), de pico de DEAE-celulose da $F_{30-60\%}$ eluído com 200 mM de NaCl em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (linha 7), de Fração $_{60-90\%}$ (linha 8), de pico de DEAE-celulose da $F_{60-90\%}$ eluído com 200 mM de NaCl em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (linha 9), do sobrenadante após $F_{60-90\%}$ (linha 10), e de marcadores de massa molecular (linhas 1 e 5). As bandas foram reveladas com prata. Setas indicam banda de 44 kDa. Aplicados 3 μ g de proteína por poço.

6.7 – Reestruturação do protocolo de isolamento da FPRL

De posse dos resultados descritos anteriormente, o protocolo de isolamento da FPRL foi reestruturado.

Folhas coletadas de plantas distribuídas pelo Campus do Pici, na UFC, foram lavadas em água corrente, seguido de água destilada, secadas com papel toalha, injuriadas com um perfurador em quatro pontos eqüidistantes (6 mm de diâmetro cada) e acondicionadas em saco plástico contendo três papéis de germinação umedecidos com água destilada autoclavada, 2,5 de saturação. Depois de vedados, os sacos foram mantidos no escuro, a 25 °C, por 72 h. Ao final do cultivo, as folhas inteiras foram submetidas à extração com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, por 2 h, a 4 °C, sob agitação constante. O extrato foi filtrado em pano de trama fina, centrifugado e o sobrenadante precipitado com sulfato de amônio na faixa de 0-30%. Após 12 h, o precipitado obtido por centrifugação foi dialisado contra água destilada, liofilizado, resuspenso em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, centrifugado, e aplicado na coluna de DEAE-celulose. O pico retido foi eluído com 200 mM de NaCl em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, dialisado contra água destilada e liofilizado. O liofilizado foi, então, resuspenso em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido com 420 mM de sulfato de amônio, aplicado em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast flow, e o pico retido eluído com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo 100 mM de sulfato de amônio. Após diálise contra água destilada e liofilização, chamou-se essa fração obtida de fração protéica rica em lectina (FPRL) a qual foi usada para ensaios biológicos e para caracterização físico-química e bioquímica. O perfil eletroforético da FPRL pode ser visualizado na Figura 20.

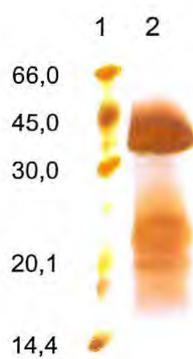


FIGURA 20 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, da fração protéica rica em lectina (FPRL) utilizada nos ensaios biológicos, obtida a partir de coluna de Phenyl Sepharose eluída com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de 100 mM de sulfato de amônio (linha 2) , e de marcador de massa molecular (linha 1). As bandas foram reveladas com prata. Aplicados 3 μ g de proteína.

6.8 - Efeito tóxico da *I. asarifolia*

Sendo a *I. asarifolia* uma planta classificada como neurotóxica (TOKARNIA *et al.*, 2000), e associando-se a isso os resultados obtidos por Santos (2001), buscou-se comprovar a hipótese de que o efeito tóxico da *I. asarifolia* é devido à proteína(s) com atividade hemaglutinante.

Foi possível observar os efeitos tóxicos da FPRL (0,1033 mg de proteína/mL) após a administração intra-orbital em camundongos de 5 µg de proteína/g de peso corporal. Os animais apresentaram ataxia e perda do equilíbrio, não sendo observado óbito.

Outras espécies do gênero *Ipomoea*, como a *I. carnea ssp fistulosa* (TOKARNIA *et al.*, 2000; HUEZA *et al.*, 2005), *I. sericophylla* e *I. riedelii* (BARBOSA *et al.*, 2006) também causam alterações no sistema nervoso. Nessas o princípio tóxico é atribuído a dois alcalóides identificados como indolizidina (swainsonina) e nortropane (calysteginas B₁, B₂, B₃ e C₁). No entanto, Medeiros *et al.* (2003b) avaliando os efeitos tóxicos da *I. asarifolia* em caprinos, não detectaram a presença de calysteginas ou de swainsoninas, sugerindo ser a causa da síndrome tremogênica observada, uma fitotoxina ou micotoxina presente nas folhas.

Para verificar a existência ou não de compostos secundários nas amostras da FPRL, as mesmas foram submetidas à análise por ressonância magnética nuclear (RMN). Não foi detectada a presença de compostos secundários na amostra utilizada nos ensaios biológicos, resultado que contribuiu para reforçar nossa hipótese.

Objetivando verificar o efeito direto da amostra de FPRL sobre o sistema nervoso autônomo, foi realizado um ensaio mais específico, mediante o uso do canal deferente de camundongos, modelo clássico corriqueiramente usado para elucidação da transmissão neuromuscular autônoma. Tanto foram analisadas amostras de extrato bruto como da FPRL. As duas preparações foram efetivas em causar redução na contração muscular, o que mede, indiretamente, inibição na neurotransmissão autônoma. Foi observado, também, que as amostras testadas foram capazes de inibir as contrações em todas as concentrações testadas; sendo o percentual de inibição crescente com o aumento da concentração, efeito concentração-dependente (FIGURA 21). Foram utilizadas para teste amostras nas concentrações de 2,5; 7,5; 25,0; 75,0; 250,0 e 750,0 µg/mL de amostra de extrato bruto, e 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 30,0;

100,0 e 300,0 $\mu\text{g/mL}$ de amostra da FPRL, ambas adicionadas de maneira cumulativa à preparação. A inibição das contrações foi quase completamente revertida após três lavagens da preparação.

Aliado a esse achado, foi possível verificar aumento da ação inibitória quando uma amostra mais pura, foi utilizada, no caso a FPRL em relação ao extrato bruto. A concentração efetiva (CE_{50}) do extrato bruto de folhas de *I.asarifolia* foi de 52,2 $\mu\text{g/mL}$, variando de 13,4 a 203,9 $\mu\text{g/mL}$, e a CE_{50} da FPRL foi de 29,8 $\mu\text{g/mL}$, com variação de 17,8 a 49,9 $\mu\text{g/mL}$ e intervalo de confiança de 95%.

Segundo Jenkinson *et al.* (1995), potência é uma expressão da atividade de uma droga em termos da concentração necessária para produzir um efeito definido. A FPRL foi mais potente que o extrato bruto, visto que sua CE_{50} foi quase duas vezes menor que a do extrato bruto, ou seja, sendo necessária quase o dobro da concentração protéica de extrato bruto em relação à FPRL para causar inibição de 50% da contração no músculo do vaso deferente. Esse achado sugere que o princípio tóxico da *I. asarifolia* seja uma proteína com atividade hemaglutinante, pois o aumento de seu grau de purificação na FPRL coincide com o aumento da atividade tóxica.

Dentre os glicoconjugados testados capazes de inibir a hemaglutinação da lectina da salsa, fetuína mostrou maior efetividade (SANTOS, 2001), sendo este fato confirmado no presente trabalho. A fetuína é uma sialoglicoproteína e se constitui no maior componente glicoprotéico do soro fetal bovino. A principal característica da fetuína é a sua carga negativa associada à presença de ácido siálico nas extremidades não redutoras das *O*- e *N*- glicanas (ASHIDA *et al.*, 2000).

A maior parte dos sólidos do sistema nervoso (40 a 65%) consiste em lipídios complexos (SWENSON, 1988). Desses, os fosfolipídeos e os glicolipídios são os componentes principais da mielina e das membranas neuronais. Dentre os glicolipídios estão os gangliosídeos, os quais são glicosfingolipídeos compostos de uma cadeia oligossacarídica hidrofílica, caracterizados pelos resíduos de ácido siálico ligados a uma molécula lipofílica.

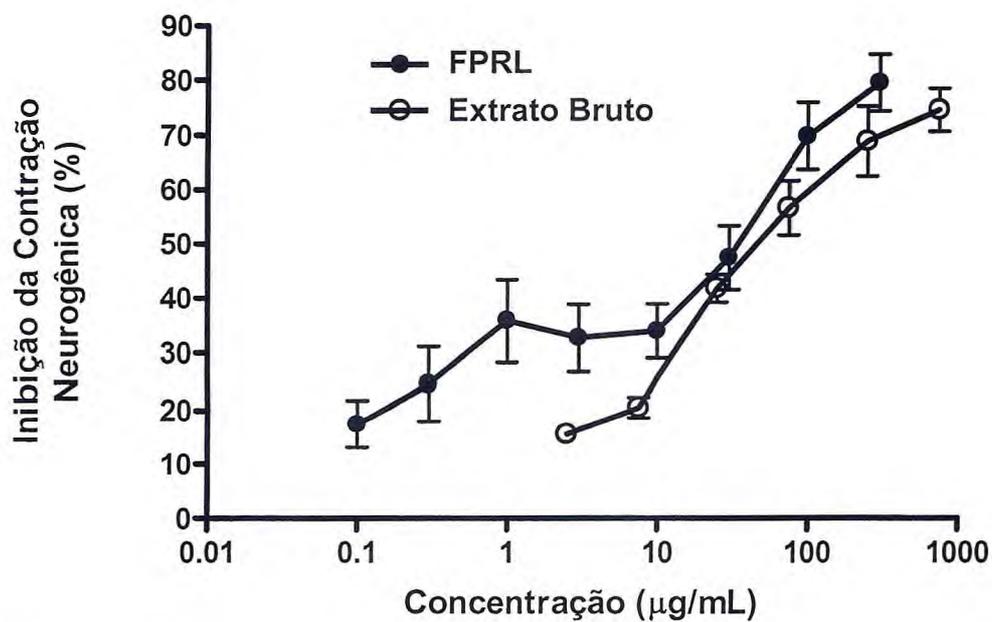


FIGURA 21 – Efeito da fração protéica rica em lectina (FPRL) e do extrato bruto de *I. asarifolia* na contração neurogênica em músculo do canal deferente. Foram testadas concentrações cumulativas de 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100,0 e 300,0 µg/mL da FPRL e concentrações cumulativas de 2,5; 7,5; 25,0; 75,0; 250,0 e 750,0 µg/mL de extrato bruto.

Em adição, uma classe importante de proteínas neurais são as glicoproteínas, as quais formam complexos globulares protéicos embebidos nas membranas neurais. Projetando-se a partir do corpo principal da molécula para dentro do espaço extracelular, encontram-se resíduos de ácido siálico (ácido neuramínico). A carga eletrostática negativa do ácido siálico e a ampla variedade de conformações das glicoproteínas está envolvida nas reações de receptor com hormônios, transmissores e neurotoxinas (SWENSON, 1988).

Tais características das glicoproteínas e glicolípídeos neurais, em apresentarem ácido siálico em sua estrutura, assim como constatado na fetuína, glicoproteína que inibe a hemaglutinação da lectina de *I. asarifolia*, podem subsidiar a explicação da afinidade da lectina pelo sistema nervoso, órgão no qual ela exerce seu principal efeito tóxico.

Pinheiro e Santa Rosa (1996a), bem como Santos (2001), relatam em seus achados, após administração oral de *I. asarifolia*, alterações histopatológicas no rim como: destruição dos glomérulos, degeneração e necrose das células epiteliais de revestimento dos túbulos da zona cortical e medular. No intuito de reforçar a hipótese do presente trabalho, foram avaliados os parâmetros renais após adição da FPRL no líquido de perfusão renal, bem como alterações histológicas nos rins perfundidos. A perfusão de rins isolados tem sido extensivamente utilizada como modelo de estudo dos efeitos renais de substâncias biologicamente ativas, evitando, assim, a interferência da ação sistêmica.

Previamente testou-se a capacidade das lectinas presentes na FPRL de se ligarem à inulina. Foi utilizada concentração de inulina de 1 mg/mL, dissolvida em solução de NaCl 150 mM. Não foi observada inibição na hemaglutinação em relação ao controle.

Lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), de *Canavalia ensiformis* (ConA) e de *Dioclea guianensis* (DGA), que têm afinidade por resíduos de glicose/manose, e a lectina de *Vatairea macrocarpa*, com afinidade por galactose, foram avaliadas em sistema de perfusão renal. Foi observado que essas lectinas provocavam aumento na pressão de perfusão (PP) e na resistência vascular renal (RVR) (TEIXEIRA *et al.*, 2001; HAVT *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2005). No entanto, o rim perfundido com a FPRL de *I. asarifolia* (10 µg/mL), não mostrou alteração significativa ($P > 0,05$) na pressão de perfusão ou na resistência vascular renal, indicando que essa fração

protéica não tem efeito vascular (FIGURAS 22 e 23), fato que pode, em parte, ser explicado pela sua especificidade, ou seja, as lectinas da FPRL não apresentam afinidade por glicose, manose, nem por galactose. Quanto ao fluxo urinário, esse mostrou-se significativamente ($P<0,05$) elevado a partir dos 60 minutos (FIGURA 24). Também, o ritmo de filtração glomerular (RFG) foi significativamente ($P<0,05$) elevado aos 120 min (FIGURA 25). Já o transporte tubular de sódio, potássio e cloro sofreu redução significativa ($P<0,05$) aos 90 min (FIGURAS 26, 27 e 28). Aos 120 min, o transporte de sódio ainda se mantinha baixo em relação ao controle interno do sistema. Quanto ao “clearance” osmótico, esse se elevou significativamente ($P<0,05$) a partir dos 60 minutos (FIGURA 29).

Em geral, quando o RFG aumenta, a reabsorção tubular de sódio aumenta proporcionalmente (SWENSON, 1988). Essa proporcionalidade é denominada de equilíbrio glomerulotubular. No entanto, embora no experimento o RFG tenha aumentado aos 120 min, a reabsorção de sódio se manteve baixa, indicando mudanças na capacidade de reabsorção de sódio, principalmente no túbulo proximal.

Quanto aos achados histopatológicos, o rim esquerdo, não perfundido, não apresentou alterações histológicas visíveis ao microscópio óptico (FIGURA 30, A). Quanto ao rim direito perfundido, poucas alterações foram detectadas no material analisado, variando de acordo com o experimento em deposição protéica tubular e/ou glomerular (FIGURA 30, B). Nas lâminas analisadas, não foram detectadas alterações nos interstícios nem nos vasos.

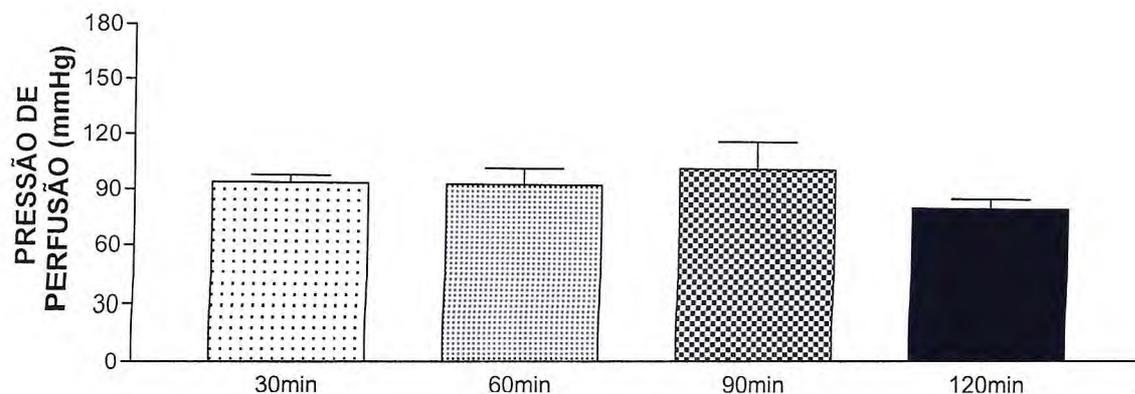


FIGURA 22 – Pressão de perfusão (mmHg) de rins perfundidos com 10 $\mu\text{g/mL}$ de fração protéica rica em lectina de *I. asarifolia*. Valores dos períodos 60, 90 e 120 min comparados com o controle interno do sistema: 30 min ($P > 0,05$). Teste t-Student.

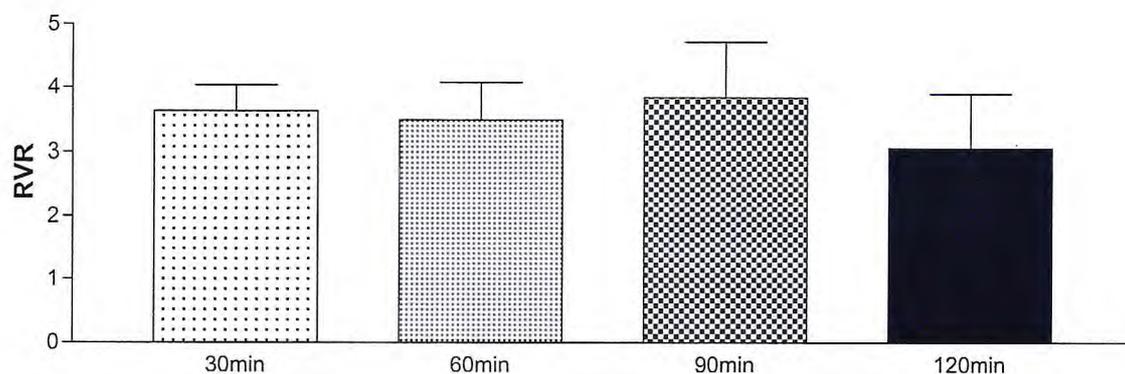


FIGURA 23 – Resistência vascular renal – RVR ($\text{mmHg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em rins perfundidos com 10 $\mu\text{g/mL}$ de fração protéica rica em lectina de *I. asarifolia*. Valores dos períodos 60, 90 e 120 min comparados com o controle interno do sistema: 30 min ($P > 0,05$). Teste t-Student.

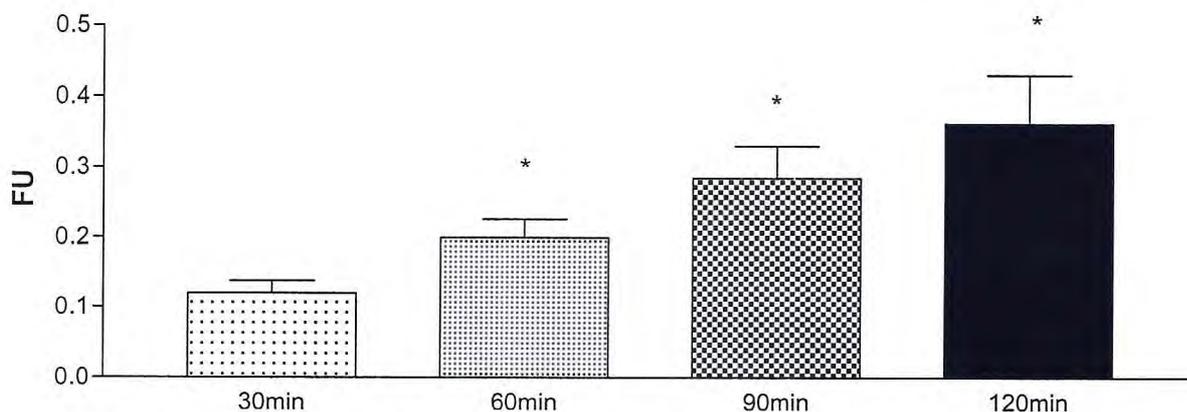


FIGURA 24 – Fluxo urinário – FU ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em rins perfundidos com 10 $\mu\text{g/mL}$ de fração protéica rica em lectina de *I. asarifolia*. Valores dos períodos 60, 90 e 120 min comparados com o controle interno do sistema: 30 min ($P < 0,05$). Teste t-Student.

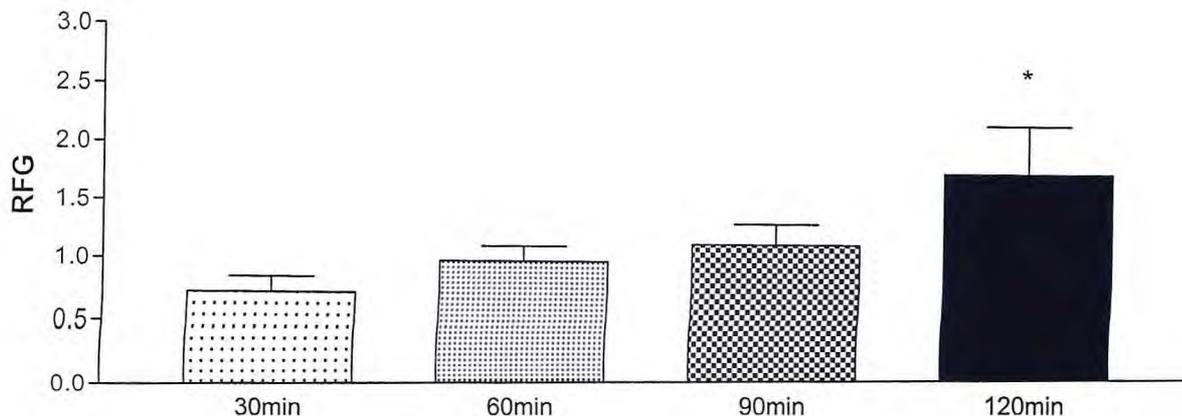


FIGURA 25 – Ritmo de filtração glomerular - RFG ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em rins perfundidos com $10 \mu\text{g/mL}$ de fração protéica rica em lectina de *I. asarifolia*. Valores dos períodos 60, 90 e 120 min comparados com o controle interno do sistema: 30 min ($P < 0,05$). Teste t-Student.

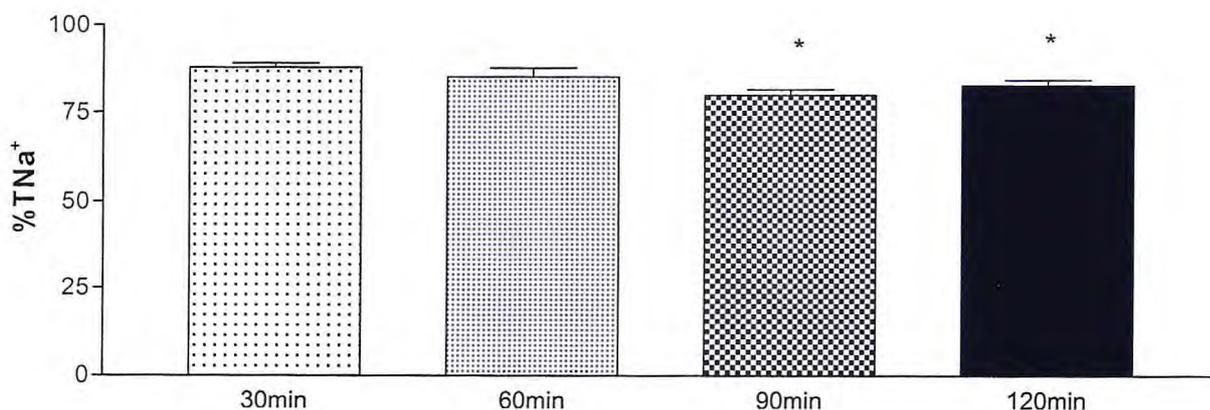


FIGURA 26 – Percentual de transporte tubular de sódio ($\%T\text{Na}^+$) em rins perfundidos com $10 \mu\text{g/mL}$ de fração protéica rica em lectina de *I. asarifolia*. Valores dos períodos 60, 90 e 120 min comparados com o controle interno do sistema: 30 min ($P < 0,05$). Teste t-Student.

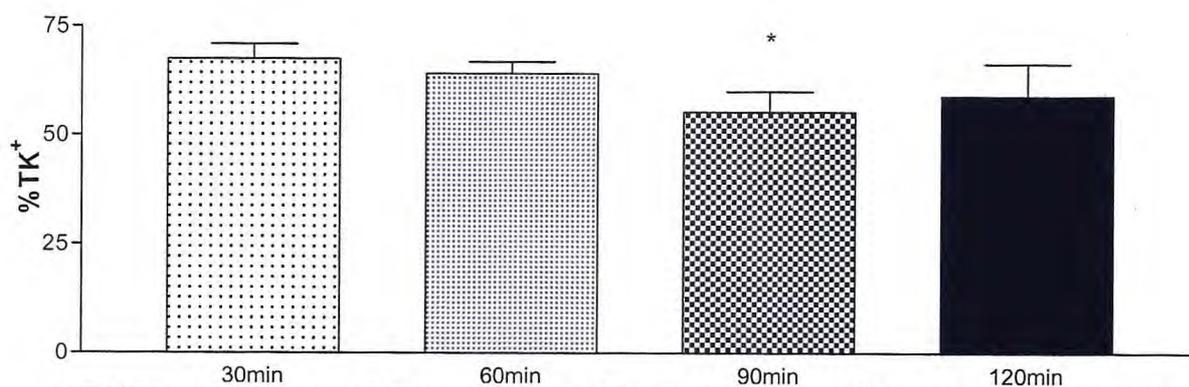


FIGURA 27 – Percentual de transporte tubular de potássio ($\%TK^+$) em rins perfundidos com $10 \mu\text{g/mL}$ de fração protéica rica em lectina de *I. asarifolia*. Valores dos períodos 60, 90 e 120 min comparados com o controle interno do sistema: 30 min ($P < 0,05$). Teste t-Student.

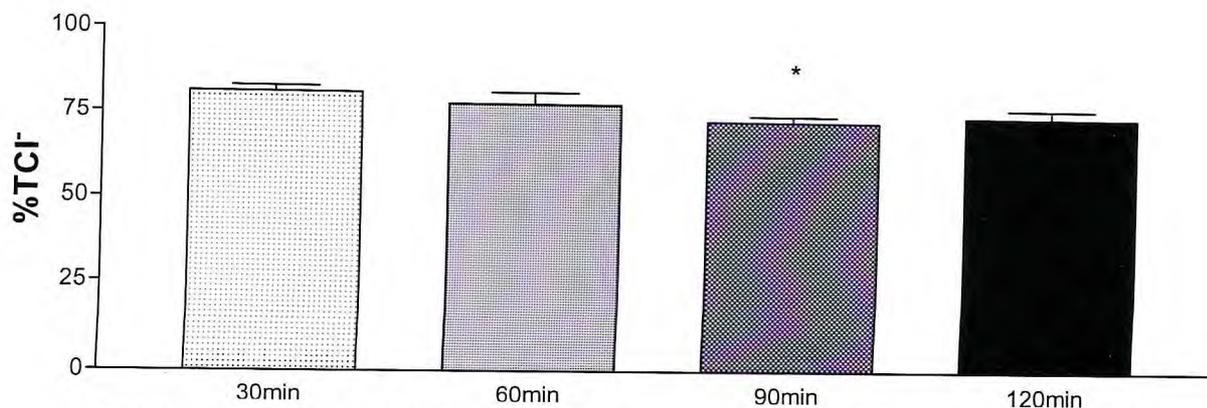


FIGURA 28 – Percentual de transporte tubular de cloreto (%TCl⁻) em rins perfundidos com 10 µg/mL de fração protéica rica em lectina de *I. asarifolia*. Valores dos períodos 60, 90 e 120 min comparados com o controle interno do sistema: 30 min (P<0,05). Teste t-Student.

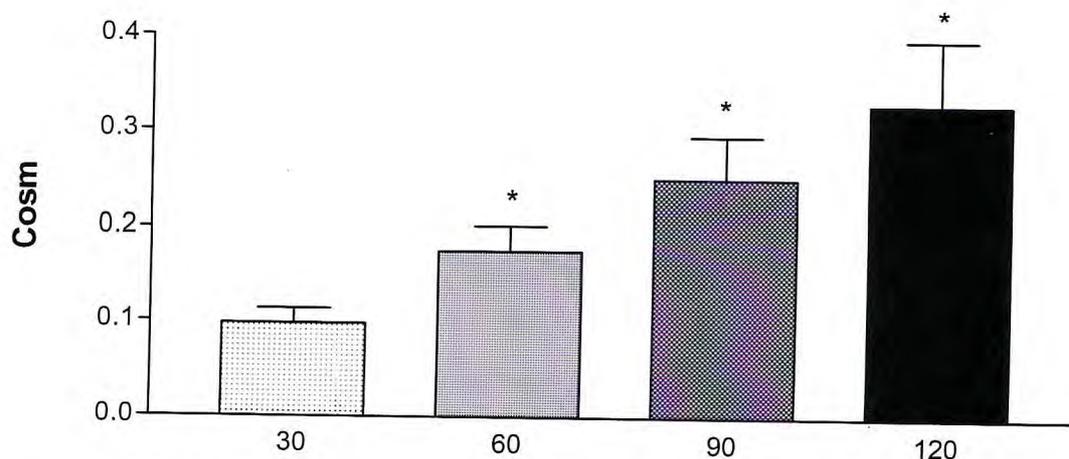


FIGURA 29 – Clearance osmótico- Cosm (mL.g⁻¹.min⁻¹) em rins perfundidos com 10 µg/mL de fração protéica rica em lectina de *I. asarifolia*. Valores dos períodos 60, 90 e 120 min comparados com o controle interno do sistema: 30 min (P<0,05). Teste t-Student.

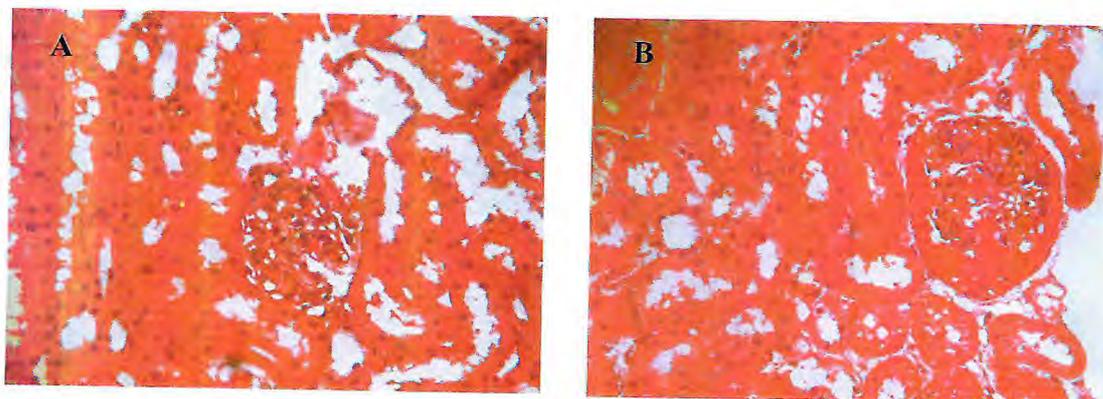


FIGURA 30 – Corte histológico de rim de rato. A: controle (rim esquerdo não perfundido). B: rim direito perfundido apresentando discreto depósito protéico no glomérulo e túbulos renais. (400X).

6.9 – Digestibilidade *in vitro* da FPRL

Nas etapas anteriores, foi observado que na FPRL obtida a partir da coluna de Phenyl Sepharose está contido o provável princípio tóxico da salsa, sendo o mesmo de origem protéica. A atividade tóxica da salsa, relatada na literatura, é observada após a ingestão da planta (PINHEIRO e SANTA ROSA, 1996a; MEDEIROS *et al.*, 2003b). É sabido da resistência de lectinas à proteólise (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Para verificar se os efeitos tóxicos da salsa poderiam ocorrer devido à indigestibilidade da lectina de salsa frente à ação de enzimas digestivas encontradas no trato digestório de animais monogástricos, a atividade hemaglutinante foi avaliada após ensaio de digestibilidade *in vitro*. Ao acrescentar à amostra da FPRL 0,1 N de HCl, pH 1,78, meio ideal para a reação com pepsina, e tentar solubilizá-la em vórtex, para posterior centrifugação, foi notado que boa parte da amostra precipitava e, portanto, apenas o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático para pepsina. Entretanto, quando o precipitado remanescente foi tratado com tampão Tris-HCl 1 M, pH 7,5, não só sua ressolubilização foi completa, como toda a atividade hemaglutinante nele foi encontrada, sendo seu perfil eletroforético idêntico àquele apresentado pela amostra inicial que lhe deu origem.

Analisando o sobrenadante na digestão *in vitro* com pepsina, esse perdeu sua atividade hemaglutinante durante a digestão, e através de eletroforese percebe-se uma redução na intensidade das bandas protéicas, o que é indicativo de digestão protéica (FIGURA 31). No entanto, como boa parte da amostra ficou no precipitado e sua atividade foi apenas temporariamente perdida, sugere que *in vivo* as proteínas contidas na salsa possam sofrer precipitação na passagem pelo estômago, com perda temporária da atividade, mas ao chegarem ao duodeno, ao ser restabelecido o pH, restabeleça também sua atividade hemaglutinante.

As amostras da FPRL acrescidas do tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,1, tampão usado para os ensaios de digestão com tripsina e quimotripsina, foram completamente resolubilizadas. Após digestão com tripsina, bem como com quimotripsina, a atividade hemaglutinante se manteve na amostra e, pelo perfil eletroforético, foi possível se inferir que essa atividade remanescente estava associada à banda protéica de 44 kDa, que se manteve íntegra, enquanto a banda de 20,1 kDa foi totalmente digerida (FIGURAS 32 e 33).

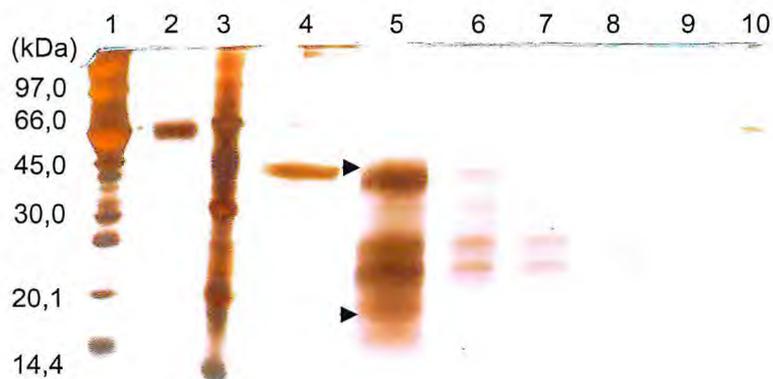


FIGURA 31 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, da albumina sérica bovina (BSA) e da fração protéica rica em lectina (FPRL) de *I. asarifolia* submetidas a diferentes tempos de tratamento enzimático com pepsina. Linhas 1 e 2 – BSA em 0,1 N HCl, pH 1,78, a 0 e 2 horas da adição da enzima, respectivamente. Linha 3 – Marcador de massa molecular. Linha 4 – Pepsina em 0,1N HCl, pH 1,78. Linhas 5, 6, 7, 8, 9 e 10 – FPRL em 0,1 N HCl, pH 1,78, a 0, 1/2, 1, 2, 4 e 6 horas da adição da enzima, respectivamente. As bandas foram reveladas com prata. Setas indicam banda de 44 kDa e 20,1 kDa.

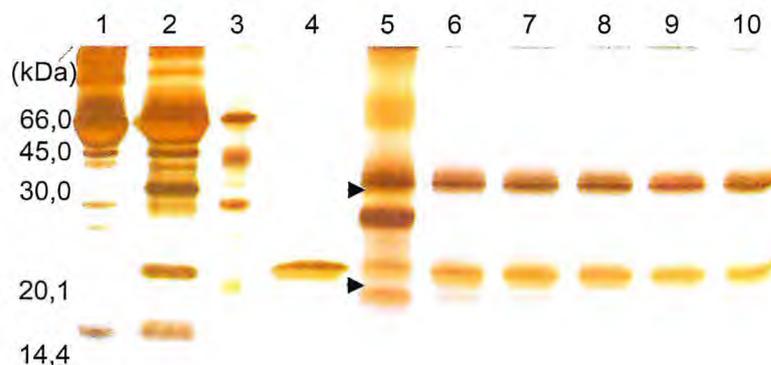


FIGURA 32 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, da albumina sérica bovina (BSA) e da fração protéica rica em lectina (FPRL) de *I. asarifolia* submetidas a diferentes tempos de tratamento enzimático com tripsina. Linhas 1 e 2 – BSA em Tris-HCl 100 mM, pH 8,1, a 0 e 6 horas da adição da enzima, respectivamente. Linha 3 – Marcador de massa molecular. Linha 4 – Tripsina em Tris-HCl 100 mM, pH 8,1. Linhas 5, 6, 7, 8, 9 e 10 – FPRL em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, a 0, 1/2, 1, 2, 4 e 6 horas da adição da enzima, respectivamente. As bandas foram reveladas com prata. Setas indicam banda de 44 kDa e 20,1 kDa.

Como no seu curso fisiológico, a digestão não acontece em etapas separadas, mas de forma seqüencial, inicialmente no estômago, seguindo pelo intestino. Para avaliar a digestão de forma seqüencial nova amostra da FPRL foi acrescida, inicialmente, do tampão 0,1 N HCl, pH 1,78, com pepsina. Dessa vez, a amostra não foi centrifugada. Após duas horas da primeira digestão, foram acrescentadas tripsina e quimotripsina, ao mesmo tempo, em tampão Tris-HCl 250 mM, pH 8,91, sendo a digestão deixada desenvolver por mais três horas.

Na primeira etapa da digestão, onde se avaliou a ação da pepsina, tanto a atividade hemaglutinante, bem como a banda de 44 kDa foram mantidas na amostra digerida (FIGURA 34, seta linha 5). Na segunda etapa da digestão, a atividade hemaglutinante ainda estava presente, mas a intensidade da banda de 44 kDa estava bastante reduzida (FIGURA 34, seta linha 6), não sendo visualizada a banda de 20,1 kDa. A partir destes dados, duas possibilidades foram levantadas para explicar a ação tóxica da lectina de salsa: a primeira é que, como a lectina pode chegar íntegra e ativa no intestino, após sua permanência no estômago, talvez possa, aí, ser absorvida por endocitose na sua forma intacta, como demonstrado para outras lectinas quando administradas oralmente (PUSZTAI, 1989); a segunda possibilidade é que como a atividade hemaglutinante se manteve após a digestão seqüencial, há a possibilidade de que ela esteja associada aos peptídeos formados, podendo esses serem absorvidos ainda numa forma ativa e exercerem o efeito tóxico.

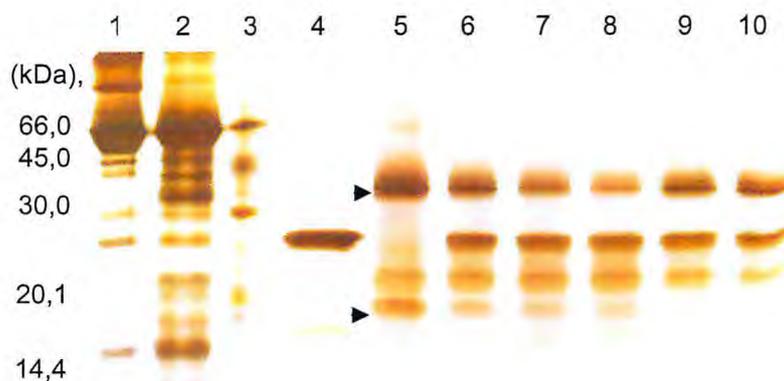


FIGURA 33 - Eletroforese em gel de poliacrinamida (15,0%), na presença de SDS, da albumina sérica bovina (BSA) e da fração protéica rica em lectina (FPRL) de *I. asarifolia* submetidas a diferentes tempos de tratamento enzimático com quimotripsina. Linhas 1 e 2 – BSA em Tris-HCl 100 mM, pH 8,1, a 0 e 6 horas da adição da enzima, respectivamente. Linha 3 – Marcador de massa molecular. Linha 4 – Quimotripsina em Tris-HCl 100 mM, pH 8,1. Linhas 5, 6, 7, 8, 9 e 10 – FPRL em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, a 0, 1/2, 1, 2, 4 e 6 horas da adição da enzima, respectivamente. As bandas foram reveladas com prata. Setas indicam banda de 44 kDa e 20,1 kDa.

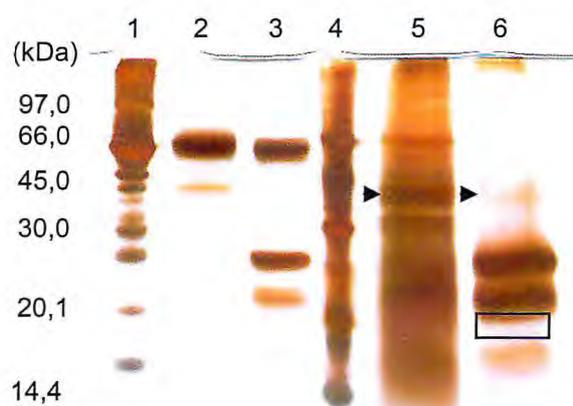


FIGURA 34 - Eletroforese em gel de poliacrinamida (15,0%), na presença de SDS, da albumina sérica bovina (BSA) e da fração protéica rica em lectina (FPRL) de *I. asarifolia* submetidas a tratamento enzimático com pepsina durante 2 h, mais tripsina e quimotripsina durante 3 h. Linhas 1 – BSA em 1 N HCl, pH 1,78, a 0 h da adição das enzimas. Linhas 2 – BSA em 0,1 N HCl, pH 1,78, após 2 h de digestão com pepsina. Linha 3 – BSA após 3 h da adição de tripsina e quimotripsina. Linha 4 – Marcador de massa molecular. Linha 5 – FPRL em 1 N HCl, pH 1,78, após 2 h de digestão com pepsina. Linha 6 – FPRL após 3 h da adição de tripsina e quimotripsina. As bandas foram reveladas com prata. Setas indicam banda de 44 kDa. Retângulo mostra ausência da banda de 20,1 kDa.

6.10 - Estabilidade térmica e necessidade de metais e DTT para a atividade hemaglutinante da FPRL

No trabalho de Santos (2001), a atividade hemaglutinante foi realizada em tubos de ensaio. No presente trabalho, como esta atividade foi realizada em placas de microtitulação, e sendo esse um método mais refinado, foi feita reavaliação da estabilidade térmica da lectina na FPRL. Santos (2001) observou que a 80 °C a atividade hemaglutinante foi abolida dentro de 10 min. Nos ensaios realizados em placa, a atividade hemaglutinante residual só foi completamente eliminada a 90 °C por 10 min (FIGURA 35).

Várias lectinas necessitam da presença de cátions divalentes para expressarem sua atividade de ligação a carboidratos. Esses íons conferem à lectina um alto grau de estabilidade estrutural, protegendo-as contra a inativação pelo calor e hidrólise por enzimas proteolíticas. Após diálise da FPRL contra Tris-HCl 25 mM pH 7,5 contendo 5 mM de EDTA e 5 mM de EGTA, a amostra perdeu sua atividade hemaglutinante. Ao ser redialisada contra tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5 acrescido de 5 mM de cálcio e manganês, a atividade não foi restabelecida. Esse resultado sugere que a lectina da salsa depende de metais, mas distintos do cálcio e do manganês. Essa colocação é reforçada diante da capacidade do EDTA e do EGTA de quelarem outros metais. O EDTA, além do cálcio e do manganês, pode quelar, por exemplo, o magnésio, o cobre, o zinco, o cobalto e o ferro (LEE *et al.*, 2007). O EGTA, além do cálcio é quelante do magnésio, do zinco e do cádmio (IBEKWE e ANGLE, 1998).

Na extração da lectina de salsa, bem como nos ensaios biológicos realizados por Santos (2001), 5 mM de DTT eram acrescidos com o objetivo de conservar a atividade tóxica. Por razões relacionadas ao custo do protocolo de isolamento, DTT não foi utilizado no decorrer deste presente trabalho. Entretanto, com o objetivo de esclarecer, definitivamente, o papel do DTT em relação à atividade hemaglutinante da lectina, bem como avaliar seu perfil eletroforético, várias concentrações de DTT (5, 10, 50 e 100 mM) foram testadas.

O perfil eletroforético obtido foi sugestivo de que pontes dissulfeto intracadeia estão presentes na molécula da lectina, pois a banda correspondente a 44 kDa, na presença de 5 mM de DTT, migrou no campo elétrico de forma mais lenta no gel, quando comparada à amostra sem DTT, assumindo uma massa molecular aparente de 50 kDa (FIGURA 36, seta linha 3), possivelmente como resultado de alterações de

sua forma tridimensional. A atividade hemaglutinante, por sua vez, foi mantida na amostra em todas as concentrações de DTT avaliadas. Esse resultado sugere que a(s) ponte(s) dissulfeto não estão envolvidas no sítio de afinidade a carboidrato, nem a alteração conformacional ocasionada pela possível redução dessas pontes pelo DTT é suficiente para alterar sua capacidade hemaglutinante.

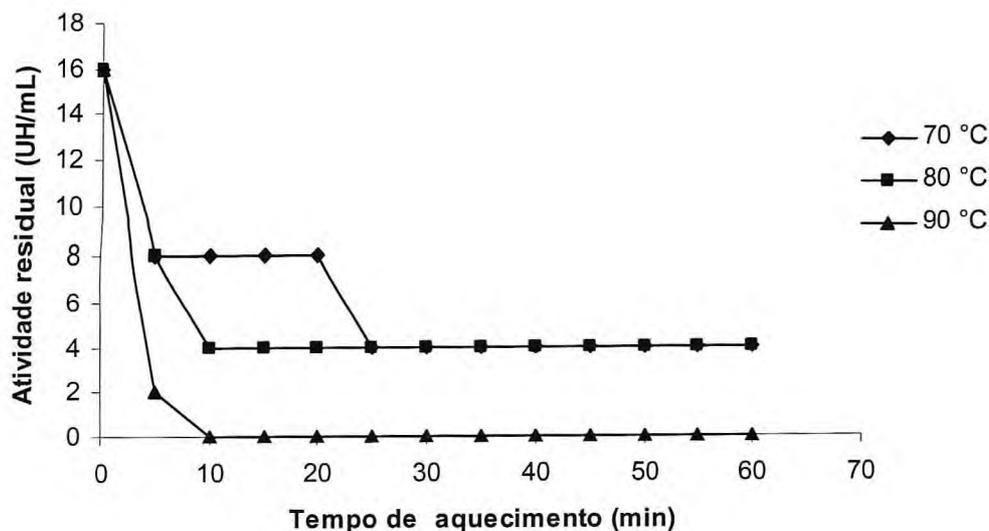


FIGURA 35 – Atividade hemaglutinante residual (UH/mL) na FPRL submetida a diferentes temperaturas e intervalos de tempo.

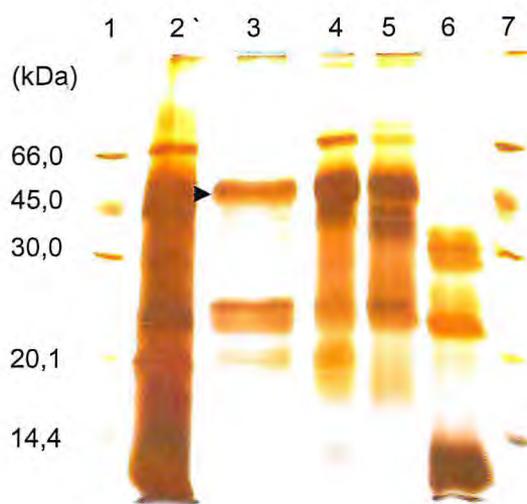


FIGURA 36 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0%), na presença de SDS, de amostra de pico obtido em DEAE-celulose eluído com 0,2 M de NaCl em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de 5 mM de DTT (linha 2), de pico retido em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast flow eluído com 0,1 M de sulfato de amônio em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, acrescido de 5 mM de DTT (linha 3), de pico retido em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast flow eluído com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, com 5 mM de DTT (linha 4), de pico retido em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast flow eluído com água destilada, com 5 mM de DTT (linha 5) e de pico não retido em coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast flow, com 5 mM de DTT (linha 6). Linhas 1 e 7 – Marcador de massa molecular. As bandas foram reveladas com prata. Seta indica banda de 44 kDa na sua forma reduzida. Aplicados 3 μ g de proteína por poço.

6.11 - Eletro-transferência e seqüenciamento das bandas protéicas presentes na FPRL

Observando o perfil eletroforético da Figura 12, na altura de 44 kDa, a lectina está, aparentemente, misturada a outras bandas protéicas. Mas, após o uso de 5 mM de DTT no tampão de amostra, a banda correspondente à lectina se isolou das demais presentes em torno de 44 kDa (FIGURA 36, seta linha 3). De posse dessa informação, foi decidida a incorporação de 5 mM de DTT no tampão da amostra para eletrotransferência e posterior seqüenciamento por Edman.

Com isso, uma seqüência com alto grau de confiabilidade e que confirmava a seqüência anteriormente determinada foi obtida. A seqüência *N*-terminal para a banda de 44 kDa foi: AVNLPAGHLSPPGGVGNVYVVTVGLCTP. Ao realizar o alinhamento com seqüências já depositadas em banco de dados para proteínas (www.expasy.ch), foi constatada identidade de 38 a 69% da lectina da salsa com uma proteína de ligação ao DNA do nucleóide de cloroplasto chamada CND-41. Ou seja, 38% (10aa/26aa) com a CND-41 de *Arabidopsis thaliana*, 65% (17aa/26aa) com a CND-41 de *Nicotiana sylvestris* e de *Nicotiana tabacum*, 69% (18aa/26aa) com a CND-41 de *Oryza sativa subsp. japonica*.

A banda correspondente a 23 kDa, presente na FPRL forneceu a seguinte seqüência *N*-terminal: AVMGLGTDPLSIIS. Através de alinhamento em banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), esta seqüência apresentou, também, identidade com a proteína de ligação ao DNA do nucleóide de cloroplasto CND-41, ou seja 57% (8aa/14aa) com a CND41 de *Nicotiana sylvestris* e de *Nicotiana tabacum* e 64% (9aa/14aa) com a CND41 de *Arabidopsis thaliana*.

A CND41 foi isolada inicialmente em *Nicotiana tabacum* (NAKANO *et al.*, 1993) e é uma proteína de 41 kDa que se liga ao DNA de cloroplasto através de uma região rica em lisina na porção *N*-terminal (NAKANO *et al.*, 1997), detentora de um sítio com atividade de protease arpártica (MURAKAMI *et al.*, 2000), além de um motivo dedo de zinco com capacidade de se ligar ao DNA do núcleo (NAKANO *et al.*, 1997). Nakano *et al.* (1997) sugerem que ela seja um regulador negativo da expressão gênica no cloroplasto, onde seu acúmulo foi observado em cultura de células no escuro, o qual foi observado estar negativamente correlacionado com o acúmulo de transcritos de genes relacionados à fotossíntese. Kodama (2007) relata em

sua revisão resultados que sugerem a participação da CND41, também, na senescência, no desenvolvimento de plastídio e na biossíntese da giberelina.

6.12 – Capacidade do anticorpo contra esporamina de reconhecer as lectinas de *I. asarifolia*

A capacidade do anticorpo contra esporamina de *I. batatas* reconhecer as bandas correspondentes às lectinas de *I. asarifolia* foi avaliada. Observou-se após revelação do *Western blot*, ser o anticorpo produzido contra esporamina capaz de reconhecer a esporamina e seus precursores presentes na F_{0-90%} de *I. batatas*, bem como a banda de 44 kDa presente na FPRL de *I. asarifolia* (FIGURA 37). Nenhum sinal de reconhecimento imunológico foi verificado à altura de 20,1 kDa. Como a lectina de 44 kDa é bem mais pronunciada na amostra testada e, mesmo assim, sua detecção imunológica foi bastante fraca. A não detecção da banda de 20,1 kDa pelo anticorpo pode ter sido devido à baixa quantidade desta proteína na amostra.

Como toda a estratégia de produzir o anticorpo contra esporamina veio a partir do seqüenciamento da banda de 20,1 kDa, e não da de 44 kDa, e tendo esse anticorpo reconhecido essa última, esse achado sugere que a banda de 20,1 kDa possa ser produto de uma modificação pós-traducional da banda de 44 kDa.

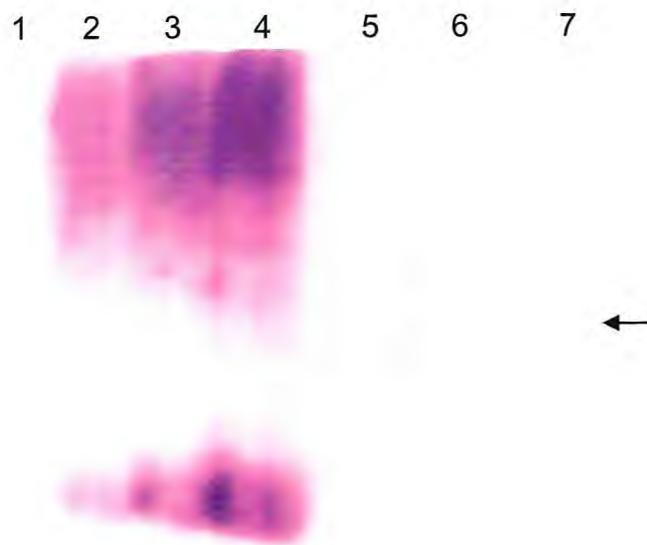


FIGURA 37 – *Western blot* contra anticorpo de esporamina de *I. batatas*, revelado com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho, conjugado à fosfatase alcalina. Linha 1 – Ovoalbumina 10 μg . Linhas 2, 3 e 4 – Fração_{0-90%} de *I. batatas* nas concentrações de 10, 25 e 50 μg de proteína, respectivamente. Linhas 5, 6 e 7 – DEAE-celulose de *I. asarifolia* nas concentrações de 10, 25 e 40 μg de proteína, respectivamente. Seta indica marcação da proteína de 44 kDa de *I. asarifolia*.

6.13 – Prospecção biotecnológica da lectina de *I. asarifolia*

A presença de resíduos de carboidratos é crítica na ligação do espermatozóide-ovócito no início da fecundação (THALER e CARDULLO, 2002). Alterações de algumas proteínas e íons no espermatozóide e/ou no ovócito podem contribuir para a deficiência da reação do acrossoma e ter conseqüências na fecundação (MORI *et al.*, 1997; KERR *et al.*, 2002).

Das três glicoproteínas da zona pelúcida, a ZP3 parece mediar tanto a primeira ligação entre o espermatozóide e o ovócito, como induzir a reação do acrossoma (BLEIL e WASSARMAN, 1983). Vários resíduos glicídicos, em particular, β -N-acetilglucosamina (GalNAc), α -D-galactose (Gal) e L-fucose, têm sido apontados como envolvidos no reconhecimento espermatozóide-ovócito (TÖPFER-PETERSEN, 1999). Mori e colaboradores (1997) observaram que após tratar ovócitos de camundongos com sialidase, houve aumento no número de espermatozoides aderidos, sugerindo haver ácido siálico nas glicoproteínas da ZP que estaria protegendo o sítio de ligação do espermatozóide ao ovócito.

Sendo a proteína alvo nesse trabalho uma lectina, com capacidade de reconhecer oligossacarídeos contendo ácido siálico em sua extremidade, vislumbrou-se o seu uso como um marcador de integridade de zona pelúcida de caprinos, a qual é formada por glicoproteínas. Para tal, a FPRL foi marcada com FITC e sua capacidade de reconhecer as glicoproteínas na ZP avaliada.

A FPRL conjugada ao FITC foi posta em contato com ovócitos imaturos de caprinos, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Depois da remoção das proteínas não ligadas à zona pelúcida, a avaliação do ovócito de caprinos através de microscopia óptica de epifluorescência mostrou haver poucos sítios de ligação da lectina de *I. asarifolia* na zona pelúcida (FIGURA 38). Em contrapartida, um grande número de sítios reativos à lectina da salsa foi detectado na membrana plasmática destes ovócitos como, comprovado pela alta intensidade fluorescente presente. Essa diferenciação na marcação das duas membranas abre a possibilidade de uso da lectina de *I. asarifolia* como um marcador de integridade da zona pelúcida. Dessa forma, ovócitos com zona pelúcida íntegra permaneceriam não marcados ou fracamente marcados. Já ovócitos com zona pelúcida rompida, a lectina adentraria no espaço perivitelino, tendo acesso à membrana plasmática e fluorescendo intensamente.

Assim, e como a zona pelúcida funciona como barreira sanitária na transmissão de várias doenças, dentre elas a artrite encefalite caprina a vírus-CAEV (SALLES *et al.*, 1998), essa lectina poderia ser usada como ferramenta para seleção de ovócitos íntegros colhidos de fêmeas soropositivas para CAEV.

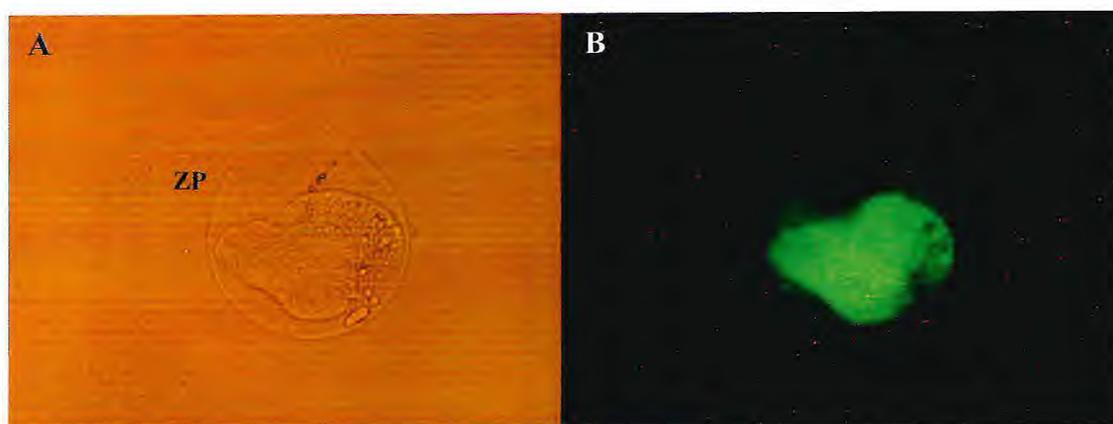


FIGURA 38 – Ovócito imaturo com zona pelúcida (ZP) rompida. A: análise à luz visível. B: análise sob luz de fluorescência após marcação com lectinas de *I. asarifolia* conjugadas a FITC (400X).

7 - CONSIDERAÇÕES

FINAIS

As lectinas estão presentes nos mais diferentes órgãos das plantas e seu comportamento ao longo do ciclo vital das plantas é da maior importância para a compreensão dos seus possíveis papéis fisiológicos.

As lectinas de *Leguminosae* e *Gramineae* têm sido as mais intensamente investigadas. Nas leguminosas, estão concentradas principalmente nas sementes, onde são sintetizadas durante o desenvolvimento, atingindo seus níveis máximos nas sementes quiescentes. Em alguns aspectos, a síntese das lectinas acompanha de perto a síntese das principais proteínas de reserva. De fato, até certo ponto, as lectinas podem ser compreendidas como proteínas de reserva, embora essas últimas sejam usualmente definidas como proteínas encontradas em grande quantidade, em células dos tecidos de reserva e às quais nenhuma outra função lhes seja atribuída, além de servir como uma fonte de nitrogênio (PEUMANS e VAN DAMME, 1995).

As plantas sintetizam proteínas com características de proteínas de reserva em diversos órgãos. Além das sementes, estas proteínas são também sintetizadas em órgãos vegetativos de reserva, como tubérculos, rizomas, bulbos, cascas, caules e folhas. Um outro aspecto característico das proteínas de reserva é que elas são sintetizadas, transportadas e armazenadas como proteínas secretoras, isto é, são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e, posteriormente, acumuladas nos corpos protéicos e/ou em vacúolos de armazenagem de proteínas (HERMAN e LARKINS, 1999). De maneira geral, as proteínas continuam a ser acumuladas até que os tecidos de armazenagem comecem a dessecar (sementes), ou entrar numa fase de descanso (tecidos vegetativos). Fatores como déficit de água, injúria, disponibilidade de nitrogênio e ácido jasmônico estimulam o acúmulo de proteínas de estocagem em órgãos vegetativos (STASWICK, 1990).

Várias proteínas de estocagem de órgãos vegetativos (VSPs) exibem atividade enzimática. Como exemplo, há a patatina de tubérculo de batata que apresenta atividade de lipase (FU *et al.*, 2001) e a VSP de soja, que tem mostrado leve atividade de fosfatase ácida (DE WALD *et al.*, 1992).

Após análise da seqüência de aminoácidos da lectina de 44 kDa, foi vista identidade de 65% com uma proteína de ligação ao DNA do nucleóide de cloroplasto de *Nicotiana tabacum*, de 41 kDa (CND41), que apresenta atividade enzimática de protease aspártica (NAKANO *et al.*, 1997; KODAMA, 2007). Embora não se tenha realizado ensaio para verificar se a lectina de *I. asarifolia* apresenta atividade de protease aspártica, essa possibilidade de atividade associada à sua expressão

constitutiva na folha, sugere que ela possa ser uma VSP. Em adição, a CND41 apresenta um domínio dedo de zinco (NAKANO et al., 1997; KODAMA, 2007). A atividade hemaglutinante da *I. asarifolia* mostrou ser dependente de metais, embora pareça não ser dependente de cálcio ou manganês. A identidade da lectina de 44 kDa com a CND41 abre a possibilidade dessa lectina ser dependente de zinco. Outras características bioquímicas de proteases aspárticas se assemelham às encontradas na proteína de 44 kDa da *I. asarifolia*. Por exemplo, foi observado que a proteína assumi uma massa molecular aparente após SDS-PAGE de 44 kDa sobre condições não redutoras e de 50 kDa sobre condições redutoras, fato também observado com a nepentesina I e II, duas proteases aspárticas isoladas de *Nepenthes distillatoria* (ATHAUDA et al., 2004). A provável presença de pontes dissulfeto internas na molécula deve favorecer a estabilidade observada nos ensaios de termoresistência. Athaуда et al. (2004) também observaram alta estabilidade térmica nas nepentesinas I e II, atribuindo essa estabilidade a existência de 12 resíduos de cisteína por molécula, os quais poderiam formar seis pontes dissulfeto. A análise da seqüência primária das nepentesinas em banco de dados também mostrou identidade com a CND41 (ATHAUDA et al., 2004).

Enzimas proteolíticas agem sobre as proteínas do sangue de modo a liberar substâncias vasoativas como a bradicinina, serotonina e histamina que atuam no efeito hipotensor. Tais enzimas já foram observadas no veneno de *Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu* (FERREIRA et al., 1970, 1992, 1998) sendo largamente utilizadas em medicamentos para o controle da hipertensão. Embora não significativa ($P > 0,05$), após a administração da FPRL no sistema de rim perfundido, observou-se uma ligeira queda na pressão de perfusão e na resistência vascular renal aos 120 min (FIGURAS 21 e 22), com aumento significativo ($P < 0,05$) na diurese e redução dos transportes dos íons sódio, potássio e cloro. Diante da identidade da lectina de 44 kDa com uma protease aspártica CND-41, pode-se especular que os efeitos observados possam ser devido ao sítio de atividade enzimática da molécula, podendo esse agir na liberação de substâncias vasoativas.

A presença de material protéico nos glomérulos denota que uma maior quantidade de proteínas está sendo filtrada, diminuindo a pressão oncótica dos capilares glomerulares. A pressão oncótica dos capilares glomerulares apresenta correlação inversa com o ritmo de filtração glomerular (KOEPPEN e STANTON, 1997). Isto poderia explicar o aumento no ritmo de filtração glomerular com

conseqüente aumento do fluxo urinário. Outra hipótese afirmada pelos mesmos autores para explicar o aumento do ritmo de filtração glomerular seria que a bradicinina estimularia a liberação de óxido nítrico que levaria ao relaxamento vascular do endotélio. Mais uma vez a atividade enzimática poderia estar influenciando os efeitos da FPRL sobre o rim perfundido.

Essa possibilidade de atividade enzimática da lectina de *I. asarifolia* sugere também que a mesma seja uma quimerolectina com, no mínimo, dois sítios de ligação a carboidratos, já que aglutina eritrócitos. Algumas enzimas vegetais são fusões protéicas compostas de uma proteína carboidrato-ligante e um domínio catalítico. Quitinases tipo I, por exemplo, são constituídas de um domínio heveína quitina-ligante e um domínio catalítico (COLLINGE *et al.*, 1993). Similarmente, as proteínas ribossomo-inativantes (RIPs) do tipo 2, como a ricina e a abrina, são produtos de fusão de uma cadeia A tóxica, que tem atividade *N*-glicosidase característica de todas as RIPs, e uma cadeia B carboidrato-ligante (OLSNES, 2004). São também quimeras a lectina de *Solanum tuberosum*, que possui um domínio semelhante à estensina (*extensin-like domain*) (VAN DAMME, 2004b) e a lectina de *Dolichos biflorus*, que exibe atividade de lipoxigenase (ROOPASHREE *et al.*, 2006).

Há crescentes evidências que muitas lectinas vegetais têm papel na defesa da planta contra diferentes tipos de organismos herbívoros. O maior argumento para esse papel é a observação de que as lectinas vegetais ligam gliconjugados de outros organismos. Apesar de lectinas de muitas plantas estarem aptas a se ligarem a açúcares simples como glicose, manose ou galactose, elas têm maior afinidade por oligossacarídeos (MACEDO *et al.*, 2004), que não são comuns ou mesmo são totalmente ausentes nas plantas. Por exemplo, lectinas vegetais quitina-ligantes reconhecem um carboidrato que é típico constituinte da parede celular de fungos e do exoesqueleto de invertebrados. Similarmente, as lectinas ácido-siálico-ligantes de *Morus alba* (RATANAPO *et al.*, 1998), de *Scilla campanulata* (WRIGHT *et al.*, 2000), de *Cepaea hortensis* (GERLACH *et al.*, 2002), bem como a isolada nesse trabalho, ligam-se a um açúcar que está ausente nas plantas, mas é o maior carboidrato componente de glicoproteínas animais.

Associada à especificidade glicídica, um outro ponto em favor da atribuição de defesa das lectinas vegetais, também observado nesse trabalho, é sua alta estabilidade sob condições desfavoráveis. Observamos que a lectina de *I. asarifolia* foi estável a

uma ampla região de pH (1,78 – 11), suportou altas temperaturas e foi resistente a proteases animais.

Um outro argumento para o papel defensivo das lectinas é a presença preferencial das lectinas em partes da planta mais susceptíveis ao ataque por organismos fitófagos ou patógenos. Nesse trabalho, foi observado que a maior atividade hemaglutinante de *I. asarifolia* se concentra nas folhas, em relação às sementes. Interessantemente, é a folha a responsável pela toxicidade dessa planta a herbívoros superiores.

Para reforçar esse provável papel de defesa dessa lectina, foi possível induzir sua expressão através de estímulos envolvidos na cascata de sinalização do mecanismo de defesa da planta. Analisando a atividade hemaglutinante em folhas de *I. asarifolia*, foi observado que a resposta à injúria mecânica foi mais tardia do que a resposta ao ácido jasmônico (AJ), além dessa última ter ocorrido em menor intensidade. É sabido que a injúria induz a produção de AJ nas plantas, mas em baixas concentrações (LANNON, *et al.*, 2007), o que justifica a resposta tardia à injúria. No entanto, a maior intensidade na atividade específica após injúria sugere que outros fatores além do AJ estejam envolvidos na indução da lectina de *I. asarifolia*, e que esses fatores sejam mais efetivos nessa indução. Por exemplo, na avaliação do grupo tratado com etanol, veículo do AJ e, portanto, seu controle correspondente, houve, também, indução da atividade hemaglutinante e, surpreendentemente, em maior intensidade do que o próprio grupo tratado com AJ. O etanol pode ter provocado perda de água na folha e sinalizado a rota de estresse osmótico, a qual o AJ pareceu ter pouca contribuição na folha de *I. asarifolia*. Outras lectinas têm sido induzidas também por outros fatores além do AJ, como é o caso da ipomoelina da *I. batatas*, que foi também induzida pela injúria (IMANISHI *et al.*, 1997).

Mais recentemente, tem sido sugerida a participação das lectinas em interações endógenas na planta. Van Damme *et al.* (2004a) levantaram a hipótese de que as lectinas possam, também, estar envolvidas na regulação e sinalização celular. Essa hipótese foi respaldada pela localização de algumas lectinas no citoplasma ou no núcleo, pela resposta a estímulos bióticos ou abióticos específicos, e pela homologia com lectina clássica já detectada na planta. Essas lectinas foram denominadas de lectinas não clássicas e possuem uma estrutura simplificada em relação à lectina clássica da planta (VAN DAMME *et al.*, 2004ac). Extrapolando essas considerações

para os nossos achados, pode-se especular ser a lectina de 20,1 kDa uma lectina não clássica, que se encontra ausente na folha não induzida.

Tendo o anticorpo contra esporamina de *I. batatas* reconhecido a lectina de 44 kDa, a lectina de 20,1 kDa parece ser uma molécula semelhante a de 44 kDa, porém mais simples, fato que pode reforçar a hipótese de que a lectina de 20,1 kDa seja uma lectina não clássica.

Quanto à banda protéica de 23 kDa, esta apresentou identidade com a mesma proteína que a banda de 44 kDa, a CND41, sugerindo que a banda de 44 kDa, que parece ser expressa de forma constitutiva após estímulo externo, sofra modificações capazes de desdobrá-la em duas novas proteínas, uma de 20,1 kDa, que mantém identidade com a esporamina, e uma de 23 kDa, que mantém identidade com a proteína de ligação ao DNA do nucleóide de cloroplasto. Coincidência ou não, a soma das duas massas de 20,1 e 23 kDa produz uma massa bem próxima a de 44 kDa.

A presença comprovada, e com maior expressão, da banda protéica de 44 kDa, a ausência de compostos secundários, e a alta atividade tóxica e hemaglutinante associada à FPRL, reforçam os achados de Santos (2001) de que essa proteína exerça forte participação na toxicidade da salsa a animais monogástricos.

8 - CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho reforçam a participação da lectina no mecanismo de defesa da planta, bem como indicam sua forte participação no mecanismo de toxicidade da *Ipomoea asarifolia* a animais monogástricos que, experimentalmente, a consomem.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação. Referências: Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

ASHIDA, H., YAMAMOTO, K., KUMAGAI, H. Trypsin inhibitory activity of bovine fetuin de-*O*-glycosylated by endo- α -*N*-acetylgalactosaminidase. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, v.64, p.2266-2268, 2000.

ATHAUDA, S.B.P.; MATSUMOTO, K.; RAJAPAKSHE, S.; KURIBAYASHI, M.; KOJIMA, M.; KUBOMURA-YOSHIDA, N.; IWAMATSU, A.; SHIBATA, C.; INOUE, H.; TAKAHASHI, K. Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. **Biochem. J.**, v.381, p.295-306, 2004.

AUSTIN, D.F. CAVALCANTI, P.B. Convolvuláceas da Amazônia. **Publicações Avulsas do Museu Goeldi**, v.36, p.1-134, 1982.

AVILÉS, M.; OKINAGA, T.; SHUR, B.D.; BALLESTA, J. Differential Expresión of glycoside residues in the mammalian zona pellucida. **Mol. Reprod. Dev.**, v.57, p.296-308, 2000.

BAKER, H. G. The evolution of weeds. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 5, p. 1-24, 1974.

BARBOSA, J.D.; OLIVEIRA, C.M.C. de; DUARTE, M.D.; PEIXOTO, P.V.; TOKARNIA, C.H. Intoxicação experimental e natural por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em búfalos e outros ruminantes. **Pesq. Vet. Bras.**, v.25, n.4, p.231-234, 2005.

BARBOSA, R.C.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T.; LIMA, E.F.; BARROS, S.S.; GIMENO, E.J.; MOLYNEUX, R.J.; GARDNER, D.R. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* e *Ipomoea riedelii* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. **Toxicon**, v.47, p.371-379, 2006.

BARBOSA, R.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; SOTO-BLANCO, B. Toxicity in goats caused by oleander (*Nerium oleander*). **Res. Vet. Sci.**, v., n., p., 2007. (in press).

BASSO, A.C.; ESPER, C.R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.39, n.6, p.311-319, 2002.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. **Biochemistry**, 5^a ed., W. H. Freeman and Company: New York, 2002, cap.11.

BLANCO, H.G. Catálogo das espécies de mato infestantes de áreas cultivadas no Brasil. Família das Campainhas (*Convolvulacea*). **O Biólogo**, v.44, p.259-278, 1978.

BLEIL, J. D., WASSARMAN, P. M. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. **Dev. Biol.**, v.95, p.317-324, 1983.

BLITHE, D.L.; ILES, R.K. The Role of Glycosylation in Regulating the Glycoprotein Hormone Free α -Subunit and Free P-Subunit Combination in the Extraembryonic Coelomic Fluid of Early Pregnancy. **Endocrinology**, v.136, n.3, p. 903-910, 1995.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSSA, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA e DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p.93-99, 1987.

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

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v.40, p.1515-1539, 2002.

CAVALCANTE, T.V.; SALLES, H.O.; FREITAS, V.J.F. Produção de embriões de cabras soropositivas para artrite encefalite caprina a vírus. **Ciênc. Vet. Tróp.**, v.1, n.2, p.71-75, 1998.

CHEN, Y.C.; CHANG, H.S.; LAI, H.M.; JENG, S.T. Characterization of the wound-inducible protein ipomoelin from sweet potato. **Plant Cell Environ.**, v.28, p.251-259, 2005.

COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plants chitinases. **Plant J.**, v.3, p.31-40, 1993.

COLODEL, E.M. Intoxicação por *Sida carpinifolia* (MALVACEAE) em caprinos **Acta Sci. Vet.**, v.33, n.2, p:233-234, 2005.

DE WALD, D.B.; MASON, H.S.; MULLET, J.H. The soybean vegetative storage proteins VSP α and VSP β are acid phosphatases active on polyphosphates. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.15958-15964, 1992.

DÖBEREINER, J., TOKARNIA, C. H., CANELA, C. F. C. Intoxicação experimental pela salsa *Ipomoea asarifolia* (R. et Schult) em ruminantes. **Arq. Inst. Biol. Anim.**, v.3, p.39-57, 1960.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, n.3, p. 350-356, mar., 1956.

DWEK, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. **Chem. Rev.**, v.96, n.2, p.683-696, 1996.

FERREIRA, S.H.; BARTELT, D.C.; GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v.9, n.13, p.2583-2593, 1970.

FERREIRA, L.A.; GALLE, A.; RAIDA, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; HABERMEHL, G. isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. **J. Protein Chem.**, v.17, p.285-289, 1998.

FERREIRA, L.A.F.; HENRIQUES, O.B.; LEBRUN, I.; BATISTA, M.B.C.; PREZOTO, B.C.; ANDREONI, A.S.S.; ZELNIK, R.; HABERMEHL, G. A new bradykinin-potentiating peptide (Peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu Tapete, Urutu Dourado). **Toxicon**, v.30, n.1, p.33-40, 1992.

FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant α -amilase inhibitors and their interaction with insect α -amilases. Structure, function and potencal for crop protection. **Eur. J. Biochem**, v.269, p.397-412, 2002.

FONTELES, M.C. Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídico no rim isolado: papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal. Fortaleza. **Tese** (Livre Docência). Centro de Ciências da Saúde. 1980.

FONTELES, M.C.; COHEN, J.J.; BLACK, A.J.; WERTHEIM, S.J. Support of renal kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.**, v.244, p.235-246, 1983.

FU, H.; DU, J.; SONG, J.; JIANG, J.; PARK, W.D. Potato and tomato *Forever Young* genes contain class-I patatin promoter-like sequences. **BBAS**, v.42, p. 231-241, 2001

GERLACH, D.; WAGNER, M.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U.; SCHMIDT, K.H. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.214, p.61-68, 2002.

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

GROTH, D. Morphological characterization of seeds and seedlings of seven weed species of Convolvulaceae occurring in agricultural seeds in Brazil. **Iheringia, Ser. Bot.** v.41, p.83-99, 1991.

HANSON, R.W.; BALLARD, F.S. Citrate, pyruvate and lactate contaminants of commercial serum albumin. **J. Lipid. Res.**, v.9, p.667-668, 1968.

HARAGUCHI, M. Plantas tóxicas de interesse na pecuária. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.37-39, 2003.

HARAGUCHI, M.; GORNIK, S.L.; IKEDA, K.; MINAMI, H.; KATO, A.; WATSON, A.A.; NASH, R.; MOLYNEUX, R.J.; ASANO, N. Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.4995-5000, 2003.

HARBOE, N.; INGLID, A. Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. In: AXELSEN, N.H. (ed). **A Manual Quantitative Immunoelectrophoresis**. London: Blackwell Scientific Publications, 1973, p.161-164.

HAVT, A.; BARBOSA, P.S.F.; SOUSA, T.M.; MARTINS, A.M.C.; NOBRE, A.C.L.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; PINTO, V.P.T.; SAMPAIO, A.H.; FONTELES, M.C.; CAVADA, B.S.; MONTEIRO, H.S.A. Renal alterations promoted by the lectins from *Canavalia ensiformis* (Con A) and *Dioclea guianensis* (DguiL) seeds. **Protein Pept. Lett.**, v.10, n.2, p.1-7, 2003.

HERMAN, E.M.; LARKINS, B.A. Protein storage bodies and vacuoles. **Plant Cell**, v.11, p.601-613, 1999.

HUEZA, I.M.; GUERRA, J.L.; HARAGUCHI, M.; ASANO, N.; GÓRNIK, S.L. The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: a study in rats. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v.57, p.53-58, 2005.

HUGHES, J.; KOSTERLITZ, H.W.; LESLIE, F. Effect of morphine on adrenergic transmission in the mouse *vas deferens*. Assessment of agonist and antagonist potencies of narcotic analgesics. **Br. J. Pharmacol.**, v.53, p.371-381, 1975.

IBEKWE, A.M.; ANGLE, J.S. Zinc and cadmium effects on rhizobia and white clover using chelator-buffered nutrient solution. **Soil Sci Soc Am J**, v.62, p.204-211, 1998.

IBGE,

http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1068&id_pagina=1 (Data de acesso: 14/05/2008).

IMANISHI, S.; KITO-NAKAMURA, K.; MATSUOKA, MORIKAMI, A.; NAKAMURA, K. A major jasmonate-inducible protein of sweet potato, ipomoelin, is an ABA-independent wound-inducible protein. **Plant Cell Physiol.**, v.38, n.6, p.643-652, 1997.

JENKINSON, D.H.; BARNARD, E.A.; HOYER, D.; HUMPREY, P.P.A.; LEFF, P.; SHANKLEY, N.P. International Union of Pharmacology Committee on receptor nomenclature and drug classification. IX. Recommendations on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.42, p.255-266, 1995.

KERR, C. L., HANNA, W. F., SHAPER, J. H., WRIGHT, W. W. Characterization of zona pellucida glycoprotein 3 (ZP3) and ZP2 binding sites on acrosome-intact mouse sperm. **Biol. Reprod.**, v.66, p.1585-1595, 2002.

KIILL, L.H.P.; RANGA, N.T. Ecologia da polinização de *Ipomoea asarifolia* (Ders.) Roem. & Schult. (Convolvulaceae) na Região Semi-árida de Pernambuco. **Acta Bot. Brs.**, v.17, n.3, p.355-362, 2003.

KIM, S.; KIM, S.I.; HA, K-S.; LEEM, S-H. An improved method for quantitative sugar analysis of glycoproteins. **Exp. Mol. Med.**, v.32, n.3, p.141-145, set., 2000.

KISSMAN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Basf, São Paulo. Tomo II. 798p.

KODAMA, Y. Plastidic proteins containing motifs of nuclear transcription factors. **Plant Biotechnol.**, v. 24, p.165-170, 2007.

KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. Glomerular filtration and renal blood flow. In: _____. **Renal Physiology**. 2^a ed. St. Louis: Mosby, 1997. cap.3, p.31-51.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAKHTIN, V.M. Molecular organization of lectins (A Review). **Mol. Biol.**, v.28, n1, part 1, p.157-177, 1994.

LAMARA, A.; FIENEKHAL, L.; CHATAGNON, G.; BRUYAS, J.F.; TAINTURIER, D.; BATTUT, I.; FORNAZERO, C.; CHEBLOUNE, Y. Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). **Theriogenology**, v.58, p.1153-1163, 2002.

LANNOO, N.; VANDENBORRE, G.; MIERSCH, O.; SMAGGHE, G.; WASTERNAK, C.; PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. The jasmonate-induced expression of *Nicotiana tabacum* leaf lectin. **Plant Cell Physiol.**, v.48, n.8, p.1207-1218, 2007.

LEE, V.E; SCHULMAN, J.M.; STIEFEL, E.I.; LEE, C.C. Reversible precipitation of bovine serum albumin by metal ions and synthesis, structure and reactivity of new tetrathiomallate chelating agents. **J Inorg Biochem.**, v.101, n.11-12, p.1707-1718, 2007.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.**, v.98, n.2, p.637-674, 1998.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSTY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Mol. Cell Biol.**, 4 ed. Nova York: W.H. Freeman, 1999. 1084p.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa, SP, 1982, 425p.

LUCCI, C.M.; SILVA, R.V.; CARVALHO, C.A.; FIGUEIREDO, R.; BÁO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Rumin. Res.**, v.41, p.61-69, 2001.

MACEDO, N.M.; COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; BOMFIM, L.R.; PESSOA, C.; MORAES M.O.; RAMOS, M.V. Embryotoxic activity and differential

binding of plant-derived carbohydrate-recognizing proteins towards the sea urchin embryo cells. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.36, n.1-2, p.90-97, 2005.

MACEDO, M.L.; FREIRE, M.G.; MARTINS, L.T.; MARTINEZ, D.S.; GOMES, V.M.; SMOLKA, M.B.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; COELHO, L.C. Novel protein from *Labramia bojeri* A. DC. seeds homologue to Kunitz-type trypsin inhibitor with lectin-like properties. **J. Agric. Food. Chem.**, v.52, n.25, p.7548-7554, 2004.

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

MARTINEZ-MALDONADO, M.; STAWROULAKI-TSAPARA, N.; SUKI, W.N.; EKNOYAN, G. Renal effects of Lithium administration in rats: alteration in water and electrolyte metabolism and the response to vasopressin and cyclic-adenosine monophosphate during prolonged administration. **J. Lab. Clin. Med.**, v.80, n.3, p.445-461, 1978.

MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, A.M.O.; HAVT, A.; BARBOSA, P.S.F.; SOARES, T.F.; EVANGELISTA, J.S.A.M.; MENEZES, D.B. de; FONTELES, M.C.; TEIXEIRA, E.H.; PINTO, V.P.T.; NASCIMENTO, K.S.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; MONTEIRO, H.S.A. Renal effects induced by the lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.57, p.1329-1333, 2005.

MEDEIROS, R.B. de; FERREIRA, M.A.S.V.; DIANESE, J.C. **Mecanismos de agressão e defesa na interações planta-patógeno**. Ed. Universidade de Brasília, Brasília, 2003a. 289p.

MEDEIROS, R.M.T.; BARBOSA, R.C.; RIET-CORREA, F.; LIMA, E.F.; TABOSA, I.M.; BARROS, S.S. de; GARDNER, D.R.; MOLYNEUX, R.J. Tremorgenic syndrome in goats caused by *Ipomoea asarifolia* in Northeastern Brazil. **Toxicon**, v.41, p.933-935, 2003b.

MEDEIROS, R.M.T.; NOBRE, V.M.T.; TABOSA, I.M.; RIET-CORREA, F. Toxic plants for ruminants in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. In: **WORLD BUIATRICS CONNGR.**, 21, p.10141-10150, 2000.

MELO, M. M., OLIVEIRA, N. J. F. Plantas Tóxicas. **Cad. Téc. Vet. Zootec.**, v.32, p. 7-76, 2000.

MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). Projeto Estratégia Nacional de Diversidade Biológica e Relatório Nacional, 2007. <http://www.mma.gov.br/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=37>

MONTREUIL, J. Glycoprotein structure and conformation: an overview. In: VERBERT, A. **Methods on Glycoconjugates**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1995, 215p.

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

MORI, E.; MORI, T.; TAKASAKI, S. Binding of mouse sperm to β -galactose residues on egg zona pellucida and asialofetuin-coupled beads. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.238, p.95-99, 1997.

MURAKAMI, S.; KONDO, Y.; NAKANO, T.; SATO, F.O, Y. Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. **FEBS Lett.**, v.468, p.15-18, 2000.

NAKANO, T.; SATO, F.; YAMADA, Y. Analysis of nucleoid-proteins in tobacco chloroplasts. **Plant Cell Physiol.**, v.34, p.873-886, 1993.

NAKANO, T.; MURAKAMI, S.; SHOJI, T.; YOSHIDA, S.; YAMADA, Y.; SATO, F. A Novel Protein with DNA Binding Activity from Tobacco Chloroplast Nucleoids. **Plant Cell**, v.9, p.1673-1682, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3^a ed., Worth Publisher: New York, 2000, cap 3.

NGO, L.; BARAJAS, M.; WEERASINGHE, G.; ZEM, G.; OPPENHEIMER, S.B. A new histochemical approach for studying sperm cell surfaces. **Acta Histochem.**, v.105, n.1, p.21-28, 2003.

NOVAK, W.K.; HASLBERGER, A.G. Substantial equivalence of antinutrients and inherent plant toxins in genetically modified novel foods. **Food Chem. Toxicol.**, v.38, p.473-483, 2000.

OLIVEIRA, J.T.A.; RIOS, F.J.B.; VASCONCELOS, I.M.; FERREIRA, F.V.A.; NOJOSA, G.B.A.; MEDEIROS, D.A. *Cratylia argentea* seed lectin, a possible

defensive protein against plant-eating organisms: effects on rat metabolism and gut histology, **Food Chem. Toxicol.**, v.42, p.1737-1747, 2004.

OLSNES, S. Review: The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, v.44, n.4, p.-361-370, 2004.

OZGUR, K.; PATANKAR, M.S.; OEHNINGER, S.; CLARK, G.F. Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding. **Mol. Hum. Reprod.**, v.4, n.4, p.318-324, 1998.

PARILLO, F.; FAGIOLI, O.; DALL'AGLIO, C.; VERINI-SUPPLIZI, A. Lectin histochemical detection of sulfoglycans in the zona pellucida of mammalian antral oocytes. **Acta Histochem.**, v.102, p.193-202, 2000.

PARILLO, F.; STRADAIOLI, G.; DALL'AGLIO, C.; VERINI-SUPPLIZI, A. Characterization of the complex carbohydrates in the zona pellucida of mammalian oocytes using lectin histochemistry. **Vet. Res. Commun.**, v.20, n.3, p.225-236, 1996.

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

PINHEIRO, R. R., SANTA ROSA, J. Intoxicação experimental por salsa (*Ipomoea asarifolia*) em caprinos: I – Sintomatologia, funções vitais e exame anátomo-histológico. In: **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, 1987-1995**. Sobral: EMBRAPA-CNPC, p.179-182. 1996a.

PINHEIRO, R. R., SANTA ROSA, J. Intoxicação experimental por salsa (*Ipomoea asarifolia*) em caprinos: II – Hemograma, urinálise e dosagens bioquímicas séricas em exames anátomo-histopatológicos. In: **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, 1987-1995**. Sobral: EMBRAPA-CNPC, p.183-188. 1996b.

PUSZTAI, A. Transport of proteins through the membranes of the adult gastrointestinal tract – a potential for drug delivery? **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v.3, p.215-228, 1989.

RAKWAL, R.; AGRAWAL, G.K.; YONEKURA, M. Light-dependent induction of *OsPR10* in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by the global stress signaling molecule jasmonic acid and protein phosphatase 2A inhibitors. **Plant Sci.**, v.161, p.469-479, 2001.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). **Plant Sci.**, v.139, p.141-148, 1998.

RATHNAM, P.; SAXENA, B.B. Conjugation of a fetuin glycopeptide to human follicle-stimulating hormone and its subunits by photoactivation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.624, p.436-442, 1980.

RIET -CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesq. Vet. Bras.**, v.21, n.1, p.38-42, 2001.

RODEHEFFER, C.; SHUR, B. C. Characterization of a novel mZP3-independent sperm-binding ligand that facilitates sperm adhesion to the egg coat. **Development**, v.131, p.503-512, 2004.

ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Ed. UFV, Viçosa, 1ª. reimpressão, 2002. 45p. (Cadernos didáticos, 56)

ROOPASHREE, S.; SINGH, S.A.; GOWDA, L.R.; RAO, A.G.A. Dual-function protein in plant defence: seed lectin from *Dolichos biflorus* (horse gram) exhibits lipoxygenase activity. **Biochem. J.**, v.395, p.629-639, 2006.

ROSENFELD, R.; BANGIO, H.; GERWIG, G.J.; ROSENBERG, R.; ALONI, R.; COHEN, Y.; AMOR, Y.; PLASCHKES, I.; KAMERLING, J.P.; MAYA, R.B-Y. A lectin array-based methodology for analysis of protein glycosylation. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v.70, p.415-426, 2007.

ROSKAMP, L.; PEGORARO, M.; LUZ, P.R; CRESTANI, S.; VAZ, R.S. Uma revisão sobre receptores opsônicos e não opsônicos. **RUBS**, v.1, n.3, p.12-16, 2005.

SALLES, H.O.; ANDRIOLI, A.; SOARES, A.T.; MOURA-SOBRINHO, P.A. Influência da artrite encefalite caprina na resposta superovulatória. **Ciênc. Anim.**, v.8, n.1, p.37-40, 1998.

SANTA ROSA, J. Ocorrência de plantas tóxicas nos municípios de Sobral e Quixadá, e seus efeitos na espécie caprina. In: **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, 1982-1986**. Sobral: EMBRAPA-CNPC, p.167-168. 1989.

SANTOS, L. F. L. **Toxina da salsa (*Ipomoea asarifolia* R. et Schult.): aspectos bioquímicos, estruturais, funcionais e potencial biotecnológico.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2001. Tese de Doutorado. 142p. 2001.

SATHE, S.K. Solubilization, electrophoretic characterization and *in vitro* digestibility of almond (*Prunus amygdalus*) proteins. **J. Food Biochem.**, v.16, p.249-264, 1993.

SCHMELZ, E.A.; ENGELBERTH, J.; ALBORN, H.T.; O'DONNELL, P.; SAMMONS, M.; TOSHIMA, H.; TUMLINSON, J.H. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. **PNAS**, v.100, n.18, p. 10552-10557, 2003.

SHEWRY, P.R. Tuber storage proteins. **Ann. Bot.**, v.91, p.755-769, 2003.

SOTO-BLANCO, B., HARAGUCHI, M., SILVA, J.A., GÓRNIK, S.L. Intoxicação natural de caprinos e ovinos por *Palicourea marcgravii* St. Hil. (Rubiaceae). **Caatinga**, Mossoró-RN, v.17, n.1, p.52-56, jan./jun. 2004.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L. C.; ANDREA, M. M. de. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna:** Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).

SERRANO, H.; DIAZ-ESPARZA, L.; GARCIA-SUAREZ, D. Pig sperm membrane integrity evaluated by lectin labeling. **Arch. of Androl.**, v.47, n.1, p.59-65, jul/ago, 2001.

SHARON, N. LIS, H. **Lectins.** New York, USA. Chapman and Hall, 1989, 127p.

SHERWANI, A.F.; MOHMOOD, S.; KHA, F.; KHAN, R.H.; AZFER, M.A. Characterization of lectins and their specificity in carcinomas- an appraisal. **Indian J. Clin. Biochem.**, v.18, n.2, p.169-180, 2003.

STASWICK, P.E. Novel regulation of vegetative storage protein genes. **Plant Cell**, v.2, p.1-6, 1990.

SWENSON, M. J. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos.** 10ed. Editora Guanabara. Rio de Janeiro, RJ. 799p. 1988.

TEIXEIRA, E.H.; HAVT, A.; BASBOSA, P.S.F.; MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Renal effects of the lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds. **Protein Pept. Lett.**, v.8, n.6, p.477-484, 2001.

THALER, C. D., CARDULLO, R. A. Distinct membrane fractions from mouse sperm bind different zona pellucida glycoproteins. **Biol. Reprod.**, v.66, p.65-69, 2002.

TOKARNIA, C. H., DÖBEREINER, J., PEIXOTO, P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000. 320 p.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J.; SILVA, M.F. da. **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: INPA, 1979, 95p.

TÖPFER-PETERSEN, E. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. **Hum. Reprod. Update**, v.5, n.4, p.314-329, 1999.

TÖPFER-PETERSEN, E.; PETROUNKINA, A.M.; EKHLASI-HUNDRIESER, M. Oocyte-sperm interactions, **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.653-662, 2000.

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

TRAVERSO, S.D.; COLODEL, E.D.; LORETTI, A.P.; CORREA, A.M.; DRIEMEIER, D. 2003. Intoxicação natural por *Trema micrantha* em caprinos. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.33, n.1, jan-fev, p.133-136, 2003.

VAN DAMME, E.J.M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W.J. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **TRENDS Plant Sci.**, v.9, n.10, p.484-489, out., 2004a.

VAN DAMME, E.J.M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W.J. Potato lectin: an updated model of a unique chimeric plant protein. **Plant J.**, v.37, p.34-45, 2004b.

VAN DAMME, E.J.M.; LANNOO, N.; FOUQUAERT, E.; PEUMANS, W.J. The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. **Glycoconj. J.**, v.20, p.449-460, 2004c.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plants lectins: a composite of several distinct families or structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Plant Sci.**, v.17, n.6, p.575-692, 1998.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.44, p.135-162, 2006.

VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v.44, n.4, p.385-403, set, 2004.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**, 2^a ed., John Wiley & Sons Inc.: New York, 1995, cap. 10 e 11.

WALSER, M.; DAVIDSON, D.G.; ORLOFF, J. The renal clearance of alkali-stable inulin. **J. Clin. Invest.**, v.34, p.1520-1523, 1955.

WANG, S.J.; LAN, Y.C.; CHEN, S.F.; CHEN, Y.M.; YEH, K.W. Wound-response regulation of the sweet potato sporamin gene promoter. **Plant Mol. Biol.**, v.48, p.223-231, 2002.

WRIGHT, L.M.; REYNOLDS, C.D.; RIZKALLAH, P.J.; ALLEN, A.K.; VAN DAMME, E.J.M.; DONOVAN, M.J.; PEUMANS, W.J. Structural characterization of the native fetuin-binding protein *Scilla campanulata* agglutinin: a novel two-domain lectin. **FEBS Lett.**, v.468, p.19-22, 2000.

YEH, K.W.; CHEN, J.C.; LIN, M.I.; CHEN, Y.M.; LIN, C.Y. Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.): a tuber storage protein with trypsin inhibitory activity. **Plant Mol. Biol.**, v.33, p.565-570, 1997.

ZARA, J.; NAZ, K. The role of carbohydrates in mammalian sperm-egg interactions: How important are carbohydrate epitopes? **Front.Biosci.**, v.3, p.1028-1038, 1998.