

LECTINAS DE Canavalia brasiliensis Mart. - COMPORTAMENTO
DURANTE A MATURAÇÃO DA SEMENTE

Lia Magalhães de Almeida Silva

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessá-
rios à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

CENTRO DE CIÊNCIAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Fortaleza - Ceará

1 9 8 6

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

A transcrição do material contido nesta dissertação é permitida desde que se faça a citação apropriada.

Dissertação aprovada em: 23/02/86

Prof. Renato de Azevedo Moreira
Orientador

Prof. Iracema Lima Ainoz

Prof. José Xavier Filho

A meus pais
A meu esposo
e a minha filha.

Este trabalho foi realizado graças às seguintes Insti
tuições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tec
nológico (CNPq), através de Bolsa de Pós-Graduação concedida à
autora.

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Su
perior (CAPES) através de auxílios ao Curso de Pós-Graduação em
Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

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

AGRADECIMENTOS

Ao professor RENATO DE AZEVEDO MOREIRA pelo interesse e dedicação com que orientou e acompanhou este trabalho, bem como pela sincera amizade e compreensão, demonstrada no convívio diário.

À professora IRACEMA LIMA AINOZ pelas sugestões apresentadas, bem como pela amizade e orientação transmitidas ao longo do trabalho.

Ao professor JOSÉ XAVIER FILHO pelas sugestões apresentadas na discussão desta tese.

À professora ANA CECÍLIA HORTA BARROS pela amizade, cooperação e sugestões fornecidas durante a realização deste trabalho.

A todos os professores, bolsistas e colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela cooperação e amizade.

De modo especial à meus pais e a meu esposo, por terem fornecido condições para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações gerais.....	1
1.2. Revisão Histórica.....	2
1.3. Ocorrência das Lectinas.....	5
1.4. Detecção e Isolamento das Lectinas....	11
1.5. Composição Química e Propriedades Fisi- coquímicas das Lectinas.....	13
1.6. Especificidade das Lectinas.....	17
1.7. Propriedades Biológicas das Lectinas....	19
1.8. Papel das lectinas na Planta.....	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1. Materiais.....	35
2.2. Métodos.....	37
2.2.1. Colheita das vagens.....	37
2.2.2. Determinação do peso fresco e pe- so seco.....	37

	Página
2.2.3. Preparação dos extratos.....	38
2.2.4. Determinação de proteínas.....	38
2.2.5. Determinação da atividade hema- glutinante.....	39
2.2.6. Cromatografia de afinidade em Sephadex G-50.....	39
2.2.7. Eletroforese em gel de poliacri- lamida contendo SDS e betamercap- toetanol.....	40
2.2.8. Eletrofocalização.....	41
2.2.9. Preparação de anticorpos (coelho) contra proteínas de <u>C. brasiliens</u> <u>sis</u>	42
2.2.10. Imunodifusão radial de Mancini..	44
2.2.11. Imunoeletroforese em gel de aga- rose contendo antissoro (Rocket).	45
3. RESULTADOS.....	46
3.1. Determinação do peso fresco e peso seco de pericarpo, tegumento e cotilédones + eixo de <u>C. brasiliensis</u> ao longo do processo de maturação.....	46
3.1.1. Peso fresco e peso seco de coti- lédones + eixo.....	46

	Página
3.1.2. Peso fresco e peso seco de pericarpo.....	49
3.1.3. Peso fresco e peso seco de tegumento.....	49
3.2. Teor de proteínas e atividade hemaglutinante de cotilédones + eixo, pericarpo e tegumento ao longo do processo de maturação.....	52
3.2.1. Teor de proteínas e atividade hemaglutinante em cotilédones + eixo.....	52
3.2.2. Teor de proteínas e atividade hemaglutinante em pericarpo e tegumento.....	58
3.3. Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50.....	61
3.3.1. Cromatografia de afinidade de extratos de cotilédones.....	61
3.3.2. Cromatografia de afinidade de extratos de pericarpo.....	64
3.3.3. Cromatografia de afinidade de extratos de tegumento.....	66

	Página
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida con <u>t</u> endo SDS e betamercaptoetanol.....	66
3.4.1. Eletroforese de extratos de cotilê <u>d</u> ones + eixo.....	66
3.4.2. Eletroforese das frações retidas em coluna de Sephadex G-50 de cotilê <u>d</u> ones.....	69
3.4.3. Eletroforese de extratos de pericar <u>o</u> e tegumento.....	71
3.5. Eletrofocalização das frações retidas em coluna de afinidade de cotilê <u>d</u> ones + e <u>i</u> xo	71
3.6. Imunodifusão radial de Mancini.....	73
3.7. Imunoeletroforese em gel de agarose cont <u>e</u> ndo antissoro contra Extrato Total e fração PIII.....	75
4. DISCUSSÃO.....	79
5. CONCLUSÕES.....	82
6. BIBLIOGRAFIA.....	83
7. COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01. Propriedades gerais e aplicações das lectinas.....	21
02. Fatores que afetam a aglutinação celular pelas lectinas.....	24
03. Funções propostas para as lectinas na Natureza.....	32
04. Peso fresco e peso seco de cotilédones + eixo ao longo do processo de maturação.....	47
05. Peso fresco e peso seco de pericarpo ao longo do processo de maturação.....	50
06. Peso fresco e peso seco de tegumento ao longo do processo de maturação.....	53
07. Teor de proteínas e atividade hemaglutinante em cotilédones + eixo ao longo do processo de maturação.....	56
08. Teor de proteínas em pericarpo e tegumento ao longo do processo de maturação.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01. Esquema para obtenção de IgG.....	43
02. Variação do peso fresco e peso seco em cotilédones + eixo ao longo do processo de maturação...	48
03. Variação do peso fresco e peso seco de pericarpo ao longo do processo de maturação.....	51
04. Variação do peso fresco e peso seco de tegumento ao longo do processo de maturação.....	54
05. Teor de proteínas, atividade hemaglutinante total e específica de cotilédones + eixo ao longo do processo de maturação.....	57
06. Teor de proteínas de pericarpo, tegumento e cotilédones + eixo ao longo do processo de maturação.....	60
07. Cromatografia de afinidade de extratos de cotilédones + eixo ao longo do processo de maturação.....	62
08. Teor de proteínas nas frações PI e PIII obtidas por cromatografia de afinidade de extratos de cotilédones + eixo ao longo do processo de maturação.....	63
09. Cromatografia de afinidade de extratos de pericarpo ao longo do processo de maturação.....	65

10. Cromatografia de afinidade de extratos de tegumento ao longo do processo de maturação.....	67
11. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e betamercaptoetanol de extratos de cotilédones + eixo ao longo do processo de maturação.....	68
12. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e betamercaptoetanol das frações de cotilédones + eixo retidas em coluna de Sephadex G-50 ao longo do processo de maturação.....	70
13. Eletrofocalização das frações proteicas de cotilédones + eixo retidas em coluna de afinidade ao longo do processo de maturação.....	72
14. Imunodifusão radial de Mancini de extratos de cotilédones + eixo ao longo do processo de maturação.....	74
15. Imunoeletroforese em gel de agarose de extratos de cotilédones + eixo ao longo do processo de maturação com antissoro contra Extrato Total....	76
16. Imunoeletroforese em gel de agarose de extratos de cotilédones + eixo ao longo do processo de maturação com antissoro contra a fração PIII....	77
17. Relação atividade/teor de lectina (UH/mg PIII) em cotilédones + eixo de <u>C. brasiliensis</u> ao longo do processo de maturação.....	78

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

Con A	Concanavalina A
PI	Primeira fração não retida em cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50
PII	Segunda fração não retida em cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50
PIII	Fração retida em cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50
PHA	Fitohemaglutinina de <u>Phaseolus vulgaris</u>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
U.H.	Unidade de hemaglutinação. Definida como o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2% em NaCl 0,15M.

RESUMO

O comportamento da lectina e das demais proteínas de semente de Canavalia brasiliensis Mart. foi investigado durante o processo de maturação.

As flores de C. brasiliensis apareceram após 150 dias do plantio. Suas vagens foram coletadas a intervalos de 5 dias até a completa maturação e separadas em três partes: pericarpo, tegumento e cotilédones + eixo. A lectina foi encontrada somente nos cotilédones + eixo de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação.

Por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex, notou-se que durante a maturação há uma síntese diferenciada da lectina com respeito às demais proteínas de peso molecular elevado. As lectinas são sintetizadas mais tardiamente, o que foi confirmado por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e betamercaptoetanol, onde se notam que as bandas características da lectina madura têm seu aparecimento retardado, só surgindo a partir do 50º dia de maturação e pela atividade hemaglutinante, que só se torna expressiva também a partir do 50º dia. Estes resultados são ainda confirmados pelos experimentos de eletroforesis de frações proteicas retidas por cromatografia de afinidade (PIII).

Foi mostrada ainda a presença de um precursor da lectina, com capacidade de se ligar à coluna de Dextrana mas apresentando peso molecular aparente ligeiramente mais elevado e ponto

isoelétrico mais baixo embora apresentando características imunológicas semelhantes à lectina madura.

Foi encontrado um pequeno decréscimo da atividade hemaglutinante nos estágios finais do processo de maturação. Por outro lado, não foi encontrado decréscimo semelhante no teor da proteína retida por coluna de afinidade nem nas quantidades relativas das bandas de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e betamercaptoetanol, nem nos experimentos de imunológica, o que indica a possível presença de um inibidor da lectina nos estágios finais do processo.

ABSTRACT

The behavior of the lectin and other protein from Canavalia brasiliensis Mart. seed was investigated during the maturation process.

The Canavalia brasiliensis flowers appeared 150 days after germination. The pods were collected in 5 days intervals until complete maturation and separated in three parts: pericarp, seed coat and cotyledons + axis. The lectin was found only in cotyledons during maturation.

A differentiated synthesis of the lectin, when compared to the other high molecular weight proteins during maturation, was found by affinity chromatography on Sephadex column. The lectin is synthesized later which was confirmed by SDS- β ME polyacrilamide gel electrophoresis, where its characteristic bands appear only after the 50th and also by hemagglutinating activity which is evident only 50 days after anthesis. These results are also confirmed by isoelectric focusing of the fractions retained by affinity chromatography (PIII).

A precursor of the lectin that interacts with dextran but shows a higher apparent molecular weight and a lower isoelectric point than the lectin although presenting the immunochemical characteristics of the mature lectin was found.

A small decrease in the hemagglutinating activity was shown in the final stages of the maturation process, but no

modification was found in the amount of PIII nor in the relative amount of proteins in the bands found by SDS β -mercaptoethanol polyacrilamide gel electrophoresis and immunochemical experiments, indicating the presence of a lectin inhibitor in the final stages of the process.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais

As lectinas são definidas como proteínas de origem não imune, capazes de reconhecimento específico e ligação reversível a carboidratos (ou compostos contendo carboidratos) e de aglutinar células e glicoconjugados (GOLDSTEIN et.al., 1980; KOCOUREK & HOREJSI, 1983).

Distribuídas amplamente na Natureza, as lectinas podem ser encontradas tanto no Reino Vegetal como no Reino Animal. Nestes, elas podem ser encontradas tanto nos vertebrados como nos invertebrados (ver revisão de GOLD & BALDING, 1975). É no Reino Vegetal, no entanto, que encontramos a maioria das lectinas hoje conhecidas, notadamente nas famílias Leguminosae e Euphorbiaceae (ver revisões de GOLDSTEIN & HAYES, 1978; LIS & SHARON, 1981; ETZLER, 1985).

A quase totalidade das lectinas vegetais estudadas tem sido extraída de sementes mas elas também podem ser encontradas em outras partes da planta como folhas (CAZAL & LALOU-RIE, 1952; COULET 1954; TÉTRY, 1955; TIGGELMAN et.al., 1956, ROUGÉ, 1977), floema (KAUSS & GLASER, 1974), raízes e tubérculos (KRUPPE & ENSGRABER, 1957; HERZOG, 1958; MARTY, 1974), látex, pericarpo (KRUPPE & ENSGRABER, 1957; HERZOG, 1958; MARTY, 1974; TALBOT & ETZLER, 1978) e cascas de árvore (BOYD, 1963; JAFFÉ, 1969; SHARON & LIS, 1972, HOREJSI et.al., 1978).

Diferentes efeitos fisiológicos têm sido sugeridos para as lectinas, desde a aglutinação de eritrócitos e leucócitos, estimulação de linfócitos, inibição de crescimento de fungos, citotoxicidade e toxidez para animais, entre outros (DATTA et.al., 1969; JAFFÉ, 1969; SHARON & LIS, 1972; LIS & SHARON, 1973; MIRELMAN et.al., 1975).

Embora até inícios da década passada poucos estudos tenham sido feitos com lectinas puras, os últimos dez anos testemunharam um enorme avanço nas investigações com lectinas e um grande número dessas substâncias foi isolado, favorecendo assim a obtenção de dados mais precisos sobre as suas propriedades.

1.2 - Revisão Histórica

O estudo das lectinas iniciou-se ainda no século passado com a descoberta de que extratos de certas plantas possuíam a habilidade de aglutinar hemácias e eram tóxicas para homens e animais.

Embora fosse fato conhecido, há bastante tempo, que as sementes de determinadas plantas eram tóxicas, até fins do século XIX, acreditava-se que tal efeito era devido à presença de toxinas bacterianas presentes na semente. Esta teoria foi desacreditada quando WARDEN & WADELL (1884) mostraram que a toxidez de sementes de Abrus precatorius era devida a uma fra

ção protéica que podia ser precipitada com álcool a partir de um extrato aquoso. A esta fração deram o nome de abrina. Pouco depois DIXON (1886), por sua vez, obteve um extrato altamente tóxico a partir de sementes de Ricinus communis. Posteriormente STILLMARK (1889) mostrou que as propriedades tóxicas de sementes de Ricinus communis eram devidas a uma proteína que ele denominou de ricina. Ele observou ainda que a ricina era capaz de aglutinar hemácias, sendo assim o primeiro a relatar a existência de hemaglutininas vegetais.

Após o trabalho pioneiro de STILLMARK, outras espécies vegetais foram encontradas apresentando atividade hemaglutinante como Robinia pseudoacacia (POWER & CAMBIER, 1890), Jatropha curcas (SIEGEL, 1893) e Croton triglium (ELFSTRAND, 1897).

O nome hemaglutinina foi primeiro sugerido por ELFSTRAND (1897) para as aglutininas vegetais e posteriormente estendido para as imunoglobulinas. O nome fitotoxina também era bastante empregado devido às suas atividades tóxicas. Graças à sua capacidade de aglutinar hemácias, outros termos como glabrificação e conglutinação foram usados para descrever suas propriedades.

LANDSTEINER & RAUBITSCHK (1908) foram os primeiros a relatar a presença de hemaglutininas em espécies comestíveis quando observaram a presença de atividade hemaglutinante em sementes de Phaseolus vulgaris. Logo depois WIENHAUS (1908) verificou que os extratos de Phaseolus vulgaris eram também capa

zes de aglutinar leucócitos bem como células de fígado e rim.

A atividade hemaglutinante, no entanto, já era sabida ser apenas uma das atividades das lectinas e o fato de serem as mesmas denominadas de aglutininas teria um significado apenas operacional (EISENBERG, 1906).

Com o passar do tempo e conseqüente descoberta de um maior número de plantas contendo hemaglutininas, o termo fito hemaglutinina tornou-se comum.

Até meados deste século supunha-se que as fitohemaglutininas eram inespecíficas e seu estudo permaneceu quase como uma curiosidade acadêmica. RENKONEN (1948) e BOYD & REGUERA (1949) foram os primeiros a encontrar fitohemaglutininas com atividade específica para grupos sanguíneos. Com esta descoberta, o interesse dos pesquisadores foi despertado e os estudos com as fitohemaglutininas tomou novo impulso, embora estivessem mais voltados para os aspectos imunológicos do que toxicológicos. Foram iniciados, então, estudos sistemáticos na tentativa de encontrar fitohemaglutininas que servissem como reagentes baratos e de fácil obtenção para a determinação clínica de grupos sanguíneos.

BOYD, em 1963, sugeriu o nome lectina (do latim lege re, escolher), pretendendo chamar a atenção para a sua especificidade, sem dar maior importância à sua origem. O termo lectina passou a ter uma aceitação cada vez maior, embora todos os agentes aglutinantes, quer de origem vegetal, quer de origem animal, nele pudessem ser compreendidos. Para clarificar a

situação um grupo de lectinólogos apresentou uma definição mais restrita para as lectinas, como sendo proteínas de origem não imune que se ligam a açúcares (ou glicoconjugados) e aglutinam células e glicoconjugados (GOLDSTEIN et.al., 1980). Uma vantagem da definição é que ao mesmo tempo que não restringe a origem, como no caso de fitohemaglutinina, exclui os anticorpos pois ao contrário destes, que são estruturalmente semelhantes entre si, as lectinas variam na composição, estrutura quaternária, peso molecular e número de sítios de ligação, embora em alguns casos possam apresentar a mesma especificidade.

Mais recentemente, graças à maior facilidade para o isolamento de lectinas, com a utilização de cromatografia de afinidade, o estudo das lectinas tomou novo impulso. A cromatografia de afinidade das lectinas faz uso quer dos carboidratos presentes na própria matriz (como é o caso de Sephadex), quer de resinas modificadas pela adição de grupos. Graças a esta maior facilidade para a obtenção de lectinas puras, os lectinólogos podem hoje melhor investigar as características das lectinas e suas interações com os mais diversos sistemas e explorar melhor as diversas hipóteses sobre o seu papel fisiológico.

1.3 - Ocorrência das Lectinas

As lectinas são de ocorrência comum em plantas, especialmente na família Leguminosae (TOMS & WESTERN, 1971). Nestas a maior concentração de lectinas está localizada nas se

mentos, onde compreendem grande parte do peso. Em Dioclea gran diflora a lectina corresponde a 1,4% do peso seco da semente (MOREIRA et.al., 1983) e em Canavalia brasiliensis este teor é de 2,2% (MOREIRA & CAVADA, 1984).

Algumas plantas, por outro lado, além das lectinas presentes nas sementes podem apresentar lectinas também em folhas (CAZAL & LALOURIE, 1952; COULET, 1954; ROUGÉ, 1977), caules (MARTY, 1974), raízes (KRUPPE & ENSGRABER, 1957), flores (CAZAL & LALOURIE, 1952), pericarpos (ROUGÉ, 1977; TALBOT & ETZLER, 1978), cascas de árvores (HOREJSI et.al., 1978) e seiva (KAUSS & ZIEGLER, 1974).

Existem ainda poucas informações sobre a localização celular e subcelular das lectinas. Altos níveis de lectinas foram encontrados em cotilédones e eixo embrionário de lentilha (HOWARD et.al., 1972; ROUGÉ 1974a e b) e ervilha (ROUGÉ, 1975) mas pouco foi encontrado nos tegumentos. Pesquisas realizadas com soja mostraram que a maior parte da lectina estava presente nos cotilédones bem como nos eixos e tegumento (PUEPPKE et.al., 1978). Nestes estudos os autores mostraram a presença da lectina não só pela atividade hemaglutinante mas também por imunodifusão e radioimunoensaio utilizando anticorpos preparados contra as lectinas purificadas da semente. CAUSSE e colaboradores (1981), utilizando o método de ELISA também encontraram pequenas quantidades de lectina em tegumentos de soja.

Através de investigações de fracionamento subcelular sabe-se hoje que as lectinas de sementes estão associadas aos

corpos protéicos nas células cotiledonárias de Phaseolus vulgaris (BEGBIE, 1979; MANEN e MIEGE, 1981). Da mesma forma, nas sementes de Datura stramonium, algumas lectinas estão nos corpos protéicos, apesar de uma parte estar associada com estruturas membranáceas (KILPATRICK et.al., 1979; JEFFREE & YEOMAN, 1981).

Diversos autores sugerem que as lectinas estejam presentes nas membranas celulares das plantas. Entretanto, como as lectinas possuem uma alta reatividade, sua ligação a membranas pode ser devida a artefatos ocorridos durante a ruptura das células. Desta forma, a presença de lectina de mamona no interior da membrana mitocondrial foi posteriormente mostrada ser um artefato (BOWLES & KAUSS, 1975; KOHLE & KAUSS, 1979).

Usando anticorpos contra lectina de sementes de Dolichos biflorus, TALBOT & ETZLER (1978) encontraram em folhas e caules pequenas quantidades de um material que apresentava reação cruzada com a lectina da semente. Este material parece estar presente nos órgãos da planta, em todos os estágios de seu desenvolvimento, aumentando marcadamente quando o botão floral aparece. Este material parece estar localizado na parede celular, ao contrário das lectinas que são, em sua maior parte, encontradas no citoplasma e corpos protéicos. Ele pode assumir propriedades semelhantes às da lectina, sob certas circunstâncias, por um processo desconhecido e é também formado em grandes quantidades se a planta está doente (ETZLER, 1980). Todos

esses resultados parecem indicar uma função deste material no crescimento celular. Alguns pesquisadores sugerem que este material seja uma possível prolectina, que possui composição de aminoácidos, estrutura de subunidades e sequência N-terminal muito semelhantes às da lectina encontrada na semente. Cada molécula possui dois tipos de subunidades, uma das quais comuns a ambas. Embora a função desta proteína seja desconhecida, existem indicações de sua presença em folhas e raízes. A existência deste material parece não estar restrita apenas a Dolichos biflorus; dados obtidos por imunodifusão indicam a presença de uma proteína similar em folhas de Phaseolus vulgaris (MIALONIER et.al., 1973), embora nada tenha sido encontrado em soja (PUEPKE et.al., 1978).

Vários investigadores têm seguido o aparecimento e desaparecimento de lectina durante o ciclo de vida da planta. A aglutinina de Maclura pomifera começa a se acumular durante a fase inicial do desenvolvimento da semente, alcançando um nível máximo quando a semente atinge a maturidade, e decresce lentamente durante a germinação, podendo ainda ser detectada em baixas concentrações após 6 meses de idade (JONES et.al., 1967).

Embora as técnicas de hemaglutinação sejam bastante sensíveis para seguir o desenvolvimento de lectinas durante o processo de maturação da semente, resultados mais precisos têm sido obtidos com técnicas imunoquímicas usando anticorpos espe

cíficos contra lectinas. Dessa forma, HOWARD et.al. (1972), utilizando pela primeira vez, imunodifusão qualitativa, mostrou que a lectina de Lens culinaris era formada no início do processo de maturação, quando as sementes tinham apenas 2mm de diâmetro. O mesmo foi encontrado para Phaseolus vulgaris (MIALONIER et.al., 1973), tendo a lectina aparecido quando a semente alcançou 6mm de diâmetro.

Imunodifusão radial quantitativa e imunoeletroforese com anticorpos específicos contra lectina e proteína solúvel total de sementes, foram utilizadas em várias plantas de leguminoseae, incluindo Pisum sativum L. (ROUGÉ, 1976), Vicia sativa L. (GRACIS & ROUGÉ, 1977) e Lens culinaris (ROUGÉ & CHATELAIN, 1978). Essas técnicas mostraram que as lectinas aparecem nos estágios iniciais do desenvolvimento da semente, e sua acumulação procede na mesma velocidade que as proteínas solúveis totais, alcançando um nível máximo na semente seca. Resultados semelhantes foram obtidos com três espécies de Lathyrus estudadas (ROUGÉ & PÈRE, 1982). Entretanto, utilizando ensaio de hemaglutinação, MARTY (1974) encontrou um decréscimo no conteúdo de lectina durante a maturação de sementes de Ulex parviflorus, o que contradiz os resultados acima.

Durante a germinação, ocorre um decréscimo progressivo no conteúdo de lectina. Em Lens culinaris (HOWARD et. al., 1972; ROUGÉ, 1974a e b), Phaseolus vulgaris (MIALONIER et.al., 1973) e Dolichos biflorus (TALBOT & ETZLER, 1978), esse de-

crêscimo é paralelo ao decrêscimo das proteínas de reserva. Técnicas imunoquímicas forneceram resultados semelhantes para Phaseolus vulgaris L. (MIALONIER et. al., 1973), lentilha (HOWARD et. al., 1972; ROUGÉ, 1974a), ervilha (ROUGÉ, 1975), Vicia sativa L. (GRACIS & ROUGÉ, 1977), soja (PUEPPKE et. al., 1978), Dolichos biflorus (TALBOT & ETZLER, 1978b), e as três espécies Lathyrus, L. ochrus L. DC, L. odoratus e L. tingitanus L. (ROUGÉ & PERE, 1982). Em Ricinus communis (YOULE & HUANG, 1976) e Canavalia brasiliensis Mart. (MOREIRA & CAVADA, 1984), no entanto, o desaparecimento das proteínas de reserva é muito mais rápido que o desaparecimento das lectinas.

Todas essas descobertas vieram confirmar os dados de EISLER e PORTHEIM (1911) de que as lectinas estão presentes principalmente naquelas partes da planta que contêm reserva de nutrientes e que elas desaparecem dos tecidos ao mesmo tempo que as proteínas de reserva. Entretanto, existem algumas exceções, como no caso da lectina de grãos de trigo, onde a lectina está restrita ao germe e não ao endosperma, e após a germinação o nível de lectina permanece alto por pelo menos 34 dias. Em plantas jovens de amendoim, apesar de 90% da lectina ser encontrada nos cotilédones, o restante se encontra nos hipocótilos, caules e folhas, enquanto que as raízes jovens não contêm praticamente nenhuma lectina (PUEPPKE, 1979). Na família Solanaceae a maior parte da atividade da lectina está associada aos tubérculos (MARINKOVICH, 1964) e não às semen-

tes. Em Phytolacca americana, a maior parte da atividade da lectina está nas folhas e caules da planta (FARNES et.al., 1964).

1.4 - Detecção e Isolamento de Lectinas

A primeira atividade biológica reconhecida para as lectinas foi sua capacidade de aglutinar eritrócitos e, por causa disto, a maior parte dos pesquisadores detectam lectinas através da hemaglutinação. Desta forma, podemos saber prontamente se um extrato de planta possui lectina, se este aglutinar eritrócitos, e também pela demonstração de que a aglutinação é específica por açúcar utilizando-se açúcares simples ou sacarídeos complexos, como inibidores. O teste de hemaglutinação pode ser realizado com eritrócitos nativos ou modificados. Uma das modificações mais comuns é a digestão com tripsina e outras enzimas proteolíticas, neuraminidase, uma enzima que remove ácido siálico de complexos carboidratos (MARIKOVSKY et.al. 1976) e outras. As células submetidas a tais tratamentos tornam-se mais sensíveis à aglutinação. Também pode ser utilizado glutaraldeído ou formaldeído, com a finalidade de estabilizá-las e obter uma preparação padrão, que poderá ser usada por longos períodos de tempo (LIENER, 1975).

A atividade da lectina é normalmente medida através de testes de hemaglutinação, realizados a uma temperatura de 37°C, adicionando-se uma suspensão de eritrócitos 2 a 3%, em

tubos ou em placas de microtitulação, contendo uma diluição seriada da lectina. Decorrido o tempo necessário, de 1-2h de incubação, a aglutinação pode ser observada a olho nu ou com auxílio de microscópio. A atividade é então expressa como o recíproco da diluição máxima que produz uma agregação visível.

Lectinas também podem ser detectadas pela sua habilidade em formar precipitados com polissacarídeos ou glicoconjugados em meio líquido utilizando tubos capilares ou em meio semi-sólido (gel de agar). Recentemente, surgiu um novo método para a detecção de lectinas chamado "eletroforese de afinidade". Esta técnica combina os princípios de cromatografia de afinidade e eletroforese (HOREJSI & KOCOUREK, 1974).

O isolamento de lectinas, normalmente inicia-se pela preparação da farinha e extração desta com salina tamponada. Posteriormente, um fracionamento com sulfato de amônio, centrifugação e dissolução do precipitado é feito para obtenção da lectina. Baseado na habilidade da lectina de ligar-se especificamente a sacarídeos, utiliza-se com muita frequência nos esquemas de purificação de lectina, cromatografia de afinidade. Também podem ser empregados adsorventes obtidos comercialmente, como monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicoproteínas tais como, mucina gástrica de cão ou proteína dessializada acoplada a Sepharose. Para a purificação da aglutinina de soja e de germe de trigo, foram utilizados ligantes sintéticos, como o N-ε-aminocaproil derivado da galactosamina e o N-acetilglucosaminilamina, respectivamente (LIS & SHARON, 1981). HOREJSI &

KOCOUREK (1973) copolimerizaram uma série de alquenil glicosídeos com acrilamida, enquanto MATSUMOTO & OSAWA (1972) incorporaram uma variedade de resíduos de açúcares em amido. Ambos são utilizados como materiais de afinidade no isolamento de lectinas. Lectinas de sementes de Canavalia ensiformis (AGRAWAL & GOLDSTEIN, 1965 e 1967; OLSON & LIENER, 1976), Canavalia brasiliensis (MOREIRA & CAVADA, 1984), Vicia cracca (ASPBERG et al., 1968), Vicia faba (TOMITA et al., 1970; WANG et al., 1974), Pisum sativum (ENTLICHER et al., 1970) e Lens culinaris (HOWARD & SAGE, 1969; TICHÁ et al., 1970) que ligam α -D-glucopiranosil e α -D-manopiranosil foram isoladas utilizando-se cromatografia de afinidade.

1.5 - Composição química e propriedades fisicoquímicas das lectinas

As lectinas são proteínas vegetais, e como tal, são ricas em ácido aspártico, serina e treonina, e pobres em aminoácidos sulfurados. No entanto, existem exceções, como é o caso das lectinas de germe de trigo e batata, que são ricas em cisteína (20 e 11,5% do total de resíduos de aminoácidos, respectivamente).

A maior parte das lectinas são glicoproteínas, possuindo algumas vezes um conteúdo em carboidratos igual ou superior à 50%, como é o caso da lectina de batata. Os açúcares consti

tuíntes são os mesmos encontrados em outras glicoproteínas de plantas, com exceção da L-arabinose, que também é encontrada em glicoproteínas animais. As lectinas de Dioclea grandiflora (MOREIRA et.al., 1983), Canavalia ensiformis (BECKER et.al., 1976), Canavalia brasiliensis (MOREIRA & CAVADA, 1984), Cratylia floribunda (MOREIRA & OLIVEIRA, 1986), germe de trigo e a aglutinina de amendoim não são ligadas covalentemente a açúcares.

As lectinas possuem pesos moleculares variáveis, indo de 36.000 para a aglutinina de germe de trigo (RICE & ETZLER, 1975), até 265.000 para a lectina de Phaseolus lunatus (GALBRAITH & GOLDSTEIN, 1972). Algumas lectinas possuem uma tendência a agregar-se, como é o caso de Con A, que a pH abaixo de 6,0, possui um peso molecular de 51.000, enquanto que a pH fisiológico é de 102.000 (WANG et.al., 1971).

Todas as lectinas consistem de subunidades, que podem ser idênticas ou não; o número de subunidades encontradas em lectinas de plantas pode variar de duas a quatro. Essas subunidades podem ter suas estruturas afetadas quando sujeitas a modificações químicas. Como exemplo, temos a acetilação da aglutinina de germe de trigo (RICE & ETZLER, 1975) ou a oxidação do triptofano por N-bromosuccinimida (PRIVAT et.al., 1976), que causa a formação de subunidades possuindo uma capacidade de ligação com açúcar, mas que não podem reassociar-se e são então desprovidas de atividade hemaglutinante. Também a dissociação em subunidades pode ser irreversível, quando na presença

de detergentes como o dodecil sulfato de sódio (LOTAN et.al., 1975), e reversível na presença de cloreto de guanidina, como foi encontrado para a aglutinina de germe de trigo (RICE & ETZLER, 1975) e PHA (FELSTED et.al., 1977).

Embora as lectinas normalmente possuam um sítio de ligação para açúcar por subunidade; a aglutinina de germe de trigo possui dois sítios de ligação (PRIVAT et.al., 1974a e b). As subunidades de uma mesma letina, normalmente possuem a mesma especificidade por açúcar. No entanto, são conhecidas lectinas, que possuem subunidades com diferentes especificidades.

Todas as lectinas, com poucas exceções, necessitam de Ca^{++} e Mn^{++} para poderem exercer suas atividades. Esses metais conferem à lectina um alto grau de estabilidade estrutural, protegendo-as contra a inativação pelo calor (DOYLE et.al., 1976) e hidrólise por enzimas proteolíticas (BLUMBERG & TAL, 1976).

Examinando a sequência de aminoácidos de Con A, notamos que existe uma distribuição não muito comum de certos aminoácidos (WANG et.al., 1975). Seus resíduos carregados estão concentrados na metade N-terminal da cadeia polipeptídica, separando a molécula em duas regiões distintas de aproximadamente 110 resíduos. Isto é melhor notado quando a distribuição dos aminoácidos aromáticos é examinada. Seis das sete tirosinas estão localizadas na metade N-terminal da molécula, e todas as 11 fenilalaninas estão entre os resíduos 111 e a porção C-terminal. Muitos dos resíduos aromáticos estão localizados nas

regiões hidrofóbicas da estrutura tridimensional da proteína.

Embora Con A, assemelhe-se a outras lectinas, com relação ao peso molecular, à estrutura da subunidade e à composição de aminoácidos, o exame de sua sequência N-terminal revela algumas diferenças. Regiões de extensa homologia têm sido encontradas nas subunidades α e β das lectinas de lentilha e ervilha (FORIERS et.al., 1977b). A sequência completa das subunidades da lectina de lentilha (52 aminoácidos) (FORIERS et.al., 1978) e ervilha (53 aminoácidos) (RICHARDSON et.al., 1978), foi determinada e encontrou-se 40 resíduos idênticos. Além do mais, as subunidades são homólogas na região entre as posições 72 e 122 de Concanavalina A, e os resíduos 83-92, localizados na região de ligação hidrofóbica de Con A, são conservadas nas lectinas de ervilha e lentilha, nos resíduos 14 a 23. O que parece sugerir uma função biológica para a cavidade hidrofóbica.

As homologias entre as lectinas de ervilha, lentilha e Con A, sugerem que essas lectinas já formadas sejam sintetizadas como cadeias polipeptídicas únicas, sendo posteriormente clivadas em dois ou possivelmente três fragmentos; dois desses sendo as subunidades α e β , e o terceiro um fragmento homólogo aos resíduos 1-70 de Con A. Esse fragmento pode ser posteriormente degradado (pos-tradução) ou perdido durante a preparação da lectina. A clivagem pós-tradução, resultando em subunidades fragmentadas, foi observada em Concanavalina A, aglutin

nina de soja e Vicia faba, sugerindo a existência de mecanismos regulatórios baseados no processamento proteolítico na biossíntese de lectinas. Processamento de uma cadeia polipeptídica comum têm sido proposto para explicar a possível relação precursor-produto, entre uma proteína presente nas folhas e caules de D. biflorus e que possui uma reação cruzada com anticorpo contra lectina de semente da mesma planta (TALBOT & ETZLER, 1978a).

Quando a lectina de Dioclea grandiflora teve sua estrutura primária determinada, uma grande homologia foi também encontrada com a Concanavalina A confirmando esses dados (RICHARDSON et.al., 1984). MOREIRA et.al. (1985) mostraram também um elevado grau de homologia entre as lectinas de C. brasiliensis e diversas outras lectinas da tribo Diocleae com a Con A.

As homologias entre diferentes lectinas obtidas de uma única família de planta, por exemplo, em Leguminosae, sugerem uma origem genética comum para essas proteínas. As lectinas que tiveram sua estrutura primária conservada, podem ser agrupadas em famílias, sugerindo então, um ancestral comum para os gens que codificam essas lectinas.

1.6 - Especificidade das lectinas

A especificação de ligação de lectinas a carboidratos, normalmente é medida utilizando-se técnicas de inibição por haptenos, onde são testados a inibição da hemaglutinação ou preci-

pitação de polissacarídeo (ou glicoproteína) com diferentes carboidratos. A especificidade da lectina é então definida em termos do melhor monossacarídeo inibidor. Outros procedimentos utilizando equilíbrio de diálise (SO & GOLDSTEIN, 1968), espectroscopia ultravioleta (BESSLER et.al., 1974), eluição em adsorventes de fase sólida (AGRAWAL & GOLDSTEIN, 1967) e estudos de precipitação com conjugados proteína-carboidrato modelo e naturais (HAMMARSTROM et.al., 1972), também têm fornecido valiosas informações. O uso de alquil α e β -glicosídeos como hapteno inibidores, além dos açúcares livres, fornece informações sobre a especificidade anomérica de lectinas. Os glicosídeos com agliconas aromáticas são fortes inibidores devido à sua interação com sítios hidrofóbicos da lectina (GOLDSTEIN & HAYES, 1978). No entanto, foi encontrado que Con A liga-se fortemente a moléculas hidrofóbicas que não contêm sacarídeos (EDELMAN & WANG, 1978).

Algumas lectinas são específicas para uma determinada configuração, enquanto outras interagem igualmente com ambas as configurações anoméricas. No caso de Con A (SMITH & GOLDSTEIN, 1967), lectinas de Bandeiraea simplicifolia (HAYES & GOLDSTEIN, 1974) e Lotus tetragonolobus (PEREIRA & KABAT, 1974), exibem respectivamente uma especificidade pronunciada para anomeros α de manose ou glucose, galactose e L-fucose. Ao contrário, a aglutinina de soja (PEREIRA & KABAT, 1974) e de Ricinus communis, são quase desprovidas de especificidade anomérica.

Muitas lectinas toleram alguma variação no C-2 onde elas se ligam, enquanto que no C-3, algumas lectinas toleram tal mudança e outras não. Um número considerável de lectinas possui uma afinidade por N-acetilgalactosamina mas também reagem com galactose (HAMMARSTROM et.al., 1977). De forma inversa, existe um grupo de lectinas que possui uma especificidade primária para galactose e no entanto reagem em graus variáveis com N-acetilgalactosamina, como é o caso da lectina específica para α -galactose de Bandeiraea simplicifolia (HAYES & GOLDSTEIN, 1974) e aglutinina de Ricinus communis (NICOLSON et.al., 1974).

1.7 - Propriedades biológicas das lectinas

As lectinas apresentam vários efeitos biológicos (Tabela 1), sendo os mais estudados, a aglutinação e a estimulação mitogênica. Além desses dois, vários outros são estudados como: redistribuição dos componentes da superfície celular, atividade semelhante à insulina em células gordurosas, modificação da atividade de enzimas de membranas, bloqueio da fertilização de ovo por espermatozoides, toxicidade in vitro e in vivo, e inibição do crescimento de fungos. No entanto, nem todas as lectinas exigem tais efeitos.

Ligação a células:

A ligação de lectinas às células é melhor demonstrada quando as lectinas são marcadas com isotópos radioativos ou utilizando-se fluoresceína, ferritina ou peroxidase (SHARON & LIS, 1975). Para atuarem sobre as células, as lectinas devem primeiramente ligar-se a elas. A aglutinação das células pode ser considerada como prova da ligação da lectina a células, mas no caso de não ocorrer uma aglutinação não significa que a lectina não se ligou à célula.

As lectinas ligam-se a quase todas as organelas subcelulares, através dos carboidratos de glicoproteínas ou glicolipídios que se estendem da célula. Essa ligação é baseada no fato de que a interação é inibida pelos açúcares para os quais as lectinas são específicas e também pela modificação dos açúcares da superfície celular por glicosidases, glicosiltransferases e galactose oxidase.

Aglutinação celular:

É através da aglutinação que detectamos a interação entre lectinas e células. Primeiramente, a lectina deve formar várias pontes cruzadas entre as células opostas e, como consequência dessas pontes, ocorre a aglutinação. A maior parte dos estudos sobre aglutinação celular, têm sido realizados em célu-

Tabela 1 - Propriedades gerais e aplicações das lectinas (CAVA DA, 1980).

Propriedade	Aplicação
Aglutinação de eritrócitos	Tipagem sanguínea; estudo de substâncias de grupos sanguíneos; identificação de novos tipos de sangue; diagnóstico de secretores.
Aglutinação de células malignas	Investigação da arquitetura de superfícies celulares e de diferenças de células malignas; base para novas pesquisas na terapia do câncer.
Indução de mitose em linfócitos	Estudo de cromossomas de células; detecção de anormalidades cromossômicas; indução da síntese de imunoglobulinas; estudo de eventos que ocorrem durante a iniciação da divisão celular.
Interação c/sacarídeos constituintes de membranas celulares. Ligação de açúcares	Investigação da estrutura complexa de carboidratos da superfície de células animais, bactérias, vírus e partículas subcelulares. Estudo de sítios específicos de ligação de açúcares nas proteínas
Toxidez em animais Aglutinação de leucócitos Inibição da síntese protéica Interação com mastócitos e basófilos	Estudo de sítios específicos de ligação de açúcares nas proteínas Estudo do valor nutritivo de alimentos

las intactas de animais, embora outras estruturas também sejam aglutinadas, como vírus (STEWART et. al., 1973), mitocôndrias e ácido nucléicos (MICOLSON et. al., 1972).

A observação da aglutinação por lectinas mostrou que existem grandes diferenças na aglutinabilidade entre células normais e malignas, células adultas e embrionárias e entre células em mitose e em interfase (NICOLSON, 1976a & b). Acredita-se que essa alta aglutinabilidade seja uma propriedade comum a todas as células malignas, e que esteja correlacionada com a perda da inibição de contato e com a tumorigenicidade (RAPIN & BURGER, 1974).

Vários tratamentos podem ser empregados nas lectinas, para aumentar a sua atividade hemaglutinante, como por exemplo: ligação cruzada por tratamento com glutaraldeído. No entanto, a succinilação de Con A, decresce sua atividade (WANG & EDELMAN, 1978b), embora não tenha efeito sobre a aglutinina de germe de trigo (RICE & ETZLER, 1975). As modificações introduzidas na porção glicídica das lectinas, não possuem nenhum efeito sobre sua atividade hemaglutinante. Dessa forma, a remoção de 40% dos resíduos manose da lectina de D. biflorus, por tratamento com α -manosidade (BIROC & ETZLER, 1978), não alterou sua habilidade em aglutinar eritrócitos. Isso, parece indicar que os carboidratos que fazem parte da estrutura da lectina não são requeridos para sua atividade biológica.

A aglutinação celular pelas lectinas é afetada por

vários fatores tais como: condições externas do ensaio, temperatura ou concentração celular, etc. Alguns fatores que afetam a aglutinação pelas lectinas são mostrados na Tabela 2.

Estimulação de linfócitos:

A estimulação de linfócitos, é um dos efeitos mais dramáticos da interação de lectinas com células.

O primeiro agente mitogênico a ser descrito foi a PHA (NOWELL, 1960). Posteriormente vieram "pokeweed mitogen" (FARNES et.al., 1964), a lectina de Wistaria floribunda (BARKER & FARNES, 1967) e Con A (DOUGLAS et.al., 1969). Durante os últimos anos, o número de lectinas mitogênicas tem aumentado consideravelmente e muitas delas são inibidas por açúcares simples. A maior parte das lectinas de plantas estimula apenas as células-T e são inativas ou inibitórias para mitose de outra classe de linfócitos, as células-B.

Além das lectinas, são conhecidos outros agentes com atividade mitogênica, como antígenos, anticorpos contra componentes da superfície celular endo-e exotoxinas bacterianas e agentes oxidantes como periodato e a enzima galactose oxidase (OPPENHEIN & ROSENSTREICH, 1976).

A estimulação de linfócitos por lectinas ou outros agentes mitogênicos resulta na liberação de substâncias solúveis com uma ampla variedade de atividade biológica, como lin-

Tabela 2 - Fatores que afetam a aglutinação celular pelas lectinas^a (LIS & SHARON, 1981).

Propriedade da lectina

número de sítios p/ligação de sacarídeos
força da ligação
carga elétrica
tamanho molecular

Estrutura química dos receptores da superfície celular

Propriedades da superfície celular

número, acessibilidade e distribuição dos sítios receptores
mobilidade dos sítios
carga elétrica
rigidez da superfície
estruturas de superfície (por ex. microvilosidades)

Componentes citoplasmáticos

proteínas da membrana periférica
sistema microtúbulo-microfilamento
fornecimento de energia (estado metabólico das células)

a modificado por NICOLSON, 1974

fotoxina e interferon (GRANGER et.al., 1975) e em certos casos, é também observado um aumento na produção de imunoglobulina (MELCHERS & ANDERSON, 1973).

Embora já bastante estudado, o mecanismo da estimulação mitogênica não é conhecido. É geralmente aceito que um primeiro sinal, seja a ligação da lectina a açúcares da superfície celular. Tal ligação conduz a uma modificação na estrutura e função da membrana, resultando na produção de um segundo sinal, o qual é transmitido para o interior da mesma célula, iniciando assim, uma série de eventos bioquímicos culminando no crescimento e proliferação celular (LIS & SHARON, 1977).

As alterações ocorridas na superfície do linfócito, por glicosidases, afetam a resposta das células a lectinas mitogênicas. Modificações químicas de lectinas também podem mudar suas propriedades mitogênicas, como a polimerização com glutaraldeído da aglutinina de amendoim, a qual é divalente, tornando-se mitogênica para linfócitos de ratos, quando submetidos a tal tratamento (LIS & SHARON, 1981). Con A quando submetida a succinilação, passa da forma tetravalente para a divalente, sem no entanto ter a sua capacidade mitogênica alterada (GUNTHER et al., 1973). Todas essas descobertas são importantes para o entendimento do mecanismo de estimulação mitogênica.

Inibição do crescimento de fungos:

A aglutinina de germe de trigo liga-se especificamente

a extremidade das hifas do fungo Trichoderma viride (MIRELMAN et.al., 1975) e inibe seu crescimento, como também a germinação do esporo, o que provavelmente ocorre nos primeiros estágios do processo de germinação. A inibição da incorporação de precursores nas hifas, pelas lectinas de diferentes especificidades parece ser o resultado da inibição da entrada de nutrientes, causada pela camada de lectinas formadas sobre as hifas dos fungos. A lectina de batata também age da mesma forma sobre o fungo Botrytis cinerea (CALLOW, 1977).

Citotoxicidade de lectinas

As lectinas são na maior parte seletivas em sua ação sobre as células. As células transformadas são frequentemente as mais sensíveis aos efeitos tóxicos de lectinas do que as células normais (NICOLSON, 1974).

Con A, aglutinina de germe de trigo, PHA, lectina de R. pseudoacacia e várias outras, são tóxicas para células de mamíferos (LIS & SHARON, 1981). No entanto sua toxicidade é muito menor do que as toxinas abrina e ricina. Estas toxinas consistem de duas cadeias mantidas juntas por pontes dissulfeto. A cadeia pesada (B) possui o sítio de ligação para carboidrato, enquanto que a cadeia leve (A) inibe a síntese protéica, num sistema livre de células, representando, então, a porção tóxica da molécula. Apenas a molécula intacta é ativa sobre as células.

Portanto, logo após a ligação de resíduos de galactose na superfície da célula, pela cadeia B, as toxinas penetram na célula, onde a cadeia A inibe a síntese protéica, interferindo com a elongação da cadeia polipeptídica nos polirribossomos. Essa relação estrutura-atividade é encontrada em abrina, ricina e modicina, isolada de raízes de Adenia digitata (OLSNES et.al.,1978), e também nas toxinas diftérica (COLLIER, 1975) e colérica (HOLMGREN & LINDHOLM, 1976). As toxinas bacterianas, também possuem dois domínios com funções análogas às cadeias A e B das toxinas de plantas, atuando sobre a célula também da mesma forma.

1.8 - Papel das lectinas nas plantas

① A maioria das funções propostas para as lectinas de plantas é baseada na afinidade que essas substâncias apresentam por carboidratos (Tabela 3). CALLOW (1975) defendeu que tal propriedade não poderia ser casual e que deveria ter alguma relevância in vivo. Isso então, pressupõe a existência de materiais na planta que possam se ligar às lectinas in vivo e que essa ligação possui alguma função biológica desconhecida. Tais receptores ou "ligantes de lectinas" foram obtidos de sementes de ervilha e feijão de porco, à pH ácido, onde a associação desses ligantes à lectina endógena é mínima (GANSERA et.al.,1979). A quantidade da lectina e seu receptor em sementes de ervilhas é equivalente. Em sementes de feijão de porco du

rante a germinação, o ligante de Con A foi encontrado apenas nas raízes. Tais fatos, sugerem alguma função biológica para esses receptores de proteínas. Receptores também têm sido obtidos de sementes de soja e feijão de porco, por cromatografia de afinidade em colunas contendo lectinas endógenas imobilizadas (BOWLES & MARCUS, 1981). Entretanto, nesse caso, nenhuma dissociação a valores baixos de pH foi tentada, e apenas traços desses receptores foi recuperado, e portanto, seu significado biológico permanece ainda não esclarecido.

MOREIRA et. al. (1983) mostraram a presença de receptores específicos para lectina em semente de Dioclea sclerocarpa quando foram capazes de isolar a lectina usando como coluna de afinidade o resíduo livre de lectina da farinha da semente.

Sementes de legumes contêm uma quantidade apreciável de sacarose e seus derivados α -galactosídicos e, como esses açúcares fazem parte da reserva de carboidratos das sementes, foi então proposto por ENSGRABER (1958) que as lectinas de sementes poderiam participar na fixação e no transporte desses carboidratos na planta. No entanto, pelo menos em sementes de Phaseolus vulgaris não foi encontrada nenhuma evidência de ligação desses oligossacarídeos a lectinas (BEGBIE, 1979).

É sabido que as lectinas de plantas reconhecem e ligam-se a materiais externos ou organismos que contenham aqueles carboidratos, para os quais as lectinas são específicas. É possível que tais mecanismos macro-moleculares complementares localizados na superfície, onde pelo menos um dos pares comple

mentares de moléculas possuam atividade, possa ser a base química dos vários processos de reconhecimento entre plantas e organismos externos.

A presença de tais receptores parece ser um pré-requisito essencial nas interações parasita-hospedeiro e simbiote-hospedeiro (CALLOW, 1975). A interação legume-Rhizobium, têm sido estudada intensamente desde a observação original por HAMBLIN e KENT (1973) de que raízes de P. vulgaris, bem como lectina de semente se ligavam a eritrócitos. Foi sugerido, então, que as lectinas localizadas na superfície das raízes de legumes, possuíam sítios receptores para a ligação específica do Rhizobium antes da infecção (SCHMIDT, 1979).

A maior parte dos trabalhos desenvolvidos sobre as interações legume-Rhizobium, parte da idéia de que lectinas são componentes característicos de legumes e que podem funcionar no reconhecimento de sacarídeos da superfície celular de Rhizobium (BAUER, 1981). Igualmente as interações hospedeiro-patógenos são baseadas na idéia de que os patógenos possuem em sua superfície sequências de sacarídeos, que podem ser reconhecidos pelas lectinas do hospedeiro apropriado (SCHMIDT & BOHLOOL, 1981).

JANZEN (1976) encontrou que larvas de Callosobruchus maculatus, não toleravam certas sementes de leguminosas, devido ao seu conteúdo em lectina. Ele propôs, então, que as lectinas estariam protegendo as sementes do ataque pelos insetos, como o que foi proposto para os alcalóides.

As lectinas podem inibir o crescimento e a esporulação de fungos pelo ataque à superfície do fungo recoberto por polissacarídeos que reagem com lectinas. Foi sugerido, então, que essas lectinas funcionam nas plantas, como parte do seu sistema de proteção, combatendo os ataques por fungos patogênicos, durante a embebição da semente e durante os primeiros estágios do crescimento da plântula (MIRELMAN et.al., 1975).

Lectinas também parecem estar envolvidas na defesa da planta contra bactérias patogênicas (SEQUEIRA, 1978). Estudos realizados com P. vulgaris, mostraram que a bactéria saprófita Pseudomonas putida é imobilizada e encapsulada nos espaços intercelulares das folhas da planta, enquanto que as bactérias fitopatogênicas Pseudomonas phaseolicola e Pseudomonas tomato, não aderiam às paredes celulares, nem eram encapsuladas (SING & SCHROTH, 1977). Os autores sugerem que as lectinas podem estar envolvidas na imobilização e encapsulação, desde que apenas células de P. putida foram aglutinadas por PHA.

Foi proposto por KAUSS & GLASER (1974), que as lectinas ajudariam a manter as células vegetais unidas, de tal forma que elas poderiam se mover durante seu crescimento. Essa hipótese é baseada na observação de que mudanças no pH, ocorrem em plantas durante o crescimento em extensão, e como sabemos, as lectinas aglutinam eritrócitos dependendo do pH.

Devido às similaridades dos sítios combinantes das lectinas com as glicosidades elas poderiam ser consideradas

enzimas que perderam seus sítios catalíticos ou, ao contrário, as enzimas poderiam ser consideradas lectinas que tenham adquirido sítios catalíticos. Nas sementes secas, as lectinas seriam proteínas enzimaticamente inativas adquirindo propriedades catalíticas durante a germinação (HANKINS & SHANNON, 1978). Demonstração recente de que uma lectina altamente purificada, específica para α -galactose, extraída de "mung bean", possui uma atividade α -galactosidásica (SHANNON et.al., 1981), serve de estímulo para a pesquisa das atividades enzimáticas de lectinas e enzimas.

(4) A aparente similaridade de lectinas com anticorpos, em sua ação, fez pensar que estas representavam um sistema químico de defesa das plantas. Apesar de não ser uma idéia substantiada em sua forma original, lectina ou proteínas similares à lectina, parecem ser responsáveis pela incompatibilidade entre pólen e estigma, de uma mesma planta, prevenindo assim, a própria fertilização (GOLYNSKAYA et.al., 1976). Lectinas também podem tomar parte no fenômeno de reconhecimento sexual em Chlamydomonas (HOMAN, 1981).

A descoberta de que lectinas são componentes de membranas, levou à sugestão de que elas poderiam desempenhar uma função no crescimento celular e alongação da parede (BOWLES & KAUSS, 1976; BOWLES et.al., 1976; KAUSS & BOWLES, 1976). Sabe-se também que elas podem ser agentes seletivos para a estimulação mitótica de callus e protoplastos, resultados obtidos com aglutinina de soja em callus, o que parece suportar tal função

Tabela 3 - Funções propostas para as lectinas na Natureza (LIS & SHARON, 1981).

"Anticorpos" contra bactérias do solo

Transporte e reserva de açúcares

Controle da germinação e desenvolvimento da semente

Regulação da extensão celular em plantas

Ligação de microorganismos fixadores de nitrogênio à legumes

Proteção contra insetos predadores

Proteção contra fungos fitopatogênicos

Enzimas

Determinantes do reconhecimento inter e intra celular

(HOWARD et.al., 1977). No entanto, resultados obtidos tanto com raízes (VASIL & HUBBEL, 1977) como com protoplastos isolados (LARKIN, 1978) foram desapontadores.

As descobertas sobre a homologia estrutural entre várias lectinas de plantas de Leguminosae (FORIERS et.al., 1978) , e a conservação de determinantes imunoquímicos (HOWARD et.al., 1979), sugerem que durante a evolução, as lectinas com essas porções conservadas podem desempenhar funções benéficas e similares para as plantas.

1.9 - Propósitos da investigação

As lectinas podem desempenhar várias funções dependendo de sua localização na planta, concentração nas células e especificidade. Estudos de sua ocorrência, distribuição, localização e da ontogenia das lectinas na planta são de grande importância para esclarecer o seu papel fisiológico.

Os trabalhos já existentes sobre o comportamento das lectinas, durante a germinação das sementes, indicam que na maioria das plantas estudadas, ocorre um decréscimo progressivo no conteúdo de lectina. No entanto, resultados contraditórios foram encontrados por YOULE & HUANG (1976), e mais recentemente por MOREIRA & CAVADA (1984), onde o desaparecimento das lectinas mostrou-se retardado com relação às proteínas de reserva. MOREIRA & CAVADA (1984) sugeriram que esta diferença

seria devida à presença de inibidores ou de ativadores.

Com relação ao comportamento das lectinas durante a maturação de sementes, podemos citar vários trabalhos já realizados, como por exemplo, a lectina de Lens culinaris Medik (HOWARD et.al., 1972), Phaseolus vulgaris (MIALONIER et.al., 1973) e três espécies Lathyrus (ROUGÉ & PÈRE, 1982), onde se verifica que as lectinas aparecem nos estágios iniciais do desenvolvimento da semente, e seu acúmulo ocorre ao mesmo tempo que as proteínas solúveis totais, alcançando um nível máximo na semente seca.

O presente trabalho tem como objetivo o estudo da lectina de C. brasiliensis, durante o processo de maturação, visando dar continuidade ao trabalho já iniciado por MOREIRA & CAVADA (1984), durante a germinação de sementes de C. brasiliensis.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Materiais

2.1.1 - Sementes

As sementes de Canavalia brasiliensis utilizadas para o plantio foram coletadas no Estado do Ceará. Após tratamento com H_2SO_4 concentrado por 50 min. (CAVADA, 1980) as sementes foram postas para germinar em placas de Petri entre duas fo_lhas de papel de filtro, em atmosfera saturada de água. Após 5 dias as sementes germinadas eram então transferidas para o solo. As primeiras vagens apareceram após 150 dias de germina_ção e as diversas amostras eram coletadas em intervalos de 5 dias até a completa maturação da semente (por volta de 80 dias).

2.1.2 - Sangue de coelho

Amostras de sangue de coelho foram obtidas de animais adultos mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da U.F.C.

2.1.3 - Outros materiais

1 - Albumina sérica bovina - Fração V 96-99%, lote

- 126c - 0199 da Sigma Chemical Co., St Louis, EUA.
- 2 - Reativo de fenol segundo Folin Ciocalteu - QEEL - Indústrias Químicas SA Brasil.
 - 3 - Acrilamida e N-N'-metilenobisacrilamida - Eastman Organic Chemicals, Rochester, New York, EUA.
 - 4 - Dodecil sulfato de sódio - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.
 - 5 - Beta-mercaptoetanol - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.
 - 6 - Sephadex G-50 super fina - Pharmacia, Uppsala, Suécia.
 - 7 - Bio Gel P₁₀₀ e Bio Gel P₃₀₀ - BioRad Laboratories-USA.
 - 8 - Adjuvante completo de Freund - B.D. Merieux, França.
 - 9 - 5-5'-Diethyl barbiturato de sódio - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.
 - 10 - Ácido dietil barbitúrico - Atlântida Representações e Importações Ltda, RJ, Brasil.
 - 11 - Agarose baixa E.E.O. - Sigma Chemical Co., St Louis, EUA.
 - 12 - Agar Oxoid - Oxoid Limited, Londres, Batch nº 1093311.
 - 13 - Anfólitos carreadores (pH 3-10) - LBK Producter AB Suécia.

14 - Kit de calibração para focalização isoelétrica - Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Colheita das vagens

As flores de C. brasiliensis apareceram após 150 dias do plantio e foram marcadas no dia em que abriam considerando-se este o dia zero. As vagens foram coletadas a intervalos de 5 dias e foram pesadas e posteriormente separadas em três partes: pericarpo, tegumento e cotilédones. Estas partes eram também pesadas, para as determinações de peso fresco e peso seco. As coletas continuaram até a completa maturação da semente, o que ocorreu por volta de oitenta dias. Todas as vagens recolhidas durante todo o processo foram congeladas, liofilizadas e estocadas no congelador, para uso posterior.

2.2.2 - Determinação de peso fresco e peso seco

Após a retirada das vagens, pericarpos, tegumentos e cotilédones eram imediatamente pesados, para obtenção da curva de peso fresco. Os cotilédones e o eixo foram sempre retirados como um todo para a determinação do peso fresco. Foram utiliza

dos pesa-filtros tarados e o peso seco determinado após tratamento a 110°C por 24 horas. O procedimento era continuado por seguidos tratamentos à mesma temperatura até se obter peso constante.

2.2.3 - Preparação dos extratos

Pericarpo, tegumento e cotilédones + eixo foram usados separadamente para a preparação dos extratos. Os cotilédones e o eixo foram sempre utilizados como um todo. O material foi macerado em um almofariz e extraído com NaCl 0,15 M por 4 horas. Os sobrenadantes obtidos após centrifugação à 15.000xg a 4°C por 20 min foram submetidos a ensaio de atividade hemaglutinante e dosagem de proteína sendo estocados em congelador para uso posterior.

2.2.4 - Determinação de proteínas

A concentração de proteínas nas diversas amostras foi determinada pelo método de Folin-Lowry, modificado para o uso de TCA (LOWRY et.al., 1951). A 1,0 ml de amostra, a diferentes diluições, eram adicionados 4,0 ml de TCA 12,5% e após 15 minutos, a mistura era centrifugada a 2500 x g por 30 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante era retirado cuidadosamente com ajuda de uma pipeta Pasteur ligada a uma trompa, de mo-

do a eliminar todo o líquido presente no tubo. O precipitado era então dissolvido em 5,0 ml do reagente C de Lowry misturando-se vigorosamente, seguido da adição de 0,5ml do reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:2), sendo os tubos mantidos no escuro por 45 min. e as leituras das absorbâncias feitas a 660 nm.

2.2.5 - Determinação da atividade hemaglutinante

Para a determinação da atividade hemaglutinante foi empregado o método descrito por MOREIRA & PERRONE (1977) modificado para o uso de hemácias de coelho (3% em NaCl 0,15M) em presença de Ca^{++} e Mn^{++} , usando-se placas de microtitulação.

2.2.6 - Cromatografia de afinidade em Sephadex G-50

Os experimentos de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50, foram feitos em uma coluna medindo 26 x 1.5 cm, preparada segundo DETERMAN (1969). O gel foi entumescido em água por 48 horas, e a coluna montada deixando-se o gel sedimentar por gravidade. A coluna equilibrada com NaCl 1M contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM, foram aplicados 0,5 ml do extrato obtido com NaCl 1M, na proporção de 1:5 (p/v). A coluna foi então eluída, com a solução de equilíbrio até a obtenção de todo o material não retido, e a seguir com NaCl 1M con

tendo CaCl_2 5mM, MnCl_2 5mM e glicose 0,1 M a um fluxo de 25mlh^{-1} . Os efluentes da coluna foram recolhidos em frações de 1,8ml em um coletor automático de frações LKB Radirac e tiveram as absorvâncias determinadas a 280 nm em espectrofotômetro Beckman DU. As frações contendo proteína foram então dialisadas exaustivamente contra água, liofilizadas e armazenadas em congelador até uso posterior.

2.2.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e betamercaptoetanol

As frações eram dissolvidas (2 mg/ml) em tampão fosfato 0,01M pH 7,0 contendo 1% de SDS e betamercaptoetanol e incubadas por 20 minutos à 110°C . Foi usada a técnica descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para o uso de placas medindo 17,5 x 16,5 cm. Antes da aplicação, a cada amostra foi adicionado azul de bromofenol (0,05%) e sacarose (20%). Para preparar as placas foi usado um gel de separação de 17,6% de poliacrilamida contendo 1% SDS em tampão Tris 1M pH 8,8 e um gel espaçador de 3,95% de acrilamida, contendo 1% de SDS em tampão Tris 1M pH 6,8.

Uma corrente de 25 mA por placa foi aplicada durante cerca de 4 horas, utilizando-se uma fonte de corrente contínua LKB Multiphor e tampão Tris-glicina 0,04M pH 8,3. A localização das bandas de proteína foi feita imergindo-se o gel em uma

solução de Coomassie brilliant blue 0,005% em metanol + ácido acético e água (4:0,7:5,3) durante pelo menos 16 horas. O descoloramento foi feito em uma solução de ácido acético, metanol e água (1:3,5:8).

2.2.8 - Eletrofocalização

Foram utilizadas placas medindo 8,9 x 11,9 cm, e o experimento realizado seguindo-se de perto a metodologia descrita por PUSZTAI & STEWART (1978). O gel foi montado entre duas placas de vidro espaçadas de 1,0 mm, e depois de polimerizado guardado em câmara úmida a 27°C., até uso posterior.

Para a realização do experimento foi retirada uma das placas e tiras de papel de filtro medindo 0,5 x 0,5 cm (Whatman nº 3) foram colocadas cuidadosamente onde foram aplicadas as amostras. Nos extremos da placa foram então colocadas tiras de papel de filtro (Whatman nº 3) medindo 12 x 0,6 cm, embebidas em ácido sulfúrico 0,2% (anodo) e etanolamina 0,4% (catodo). Sobre essas tiras de papel foram colocados os eletrodos.

Uma voltagem inicial de 40 V foi aplicada sendo a mesma elevada lentamente durante o processo de modo a se manter a potência inferior à 200 mW, até um valor de 100 volts. Após cerca de 5 horas quando a focalização estava terminada a placa foi submetida ao processo de coloração.

A placa foi imersa em ácido tricloroacético 15% por 30

minutos, e o gel cuidadosamente desprendido da placa com o auxílio de um pincel. As proteínas foram reveladas com Coomassie brilliant blue 0,005% em ácido acético, água e metanol (1:9:10) com uma troca após 15 minutos, deixado durante a noite. O gel foi descorado com uma solução de ácido acético, água e metanol (1:11,4:0,7).

2.2.9 - Preparação de IgG (coelho) contra proteínas de C. brasiliensis

Dois coelhos foram sensibilizados, um com extrato total de sementes quiescentes de C. brasiliensis (ET) e o outro com a fração PIII obtida por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 da Fração 50/90 de C. brasiliensis (MOREIRA & CAVADA, 1984).

Em um dos coelhos foi feita uma sensibilização inicial com 10mg (ET) dissolvidos em 0,5ml de NaCl 0,15M mais 0,5ml de adjuvante completo de Freund, por via intramuscular, na coxa. Após 21 dias foi dado o primeiro reforço (injeção subcutânea, nas costas) de 10mg da amostra dissolvida em 1,0ml de NaCl 0,15M. No 36º dia foi feita a primeira sangria na orelha e dado um reforço, igual ao anterior. A partir de então, de 7 em 7 dias foram feitas sangrias e reforços até se obter quantidades suficientes de soro. O soro foi então submetido ao processo de purificação mostrado na figura 1 seguindo-se

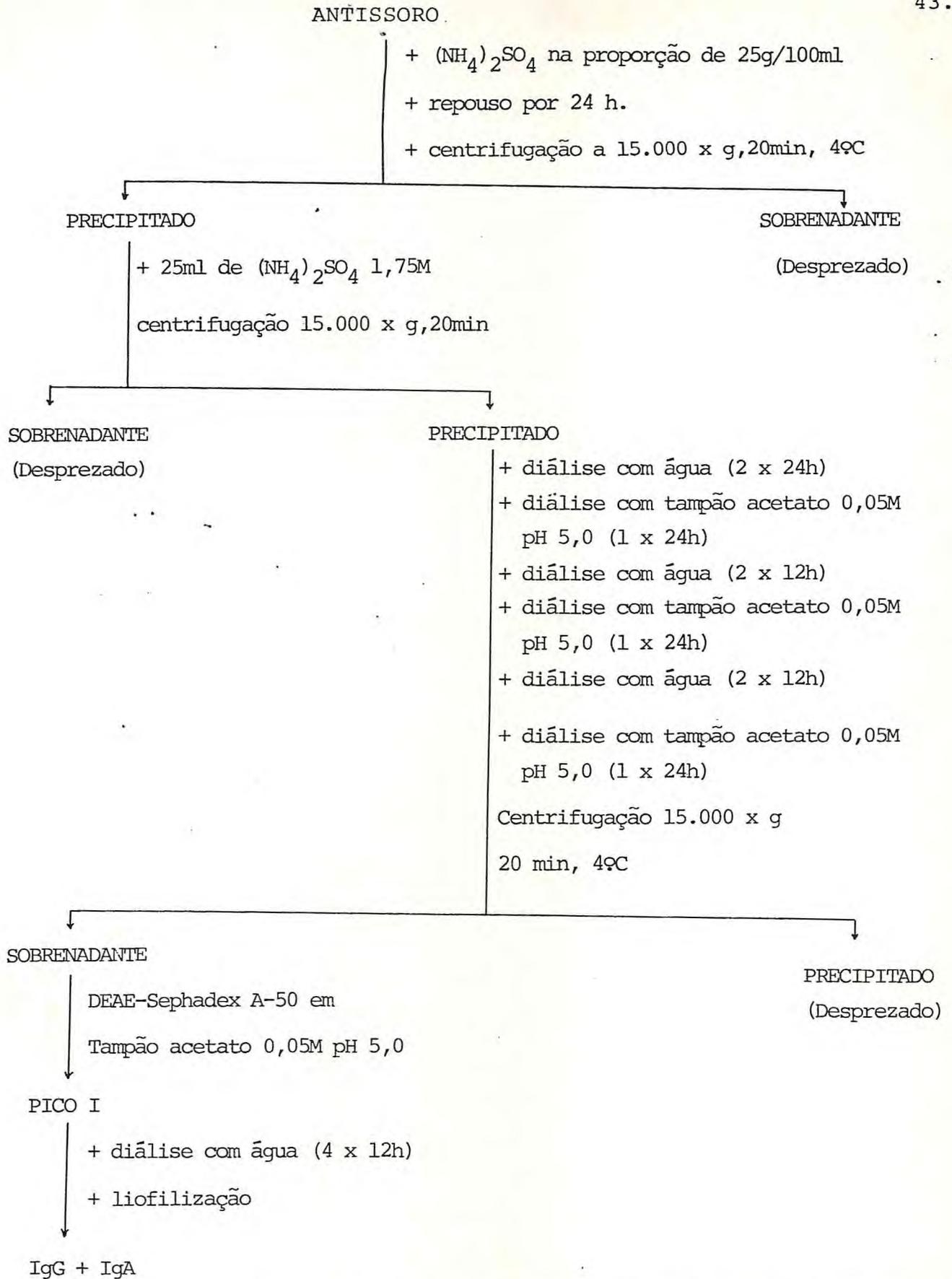


Figura 1 - Esquema geral para obtenção de IgG de coelho anti-PIII.

de perto o procedimento de HARBOE & INGLID (1973). Para obtenção de anticorpos contra PIII de C. brasiliensis foi seguido o mesmo esquema acima, só que foram aplicados apenas 2mg/ml de PIII em NaCl 0.15M, nas inoculações realizadas.

2.2.10 - Imunodifusão

Foi utilizada a técnica de imunodifusão radial de Mancini descrita por CLAUSEN (1969).

Gel de agarose (1%) contendo 0,1M de glicose, 0,02% de azida de sódio e antissoro anti-ET (15mg/ml) ou anti-PIII (2,5mg/ml) foi montado em placas de vidro medindo 11,9x8,9cm. Após a solidificação, foram feitos vários orifícios no gel, onde foram aplicadas as amostras. Os extratos de cotilédones + eixo (2mg/ml), pericarpo (5mg/ml) e tegumento (2,5mg/ml), foram aplicados nos orifícios e deixados difundir por pelo menos 24 horas, em câmara úmida, de modo a permitir que as reações de precipitação ocorressem. Após a formação dos arcos de precipitação o gel foi lavado em NaCl 0,15M contendo azida de sódio 0,02%, durante 24 horas, para retirar as proteínas não precipitadas seguido de lavagens com água destilada, por pelo menos 3 horas, para retirar todo o sal aí depositado. O gel foi então seco e corado com Coomassie brilliant blue 0,5% por 15 minutos e descorado com ácido acético, metanol e água (1:3,5:8).

2.2.11 - Imunoeletroforese em gel de agarose contendo anti
corpo

Estes experimentos foram realizados em placas medindo 20,5 x 11 cm segundo método descrito por WEEKE (1973).

Gel de agarose a 1,0% em tampão barbital 0,15M pH 8,6 com lactato de cálcio 0,08% e azida de sódio 0,02%, contendo IgG anti-ET (12,5mg/ml) ou IgG anti-PIII (10mg/ml), foi deixado solidificar entre duas placas de vidro separadas por um espaçador de 2,0mm. Após a solidificação, uma das placas foi retirada e foram feitos orifícios no gel à 1,0cm da base. A cada poço foram aplicados 20 μ l de uma solução 2,0mg/ml de amostra a ser examinada. A eletroforese foi feita a uma corrente constante de 25mA e com uma voltagem inicial de 50V, por 15 horas. Após a eletroforese, as placas eram deixadas imersas em NaCl 0,15M por 24 horas e lavadas com água destilada, secas e coradas nas mesmas condições do item anterior.

3 - RESULTADOS

3.1 - Determinação do peso fresco e peso seco de pericarpo, tegumento e cotilédones + eixo de Canavalia brasiliensis, ao longo do processo de maturação.

3.1.1 - Peso fresco e peso seco de cotilédones + eixo

Quando investigamos a variação de peso fresco de cotilédones + eixo, ao longo do processo de maturação (Tabela 4 e Figura 2), podemos notar um aumento até o 65º dia atingindo um valor de 1,450g/órgão, para logo a seguir decrescer bruscamente para um valor de 0,763g/órgão no 85º dia.

Na curva de peso seco obtida (Tabela 4 e Figura 2), notamos também um aumento crescente no peso até o 70º dia, quando atinge um valor de 0,744g/órgão, decrescendo um pouco para um valor de 0,672g/órgão no final do processo (90º dia de maturação).

Quando essas duas curvas são comparadas, notamos que embora as duas atinjam o máximo na mesma época (65-70 dias), a curva de peso seco cai para 90% de seu valor máximo no fim do processo (90º dia) enquanto o peso fresco tem seu valor abruptamente diminuído para apenas 53% de seu valor máximo, atingindo um valor bem próximo ao do peso seco, aos 85 dias de maturação.

Tabela 4 - Peso fresco e peso seco (em g/órgão) de cotilédones + eixo de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação.

Dias	Peso fresco	Peso seco
20	0,034 ± 0,006	0,003 ± 0,001
25	0,055 ± 0,009	0,006 ± 0,001
30	0,342 ± 0,024	0,067 ± 0,006
35	0,544 ± 0,072	0,123 ± 0,017
40	0,620 ± 0,069	0,173 ± 0,020
45	1,001 ± 0,112	0,280 ± 0,026
50	1,170 ± 0,125	0,496 ± 0,062
55	1,223 ± 0,175	0,500 ± 0,106
60	1,342 ± 0,194	0,642 ± 0,091
65	1,450 ± 0,183	0,680 ± 0,086
70	1,255 ± 0,158	0,744 ± 0,133
75	1,147 ± 0,149	0,716 ± 0,112
80	0,809 ± 0,119	0,666 ± 0,085
85	0,763 ± 0,164	0,646 ± 0,112
90	0,763 ± 0,078	0,672 ± 0,083

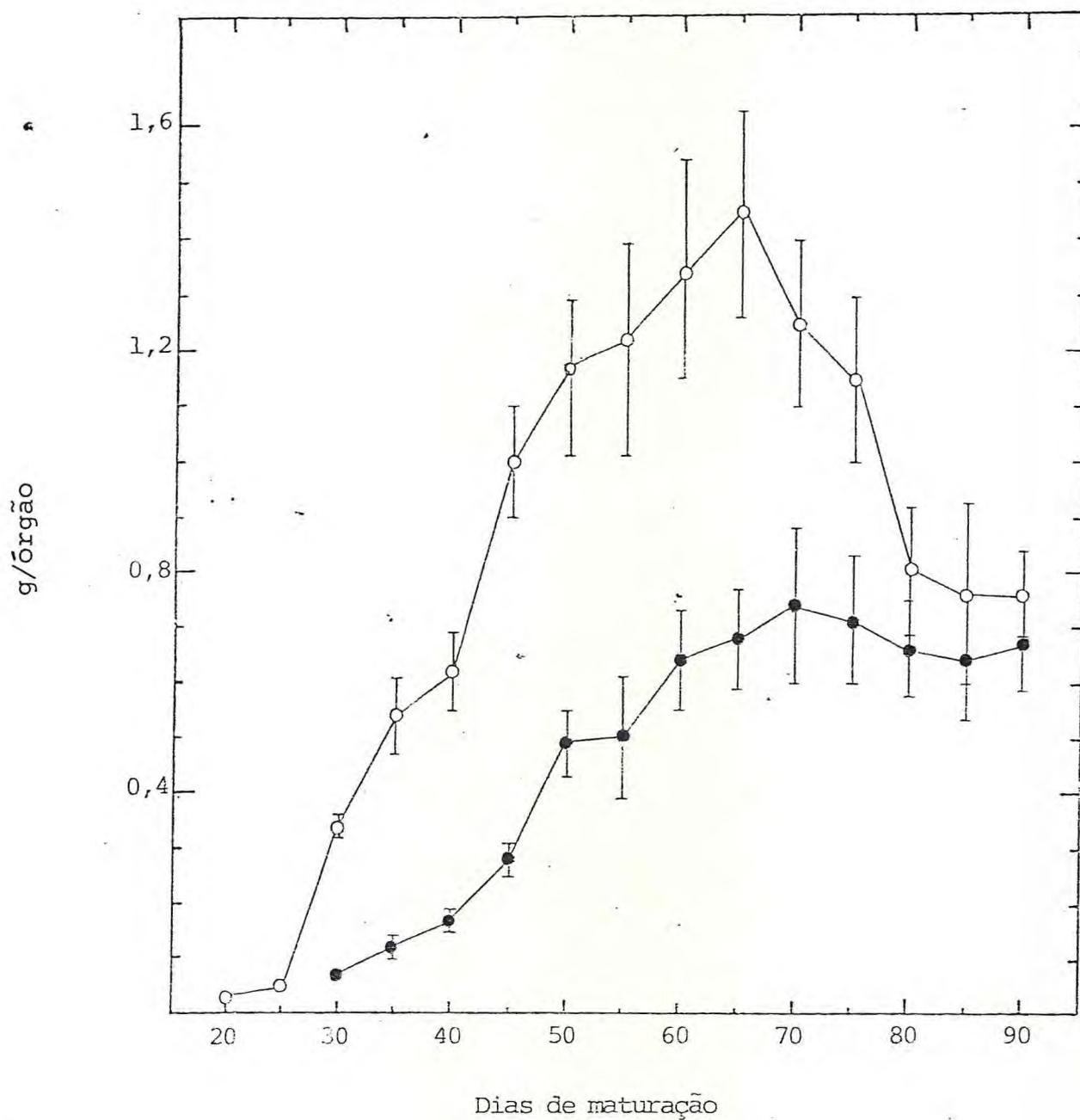


Figura 2 - Variação de peso fresco (o-o) e peso seco (●-●) de cotilédones + eixo de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação.

3.1.2 - Peso fresco e peso seco de pericarpo

Quando foi investigada a variação de peso fresco de pericarpo de *C. brasiliensis*, ao longo do processo de maturação (Tabela 5 e Figura 3), foi notado um aumento até o 45º dia, quando atingiu o valor máximo de 5,018 g/órgão. A partir do 60º dia, a curva de peso fresco começou a decrescer, caindo brusca-mente para um valor de 0,600 g/órgão, no 85º dia de maturação (12% do valor máximo).

Na curva de peso seco (Tabela 5 e Figura 3), notamos que ocorre um aumento em peso, atingindo o valor de 0,897 g/órgão no 30º, permanecendo aproximadamente constante, até o 80º dia de maturação, com uma queda no final do processo quando atinge um valor de 0,510 g/órgão no 90º dia.

Quando essas duas curvas são comparadas pode-se notar que o peso seco já atinge o valor máximo aos 30 dias, permanecendo constante até o final do processo. Os elevados valores de peso fresco se devem grandemente à absorção de água pela vagem, caracterizando-se por um decréscimo neste teor de água por volta do 60º dia quando a semente inicia a fase final do processo de maturação (secagem da vagem).

3.1.3 - Peso fresco e peso seco de tegumento

A curva obtida quando estudamos a variação de peso

Tabela 5 - Peso fresco e peso seco (em g/ôrgão) de pericarpo de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação.

Dias	Peso fresco ($\bar{x} \pm v$)	Peso seco ($\bar{x} \pm v$)
10	0,759 ± 0,310	0,113 ± 0,053
15	2,581 ± 0,401	0,383 ± 0,082
20	3,760 ± 0,659	0,681 ± 0,154
25	3,685 ± 0,331	0,743 ± 0,089
30	4,415 ± 0,359	0,897 ± 0,090
35	3,797 ± 0,567	0,849 ± 0,071
40	4,705 ± 0,726	1,059 ± 0,084
45	5,018 ± 0,636	0,980 ± 0,094
50	4,732 ± 1,043	0,670 ± 0,270
55	4,663 ± 0,522	0,860 ± 0,101
60	3,453 ± 0,449	0,680 ± 0,088
65	3,585 ± 0,717	0,860 ± 0,160
70	1,068 ± 0,243	0,850 ± 0,100
75	1,003 ± 0,114	0,810 ± 0,044
80	0,970 ± 0,117	0,850 ± 0,110
85	0,600 ± 0,089	0,520 ± 0,090
90	0,580 ± 0,040	0,510 ± 0,040

Os valores de peso fresco e de peso seco foram divididos pelo número de sementes da vagem.

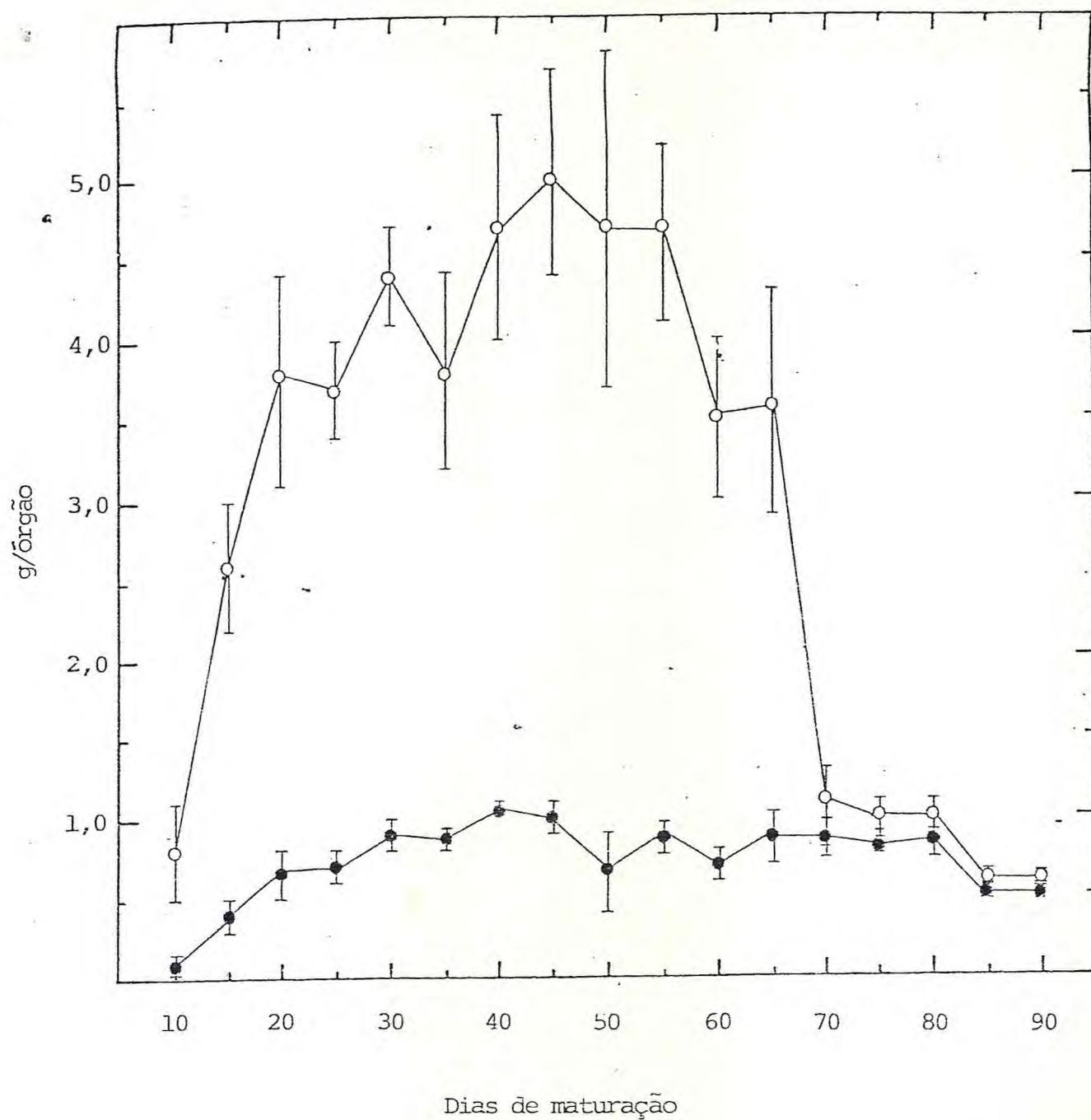


Figura 3 - Variação do peso fresco (o-o) e peso seco (●-●) de pericarpo de *C. brasiliensis* ao longo do processo de maturação.

fresco de tegumento, ao longo da maturação (Tabela 6 e Figura 4), nos mostra que ocorre um aumento brusco até o 45º dia, alcançando o tegumento um peso de 0.756 g/órgão. Esse valor permanece constante até o 55º dia, vindo logo a cair bruscamente para um valor de 0.202 g/órgão, ao final do processo (26% do valor máximo).

Para a curva de peso seco (Tabela 6 e Figura 4), obtivemos um aumento em peso até o 70º dia, de aproximadamente 0.261 g/órgão, permanecendo esse valor constante até o 75º dia, vindo a decrescer um pouco no 80º dia, para um valor de 0,182g/órgão (66% do valor máximo).

Quando comparamos as duas curvas, notamos que ambos os valores de peso seco e de peso fresco atingem um platô já no 45º dia. Por outro lado, enquanto o peso fresco apresenta uma queda já no 60º dia o peso seco permanece constante até o 75º dia.

3.2 - Teor de proteínas e atividade hemaglutinante de cotilédones + eixo, pericarpo e tegumento ao longo do processo de maturação de C. brasiliensis

3.2.1 - Teor de proteínas e atividade hemaglutinante em cotilédones + eixo

O teor de proteínas de cotilédones + eixo de sementes

Tabela 6 - Peso fresco e peso seco (em g/órgão) de tegumento de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação.

Dias	Peso fresco ($\bar{x} \pm v$)	Peso seco ($\bar{x} \pm v$)
25	0,140 \pm 0,013	0,032 \pm 0,003
30	0,288 \pm 0,040	0,077 \pm 0,011
35	0,517 \pm 0,046	0,131 \pm 0,012
40	0,534 \pm 0,064	0,160 \pm 0,019
45	0,756 \pm 0,095	0,206 \pm 0,026
50	0,782 \pm 0,081	0,217 \pm 0,025
55	0,780 \pm 0,091	0,209 \pm 0,024
60	0,733 \pm 0,110	0,225 \pm 0,025
65	0,664 \pm 0,088	0,213 \pm 0,028
70	0,359 \pm 0,048	0,261 \pm 0,035
75	0,369 \pm 0,057	0,273 \pm 0,042
80	0,206 \pm 0,055	0,182 \pm 0,047
85	0,203 \pm 0,046	0,182 \pm 0,041
90	0,202 \pm 0,036	0,179 \pm 0,032

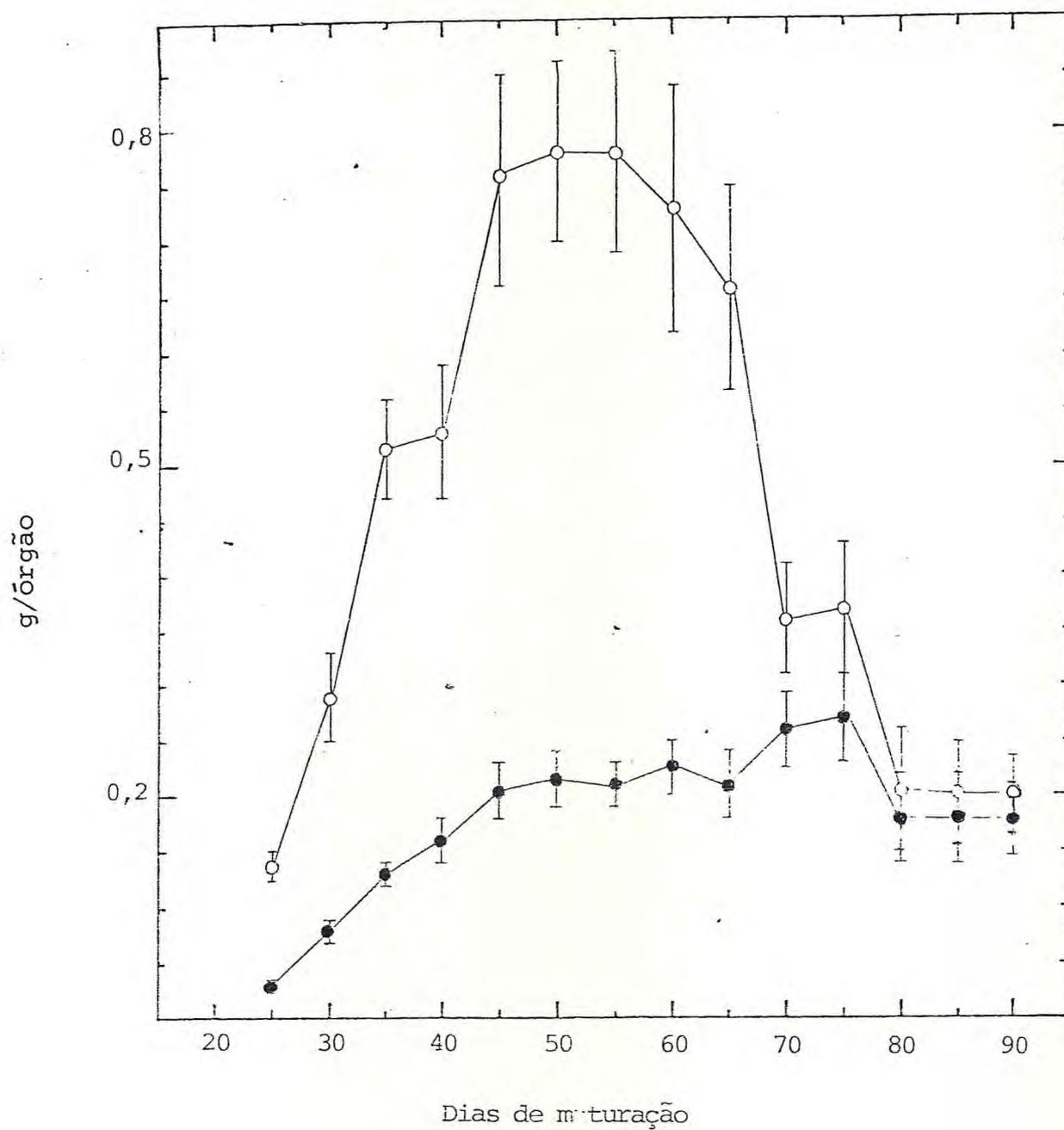


Figura 4 - Variação de peso fresco (o-o) e peso seco (●-●) de tegumento de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação.

de C. brasiliensis, ao longo do processo de maturação é mostrado na Tabela 7 e Figura 5, onde se nota um aumento crescente até o 70º dia, com um valor de 107,44 mg/órgão, mantendo-se constante até o 75º dia, decrescendo então até atingir um valor de 72,73 mg/órgão no 90º dia (68% do valor máximo).

A curva de atividade hemaglutinante total obtida durante a maturação de C. brasiliensis é mostrada na Tabela 7 e Figura 5, onde se nota que esta atividade atinge seu ponto máximo aos 70 dias com um valor de 3374 UH/órgão. À partir desse dia a atividade hemaglutinante total começa a decrescer atingindo um valor de 1289 UH/órgão, aos 90 dias de maturação (38% do valor máximo).

Na curva de atividade hemaglutinante específica, mostrada na Tabela 7 e Figura 5, podemos notar que a atividade hemaglutinante específica máxima é alcançada aos 60 dias, com 30,800 UH/mg de proteína. Esse valor mantém-se constante até o 70º dia, vindo a seguir decrescer para um valor de 17,73UH/mg de proteína aos 85 dias de maturação.

Comparando as curvas de proteína total e atividade hemaglutinante total, notamos que ambas atingem o valor máximo aos 70 dias de maturação. Quando, no entanto, analisamos a curva de atividade hemaglutinante específica, notamos a existência de uma síntese diferenciada da lectina com relação às demais proteínas. Esta síntese diferenciada é marcante entre o 45º e 60º dia. A partir desses três gráficos, podemos observar que toda a atividade hemaglutinante, bem como toda a proteína total,

Tabela 7 - Teor de proteínas e atividade hemaglutinante em cotilédones + eixo de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação.

Dias	Proteína		Atividade hemaglutinante		
	mg/g farinha	mg/órgão	UH/g farinha	UH/ór- gão	UH/mg proteína
25	11,0	0,07	0	0	0
30	65,1	4,36	0	0	0
35	74,0	9,10	844	103,8	11,4
40	95,1	16,45	842	145,7	8,90
45	95,3	26,68	1546	432,9	16,20
50	110,9	55,01	2177	1080	19,60
55	117,7	58,85	2708	1354	23,00
60	141,8	91,04	4367	2804	30,80
65	140,7	95,68	4167	2834	29,60
70	144,4	107,44	4535	3374	31,40
75	149,7	107,19	2992	2142	20,00
80	141,1	93,97	2577	1716	18,30
85	142,1	74,15	2528	1315	17,73
90	142,6	72,73	2528	1289	17,73

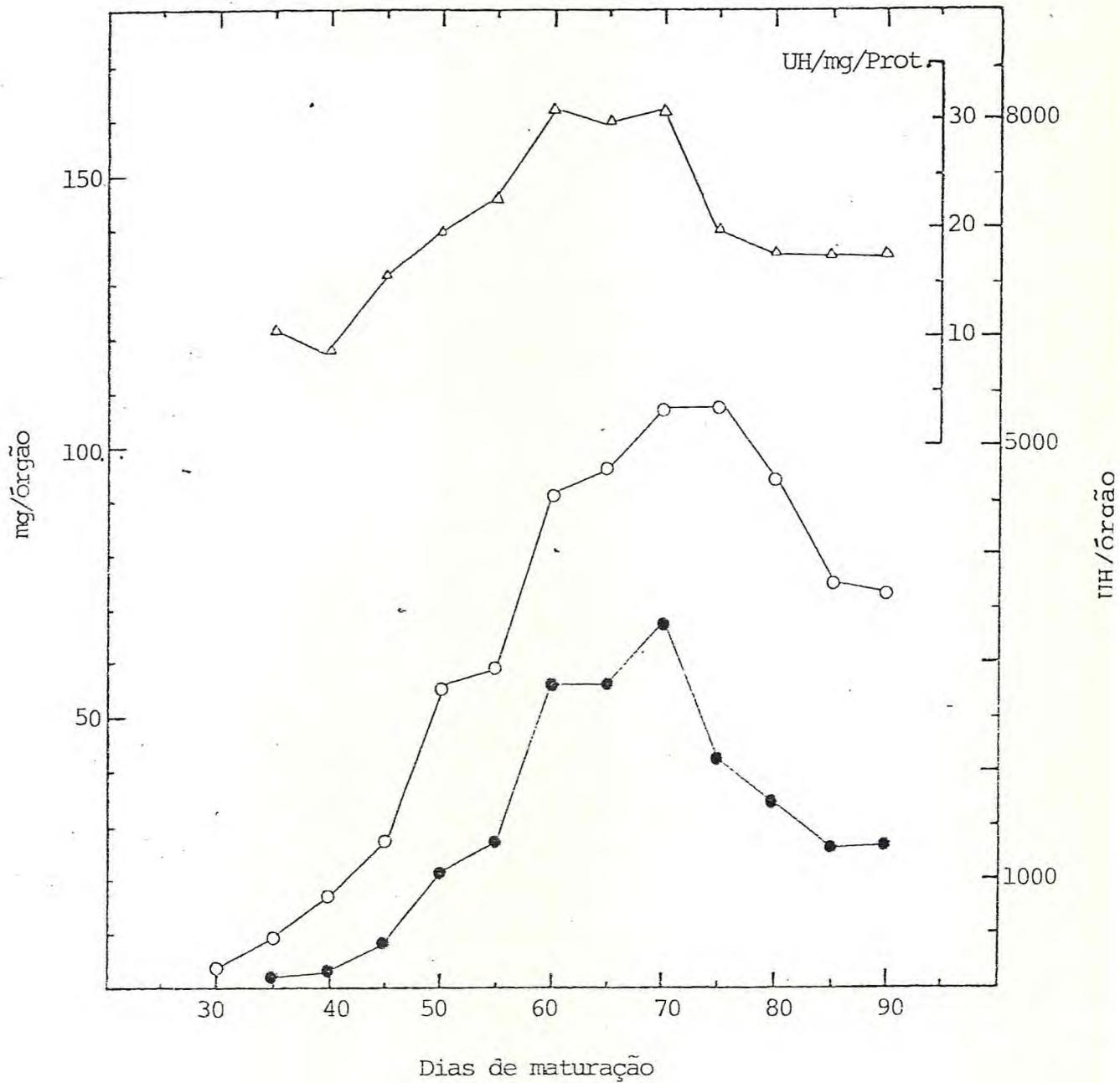


Figura 5 - Teor de proteínas (o-o), atividade hemaglutinante total (●-●) e atividade hemaglutinante específica (Δ-Δ) de cotilédones+eixo de *C. brasiliensis* ao longo do processo de maturação.

estão concentradas em seu valor máximo aos 70 dias de matura
ção. A queda da atividade específica no final do período pode
ria indicar uma insolubilização da lectina, o aparecimento de
um inibidor endógeno que a inative ou ainda uma degradação
da mesma.

3.2.2 - Teor de proteínas e atividade hemaglutinante em peri - carpo e tegumento

O teor de proteína total de pericarpo e tegumento ao
longo da maturação de C. brasiliensis, estão mostrados na Tabe
la 8 e Figura 6 .

Observando a curva de proteína de pericarpo, notamos
que ocorre um aumento brusco de proteína aos 30 dias, com um
valor de 4,66 mg/órgão, decrescendo também rapidamente para um
valor de 0,43 mg/órgão, aos 80 dias de maturação (9,2% do va-
lor máximo).

O teor de proteína solúvel total dos tegumentos , ao
longo da maturação, passa de 0,073 mg/órgão, aos 30 dias, para
um valor de 0,25 mg/órgão, aos 50 dias, mantendo-se constante
até os 60 dias, para em seguida decrescer à um valor de 0,19
mg/órgão, ao final do processo (73% do valor máximo).

Quando essas duas curvas são comparadas com a curva
de proteína total de cotilédones + eixo podemos notar que en-
quanto o teor de proteína do pericarpo decresce o de cotilêdo

Tabela 8 - Teor de proteínas em pericarpo e tegumento de C.bra
siliensis ao longo do processo de maturação.

Dias	Pericarpo		Tegumento	
	mg/farinha	mg/ôrão	mg/farinha	mg/ôrgão
15	0,405	0,155	nd	nd
20	1,06	0,722	nd	nd
25	0,816	0,606	nd	nd
30	5,20	4,66	0,95	0,073
35	3,75	3,18	1,00	0,131
40	2,15	2,28	1,40	0,224
45	nd	nd	nd	nd
50	1,18	0,791	1,15	0,250
55	0,91	0,783	nd	nd
60	0,55	0,374	1,15	0,259
65	nd	nd	nd	nd
70	0,59	0,502	nd	nd
75	nd	nd	nd	nd
80	0,50	0,425	1,05	0,191

. Os valores de proteína para o pericarpo foram divididos pelo número de sementes da vagem.

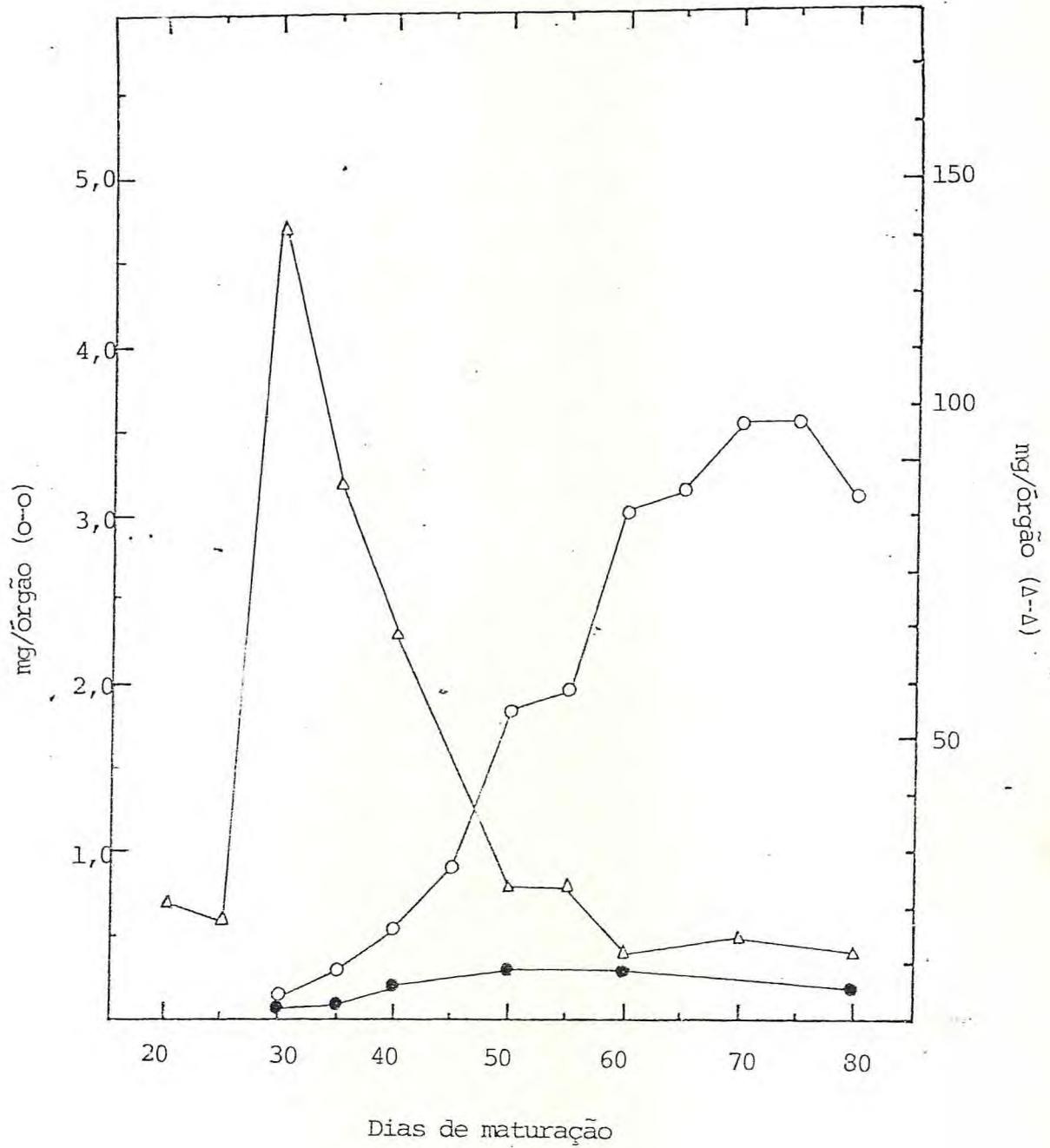


Figura 6 - Teor de proteínas de pericarpo (Δ - Δ), tegumento (\bullet - \bullet) e cotilédones + eixo (o-o) de *C. brasiliensis* ao longo do processo de maturação.

nes + eixo aumenta.

Foram realizados vários ensaios de atividade hemaglutinante, tanto em pericarpo como em tegumentos de C. brasiliensis, ao longo do processo de maturação. Contudo, não foi detectada a presença de lectina em pericarpo e tegumento, em nenhum dos dias testados, desde o início do processo, até o seu final, aos 80 dias.

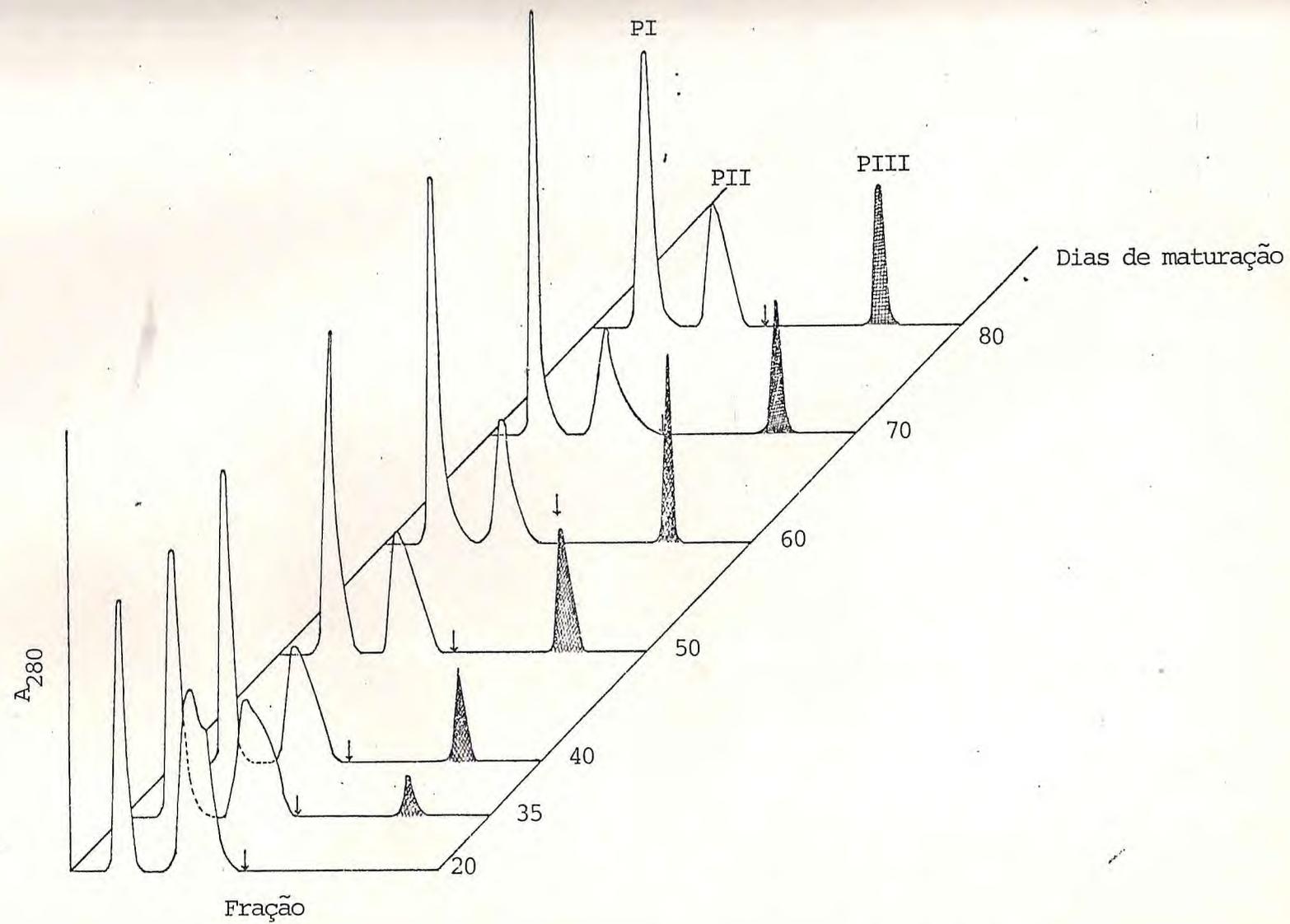
3.3 - Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50

3.3.1 - Cromatografia de afinidade de extratos de cotilédones + eixo

Quando extratos de cotilédones + eixo de C. brasiliensis, foram submetidos a cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50, foram obtidos os resultados apresentados na Figura 7, onde notamos que a partir do 35º dia, aparece uma fração que fica retida na coluna, portanto com especificidade por polidextrana. Essa fração vai crescendo a medida que o processo de maturação chega ao fim.

A relação entre as proteínas não retidas (PI), e aquelas que apresentam atividade anti-dextrana (PIII), é apresentada na Figura 8. Pelos dados obtidos podemos notar que a contribuição da fração PIII para o teor total de proteínas aumenta até o 50º dia de maturação mantendo-se constante até o

Figura 7 - Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 de extratos de cotilédones + eixo de sementes de C. brasiliensis durante o processo de maturação. A coluna foi equilibrada com NaCl 1M contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM, seguido de NaCl 1M contendo CaCl_2 5mM, MnCl_2 5mM e glicose 0,1M. Amostra: 0,5ml de extrato 1:5 (p/v) em NaCl 1M.



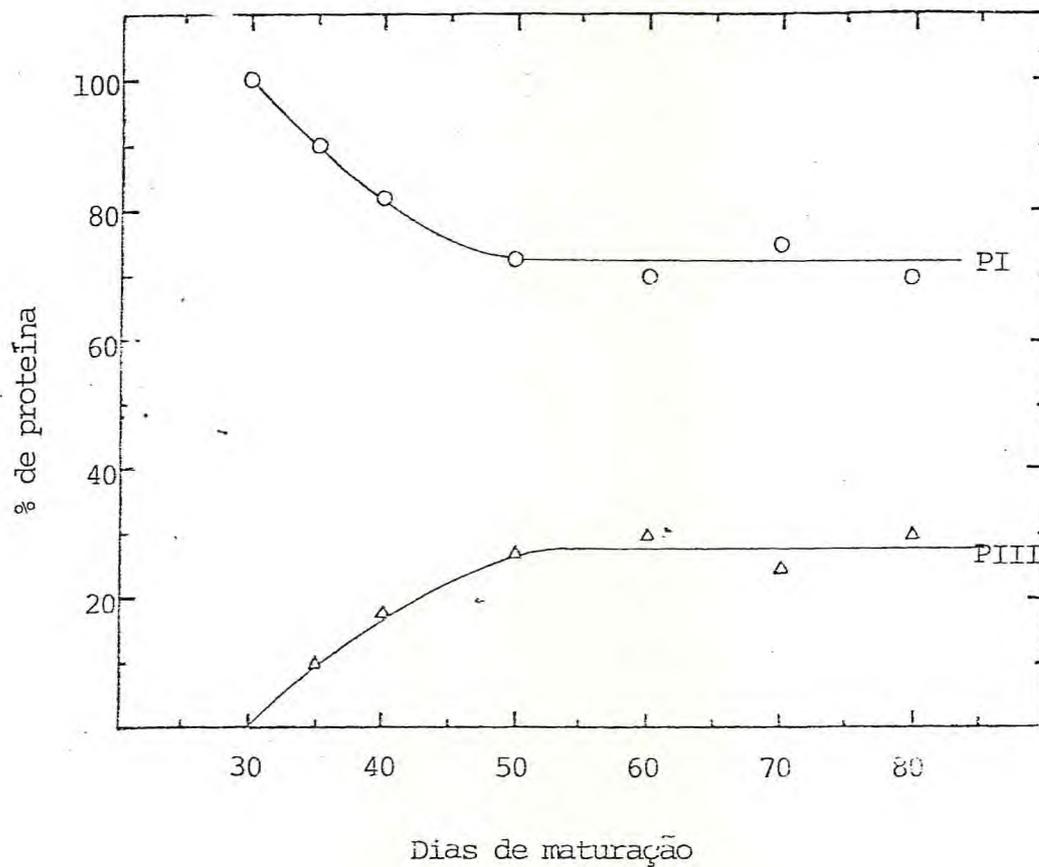


Figura 8 - Teor de proteínas nas frações PI (o-o) e PIII (Δ - Δ), obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 de cotilédones + eixo de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação. Os valores (%) são apresentados em relação ao teor total (PI + PIII).

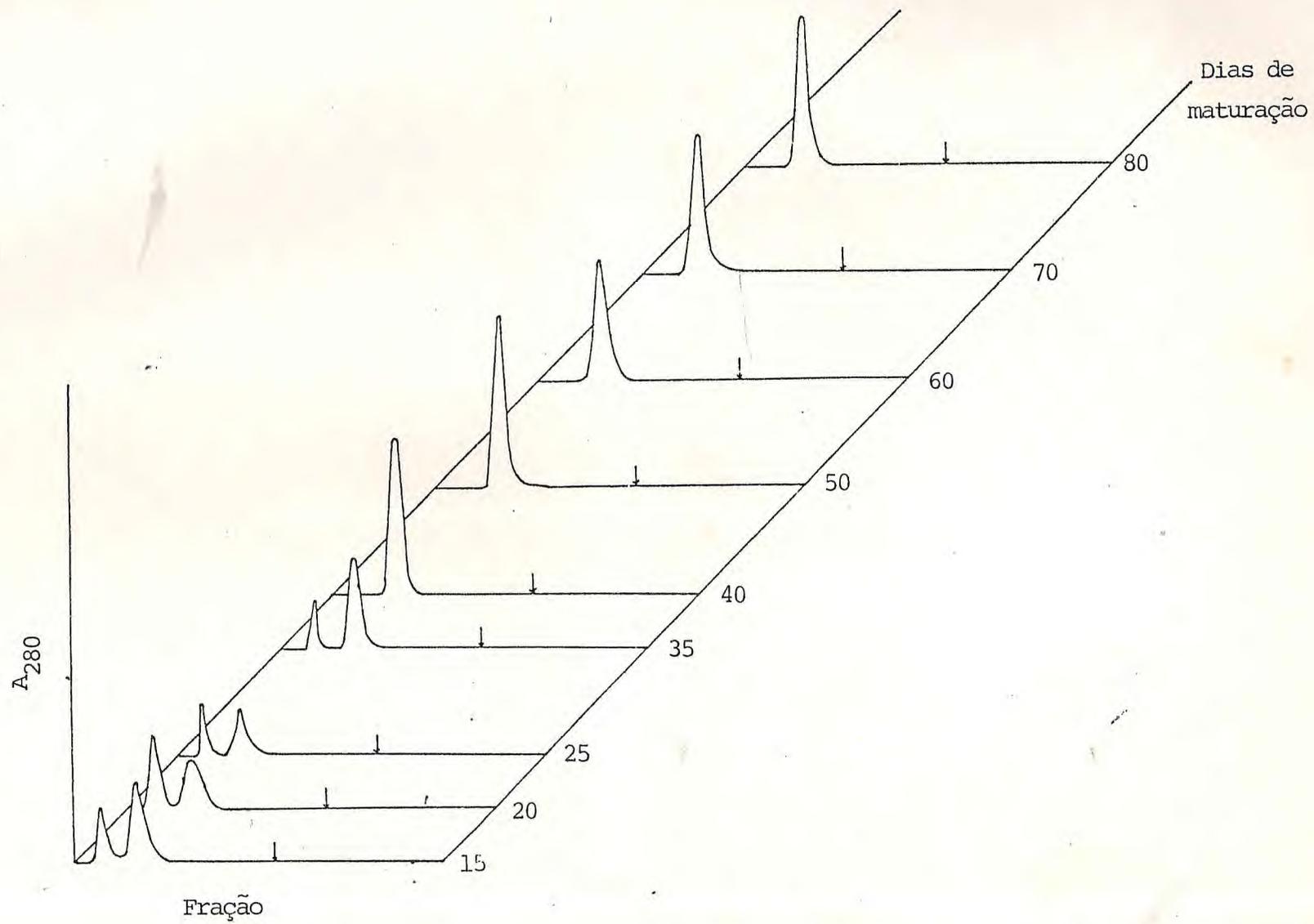
final do processo. Comparando esses resultados com a curva de atividade hemaglutinante (Figura 5), podemos observar que embora a fração retida aos 35 dias possua afinidade por dextrana, esta ainda não possui atividade hemaglutinante significativa (3,1% do valor máximo) vindo a aparecer somente a partir do 50º dia, tornando-se bem acentuada entre os dias 60 e 70. Diante destes resultados podemos sugerir a existência de um precursor da lectina que, embora tenha afinidade por dextrana ainda não tem a mesma atividade hemaglutinante específica.

3.3.2 - Cromatografia de afinidade de extratos de pericarpo

Quando foram feitas cromatografias, mostradas na Figura 9, com extratos de pericarpo de C. brasiliensis, ao longo do processo de maturação, notamos o aparecimento de apenas 2 picos não retidos na coluna, e já aos 40 dias notamos o desaparecimento por completo da fração de peso molecular mais alto, permanecendo então um só pico até o final do processo. Nenhuma fração foi obtida por eluição com NaCl 1M contendo CaCl₂ 5mM, MnCl₂ 5mM e glicose 0,1M.

Os resultados obtidos confirmam a ausência de lectina (já evidenciada pela inexistência de atividade hemaglutinante) nos pericarpos de C. brasiliensis, ao longo do processo de maturação.

Figura 9 - Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 de extratos de pericarpo de C. brasiliensis durante o processo de maturação. A coluna foi equilibrada com NaCl 1M contendo CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM, seguido de NaCl 1M contendo CaCl₂ 5mM, MnCl₂ 5mM e glicose 0,1M. Amostra: 0,5ml de extrato 1:5 (p/v) em NaCl 1M.



3.3.3 - Cromatografia de afinidade de extratos de tegumento

Por cromatografia em Sephadex G-50 de extratos de tegumento de C. brasiliensis (Figura 10) podemos notar a presença de três frações não retidas. Nenhuma fração foi obtida por eluição com NaCl 1M contendo CaCl_2 5mM, MnCl_2 5mM e glicose 0,1M.

Os resultados obtidos confirmam a ausência da lectina (já mostrada nas determinações de atividade hemaglutinante) nos tegumentos de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação.

3.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e betamercaptoetanol

3.4.1 - Eletroforese de extratos de cotilédones + eixo

Por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e betamercaptoetanol de extratos de cotilédones + eixo de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação (Figura 11), notamos a presença de várias bandas de proteínas, cujos pesos moleculares aparentes estão compreendidos entre 8000 e 40000 daltons.

Pode-se notar a presença de bandas características de proteínas de cotilédones + eixo de semente quiescente, valendo

Figura 10 - Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 de extratos de tegumento de sementes de C. brasiliensis durante o processo de maturação. A coluna foi equilibrada com NaCl 1M contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM, seguido de NaCl 1M contendo CaCl_2 5mM, MnCl_2 5mM e glicose 0,1M. Amostra: 1,0ml de extrato 1:10 (p/v) em NaCl 1M.

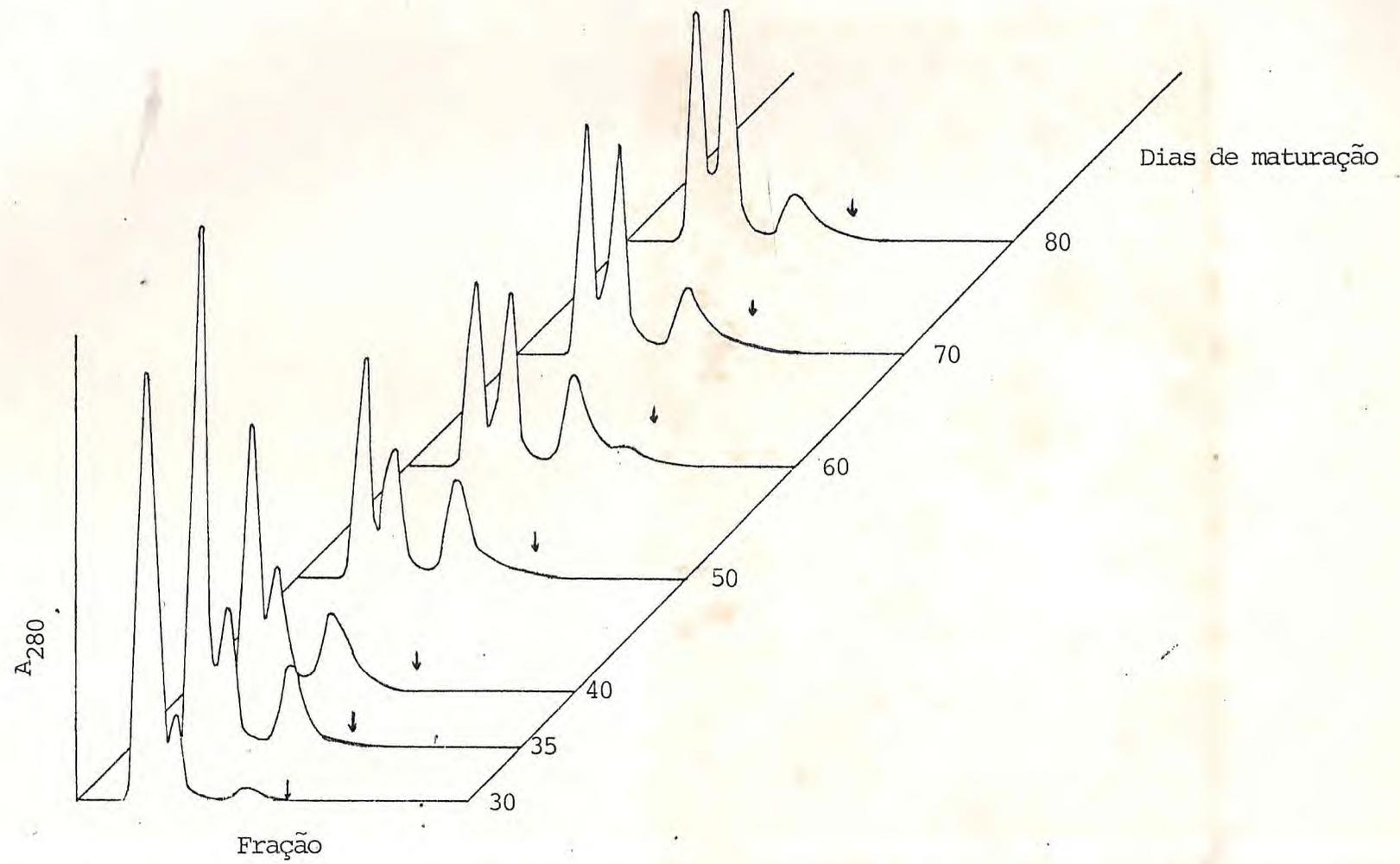




Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e betamercaptoetanol de extra-
tos de cotilédones + eixo de sementes
de C. brasiliensis durante a matura-
ção. Amostras: (1) PIII de C. brasili-
ensis, (2) 30 dias, (3) 40 dias, (4)
50 dias, (5) 60 dias, (6) 70 dias, (7)
80 dias, (8) extrato quiescente + ei-
xo quiescente, (9) PIII de C. brasili-
ensis, (10) padrão.

a pena destacar a banda correspondente à fração PI da cromatografia de afinidade e bandas com valores de Rf correspondentes à lectina (por comparação ver MOREIRA & CAVADA, 1984), que só aparecem após 60 dias de maturação.

3.4.2 - Eletroforese das frações de extratos de cotilédones + eixo retidas em coluna de Sephadex G-50

.. Frações de extratos de cotilédones + eixo de C. brasiliensis, ao longo do processo de maturação, retidas em coluna de afinidade (Sephadex G-50), foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e betamercaptoetanol (Figura 12). Por esses resultados podemos notar que as bandas características da lectina, também têm o seu aparecimento retardado, coincidindo com o aparecimento da atividade hemaglutinante, que se dá somente aos 50 dias de maturação. Além disto, nos dias iniciais do processo há o aparecimento de bandas com pesos moleculares aparentes ligeiramente mais elevados que as bandas características das lectinas maduras.

Deve-se notar ainda que apenas as duas bandas de pesos moleculares mais elevados estão modificadas.

Estes resultados parecem confirmar a hipótese, levantada no item 3.1, da existência de um precursor da lectina, que de alguma maneira apresenta peso molecular aparente superior ao da lectina.



Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e betamercaptoetanol das frações retidas em coluna de afinidade (Sephadex G-50). Amostras: (1) padrão, (2) extrato quiescente, (3) PIII quiescente, (4) PIII 35 dias, (5) PIII 40 dias, (6) PIII 50 dias, (7) PIII 60 dias, (8) PIII 70 dias, (9) PIII 80 dias, (10) PIII quiescente, (11) extrato quiescente, (12) padrão.

3.4.3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e betamercaptoetanol de extratos de pericarpo e tegumento

Quando extratos de pericarpo e tegumento foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e betamercaptoetanol, não foram encontradas bandas correspondentes da lectina. Estes resultados vêm, mais uma vez, confirmar a ausência de lectina nestas partes da vagem.

3.5 - Eletrofocalização

Frações protéicas de cotilédones + eixo de sementes de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação, retidas em coluna de afinidade (PIII), foram submetidas a eletrofocalização (Figura 13). Notamos, por este resultado, o aparecimento, aos 35 dias, de bandas com pontos isoelétricos diferentes daqueles característicos da lectina madura.

Os resultados acima parecem confirmar aqueles obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e betamercaptoetanol, quanto à presença de proteínas com característica próximas da lectina (são retidas em coluna de afinidade) mas com propriedades fisicoquímicas ligeiramente diferentes.

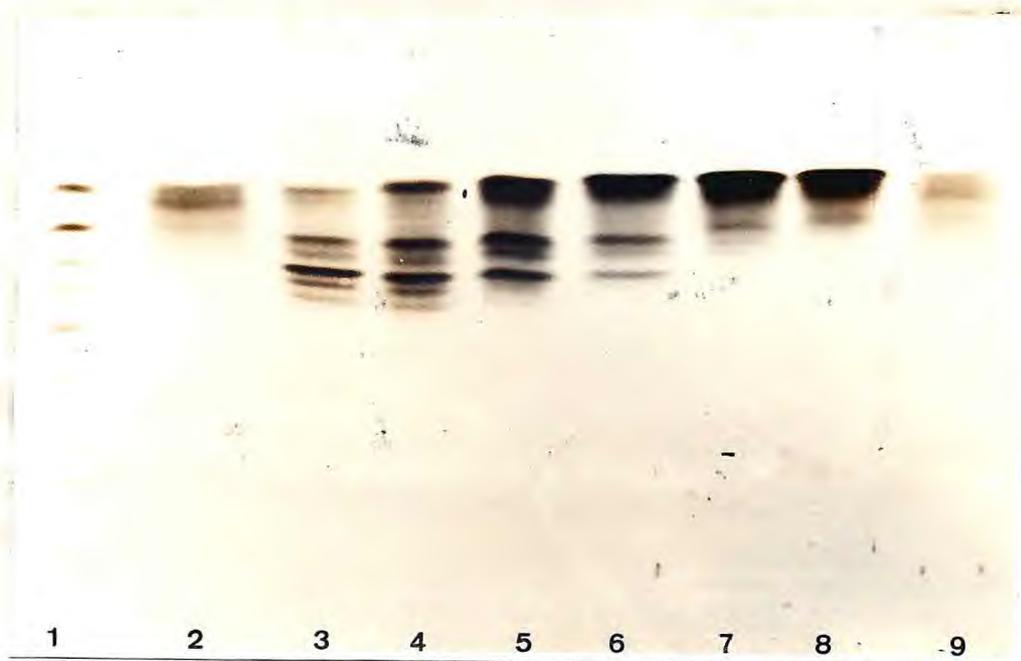


Figura 13 - Eletrofocalização em placa de poliacrilamida das frações proteicas de cotilédones de sementes de C. brasiliensis em maturação retidas em coluna de afinidade (Sephadex G-50). Amostras: (1) padrões, (2) PIII quiescente, (3) 35 dias, (4) 40 dias, (5) 50 dias (6) 60 dias, (7) 70 dias, (8) 80 dias, (9) PIII quiescente.

3.6 - Imunodifusão radial de Mancini

Extratos de cotilédones + eixo de C. brasiliensis nos diversos estágios de maturação foram deixados difundir em gel de agarose contendo IgG contra ET ou IgG contra PIII (Figura 14). Podemos notar na placa que contém IgG contra ET a presença de 3 arcos principais que aumentam a partir do 25º dia de maturação, mantendo-se constante já a partir do 40º dia até o fim do processo. Por outro lado, nas placas contendo IgG contra PIII, há o aparecimento de apenas um único arco que surge já aos 25 dias vindo a aumentar progressivamente até o 35º dia mantendo-se então constante até o fim do processo.

Quando os mesmos experimentos foram realizados com extratos de pericarpo e tegumento não foram encontrados arcos de precipitação em qualquer dia.

Estes resultados confirmam os experimentos anteriores quanto à ausência de lectinas nos pericarpos e tegumentos de C. brasiliensis nos diversos estágios do processo de maturação. Além disto, estes resultados confirmam também a presença de proteínas com propriedades muito semelhantes às da lectina, mas com atividade específica mais baixa, já nos primeiros dias do processo.

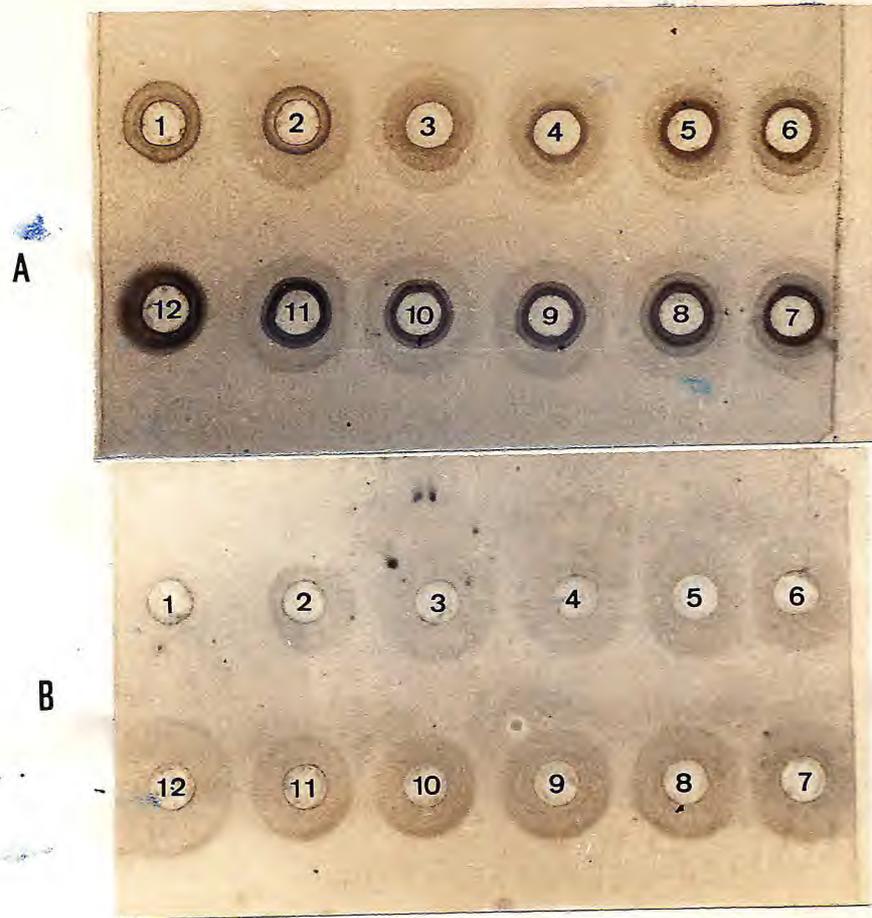


Figura 14 - Imunodifusão radial de Mancini, em gel de agarose contendo antissoro contra ET (A) e contra PIII (B) de extratos de cotilédones + eixo de Canavalia brasiliensis, ao longo do processo de maturação. 1: 25 dias, 2: 30 dias, 4: 40 dias, 5: 45 dias, 6: 50 dias, 7: 55 dias, 8: 60 dias, 9: 65 dias, 10: 70 dias, 11: 80 dias, 12: quiescente.

3.7 - Imunoeletroforese em gel de agarose contendo anticorpo

Quando extratos totais e frações proteicas retidas em coluna de afinidade, de cotilédones de C. brasiliensis nos diversos estágios do processo de maturação foram submetidos a imunoeletroforese em gel de agarose contendo IgG contra ET e PIII foram obtidos os resultados mostrados nas Figuras 15 e 16. A placa que contem IgG contra ET apresenta bandas características da semente quiescente já no 30º dia do processo, aumentando gradativamente até o 50º dia, permanecendo constante até o 80º dia. Nas placas contendo IgG contra PIII, por sua vez, notamos a presença de bandas já no 30º dia que cresce até o 45º dia mantendo-se praticamente constante até o fim do experimento. Notou-se também uma inversão do sentido de migração das proteínas, devida provavelmente à diferença de pontos isoelétricos durante o processo de maturação, o que é confirmado pelos experimentos de eletrofocalização.

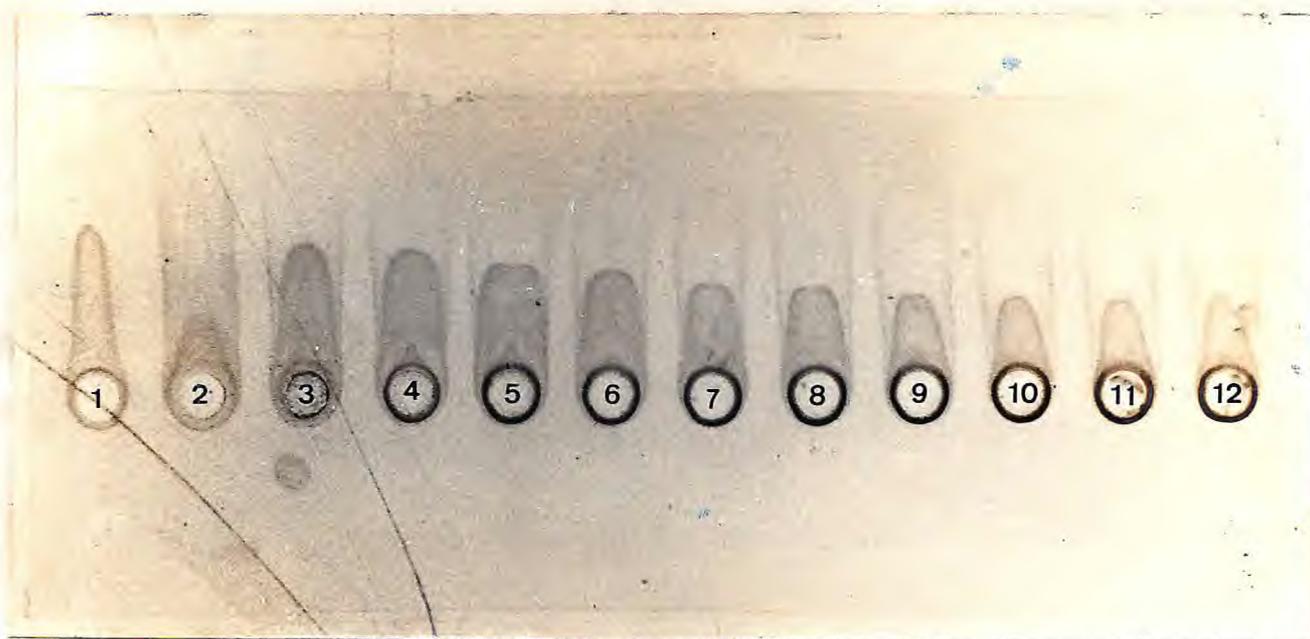


Figura 15 - Rocket - imunoeletroforese em gel de agarose contendo IgG contra Extrato Total, de extratos totais de cotilédones + eixo de Canavalia brasiliensis, ao longo do processo de maturação. 1: 25 dias, 2: 30 dias, 3: 35 dias, 4: 40 dias, 5: 45 dias, 6: 50 dias, 7: 55 dias, 8: 60 dias, 9: 65 dias, 10: 70 dias, 11: 75 dias, 12: 80 dias.

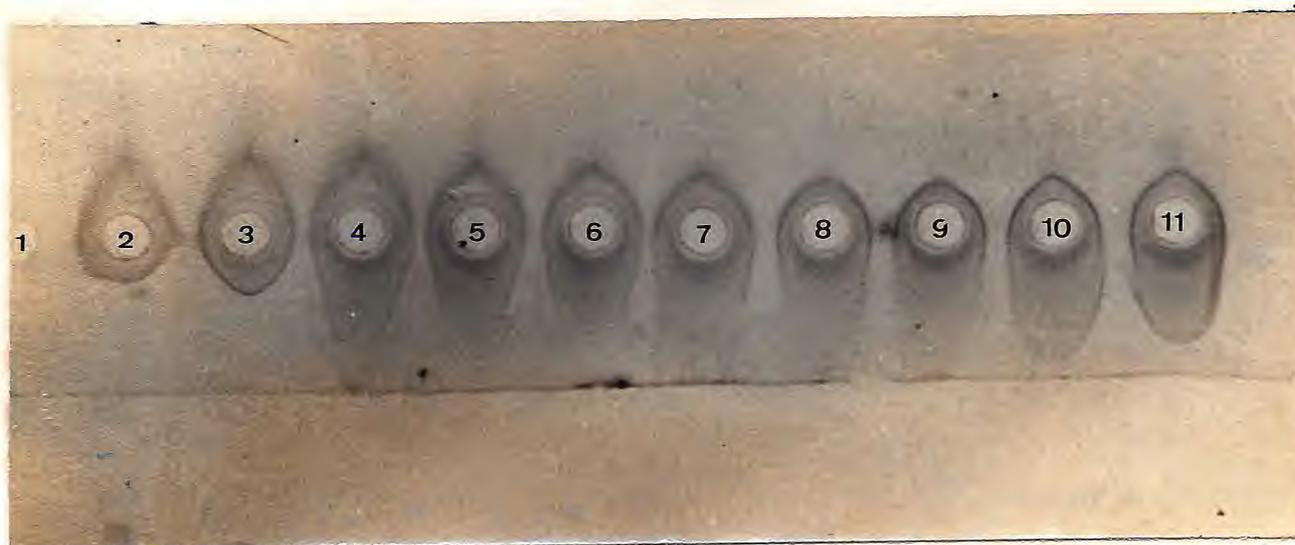


Figura 16 - Rocket - imunoeletroforese em gel de agarose contendo IgG contra PIII, de extratos totais de cotilédones de Canavalia brasiliensis, ao longo do processo de maturação. 1:30 dias; 2: 35 dias, 3: 40 dias, 4: 45 dias, 5: 50 dias, 6: 55 dias, 7: 60 dias, 8: 65 dias, 9: 70 dias, 10: 75 dias, 11: 80 dias.

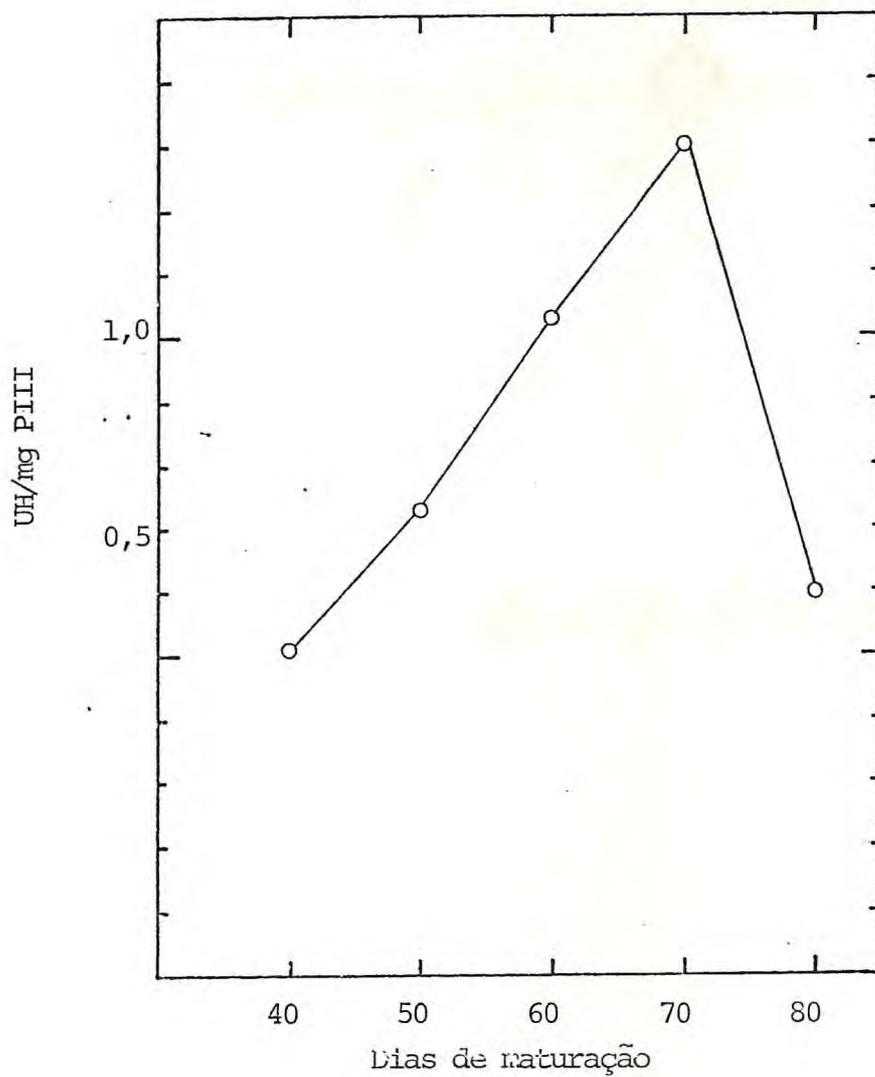


Figura 17 - Relação atividade/teor de lectina (UH/mg PIII) em cotilédones + eixo de C. brasiliensis ao longo do processo de maturação.

4 - DISCUSSÃO

A variação do peso fresco e do peso seco de pericarpo, tegumento e cotilédones + eixo durante o processo de maturação de Canavalia brasiliensis é similar à de outras sementes já estudadas, caracterizando-se inicialmente por uma etapa de absorção pronunciada de água seguida por uma etapa de perda brusca (PUSZTAI et.al., 1983).

A duração dessas etapas varia, no entanto, entre os órgãos. Enquanto o pericarpo tem a sua etapa inicial completada já em torno dos 40 dias, quando o peso fresco e o peso seco atingem o máximo, o tegumento atinge pouco mais tarde (45 dias) e os cotilédones bem mais tardiamente (65-70 dias). É digno de nota, também, um pequeno decréscimo de peso seco que ocorre no pericarpo e tegumento, no final do experimento causado provavelmente por mobilização para os cotilédones (Figura 6).

Quando o teor de proteína dos cotilédones + eixo é examinado ao longo do processo de maturação da semente e comparado com a variação do peso seco vemos que embora no início haja um crescimento mais rápido do peso seco, a partir do 60º dia o comportamento é semelhante, com uma concentração de proteína aproximadamente constante até o fim do experimento (Tabela 7). Quando no entanto comparamos o comportamento da atividade hema glutinante tanto com o peso seco como com o teor de proteína, verificamos que há uma síntese diferenciada da lectina com um máximo tanto de atividade específica (UH/mg) como de atividade

por grama de farinha no 70º dia com uma queda pronunciada até o fim do processo. Provavelmente tal comportamento é devido a uma insolubilização da lectina, à presença de algum inibidor que a torna inativa, ou à degradação da lectina. Os experimentos de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 ao mesmo tempo que confirmam a ausência de atividade hemaglutinante tanto no pericarpo como no tegumento sugere a presença nos cotilédones + eixo, de uma proteína que embora apresente algumas características da lectina (fica retida em coluna de dextrana, sendo eluída apenas quando em presença de glicose, um dos açúcares específicos para a lectina) não apresenta a atividade específica esperada para a lectina. Podemos sugerir que esta proteína seja um precursor da lectina que ainda necessite sofrer modificações para se transformar na lectina madura.

Além disto as cromatografias de afinidade em coluna de Sephadex G-50 sugerem, ao mesmo tempo que eliminam a hipóteses de insolubilização e degradação da lectina, a exemplo do que acontece no início da germinação (MOREIRA & CAVADA, 1984), a possível existência de um inibidor da lectina nos estágios finais da maturação dos cotilédones.

A hipótese da existência de um precursor é confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e betamercaptoetanol. No início do processo de maturação a proteína retida na coluna de afinidade apresenta subunidades de pesos moleculares aparentes mais elevados. MOREIRA et.al.(1984)

mostraram que a lectina de C. brasiliensis apresenta três bandas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e beta-mercaptoetanol uma das quais corresponde à subunidade α e as outras duas, de pesos moleculares aparentes mais baixos, corresponde a fragmentos daquela subunidade. A exemplo do que acontece com a lectina de Dioclea grandiflora (RICHARDSON et. al., 1984 e AINOUZ et.al., 1985) e a lectina de Canavalia ensiformis (CARRINGTON, AUFFRET & HANKE, 1985) estes fragmentos devem corresponder aos fragmentos N-terminal(β) e C-terminal (γ). Isto indicaria que apenas a subunidade α completa e o fragmento N-terminal(banda β) estão modificados.

A sugestão da existência de um precursor nos estágios iniciais é ainda confirmada tanto por imunodifusão radial de Mancini como por imunoeletroforese em gel de agarose contendo antissoro, e por eletrofocalização em gel de poliacrilamida, onde foi detectada a presença do precursor já no início do processo de maturação.

5 - CONCLUSÕES

1 - A lectina de Canavalia brasiliensis Mart. apresenta um comportamento diferenciado com respeito às demais proteínas da semente, ao longo da maturação.

2 - Há síntese de um precursor da lectina no início do processo de maturação, com uma posterior quebra de um peptídeo para dar origem à lectina madura.

3 - Há, aparentemente, síntese de um inibidor da atividade hemaglutinante, nos estágios finais do processo de maturação.

6 - BIBLIOGRAFIA

- AGRAWAL, B.B. L. and GOLDSTEIN, I.J. Biochem. J., 96, 230-250 (1965). Citado em GOLDSTEIN and HAYES, 1978.
- AGRAWAL, B.B. L. and GOLDSTEIN, I.J. Biochim. Biophys. Acta, 147, 262-271 (1967). Citado em GOLDSTEIN and HAYES, 1978.
- AINOUZ, I.L., MOREIRA, R.A., CAMPOS, F.A.P., RICHARDSON, M., BEGBIE, R., STEWART, J.C., WATT, W.B. and PUSZTAI, A. The isolation and complete aminoacid sequence of the α and β subunits of the lectin from the seeds of Dioclea grandiflora Mart. Comunicação pessoal, 1985.
- ANDERSON, M.A., HOGART, R.D. and CLARKE, A.E. The possible role of lectins in mediating plant cell-cell interactions. In GOLDSTEIN, I.J. and ETZLER, M.E. Chemical Taxonomy Molecular Biology, and Function of Plant Lectins. Alan R. Liss, Inc., New York, 1983 pp143-161.
- ASPBERG, K., HOLMEN, H., PORATH, J. Biochim. Biophys. Acta, 160-117 (1968). Citado em GOLDSTEIN and HAYES, 1978.
- BALDING, P. Lectins: sugar-specific or receptor-specific proteins? In Bøg-Hansen, T.C. Ed. Lectins: Biology, Biochemistry. Proceedings of the 3rd. Lectin Meeting. Walter de Gruyter Berlin, New York 1981, pp 11-16.
- BARKER, B.E. and FARNES, P. Nature (London) 215, 659-660 (1967). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- BAUER, W.D. Infection of legumes by Rhizobia. Ann. Rev. Plant. Physiol. 32, 407 (1981). Citado em ANDERSON et.al., 1983.

- BEGBIE, R. A non-aqueous method for the sub-cellular fractionation of the cotyledones from dormant seeds of Phaseolus vulgaris L. Planta 147, 103-110 (1979).
- BESSLER, W., SHAFER, J.A., and GOLDSTEIN, I.J. A spectrophometric study of the carbohydrate binding site of Concanavalin A. J. Biol. Chem. 249, 2819-2822 (1974).
- BIROC, S.L. and ETZLER, M.E. Biochim. Biophys. Acta 544, 85-92 (1978). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- BLUMBERG, S. and TAL, N. Biochim. Biophys. Acta 453, 357-364 (1976). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- BOWLES, D.J. and KAUSS, H. Plant. Sci. Lett. 4, 411-418 (1975). Citado em PUSTAZI et.al., 1983.
- BOWLES, D.J., SCHNARRENBURGER, C. and KAUSS, H. Lectins as membranes components of mitochondria from Ricinus communis. Biochem. J. 160, (15), 375-382 (1976).
- BOWLES, D.J. and KAUSS, H. Characterization, enzymatic and lectin properties of isolated membranes from Phaseolus aureus. Biochim. Biophys. Acta 443(3): 360-375 (1976).
- BOWLES, D.J. and MARCUS, S. Febs Lett. 129, 135-138 (1981). Citado em PUSZTAI et.al., 1983.
- BOYD, W.C. The Lectins: Their present status. Vox Sang 8: 1 (1963).
- BOYD, W.C. and REGUERRA, R.M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. J. Immunol. 62, 333-339 (1949).

- CALLOW, J.A. Curr. Adv. Plant.Sci. 7, 181-193 (1975). Citado em PUSZTAI et.al., 1981.
- CALLOW, J.A. Adv. Bot. Res. 4, 1-49 (1977). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- CARRINGTON, D.M., AUFFRET, A. and HANKE, D.E. "Polypeptide li-
gation occurs during post-translational modification of
Concanavalin A". Nature 313, 64-67 (1985).
- CAVADA, B.S. Lectinas de Canavalia brasiliensis Mart. Isola-
mento, caracterização parcial e comportamento durante a
germinação. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento
de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Fede-
ral do Ceará, 87 pp, (1980).
- CAUSSE, H., LEMOINE, A. and ROUGÉ, P. Determination of
soybean seed lectin using linked immunosorbent assay (ELI-
SA); evolution of lectin during germination. International
Symposium on Seed Protein - Versailles (França), 1981.
- CAZAL, P. and LALOURIE, M. Acta haemat. 8, 73-80 (1952). Ci-
tado em ROUGÉ and PÈRE, 1982.
- CLAUSEN, J. Imunochemical techniques for the identification
and estimation of macromolecules. In Work T.S. and
Work, E. Laboratory Techniques in Biochemistry and Mole-
cular Biology, North-Holland Publishing Company Amsterdam
London (1969).
- COLLIER, R.J. Bacteriol. Rev. 39, 54-85 (1975). Citado em
LIS and SHARON, 1981.

- COULET, M. Contribution à l'étude des hêmo-agglutinines végétales, essentiellement chez Phaseolus vulgaris L. Thèse Doct. Pharm. Montpellier (1954). Citado em ROUGÉ and PÈRE, 1982.
- CUNNINGHAM, B.A. WANG, J.L., WAXDAL, M.J. and EDELMAN, G.M. J. Biol. Chem. 250, 1503-1512 (1975). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- DATTA, S.P. et.al. "Effect of phytohemagglutinin on Ehrlich ascites carcinoma". Brit. J. Cancer, 23, 616 (1969).
- DETERMAN, H. Gel Chromatography - Springer Verlag 2nd, New York 202 pp (1969).
- DIXSON, T. Australes Med. Gaz. 6: 155, 1886-7. Citado em LIENER, 1964.
- DOUGLAS, S.D., KAMIN, R., DAVIS, W.G. and FUDENBERG, H.H. In Proceedings Third Annual Leucocyte Culture Conference (W. O. Rieke, Ed.), 607-621 (1969). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- DOYLE, R.J., THOMASSON, D.L. and NICHOLSON, S.K. Carbohydr. Res. 46, 111-118 (1976). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- EISENBERG, P. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 41, 96 (1906). Citado em BALDING, 1981.
- EISLER, von M. and PORTHEIM, von L. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 29, 419-430 (1911). Citado em PUSZTAI et.al., 1983.
- EDELMAN, G.M. and WANG, J.L. J. Biol. Chem. 253, 3016-3022 (1978). Citado em LIS and SHARON, 1981.

- ELFSTRAND, W. Uber Blutkorperchen-agglutinierende Eiweisse. Gorgeredorfer veroeffentl. 1, 1 (1897). Citado em JAFFÉ, 1969.
- ENSGRABER, A. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 71, 349-361 (1958). Citado em PUSZTAI, et. al., 1983.
- ENTLICHER, G., KOSTER, J.V. and KOCOUREK, J. Studies of phytohemagglutinins. III. Isolation and characterization of hemagglutinins from the pea (Pisum sativum L.) Biochim. Biophys. Acta, 221, 272-281 (1970).
- ETZLER, M. Federation Proceedings 39, Abstr. 2698 (1980). Citado em RUDIGER, 1981.
- ETZLER, M.E. Plant lectins: Molecular and Biological aspects. Ann. Rev. Plant. Physiol. 36, 209-234 (1985).
- FARNES, P., BARKER, B.E., BROWHILL, L.E. and FANGER, H. Lancet ii, 1100-1101 (1964). Citado em PUSZTAI et. al., 1983.
- FELSTED, R.L., EGORIN, M.J., LEAVITT, R.D. and BACHUR, N.R. J. Biol. Chem. 252, 2967-2971 (1977). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- FORIERS, A., WUILMART, C., van DRIESSCHE, E., DE NEVE, R., KANAREK, L. and STROSBERG, A.D. Febs. Lett. 75, 237-240, (1977). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- FORIERS, A., DE NEVE, R., KANAREK, L. and STROSBERG, A.D. Common ancestor for concanavalin A and lentil lectin. Proc. Natl. Sci. USA 75(3), 1136-1139 (1978).
- GALBRAITH, W. and GOLDSTEIN, I.J. Phytohemagglutinin of the lima bean (Phaseolus vulgaris) Isolation, characterization and interaction on the type A blood group substance. Bio

- mistry 11, 3976-3984 (1972).
- GANSERA, R., SCHURZ, H. and RUDIGER, H. Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem. 360, 1579-1585 (1979).
- GOLD, E.R. and BALBING, P. Receptor-specific proteins, plant and animal lectins. Excerpta Medica, Amsterdam, 440 pp., (1975).
- GOLDSTEIN, I.J. and HAYES, C.E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animal. In Tipson, R.S. e Horton, D., Advance in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, vol. 35, Academic Press, New York (1978).
- GOLDSTEIN, I.J.; COLIN HUGHES, R., MONSIGNY, M., OSAWA, T. and SHARON, N. What should be called a lectin? Nature 285, 66 (1980).
- GOLYŃSKAYA, E.L., BASHKIROVA, N.V. and TOMCHUK, N.N. Fisiol. Rast. 23, 88-97 (1976), ascites after Chem. Abstr. 84, 161759D (1976). Citado em RUDIGER, 1981.
- GRACIS, J.P. and ROUGÉ, P. Bull. Soc. Bot. Fr. 124, 301-306 (1977).
- GRANGER, G.A., DAYNES, R.A., RUNGE, P.E., PRIEUR, A.M. and JEFFES, E.W.B., III. In Contemporary Topics in Molecular Immunology (Inman, F.P. and Mandy, W.J., Eds.), vol. 13, pp. 205-241. Plenum, New York (1975). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- GUNTHER, G.R., WANG, J.L., YAHARA, I., CUNNINGHAM, B.A., and EDELMAN, G.M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1012-1016 (1973). Citado em LIS and SHARON, 1981.

- HAMBLIN, J. and KENT, S.P. Possible role of phytohemagglutinin in Phaseolus vulgaris L. Nature (London) New Biol. 245, 28-30 (1973).
- HAMMARSTROM, S., LINDBERGER, A.A. and ROBERTSSON, E.S. Eur. J. Biochem. 25, 274-282 (1972). Citado em GOLDSTEIN and HAYES, 1978.
- HAMMARSTROM, S., MURPHY, L.A., GOLDSTEIN, I.J. and ETZLER, M. Biochemistry 16, 2750-2755 (1977). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- HANKIS, C.N. and SHANNON, L.M. J. Biol. Chem. 253, 7791-7797 (1978). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- HARBOE, N. and INGLID, A. Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. In A manual quantitative immunoelectrophoresis. AXELSEN, N.H. et.al., Ed. Blackwell Scientific Publications, London, 1973.
- HAYES, C.E. and GOLDSTEIN, I.J. An α -D-galactosyl binding lectin from Bandeiraea simplicifolia seeds. J. Biol. Chem. , 249, 1904-1914 (1974).
- HERZOG, P. Ceskosl. Biol. 7, 444-445 (1958). Citado em ROUGÉ and PÈRE, 1982.
- HOMAN, W.L. Sexual Cell Recognition in Chlamydomonas Eugametos. In Bøgg-Hansen, T.C. Ed. Lectins; biology, biochemistry, clinical biochemistry. Proceedings of the 3rd Lectin Meeting. Walter de Gruyter Berlin, New York 1981, vol. 1, pp 51-58 (1981).

- HOREJSI, V. and KOCOUREK, J. J. Biochim. Biophys. Acta, 297, 346-351 (1973). Citado em GOLDSTEIN and HAYES, 1978.
- HOREJSI, V. and KOCOUREK, J. Studies on phytohemagglutinin. XVIII. Affinity electrophoresis of phytohemagglutinin. Biochem. Biophys. Acta, 336, 338-343 (1974).
- HOREJSI, V., HASKOVEC, C. and KOCOUREK, J. Biochim. Biophys. Acta, 532, 98-104 (1978). Citado em ROUGÉ and PÈRE, 1982.
- HOWARD, I.K. and SAGE, H.J. Isolation and characterization of a phytohemagglutinin from the lentil. Biochemistry, 8, (6) 2436-2441 (1969).
- HOWARD, I.K., SAGE, H.J. and HORTON, C.B. Studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant. Arch. Biochem. Biophys. 149, 323-326 (1972).
- HOWARD, J., SHANNON, L., OKI, L. and MUROSHIGE, T. Soybean agglutinin. A mitogen for soybean callus cells. Exp. Cell. Res. 107(2), 448-450 (1977).
- HOWARD, J., KINDINGER, J. and SHANNON, L.M. Conservations of antigenic determinants among different seed lectins. Arch. Biochem. Biophys. 192, 457-465 (1979).
- JAFFE, W.G. Hemagglutinins, In LIENER, I.E. Ed. Toxic Constituents of plant foodstuffs. Academic Press, New York, 1969, 500 pp.
- JANZEN, D.H. and JUSTER, H.B., LIENER, I.E. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. Science 192, 795-796 (1976).

- JEFFREE, C.E. and YEOMAN, M.M. New Phytol. 87, 463-471(1981).
Citado em PUSZTAI et. al., 1983.
- JONES, J.M., CAWLEY, L.P. and TERESA, G.W. The lectins of Maclura pomifera:zymographic studies, distribution in the developing plant and production in tissue cultures of epicotyls. J. Immunol. 98, 364-368 (1967).
- KAUSS, H. and ZIEGLER, H. Plant 121, 197-200 (1974).Citado em ROUGÉ and PÈRE, 1982.
- KAUSS, H. and GLASER, C. Carbohydrate-binding proteins from plant cells walls and their possible involvement in extensive growth. Febs Letters 45, 304-307 (1974).
- KAUSS, H. and BOWLES, D.J. Some properties of carbohydrate-binding proteins (lectins) solubilized from cell walls of Phaseolus aureus. Plant 130(2), 169-174 (1976).
- KILPATRICK, D.C., YEOMAN, M.N. and GOULD, A.R. Biochem. J. 184, 215-219 (1979). Citado em PUSZTAI et.al., 1983.
- KOHLE, H. and KAUSS, H. Biochem. J. 184, 721-723 (1979). Cita do em PUSZTAI et.al., 1983.
- KOCOUREK, J. and HOREJSI, V. A note of the recent discussion on definition of the term "lectin". In Børg-Hansen, T.C.and Spengler, G.A. Eds. Lectins:biology, biochemistry,clinical biochemistry. Proceedins of the 5th Lectin Meeting Vol. 3 Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1983.
- KRUPE, M. and ENSGRABER, A. Planta 50, 371-378 (1957). Citado em ROUGÉ and PÈRE, 1982.

- LAEMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970).
- LANDSTEINER, K. and RAUBITSCHKEK, H. Beobachtungen über Hemolyse und Haemagglutination Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II Orig. 45, 660 (1908). Citado em JAFFÉ, 1969.
- LARKIN, P.J. Plant Protoplast agglutination by lectins. Plant Physiol. 61, 626-629 (1978).
- LIENER, I.E. Seed hemagglutinins. Economic Bot., 18(1), 27-33(1964).
- LIENER, I.E. Anal. Biochem. 68, 651-653 (1975). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- LIENER, I.E. Phytohemagglutinins (phytolectins) Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 291-319 (1976).
- LIS, H. and SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinins). Ann. Rev. Biochem., 42, 541 (1973).
- LIS and SHARON, N. In The Antigens. Sela, M. Ed. Vol. IV, pp 429-529. Academic Press, New York (1977). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- LIS, H. and SHARON, N. Lectins in higher plants. In The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol. 6 Abraham Marcus, Ed. Academic Press London, 1981.
- LOTAN, R., LIS, H. and SHARON, N. Aggregation and fragmentation of soybean agglutinin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 144-150 (1975).
- LOWRY, O.H. et. al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.

- MANEN, J.F. and MIÉGE, M.N. Physiol. Veg. 19, 45-48 (1981). Citado em PUSTAZI et.al., 1983.
- MARINKOVICH, V.A. Purification and characterization of the hemagglutinin present in proteins. J. Immunol. 93(5), 732-741 (1964).
- MARIKOVSKY, Y., LOTAN, R., LIS, R., SHARON, N. and DANON, D. Exp. Cell. Res. 99, 453-456 (1976). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- MARTY, B. Recherches sur les phytoagglutinines d'Ulex parviflorus Pourr., Thèse Doct. Pharm., n° 102, Montpellier (1974). Citado em ROUGÈ and PÈRE, 1982.
- MATSUMOTO, I., OSAWA, T. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1810-1815 (1972). Citado em GOLDSTEIN and HAYES, 1978.
- MELCHERS, F. and ANDERSON, J. Transplant Rev. 14, 76-130 (1973). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- MIALONIER, G., PRIVAT, J.P., MONSIGNY, M., KAHLEM, G. and DURAND, R. Isolement, propriétés physicochimiques e localization in vivo d'une phytohémagglutine (lectine) de Phaseolus vulgaris L. (var. rouge). Physiol. Veg. 11, 519-537 (1973).
- MIRELMAN, D., GALUM, E., SHARON, N. and LOTAN, R. Nature (London) 256, 414-416 (1975). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- MOREIRA, R.A. and PERRONE, J.C. Purification and partial characterization of a lectin from Phaseolus vulgaris. Plant. Physiol. 59, 783-787 (1977).

- MOREIRA, R.A., BARROS, A.C.H., STEWART, J.C. and PUSZTAI, A.
Isolation and characterization of a lectin from the seeds
of Dioclea grandiflora Mart. Planta 158, 63-69 (1983).
- MOREIRA, R.A. and CAVADA, B.S. Lectin from Canavalia brasi-
liensis Mart. Isolation, characterization and behavior
during germination. Biologia Plantarum 26(2), 113-120
(1984).
- MOREIRA, R. A., BARROS, A.C.H., OLIVEIRA, J.A.T. and RICHARD -
SON, M. Comparative studies of lectins from seeds of the
Tribe Diocleae. Arq. Biol. Tecnol. 28(1) 1985.
- MOREIRA, R.A. and OLIVEIRA, J.T.A. Comunicação pessoal, 1986.
- NICOLSON, G.L. Int. Rev. Cytol. 39, 89-190 (1974). Citado em
LIS and SHARON, 1981.
- NICOLSON, G.L. Biochim. Biophys. Acta 457, 57-108 (1976a). Ci
tado em LIS and SHARON, 1981.
- NICOLSON, G.L. Biochim. Biphys. Acta. 458, 1-72 (1976b). Cita-
do em LIS and SHARON, 1981.
- NICOLSON, G.L., LACORBIÈRE, M. and DELMONTE, P. Exp. Cell.
Ress. 71, 468-472 (1972). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- NICOLSON, G.L., BLAUSTEIN, J. and ETZLER, M.E. Characterization
of two plant lectins from Ricinus communis and their quan-
titative interaction with a murine lymphoma. Biochemistry,
13, 196-204 (1974).
- NOWELL, P.C. Cancer Res. 20, 462-466 (1960). Citado em LIS
and SHARON, 1981.

- OLSEN, M.O.J. and LIENER, I.E. Some physical and chemical properties of Concanavalin A, the PHA of the jack bean. Biochemistry 6(1), 105-111 (1967).
- OLSNES, S., HAYLETT, T. and REFSNES, K. Purification and characterization of the highly toxic lectin Modecin. J. Biol. Chem. 253, 5069-5073 (1978).
- OPPENHEIN, J.J. and ROSENSTREICH, D.L. Eds. Mitogens in Immunobiology. Academic Press, New York (1976). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- PEREIRA, M.E.A. and KABAT, E.A. Specificity of purified hemagglutinin (lectin) from Lotus tetragonolobus. Biochemistry 13, 3184-3192 (1974).
- POWER, F.P. and CAMBIER, J. On the chemical constituents and poisonous principles of the bark of the Robinia Pseudoacacia. Pharm. Rundschau, 8, 29 (1980). Citado em JAFFÉ, 1969.
- PRIVAT, J.P., DELMOTTE, F. and MONSIGNY, M. Protein-sugar interactions. Association of β (1-4) linked N-acetyl-D-glucosamine oligomer derivatives with wheat germ agglutinin. Febs Letters 46, 224-228 (1974a).
- PRIVAT, J.P., DELMOTTE, F. and MONSIGNY, M. Protein-sugar interactions. Association of wheat germ agglutinin (lectin) and o-(4-methyl-umbellifery)-glycosides. Febs Letters 46, 229-232 (1974b).
- PRIVAT, J.P., LOTAN, R., BAUCHARD, P., SHARON, N. and MONSIGNY,

- M. J. Biochem. 68, 563-575 (1976). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- PUEPPKE, S.G. Distribution of lectins in the Jumbo Virginia and Spanish varieties of the peanut, Arachis hypogea L. Plant Physiol. 64, 575-580 (1979).
- PUEPPKE, S.G., BAUER, W.D., KEEGSTRA, K. and FERGUSON, A.L. Role of lectins in plant microorganism interactions. II. Distribution of soybean lectin in tissues of Glycine max (L) Merr. Planta Physiol. 61, 779-784 (1978).
- PUSZTAI, A. and STEWART, J.C. Isolectins of Phaseolus vulgaris Physicochemical studies. Biochim. Biophys. Acta 536, 38-49 (1978).
- PUSZTAI, A., CROY, R.R.D., GRANT, G. and STEWART, J.C. Seed lectins: distribution, location and biological role. In Seed Proteins, Doussant, J., Mosse, J. and Vaughan, J. Eds. pp 53-82 New York Academic Press (1983).
- RAPIN, A.M.C. and BURGER, M.M. Adv. Cancer Res. 20, 1-91 (1974). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- RENKONEN, K.O. Studies on the hemagglutinins present in seed of some representatives of the family of Leguminosae. Ann. Med. Exptl. Fenniae (Helsinki) 26: 66, 1948. Citado em JAFFÉ, 1969.
- RICE, R.H. and ETZLER, M.E. Biochemistry, 14, 4093-4099 (1975). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- RICHARDSON, C., BEHNKE, W.D., FREISHEIM, J.H. and BLUMENTHAL, K.M. Biochim. Biophys. Acta 537, 310-319 (1978). Citado em

- LIS and SHARON, 1981.
- RICHARDSON, M., CAMPOS, F.D.A.P., MOREIRA, R.A., AINOUZ, I. L., BEGBIE, R., WATT, W.B. and PUSZTAI, A. The complete amino-acid sequence of the major α -subunit of the lectin from the seeds of Dioclea grandiflora Mart. Eur. J. Biochem. 144 ; 101-111(1984).
- ROUGÉ, P. Etude de la phytohémagglutinine des graines de Lentille au cours de la germination et des premiers stades du développement de la plante. Evolution dans les Cotylédons. C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D 278, 449-452 (1974a).
- ROUGÉ, P. Investigations on the phytohemagglutinin of common lentil seeds during germination and early stages of development. Evolution in roots, stems and leaves. C.R. Acad. Sci. Paris Ser. D 278, 3083-3086 (1974b).
- ROUGÉ, P. Devenir des phytohemagglutines provenant des diverses parties de la graine dans les jeunes germinations du Pois. C.R. Acad. Sci. Paris Ser D 280, 2105-2108 (1975).
- ROUGÉ, P. Biosynthèse des hémagglutinines au cours de la maturation des graines de pois. C.R. Acad. Sci. Paris 282, 621-623 (1976).
- ROUGÉ, P. Ann. Pharm. Fr. 35 , 287-294 (1977). Citado em ROUGÉ and PÈRE, 1982.
- ROUGÉ, P. and CHATELAIN, C. Bull. Soc. Bot. Fr. 125, 421-424 (1978). Citado em ROUGÉ and PÈRE, 1982.
- ROUGÉ, P. and PÈRE, D. Occurrence of lectin during the cycle of

- Lathyrus species. In Bøg-Hansen, T.C. Ed. Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry. Proceedings of the 5th Lectin Meeting. Walter de Gruyter, Berlin-New York Vol. II, 137-150 (1982).
- RUDIGER, H. Lectins-and Introduction. In Bøg-Hansen, T.C. Ed. Lectins-biology, biochemistry, clinical biochemistry. Proceedings of the 3rd Lectin Meeting. Walter de Gruyter, Berlin · New York Vol. I, pp 3-10 (1981).
- SEQUEIRA, L. Annu. Rev. Phytopathol. 16, 453-481 (1978). Cita do em LIS and SHARON, 1981.
- SCHMIDT, E.L. Ann. Rev. Microbiol. 33, 355-376 (1979). Citado em PUSZTAI et.al., 1983.
- SCHMIDT, E.L. BOHLOOL, B.B. The role of lectins in symbiotic plant microbe interactions. In Tanner, W., Loewus, F.A. Eds. Encyclopaedia of Plant Physiology. New Series, vol. 13B , Plant Carbohydrates II. Berlin: Springer-Verlag. Citado em ANDERSON et.al., 1983.
- SHANNON, L.M., HANKINS, Ch. N. and STRASBERG, A.D. Enzymic Phytohemagglutinins. In Bøg-Hansen, T.C. Ed. Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry. Proceedings of the 3rd Lectin Meeting. Walter de Gruyter, Berlin - New York. Vol. I, pp 81-91 (1981).
- SHARON, N. and LIS, H. Lectins: cell agglutinating and sugar specific proteins. Science, 177, 949 (1972).
- SHARON, N. and LIS, H. Meth. Membr. Biol. 3, 147-210 (1975) . Citado em LIS and SHARON, 1981.

SIEGEL, S. Uber Giftstoffe zweier Euphorbiaceen. Diss. Uni. Dorpat., 1983. Citado em JAFFÉ, 1969.

SING, V.O. and SCHROTH, M.N. Science 197, 759-761 (1977). Citado em LIS and SHARON, 1981.

SMITH, E.E. and GOLDSTEIN, I.J. Arch. Biochem. Biophys. 121, 88-95 (1967). Citado em LIS and SHARON, 1981.

SO, L.L. and GOLDSTEIN, I.J. Protein-carbohydrate interaction XX. On the number of combining sites of Concanavalin A, the PHA of the jack bean. Biochim. Biophys. Acta, 165, 398-404 (1968).

STEWART, M.L., SUMMERS, D.F., SOEIRO, R., FIELDS, B.N. and MAIZEL, J.V. Jr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1308-1312 (1973). Citado em LIS and SHARON, 1981.

STILLMARK, H. Uber Ricin Arch. Pharmakol. Inst. Dorpat 3, 59 (1889). Citado em JAFFÉ, 1969.

TALBOT, C.E. and ETZLER, M.E. Development and distribution of Dolichos biflorus lectin as measured by radioimmunoassay. Plant. Physiol. 61, 847-850 (1978).

TÉTRY, A. C.R. Acad. Sc. Paris 240, 434-436 (1955). Citado em ROUGÉ and PÈRE, 1982.

TICHÁ, M., ENTLICHER, G., KOSTIR, J.V. and KOCOUREK, J. Studies on phytohemagglutinin from the lentil, Lens esculenta Moench. Biochim. Biophys. Acta, 221, 282-289 (1970).

TIGGELMAN-von KRUGTEN, V.A.H., OSTENDORF-DOYER, C.M. and COLLIER, W.A. Ant. Leeu. J. Micro. Serol. 22, 289-303 (1956). Citado em ROUGÉ and PÈRE, 1982.

- TOMITA, M., OSAWA, T., SAKURA, Y. and UKITA, Y. On the surface structure of murine ascites tumors. I. Interactions with various phytohemagglutinins. Int. J. Cancer, 6, 283-289 (1970).
- TOMS, G.C. and WESTERN, A. In Chemotaxonomy of the Leguminosae. Harbourne, J.B., Boulter, D. and Turner, B.L. Eds. Academic Press, New York pp 367-462 (1971).
- VASIL, I.K. and HUBBEL, D.H. Role of lectins in Cell Division of Tissue Cultures of Soybean and Tobacco. Z. Pflanzenphysiol. 84S, 349-355 (1977).
- WANG, J.L., CUNNINGHAM, B.A. and EDELMAN, G.M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1130-1134 (1971). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- WANG, J.L., BECKER, J.W., REEKE, G.N. Jr. and EDELMAN, G. M. Favin, a crystalline lectin from Vicia faba. J. Mol. Biol. 88, 259-262 (1974).
- WANG, J.L., CUNNINGHAM, B.A., WAXDAL, M.J. and EDELMAN, G.M. J. Biol. Chem. 250, 1490-1502 (1975). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- WANG, J.L. and EDELMAN, G.M. J. Biol. Chem. 253, 3000-3007 (1978). Citado em LIS and SHARON, 1981.
- WARDEN, C.G.H. and WADDELL, L.A. Bengal Secretarial Press, Calcutta, 1884, 76p. Citado em LIENER, 1964.
- WEBER, T.H. Isolation and characterization of lymphocyte-stimulating leucoagglutinin from red kidney beans (Phaseolus vulgaris). Acad. Diss. Scand J. Clin Lab. Invest. Suppl.

III (Helsinki), 80p (1969).

WEEKE, B., AXELSEN, N.H. and KROLL, J. A manual of quantitative immunoelectrophoresis, methods and applications. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 169p (1973).

WIENHAUS, O. Zur Biochemie des Phasins. Biochem.Z. 18, 228 (1909). Citado em WEBER, 1969.

YOULE, R.J. and HUANG, A.H.C. Protein bodies from the endosperm of castor bean subfraction, protein components, lectins and changes during germination. Plant Physiol. 58, 703-709 (1976).

7. COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS

Sociedade Brasileira de Bioquímica
III Reunião Regional do Nordeste
NATAL — RIO GRANDE DO NORTE

Caderno de Resumos

COMPORTEAMENTO DA LECTINA DE Canavalia brasiliensis AO LONGO DA MATURAÇÃO DA SEMENTE

L.M.ALMEIDA, A.C.HORTA-BARROS e R.A.MOREIRA

Depto. Bioquímica e Biol. Molecular, Centro de Ciências-Universidade Federal do Ceará.
Caixa Postal 1065, 60.000 Fortaleza, Ceará.

Embora as lectinas presentes em sementes de muitas espécies já tenham sido isoladas e bem caracterizadas química e fisicoquimicamente, somente poucos autores investigaram seu comportamento durante o ciclo vital da planta. O comportamento da lectina de Canavalia brasiliensis durante a germinação e primeiros estágios de desenvolvimento da planta já foi descrito (Moreira e Cavada, Biol. Plantarum 26 (2): 113-120, 1984). Para dar prosseguimento à tentativa de esclarecimento do papel desta lectina na planta, o seu comportamento, bem como o das demais proteínas da planta, foi seguido durante a maturação da semente.

Em extratos salinos feitos a partir de amostras liofilizadas, coletadas a intervalos de 5 dias até a maturação completa da semente, foram determinadas a atividade hemaglutinante e a concentração de proteínas. Destes extratos foi ainda feita eletroforese em gel de poli-acrilamida em presença de SDS e beta-mercaptoetanol.

A afinidade por Sephadex G-50, uma das características da lectina de C. brasiliensis, foi também utilizada para seguir a lectina ao longo da maturação da semente. O teor relativo de lectina em relação ao teor total de proteínas aumenta ao longo dos primeiros 60 dias, mostrando uma síntese diferenciada. Resultados semelhantes foram também obtidos por imunológica (difusão radial e "rocket"-eletroforese).

Apoio financeiro: UFC, CAPES, CNPq.

LECTIN FROM Canavalia brasiliensis Mart. BEHAVIOR DURING MATURATION OF THE SEED.

R.A. Moreira; L.M. Almeida and A.C. Horta-Barros.

Depto Bioquímica e Biologia Molecular, UFCE, P.O.Box 1065, 60000-Fortaleza(CE)-Brazil

The lectin from Canavalia brasiliensis has already been isolated and characterized and its behavior during germination and early stages of the plant life investigated (Moreira and Cavada, Biol. Plant. 26(1):1384). In this paper, the behavior of the lectin and the other proteins from Canavalia brasiliensis were followed during the maturation of the seeds.

The seeds of C. brasiliensis, after treatment with concentrated H_2SO_4 were put to germinate in petri dishes between two sheets of filter paper, in a H_2O saturated atmosphere, and the plantlets transferred to the ground after 5 days. The first seeds appeared after 150 days of germination and samples were collected in five days intervals until the complete maturation of seeds (around 80 days). Fresh and dry weight were determined in the collect material (pods, pericarp, whole seeds, teguments and kernel) after which they were freeze-dried for subsequent use.

Saline (0.85% NaCl) extracts were done with the several freeze-dried samples and had their protein concentration and hemagglutinating activity determined. The appearance of the hemagglutinating activity in the seed seems to accompany that of the lectin. SDS-PAGE electrophoresis was also used to follow the appearance of the lectin during the maturation of the seeds.

Supported by UFCE, CNPq.

Apresentado na XIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica - Caxambú (MG), 1984.

LECTIN FROM Canavalia brasiliensis Mart. FURTHER STUDIES DURING MATURATION

R. Azevedo Moreira, L.M. Almeida, A.C.H. Barros & M. Richardson*

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, C.P. 1065, 60.000, Fortaleza, CE

*Department of Botany, University of Durham, England.

The lectin from C. brasiliensis has already been isolated, characterized and its behaviour during germination and early stages of the plant life was followed (Moreira R.A. & Cavada, B.S., Biol. Plant, 1984, 26(2), 113-120). Some events during maturation of the seed have also been investigated (Moreira, R.A. et al., Arq. Biol. Tecnol., 1984, 27(2), 263). In this paper further studies on this lectin during maturation are presented.

The maturing C. brasiliensis seeds present hemagglutinating activity only in the cotyledons. When both pericarp and endosperm were examined no activity was found. The presence of the characteristic bands, by SDS-polyacrylamide gel slab electrophoresis and Mancini radial immunodiffusion, have also not been found.

In the maturing cotyledons it was found an "immature" lectin recognized by the specific antibody against the "mature" lectin, different pI, and higher apparent molecular masses in the complete subunit and in the N-terminal fragment. This precursor presents a "signal peptide" in the N-terminal position, but showed homology to the "mature lectin" in the rest of the molecule. The "signal peptide" is composed of only four aminoacids: ALA-ALA-TYR-ASN.

Supported by UFC, CNPq & British Council.

Apresentado na XIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica - Caxambú (MG), 1985.